บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคในเขตบางกะปิ ใช้วิธีสุ่มตัวอย่างจากจำนวนสถานจำหน่ายอาหารทั้งหมด เขตบางกะปิประกอบด้วยแขวงต่าง ๆ 8 แขวง มีร้านอาหารและภัตตาคาร ที่สำรวจตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2526 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2527 โดยกองอนามัยสิ่งแวดล้อม กรุงเทพมหานคร จำนวน 457 ร้าน มีหาบเร่-แผงลอย ที่สำรวจเมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2528 โดยสำนักตำรวจเทศกิจ กรุงเทพมหานคร จำนวน 106 แห่ง เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการวิจัยต้องการเปรียบเทียบสุขลักษณะของอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในร้านอาหาร ภัตตาคารกับหาบเร่-แผงลอย จึงใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างจำนวนสถานจำหน่ายร้อยละ 20 จาก จำนวนสถานจำหน่ายทั้งหมดตามวิธีการทางสถิติระหว่างเดือน มีนาคม - ตุลาคม พ.ศ. 2529 โดยเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 114 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างอาหารจากร้านอาหารและภัตตาคาร 92 ตัวอย่าง จากหาบเร่-แผงลอย 22 ตัวอย่าง แยกเก็บตัวอย่างจากแขวงต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงการสุ่มตัวอย่างจากแขวงต่าง ๆ ในเขตบางกะปิ

แขวง	จำนวนร้านอาหาร-ภัตตาคาร (ร้าน)	จำนวนหาบเร่-แผงลอย(แผง)
วังทองหลาง	12	4
หัวหมาก	12	4
คลองจั่น	12	3
ลาดพร้าว	12	3
คลองกุ่ม	11	2
จระเข้บัว	11	2
สะพานสูง	11	2
คันนายาว	11	2
รวม	92	22

ตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคที่จะนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เป็นตัวอย่างที่ซื้อมาจากสถานจำหน่ายอาหาร โดยผู้ขายเป็นผู้หยิบใส่ลงในถุงพลาสติกหรือห่อมาในลักษณะเดียวกันกับที่หยิบขายให้แก่ผู้ซื้อ ตัวอย่างจะถูกแช่ในกระติกน้ำแข็งแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ทันที

3.2 <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

Baird - Parker Medium (BP)

Bismuth Sulfite Agar

Brain Heart Infusion Broth (BHI)

Brilliant Green Agar

Brilliant Green Lactose Bile Broth, 2% (BGLB)

EC Broth

Eosin - Methylene Blue Agar (Levine) (L-EMB)

Indole Nitrate Medium

Lactose Broth

Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST)

MR-VP Broth

Nutrient Agar

Peptone Dilution Fluid (0.1%)

Plate Count Agar (PCA)

Potato Dextrose Agar (PDA)

Salmonella - Shigella Agar (SS)

Selenite Cystine Broth

Simmons Citrate Agar

Tetrathionate Broth

Thiosulfate - Citrate - Bile - Sucrose Agar (TCBS)

Triple Sugar Iron Agar

Trypticase Soy Agar

Trypticase Soy Broth

Urea Broth

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น analytical grade
Alpha-naphthol
95% ethanol
potassium hydroxide
creatine
methyl red
p-dimethyl-amino-benzaldehyde
iso-amylalcohol
conc. HCl
iodine
potassium iodide
ammonium oxalate
safranin O
crystal violet

3.4 ตัวอย่าง

เป็นตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคทุกประเภทที่วางขายอยู่ทั่วไปตามสถานจำหน่ายอาหารประเภท ร้านอาหาร ภัตตาคาร และหาบเร่-แผงลอย ในเขตบางกะปิ

3.5 วัสดุอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
ตู้เพาะเชื้อ (incubator)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
เครื่องตีป่น (stomacher)
rotary shaker
water bath

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องวัด pH
เทอร์โมมิเตอร์
กล้องจุลทรรศน์
ตู้อบฆ่าเชื้อ
เครื่องนับโคโลนี
อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่จำเป็น

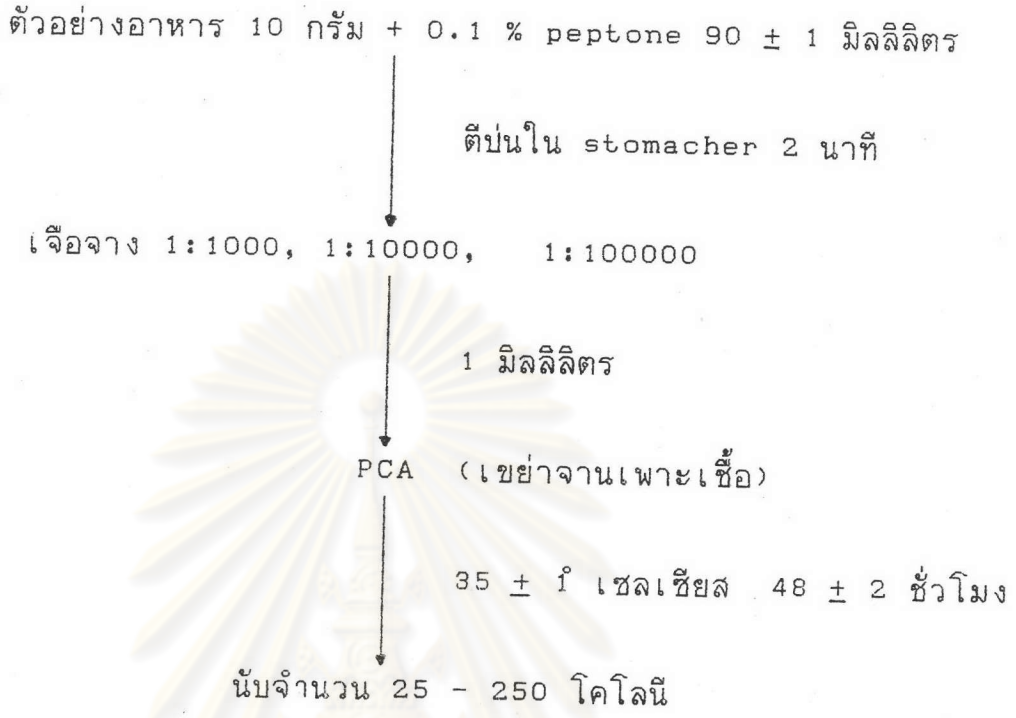
3.6 <u>วิธีการทดลอง</u>

3.6.1 การตรวจสอบทางด้านจุลินทรีย์ มีการวิเคราะห์คุณภาพจุลินทรีย์ทั้งชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ดังนี้

3.6.1.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

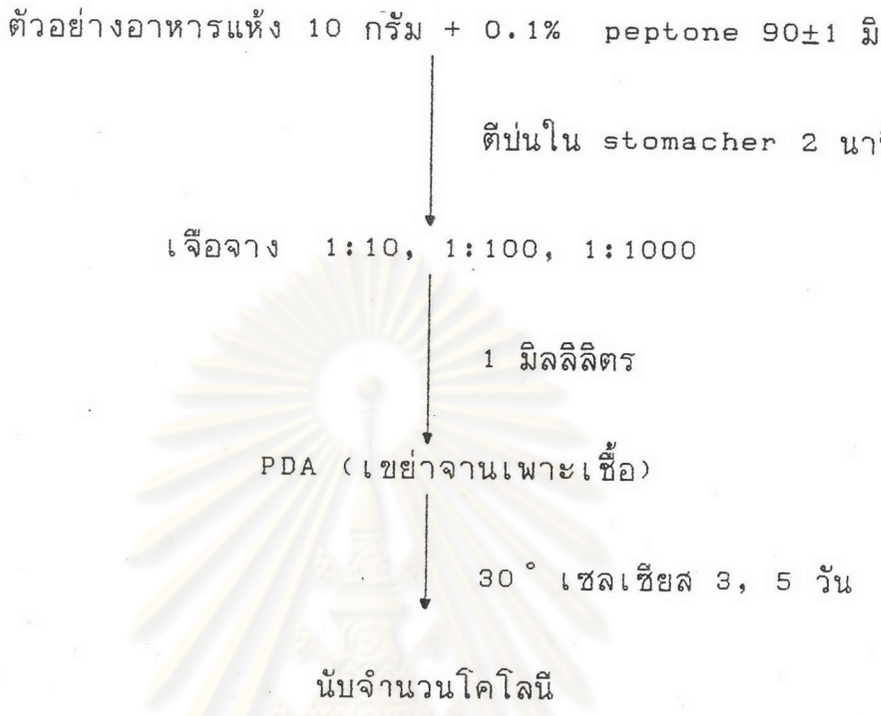
นำตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคมาตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี Standard Plate Count (SPC) โดยชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตน 0.1% สำหรับเจือจางตัวอย่างอาหาร 90 ± 1 มิลลิลิตร ตีบ่นตัวอย่างอาหารให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที ทำตัวอย่างให้เจือจางเป็นลำดับจนได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ 3 ระดับ แล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารเจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ซึ่งหลอมละลายและมีอุณหภูมิ 45 ± 1 เซลเซียส เขย่าจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกัน ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 เซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีจากจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี ด้วยเครื่องนับโคโลนี แล้วคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร 1 กรัม (FDA, 1984) (ดังรูปที่ 3.1)

นำตัวอย่าอาหารพร้อมบริโภค 7 ชนิด คือ ก๋วยเตี๋ยวเนื้อ ขนมจีนน้ำยา ผัดวุ้นเส้น ไก่ต้มข่า ข้าวหน้าเป็ด ส้มตำ และข้าวผัดหมูมาตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี SPC ทุก ๆ 3 ชั่วโมง โดยอาหารจะถูกทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง และบรรจุในลักษณะเดียวกับที่ซื้อมาจากสถานจำหน่าย ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ในช่วงเวลา 0, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 3.1 ผังการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

3.6.1.2 การวิเคราะห์เชื้อรา ใช้วิเคราะห์อาหารพร้อมบริโภคประเภทอาหารแห้งได้แก่ กุนเชียงทอด ปลาสลิดทอด เป็นต้น โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งทำให้เป็นกรดด้วยสารละลาย tartaric acid 10% ปรับให้ได้ pH 3.5 ที่อุณหภูมิ 45 ± 1 เซลเซียส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีหลังจากบ่มเชื้อไว้ 3 วัน และ 5 วันตามลำดับ (FDA, 1984) (ดังรูปที่ 3.2)

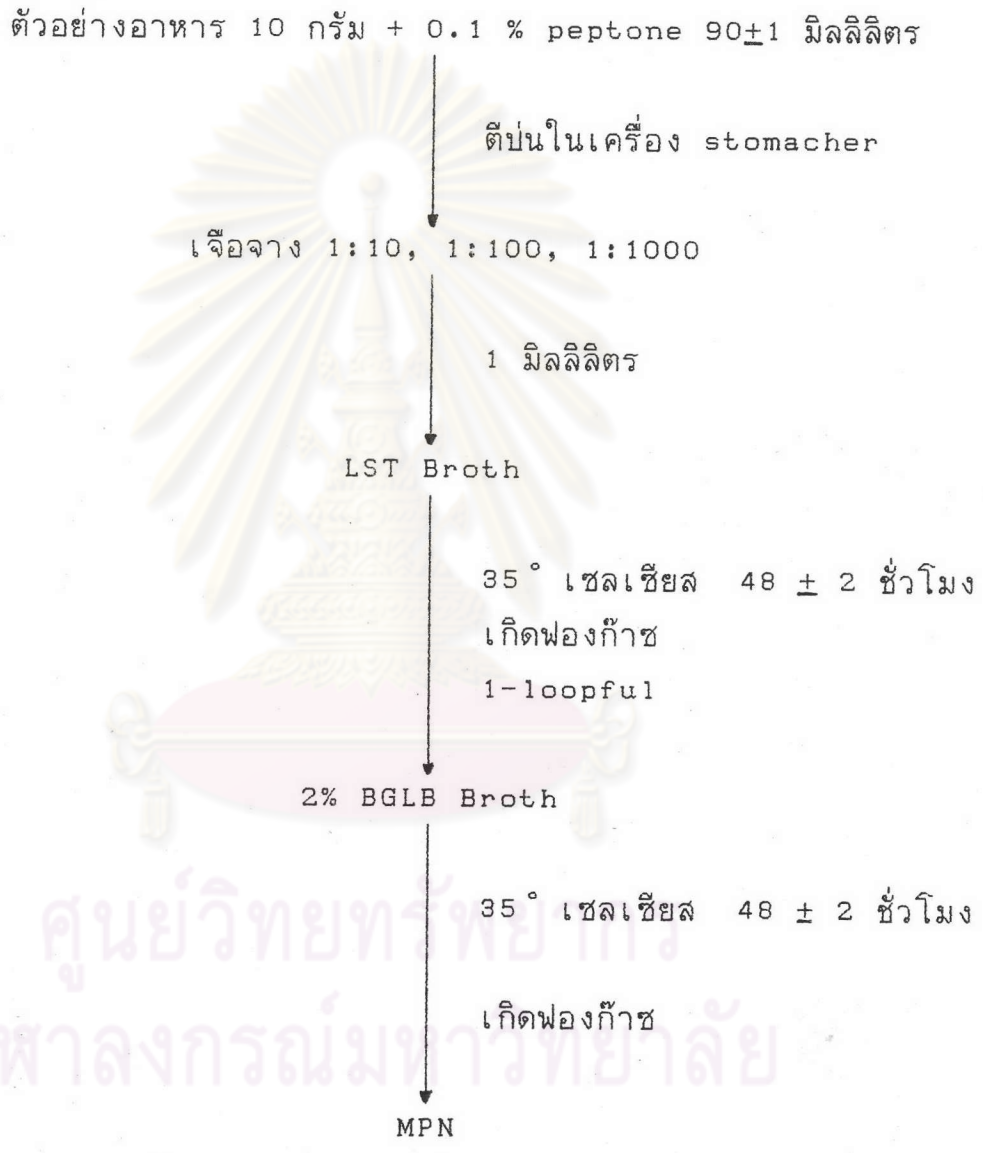


รูปที่ 3.2 ผังการวิเคราะห์หาเชื้อราในตัวอย่างอาหารแห้ง

3.6.1.3 การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.1 แล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารระดับความเจือจางที่ 1:10, 1:100, และ 1:1000 ระดับละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Lauryl SulfateTryptose Broth 10 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีหลอดดักก๊าซอยู่ด้วย ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มเชื้อที่ 35° เซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง หลอดที่ให้ผลบวกคือ หลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นภายใน 24 ± 2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองขั้น presumptive จากนั้นใช้ลูปขนาด 3 มิลลิเมตร ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกจากอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose Broth ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) 10 มิลลิลิตร ซึ่งภายในหลอดดังกล่าวมีหลอดดักก๊าซเช่นเดียวกัน จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง สำหรับหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose Broth ซึ่งให้ผลบวกภายใน 48 ± 2 ชั่วโมง

บันทึกผลหลอดที่ให้ผลบวก แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหาร BGLB จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง เช่นกัน นับจำนวนหลอดซึ่ง เกิดก๊าซทั้งหมดในขั้น confirmed test แล้วแสดงจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ซึ่งอ่านค่าได้จากตาราง MPN (ตารางผนวกที่ 1) (ดังรูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ผังการวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มในตัวอย่างอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์หา Escherichia coli ต่อไป โดยใช้ลูปขนาด 3 มิลลิเมตร ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกจากอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose Broth ในขั้น presumptive ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร EC Broth 10 มิลลิลิตร ซึ่งภายในหลอดดังกล่าวมีหลอดดักก๊าซเช่นเดียวกัน จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5 ± 0.2° เซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง ใน water bath แล้วถ่ายเชื้อจากอาหาร EC Broth แต่ละหลอดที่ให้ผลบวกลงในอาหาร Eosin Methylene Blue Agar (EMB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°เซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง ลักษณะของ E.coli บน EMB Agar มีส่วนบนแบน หรือเว้าลง มีจุดกลางเป็นสีเข้ม และมีประกายโลหะสีเขียวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร เลือกโคโลนีจาก EMB Agar ที่แสดงลักษณะเฉพาะของ E. coli ดังกล่าวไปเพาะใน Plate Count Agar slant นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง เชื้อที่เจริญบน PCA slant นำไปทดสอบผลต่อไปนี้

ก. ย้อมสีแกรม E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์

ข. ทดสอบ IMViC ตามขั้นตอนดังนี้

(1) ทดสอบ Indole โดยถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Indole Nitrate Medium 5 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ บ่มเพาะเชื้อที่ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย kovac's ลงไป 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร ถ้าส่วนบนของอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีชมพู แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบให้ผลบวก

(2) ทดสอบ Methyl Red และ Voges-Proskauer โดยถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงใน MR-VP Broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 0.7 มิลลิลิตร ลงในจานหลุมกระเบื้องทำการทดสอบ Voges - Proskauer โดยเติมสารละลายแอลฟาแนฟทอลในอัลกอฮอล์ 0.6 มิลลิลิตร ลงไปบนเชื้อในจานหลุมกระเบื้อง แล้วเติมสารละลาย creatine-KOH 0.2 มิลลิลิตร ลงไป ผลการทดสอบ Voges-Proskauer จะ

I1030292X

เป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง เมื่อปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม เก็บบ่มเชื้อใน MR-VP Brothที่เหลือ ที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส ต่อไปอีก 48 ± 2 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย methyl red 5 หยดลงไป ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียเจริญอยู่นั้นเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าผลการทดสอบ MR เป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลืองผลการทดสอบ MR เป็นลบ

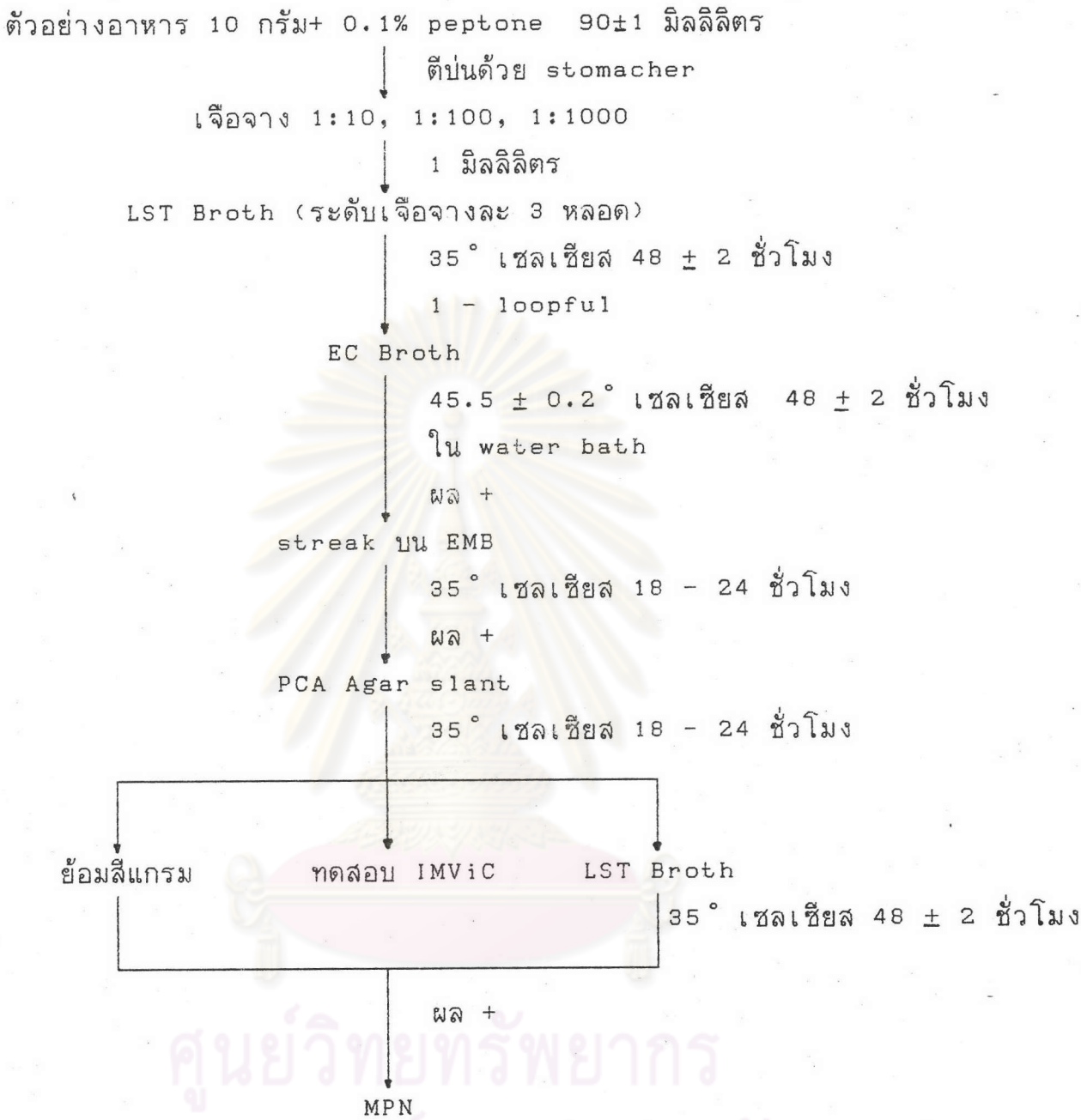
(3) ทดสอบ Citrate โดยถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmon Citrate Agar คุณสมบัติการใช้ Citrate ของแบคทีเรียดูได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่บริเวณรอบ ๆ โคโลนี ถ้าให้ผลบวกสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินภายในเวลาที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง หรือ 48 ± 2 ชั่วโมง

ถ้าเป็น E. coli จะให้ผลการทดสอบ IMViC ดังนี้

	I	M	Vi	C
	+	+	-	-
หรือ	-	+	-	-

ค. นำไปทดสอบการเฟอร์เมนต์แล็กโทส โดยถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงใน LST Broth ที่มีหลอดดักก๊าซอยู่ แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง ถ้าเป็น E. coli ผลการทดสอบจะเป็นบวกมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ

แบคทีเรียที่ทดสอบจะเป็น E. coli เมื่อผลการทดสอบในข้อ ก. ข. และ ค เป็นบวก นำผลที่ได้ไปคำนวณหาจำนวน E. coli จากตาราง MPN (ตารางผนวกที่ 1) (ดังรูปที่ 3.4)



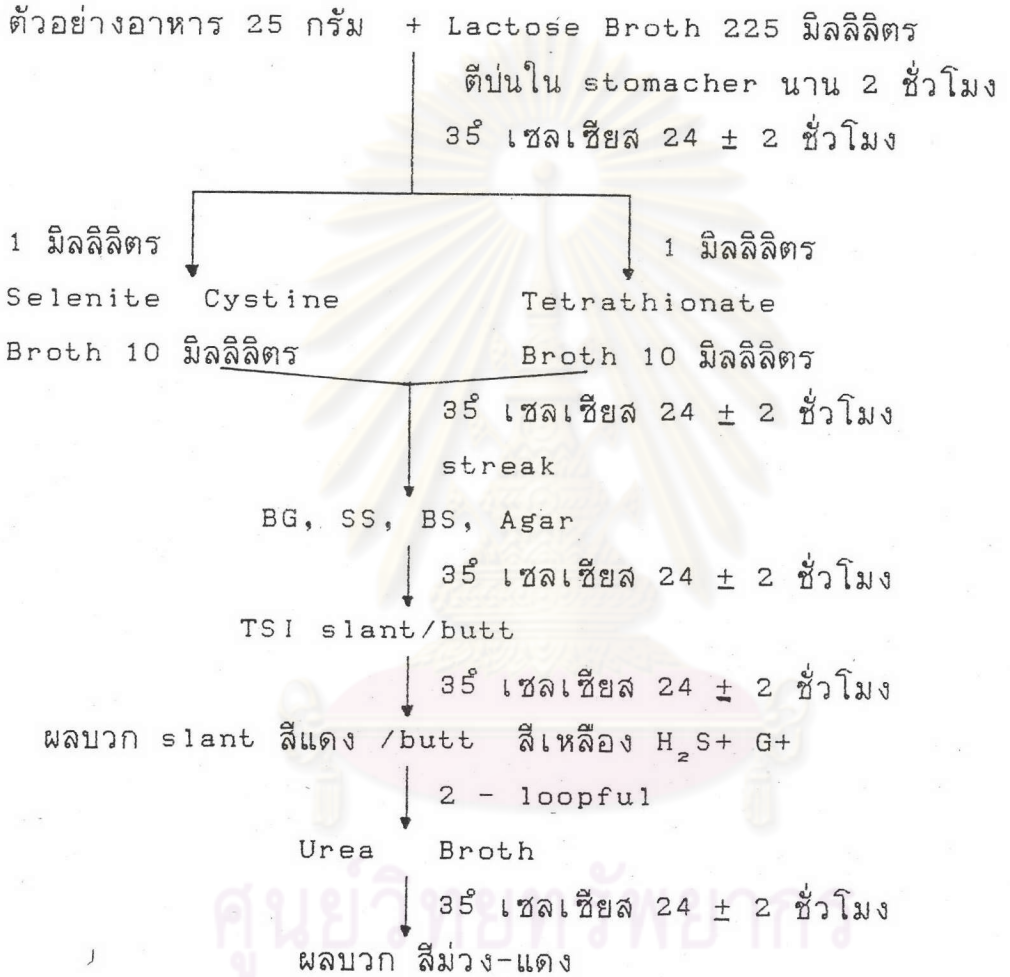
รูปที่ 3.4 ผังการวิเคราะห์ Escherichia coli ในตัวอย่างอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.1.4 การวิเคราะห์ Salmonella

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ แล้วเติมอาหาร Lactose Broth สำหรับเสริมอาหารแก่จุลินทรีย์ลงไป 225 มิลลิลิตร นำไปตีบ่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นใช้บิเปตดูดอาหาร Lactose Broth ดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร Selenite Cystine Broth และอาหาร Tetrathionate Broth จำนวน 10 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอด เพื่อ enrich แบคทีเรียในกลุ่ม Salmonella บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากอาหาร Selenite Cystine Broth และ Tetrathionate Broth ลงไปstreakบนอาหาร selective คือ Bismuth Sulfite Agar, Brilliant Green Agar และ Salmonella-Shigella Agar ตามลำดับ จากนั้นไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วนั้นจึงตรวจลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งแตกต่างกันดังนี้ จานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหาร Bismuth Sulfite Agar ลักษณะโคโลนีของ Salmonella จะมีสีน้ำตาลหรือดำ บางครั้งให้เงาโลหะ รอบ ๆ โคโลนีให้สีน้ำตาลในตอนแรก เมื่อเก็บไว้นานขึ้นรอบโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีดำ บางสายพันธุ์อาจให้โคโลนีสีเขียว รอบโคโลนีอาจมีสีดำหรือไม่มีก็ได้ อาหาร Brilliant Green Agar ลักษณะโคโลนีของ Salmonella จะไม่มีสี หรือมีสีชมพูโปร่งแสงจนถึงทึบแสง รอบ ๆ โคโลนีให้สีชมพูหรือแดง บางโคโลนีอาจให้สีเขียวใส รอบโคโลนีมีสีเหลืองหรือเหลืองเขียว ส่วนอาหาร Salmonella-Shigella Agar ลักษณะโคโลนีของ Salmonella จะไม่มีสี หรือมีสีชมพูซีด บางสายพันธุ์อาจให้สีดำกลางโคโลนี เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น Salmonella ไปเลี้ยงเชื้อบน Triple Sugar Iron Agar (TSI) slant โดยวิธีแทงเชื้อลงไป (stab) บนส่วน butt และ streak ในส่วน slant บ่มเพาะเชื้อที่ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง หลอดที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ slant ของ TSA Agar มีสีแดง เนื่องจากมีปฏิกิริยา alkaline slant ไม่มีการเฟอร์เมนต์ของแล็กโทสและซูโครส ส่วน buttมีสีเหลือง เนื่องจากมีปฏิกิริยา acid butt มีการเฟอร์เมนต์ของกลูโคส อาจมีสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์(H_2S) อาจเกิดรอยแตกหรือฟองอากาศเนื่องจากมีก๊าซ ต่อจากนั้นถ่ายเชื้อ 2 ลูป จากหลอดที่ให้ผลบวกบน TSI Agar ลงใน Urea Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง เพื่อตรวจผลการสร้างเอนไซม์ urease หลอดที่ให้ผลบวก สีของ Urea Broth จะ

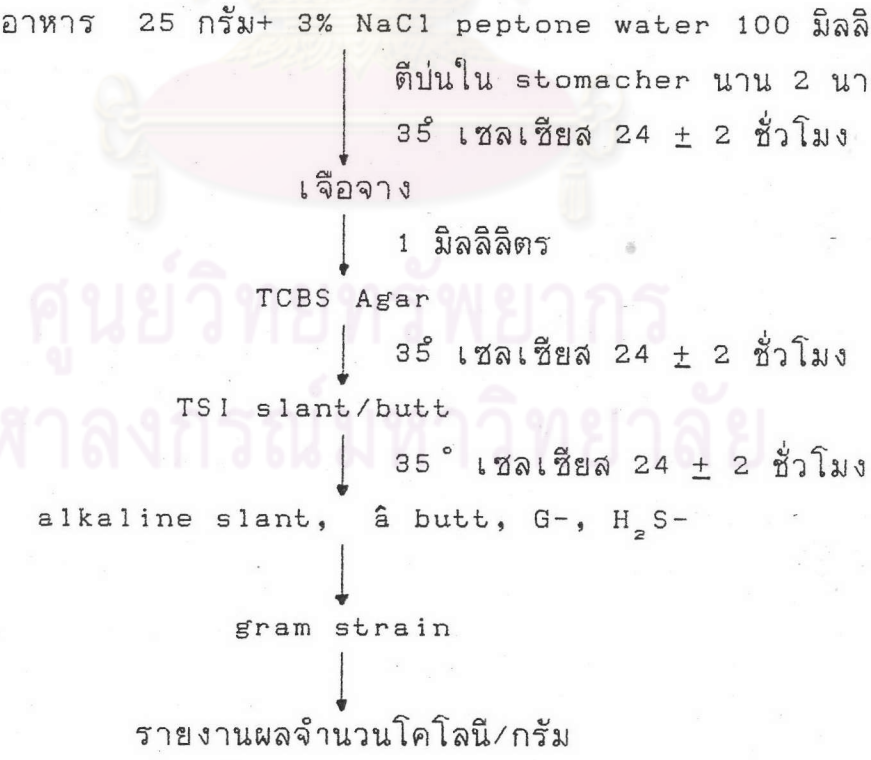
เปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไปย่อยสลายยูเรีย (urea) แล้วเกิด amine ขึ้น ทำให้สภาพอาหารเปลี่ยนเป็นด่าง บันทึกผลตัวอย่างอาหารที่ให้ผลการวิเคราะห์ Salmonella เป็นบวก (FDA, 1984) (ดังรูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 แสดงผังการวิเคราะห์หา Salmonella ในตัวอย่างอาหาร

3.6.1.5 การวิเคราะห์ Vibrio parahaemolyticus

ใช้วิเคราะห์อาหารทะเลพร้อมบริโภคโดยดำเนินการ enrichment อาหารเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ Salmonella แต่ใช้ 3% NaCl peptone water 100 มิลลิลิตร เป็น enrichment medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเจือจางตัวอย่างจนได้ระดับที่เหมาะสมแล้วดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในอาหาร Thiosulfate Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBS) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะของ V. parahaemolyticus และนับจำนวนโคโลนีของ V. parahaemolyticus ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จะมีโคโลนีสีเขียวแกมน้ำเงิน มีขนาด 2-4 มิลลิเมตร โคโลนีอาจไม่มีสี ส่วนตรงกลางโคโลนีจะมีสีเขียว จากนั้นเลือกโคโลนีที่สงสัยไปเลี้ยงเชื้อบน TSI Agar slant โดยวิธีการเดียวกับ ข้อ 3.6.1.4 ซึ่ง V. parahaemolyticus จะให้ปฏิกริยา alkaline slant และ acid butt ไม่เกิดก๊าซ จากนั้นย้อมสีแกรม และบันทึกผลจำนวน V. parahaemolyticus ต่อกรัม (สุมณฑา วัฒนสินธ์ และคณะ, 2518) (ดังรูปที่ 3.6)



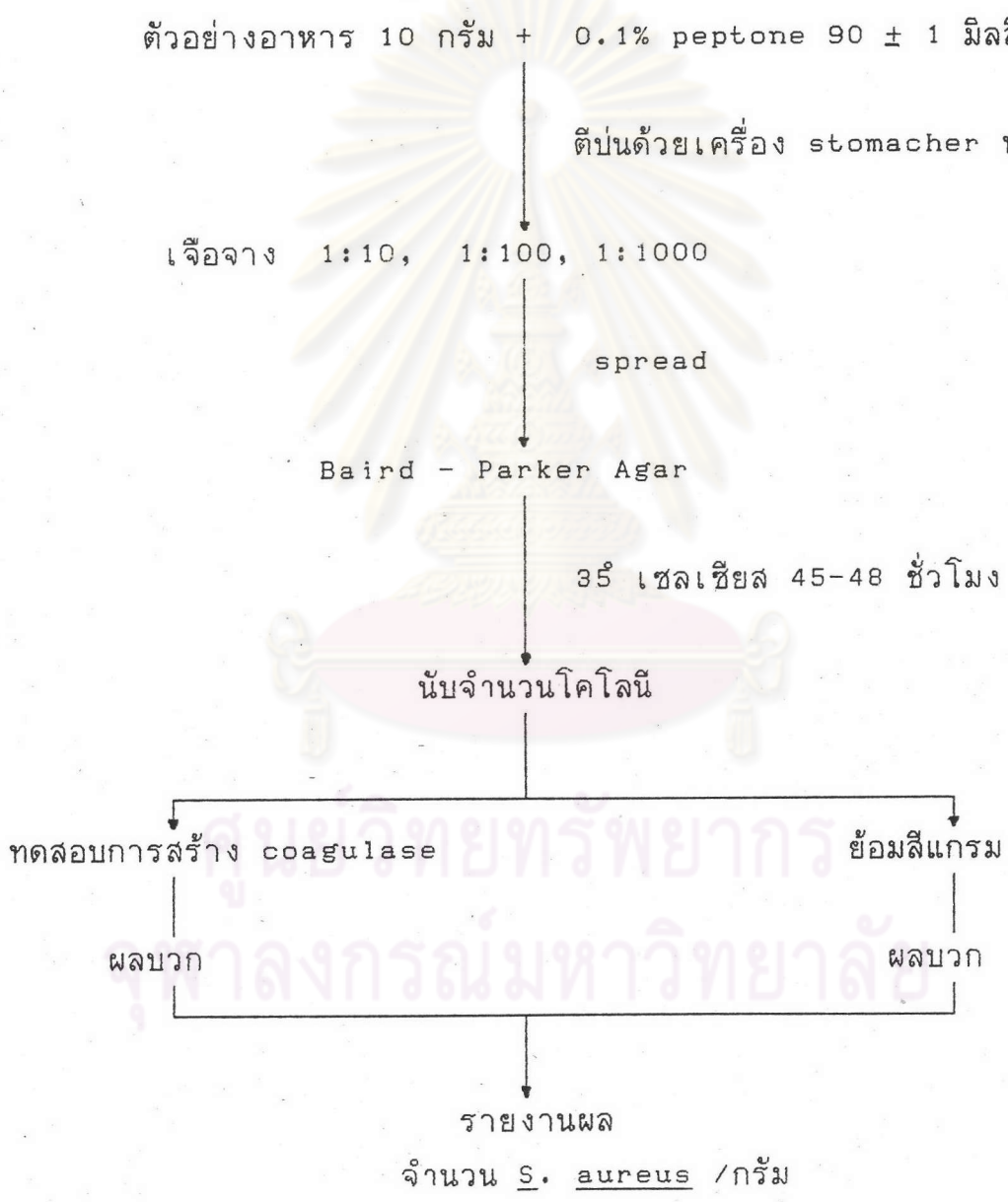
รูปที่ 3.6 ผังการวิเคราะห์ Vibrio parahaemolyticus ในตัวอย่างอาหาร

3.6.1.6 การวิเคราะห์ Staphylococcus aureus

การวิเคราะห์ใช้วิธีการ surface plating procedure ตาม American Public Health Association (APHA, 1976) วิธีนี้เหมาะสำหรับจะใช้ตรวจสอบ S. aureus ในอาหารสดหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมาแล้ว การเตรียมตัวอย่างอาหารสำหรับตรวจสอบและการเจือจางตัวอย่างอาหาร ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ระดับของการเจือจางตัวอย่างอาหารควรจะใช้ตั้งแต่ 2 ระดับหรือมากกว่าเพื่อที่จะสามารถนับจำนวนโคโลนีได้ตามต้องการ โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker complete medium (Bacto EY tellulite enrichment) ใช้ตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว 3 จาน ใช้แท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อและปล่อยให้เย็นแล้ว เกลี่ยสารละลายตัวอย่างอาหารให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 45-48 ชั่วโมง เลือกชุดของจานเลี้ยงเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีของ S. aureus ตั้งแต่ 20-200 โคโลนี ลักษณะโคโลนีของ S. aureus จะมีสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร รอบ ๆ โคโลนีจะเกิด clear zone และบริเวณใต้โคโลนีจะพบตะกอนขุ่นสีขาว นับจำนวนเชื้อซึ่งให้ลักษณะโคโลนีดังกล่าว ในกรณีชุดของจานเพาะเชื้อซึ่งมาจากสารละลายที่มีความเข้มข้นมากที่สุดแล้ว แต่พบจำนวนโคโลนีของ S. aureus น้อยกว่า 20 โคโลนี ก็สามารถนำมาใช้ได้ หรือกรณีที่ชุดของจานเพาะเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีของ S. aureus มากกว่า 200 โคโลนี แต่ไม่พบลักษณะโคโลนีของ S. aureus ที่ระดับความเจือจางมากกว่าถัดไป ก็สามารถนำเอาค่าดังกล่าวมาใช้ได้เช่นกัน เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ S. aureus 1 โคโลนี หรือมากกว่า ไปทดสอบการสร้างโคแอกกูเลส (coagulase) ต่อไป รวมจำนวนโคโลนีจากชุดของจานเลี้ยงเชื้อที่ให้ผล coagulase test เป็นบวก คูณด้วยค่า dilution factor รายงานผล S. aureus ต่อตัวอย่างอาหาร 1 กรัม

การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น S. aureus ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วถ่ายเชื้อจาก BHI Broth ใส่ลงใน TSA slant บ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดไว้ที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำ slant ที่บ่มไว้ออกมา

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะนำเชื้อนี้มาใช้ในกรณีที่จำเป็นจะต้องตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสซ้ำ เติม coagulase plasma ลงในหลอดซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Broth 0.5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส ตรวจสอบการแข็งตัวของพลาสมาทุก 6 ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวก็แสดงว่ามีโคแอกกูเลสเก็บเชื้อ S. aureus ที่ให้ผลการทดสอบโคแอกกูเลสเป็นบวกไว้บน TSA slant วิธีการวิเคราะห์ S. aureus จากตัวอย่างอาหารแสดงดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ผังการวิเคราะห์หา Staphylococcus aureus จากตัวอย่างอาหาร

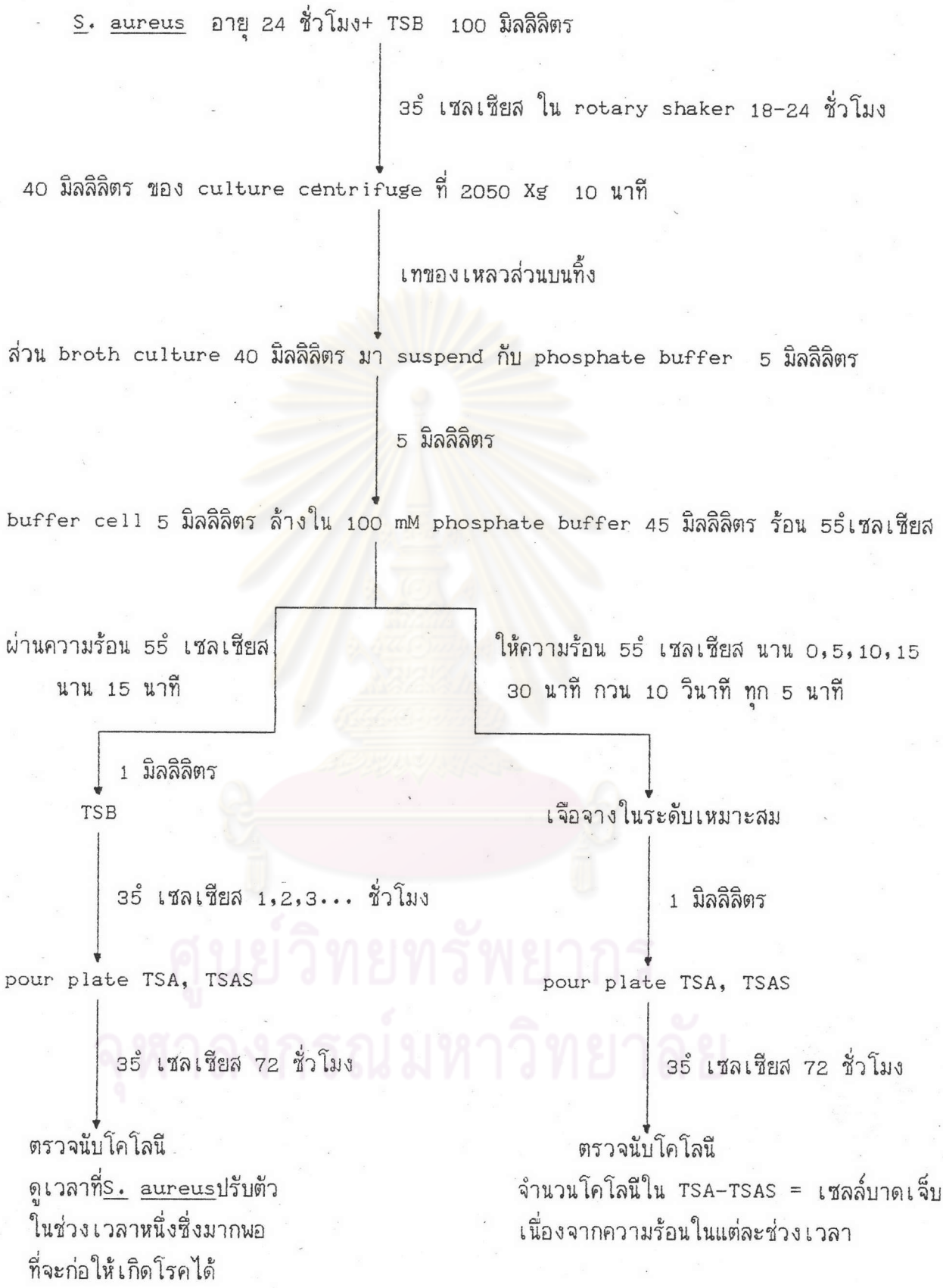
3.6.2 การตรวจนับจำนวนเซลล์บาดเจ็บ S. aureus เมื่อผ่านความร้อนและการศึกษาเวลาที่เซลล์บาดเจ็บใช้ในการเพิ่มจำนวนในสภาพที่มีอาหารสมบูรณ์ จนมีปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร

3.6.2.1 เลือกเก็บเชื้อ S. aureus ในข้อ 3.6.1.6 ที่ให้ผลการทดสอบโคแอกกูเลสเป็นบวกไปเก็บไว้บนอาหาร Trypticase Soy Agar slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6° เซลเซียส ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 21-30 วัน

3.6.2.2 นำเชื้อบริสุทธิ์ของ S. aureus ที่แยกได้จากอาหารพร้อมบริโภคไปเลี้ยงในอาหารสมบูรณ์คือ Trypticase Soy Broth (TSB) 100 มิลลิลิตร ใน rotary shaker ที่ 35° เซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อ S. aureus ที่เจริญใน TSB ประมาณ 40 มิลลิลิตร ไป centrifuge ที่ 2050 xg นาน 10 นาที แล้วค่อย ๆ เทของเหลวข้างบนทิ้ง นำส่วน broth culture ไป suspend ใน 0.1 M phosphate buffer โดยใช้อัตราส่วนของ buffer 5 มิลลิลิตรต่อ broth culture 40 มิลลิลิตร แล้วปิเปต buffer cell suspension 5 มิลลิลิตร ลงใน 0.1 M phosphate buffer 45 มิลลิลิตร ซึ่งร้อน 55° เซลเซียส ให้ความร้อนแก่ส่วนผสมนี้อย่างทั่วถึงใน water bath เพื่อให้เกิดสภาพบาดเจ็บ คอยกวน 10 วินาทีทุก ๆ 5 นาที แล้วปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในระดับที่เหมาะสมในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำในช่วงเวลา 0,5,10,15,30 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อใน Trypticase Soy Agar (TSA) และ Trypticase Soy Agar+7.5% NaCl (TSAS) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ตามวิธีการของ landolo et al.(1966) จำนวนเซลล์ที่นับได้จาก TSA คือจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ทั้งหมด ทั้งชนิดที่ปกติและบาดเจ็บเนื่องจากการใช้ความร้อน ส่วนเซลล์ที่นับได้จาก TSAS เป็นเซลล์ที่ปกติเท่านั้น เนื่องจากเซลล์ที่บาดเจ็บมีความไวต่อเกลือจึงไม่เจริญใน TSAS จำนวนที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ

ในขณะเดียวกันปิเปตตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 15 นาที 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสมบูรณ์คือ TSB ที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส นาน 0,1,2,3,... ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อทดสอบหาเวลาที่ S. aureus ที่บาดเจ็บใช้ในการปรับตัวจนกระทั่งมีปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้ ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากแต่ละช่วงเวลามาเจือจางในน้ำกลั่น ให้ได้ระดับที่เหมาะสม แล้วใช้วิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ TSAS (ดังรูปที่ 3.8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.8 แสดงผังการวิเคราะห์หาเซลล์บาดเจ็บ S. aureus และการปรับตัว