รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *B. cereus*, *S. aureus* และ *C. perfringens*

Determination of *B. cereus*, *S. aureus* and *C. perfringens*

โดย

นางสาวกิ่งกาญจน์ น่าเมืองปักษ์

B4350095

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา 305 481 สหกิจศึกษา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วันที่ 17 ธันวาคม พ.ศ. 2546

รายงานปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *B. cereus*, *S. aureus* และ *C. perfringens*

Determination of *B. cereus*, *S. aureus* and *C. perfringens*

โดย

นางสาวกิ่งกาญจน์ ฉ่ำเมืองปักษ์

B4350095

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปฏิบัติงาน ณ.

บริษัทดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด

154/1 หมู่ 1 ซอย สี่ศอก ถนนเทพารักษ์ ตำบลบางเสาธง

กิ่งอำเภอบางเสาธง จ. สมุทรปราการ 10540

วันที่ 23 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2546

เรื่อง ขอส่งรายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

เรียน อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร อาจารย์มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์

ตามที่ข้าพเจ้า นางสาวกิ่งกาญจน์ ฉ่ำเมืองปักษ์ นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ไปปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ระหว่างวันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2546 ถึง วันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2546 ในตำแหน่งผู้ช่วย QC. Supervisor ณ. บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด และได้รับมอบหมายจาก Job superviser ให้ศึกษาและทำรายงานวิชาการ เรื่อง วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *B. cereus*, *S. aureus* และ *C. perfringens* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

บัดนี้ การปฏิบัติงานสหกิจศึกษาได้สิ้นสุดลงแล้ว ข้าพเจ้าขอส่งรายงานดังกล่าวมาพร้อมนี้ จำนวน 1 เล่ม เพื่อขอรับคำปรึกษาต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

(นางสาวกิ่งกาญจน์ ฉ่ำเมืองปักษ์)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgment)

การที่ข้าพเจ้าได้มาปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2546 ถึงวันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2546 ส่งผลให้ข้าพเจ้าได้รับความรู้และประสบการณ์ต่างๆ จากการทำงานที่มีค่ามากมาย สำหรับรายงานสหกิจศึกษาศึกษาฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยดี จากความร่วมมือและสนับสนุนจากหลายฝ่าย ดังนี้

1. คุณชัชวาลย์ สุมากุล กรรมการผู้จัดการบริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด และห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโดเดน ที่เห็นความสำคัญของระบบการศึกษาแบบสหกิจศึกษาและได้ให้โอกาสที่มีคุณค่ายิ่งแก่ข้าพเจ้า

2. คุณวรวิทย์ กาพย์ไกรแก้ว ผู้จัดการฝ่ายผลิต ห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโดเดน

3. คุณคูนิโอะ โอกาเบ้ ผู้จัดการฝ่ายประสานงานระหว่างประเทศ

4. คุณศุภชัย ฟ้าขลิบทอง ผู้จัดการฝ่ายตรวจสอบคุณภาพ

5. คุณรณพงษ์ ทองอินทร์ ผู้จัดการฝ่ายผลิต บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด

6. คุณปาริชาติ ภาพสิงห์ เจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจสอบคุณภาพ ซึ่งเป็น Co – op Superviser

7. คุณสมพงษ์ แก้วประเสริฐ เจ้าหน้าที่ฝ่ายบุคคล

8. คุณอนามัย สิงห์เส ผู้ช่วยเจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจสอบคุณภาพ

9. คุณสุกัญญา โชติสุวรรณ ผู้ช่วยเจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจสอบคุณภาพ

และบุคคลท่านอื่นๆที่ไม่ได้กล่าวนามทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำช่วยเหลือในการจัดทำรายงาน

ข้าพเจ้าใคร่ขอขอบคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมในการให้ข้อมูล เป็นที่ปรึกษาในการทำรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนให้การดูแลและให้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีวิตของการทำงานจริง ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

นางสาวกิ่งกาญจน์ ฉ่ำเมืองปักษ์

ผู้จัดทำรายงาน

17 ธันวาคม 2546

บทคัดย่อ

(Abstract)

บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด และห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโดเดน เป็นบริษัทที่ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารประเภทซุปเข้มข้น เครื่องปรุงรส ผลิตภัณฑ์อาหารสด เช่น ลูกชิ้นทอด จิกุวะ คามาโบโกะ เต้าหู้ทอด อุด้ง โมจิ ภายใต้เครื่องหมายการค้า ตรา "มารูเคน" นัตโต้ ภายใต้เครื่องหมายการค้าตรา "เคน" จากการเข้าไปปฏิบัติงานในบริษัท ได้รับมอบหมายให้ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *B. cereus, S. aureus* และ *C. perfringens* ในผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ยังได้มีการจัดทำเอกสารโปรแกรมการทำความสะอาดของแต่ละแผนกและบริเวณรอบโรงงาน, เอกสารการตรวจรับและ specification วัตถุดิบ, คู่มือวิธีการตรวจคุณภาพ Environmental Monitoring Procedures Air & Surface Sampling และปฏิบัติงานตรวจวัดคุณภาพในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการดำเนินการทั้งหมดเป็นส่วนหนึ่งของการจัดการคุณภาพของทางบริษัท

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

		หน้า
จดหมายนำส่ง		1
กิตติกรรมประกาศ		2
บทคัดย่อ		3
สารบัญ		4
สารบัญตาราง		5
สารบัญรูป		5
บทที่ 1 บทนำ		6
	1. วัตถุประสงค์	6
	2. รายละเอียดเกี่ยวกับบริษัท	6
บทที่ 2	รายละเอียดเกี่ยวกับงานที่ปฏิบัติ	9
	1. ทฤษฎีเกี่ยว *B. cereus*, *S. aureus* และ *C. perfringens*	9
	2. หลักการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร	12
	3. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* วิธี AOAC	15
	4. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* วิธี plate count	23
	5. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ใช้ petrifilm	29
	6. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens*วิธี plate count	33
บทที่ 3	สรุปผลการปฏิบัติงาน	39
บทที่ 4	ปัญหาและข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม		41
ภาคผนวก		42

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตาราง 1 ตารางแสดง temp, pH และ a_w ที่ *B. cereus*, *S. aureus*, *C. perfringens* สามารถเจริญได้และสภาวะที่เชื้อถูกทำลาย

ตาราง 2 ตารางสรุปผลทดสอบการยืนยัน *B. cereus* โดยปฏิกิริยาชีวเคมี

ตาราง 3 ตารางสรุปผลทดสอบการยืนยัน *S. aureus* โดยปฏิกิริยาชีวเคมี

ตาราง 4 ตารางสรุปผลการทดสอบการยืนยันเชื้อ *C. perfringens* ทางชีวเคมี

สารบัญรูปภาพ

ภาพ 1 ภาพแสดงลักษณะปกติของโคโลนี *S. aureus* ที่เจริญบน Petrifilm™ RSA plate

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาการทำงานภายในห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโคเดน และบริษัทดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด
- เพื่อศึกษา เข้าใจถึงวิธีการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหาร
- เพื่อเพิ่มพูนประสบการณ์การทำงานจากการปฏิบัติงานจริง
- เพื่อนำทฤษฎีจากการศึกษามาใช้ในการปฏิบัติงานจริง

2. รายละเอียดเกี่ยวกับบริษัท

2.1 ห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโคเดน ก่อตั้งเมื่อวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2529 ผลิตซอสปรุงรส ต่างๆ อาทิเช่น ซีอิ้ว เต้าเจี๊ยวญี่ปุ่น ซอสปรุงต่างๆ และอาหารสด เช่น ลูกชิ้นโอเด้ง คามาโบโกะ เต้าหู้ทอด อุด้งและโมจิ

2.2 บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด ก่อตั้งเมื่อวันที่ 10 กรกฎาคม พ.ศ. 2540 โดยการร่วมทุนระหว่างห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโคเดน กับ บริษัท ฮาจิบัง ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประกอบธุรกิจอาหารแฟรนชายด์ ทำการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทซุปหมูและซุปไก่เข้มข้น

2.3 ชื่อ – ที่ตั้งสถานประกอบการ :

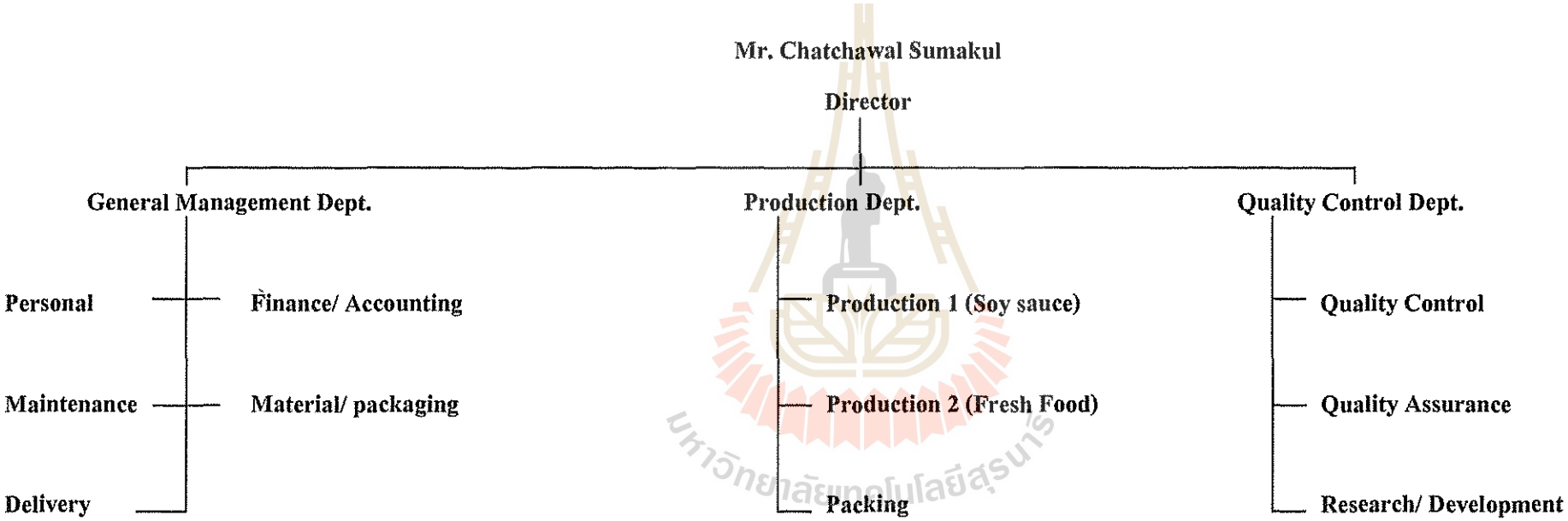
ห้างหุ้นส่วนจำกัด คิดโคเดน (KIK) ตั้งอยู่ที่ 154 หมู่ 1 ซอยสี่ศอก ถนนเทพารักษ์ ตำบลบางเสาธง กิ่งอำเภอบางเสาธง จำหวัดสมุทรปราการ รหัสไปรษณีย์ 10540

บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด (D.F.C) ตั้งอยู่ที่ 154/1 หมู่ 1 ซอยสี่ศอก ถนนเทพารักษ์ ตำบลบางเสาธง กิ่งอำเภอบางเสาธง จำหวัดสมุทรปราการ รหัสไปรษณีย์ 10540

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

KIKKOKEN LTD., PART

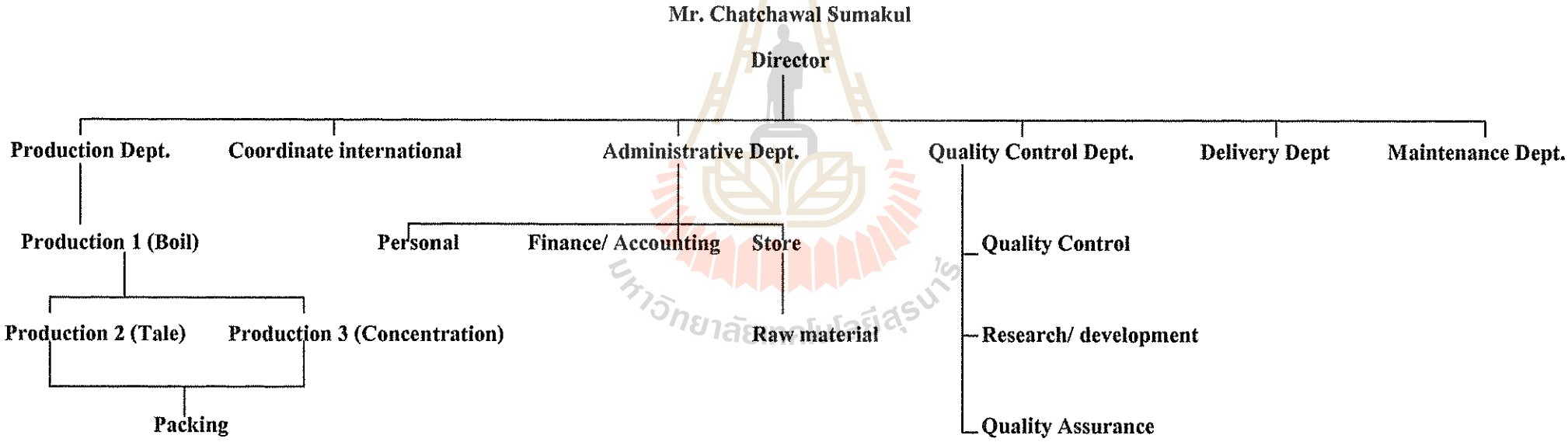
Organization Structure



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

DOUBLEFLOWERING CAMELLIA CO., LTD.

Organization Structure



มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์

บทที่ 2

รายละเอียดการปฏิบัติงาน

วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *B. cereus*, *S. aureus* และ *C. perfringens* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

วัตถุประสงค์ : เพื่อให้ทราบถึงหลักการและขั้นตอนที่สำคัญและเหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus* และ *C. perfringens* ได้

1. ทฤษฎี

ลักษณะรูปร่างและการเจริญเติบโตของ *B. cereus*

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นท่อนยาว เซลล์มีขนาด 1 × 3 – 5 ไมโครเมตร สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 – 30 นาที เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobes) เจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 10 – 48 °C ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 35 – 45 °C บางสายพันธุ์สามาถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 4 °C แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 °C ไม่ทนกรด (ค่า pH ต่ำสุดประมาณ 5.0 – 6.0) และ a_w ต่ำสุดประมาณ 0.95 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคสร้างสารพิษ 2 ชนิด คือ สารพิษที่ไม่ทนความร้อน (heat – sensitive toxin) จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาทีและสารพิษชนิดที่ทนความร้อน (heat – resistant toxin) เป็นสารพิษที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 126 °C ได้นานถึง 90 นาที

แหล่งที่พบเชื้อ พบ *B. cereus* ได้ทั่วไปในดิน น้ำ และอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น พืช ผัก เนื้อสัตว์ และธัญพืช

การตรวจหาเชื้อ ในการตรวจหาเชื้อ *B. cereus* นั้นจำเป็นต้องตรวจนับจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร เนื่องจากต้องตรวจพบเชื้อปริมาณมากจึงจะก่อให้เกิดโรคกับผู้บริโภค อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจนับเป็นอาหารเพื่อคัดเลือกเชื้อ (selective medium) ที่เติมสารปฏิชีวนะพอลิมัยซิน (polymyxin) ไข่แดง (egg yolk) แมนนิทอล (mannitol) และสารบ่งชี้ความเป็นกรด – ด่าง (pH indicator) เช่น โบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue) ภายหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hr. จะพบบริเวณขุ่นรอบโคโลนีของ *B. cereus* เนื่องจากการตกตะกอนของเลคซิตินที่ย่อยสลายแล้ว (hydrolysed lecithin) ของไข่แดงและอาหารบริเวณที่เชื้อเจริญจะมีสีน้ำเงิน เนื่องจาก *B. cereus* ไม่เฟอร์เมนต์แมนนิทอล ในขณะที่เชื้ออื่นสามารถเฟอร์เมนต์แมนนิทอลจะมีโคโลนีสีเหลือง

ลักษณะรูปร่างและการเจริญเติบโตของ *S. aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์อยู่ในช่วง 0.5 – 1 ไมโครเมตร เชื้อไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ในสภาพที่เจริญจะพบเซลล์อยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 37 °C และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 8 °C สามารถทนต่อสภาพความชื้นต่ำ ค่า water activity (a_w) ต่ำสุดที่เจริญได้คือ 0.86 เจริญได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง *S. aureas* สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 4.0 – 9.8 แต่ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6.0 – 7.0 ถ้ามีพารามิเตอร์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตร่วมด้วยค่า pH ต่ำสุดที่ *S. aureus* จะเจริญได้ขึ้นอยู่กับระดับความเหมาะสมของพารามิเตอร์เหล่านั้น *S. aureas* ทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เลือดหรือพลาสมาจับตัวเป็นก้อน (conagulase) *S. aureus* บางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้างสารพิษได้ ซึ่งสารพิษเหล่านี้เป็นสารพิษที่ทนความร้อน ส่วนใหญ่ทนความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดถึง 30 นาที ดังนั้นถ้าใช้ความร้อนระดับการพลาสเจอไรซ์คือ 62.8 °C เป็นเวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อได้แต่ไม่สามารถทำลายสารพิษได้

แหล่งของเชื้อ พบ *S. aureus* ได้ทั่วไปในอากาศ ฝุ่นละออง น้ำ อาหาร ร่างกายคน ได้แก่ ผิวหนังหรือตามบาดแผลที่เป็นหนอง แหล่งของเชื้อ *S. aureus* ที่สำคัญที่สุดคือร่างกายคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจมูก ประมาณ 30 – 40% ของคนที่สุขภาพแข็งแรงจะมีเชื้อสะสมอยู่ที่บริเวณจมูก ตามมือและส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย อีกแหล่งหนึ่งที่เป็นแหล่งสะสมคือ เส้นผม สำหรับสัตว์ก็เป็นแหล่งของเชื้อ *S. aureus* ที่สำคัญนอกจากนี้ยังพบเชื้อได้ง่ายในสัตว์ปีกและปนเปื้อนกับเนื้อสัตว์ปีกด้วย ดังนั้นอาหารที่พบการเจริญของเชื้อและสารพิษส่วนใหญ่อาหารจำพวกเนื้อสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม ไข่แลขนมอบต่าง ๆ อาหารที่ต้องใช้มือจับมาก ๆ ลักษณะอาหารที่มีเชื้อนี้เจริญจะมีกลิ่นและรสไม่เปลี่ยนแปลงและไม่แสดงการเน่าเสีย ถึงแม้ว่าจะมีการย่อยสลายโปรตีนและกระบวนการหมักเกิดขึ้นบ้าง

การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ทนความเค็มได้ดี สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10% หรือสูงกว่าในบางสายพันธุ์ การเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการจึงมักเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 7.5% เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ ในการตรวจนับ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารคือ Baird – Parker agar ที่เติม potassium tellulite, lithium chloride และไข่แดง โคโลนีของ *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารดังกล่าวจะมีสีดำล้อมรอบด้วยบริเวณใส ภายหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hr. และจะพบการตกตะกอนของเลคซิตินที่ย่อยสลายแล้ว (hydrolysed lecithin) ในบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อในระยะต่อมา

ลักษณะรูปร่างและการเจริญเติบโตของ *C. perfringens*

C. perfringens หรืออีกชื่อหนึ่งที่รู้จักกันคือ *Clostridium welehii* เป็นแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนขนาด 0.6 – 2.4 × 1.3 – 19.0 ไมโครเมตร เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ มักจะพบเซลล์อยู่เป็นเดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ ไม่เคลื่อนที่และสามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 37 – 45 °C แต่เจริญได้ในที่มีอุณหภูมิต่ำถึง 15 °C pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6.0 – 7.5 โดยมี pH ต่ำสุดประมาณ 5.0 และ a_w ต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.95 – 0.97 ในสภาวะที่มีเกลือแกงร้อยละ 6 ขึ้นไป แบคทีเรียนี้จะไม่เจริญ สปอร์ของ *C. perfringens* บางสายพันธุ์สามารถทนความร้อน 100 °C นานกว่า 1 hr. ดังนั้นอาหารที่ปรุงแล้วและไม่เก็บไว้ในตู้เย็นเชื้อจะเจริญได้ดีในสภาพที่ขาดออกซิเจน

แหล่งของเชื้อ เซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* กระจายอยู่ทั่วไปในฝุ่นละออง ดิน มูลสัตว์ และปนเปื้อนในอาหารและอุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ อาหารที่พบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดโรคได้แก่ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ผัก และเครื่องเทศ

การตรวจเชื้อ ปริมาณเชื้อ *C. perfringens* ที่ปนเปื้อนในอาหารบ่งบอกถึงอันตรายเนื่องจากอาหารดังนั้นจึงต้องมีการตรวจนับปริมาณ (จำนวน) ของเชื้อในอาหาร ซึ่งอาจใช้เทคนิค pour plate หรือ spread plate มีการเจือจางตัวอย่างอาหารเพื่อการตรวจนับ และใช้อาหารเพื่อคัดเลือกเชื้อ (selective medium) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อตรวจนับ *C. perfringen* ชนิดหนึ่งคือ sulfite cycloserine agar ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะไซโคลเซรีน (cycloserine) และสารประกอบของซัลไฟท์ (sulfite) *C. perfringen* สามารถรีดิวซ์ซัลไฟท์ (sulfite) เป็นซัลไฟด์ (sulfide) ได้และให้โคโลนีสีดำในขณะที่มีเกลือแกงของเหล็กอยู่ด้วย ภายหลังการบ่มเชื้อสภาพไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 hr. จากนั้นจะทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility) และความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate) เป็นไนไตรท์ (nitrite) ของเชื้อจากโคโลนีที่แยกได้เพื่อเป็นการยืนยัน

ตาราง 1 ตารางแสดง temp, pH และ a_w ที่ *B. cereus*, *S. aureus*, *C. perfringens* สามารถเจริญได้และสภาวะที่เชื้อถูกทำลาย

ชนิดจุลินทรีย์	สภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี			ภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย
	temp	pH	a_w	
B. cereus	35 – 45 °C	5.6 – 6.0	0.95	อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 – 30 นาที
S. aureus	37°C	4.0 – 7.0	0.86	อุณหภูมิ 62.8 °C เป็นเวลา30 นาที
C. perfringens	37 – 45 °C	6.0 – 7.5	0.95 – 0.97	อุณหภูมิ 100 °C เวลา นานกว่า 1 ชม.

2. หลักการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์

จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ในอาหารสามารถชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยและคุณภาพอาหาร ดังนั้นในการตั้งมาตรฐานอาหารด้านจุลชีววิทยาจึงคำนึงถึงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ จุลินทรีย์ที่สามารถทำให้อาหารนั้นเน่าเสีย จุลินทรีย์ที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพอาหาร เช่น แบคทีเรียโคลิฟอร์ม รวมถึงวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจสอบจุลินทรีย์เหล่านั้นด้วยวิธีมาตรฐาน

วิธีการสุ่มตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การสุ่มตัวอย่างอาหารมีความสำคัญในการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาอย่างมากในการที่จะให้ผลถูกต้องแน่นอน ดังนั้นในการสุ่มตัวอย่างอาหารต้องทำด้วยวิธีปราศจากเชื้อ โดยใช้ภาชนะบรรจุ เครื่องมือ เครื่องใช้ที่ปราศจากเชื้อและต้องป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก นอกจากนี้ตัวอย่างอาหารจะต้องเก็บไว้ในสภาพที่ไม่ทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเพิ่มจำนวนขึ้นหรือตายลงจนกว่าจะได้รับการวิเคราะห์ ซึ่งไม่ควรเกิน 36 ชั่วโมงหลังการเก็บตัวอย่างอาหาร

การเก็บตัวอย่างอาหาร

1. ภาชนะบรรจุตัวอย่าง

ภาชนะที่ใช้บรรจุตัวอย่างอาหารต้องแห้ง สะอาด ปราศจากเชื้อ ภาชนะที่นิยมใช้ เช่น ขวดแก้วหรือขวดพลาสติกปากกว้าง กระป๋องโลหะปลอดสนิม ถุงพลาสติกขนาดบรรจุไม่น้อยกว่า 200 กรัม

2. เครื่องมือเครื่องใช้ในการเก็บตัวอย่าง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น สว่าน ปิเปต สำลีพันปลายไม้(swab)ที่ปราศจากเชื้อ

2.2 กรรไกร มีด เครื่องเปิดกระป๋องปราศจากเชื้อ สำหรับใช้เปิดภาชนะบรรจุอาหาร

2.3 ปากกาสำหรับลงรายการ (marker)

2.4 ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่างให้มี temp 0 – 5 $^{\circ}$C

2.5 เครื่องมือที่ใช้ในการทำให้ปราศจากเชื้อ เช่น Autoclave ตู้อบแห้ง สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาด เช่น แอลกอฮอล์ 70%

3. ปริมาณตัวอย่างที่เก็บ

ตัวอย่างที่เก็บแต่ละตัวอย่าง ต้องมีขนาดประมาณ 200 กรัม ส่วนปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Sample Unit หรือ analytical unit) ใช้ 25 กรัม หรือ 50 กรัม

4. เทคนิคการเก็บตัวอย่าง

เทคนิคการเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปสิ่งที่ควรจะพิจารณามีดังนี้

4.1 ถ้าเป็นไปได้ ควรเก็บตัวอย่างทั้งภาชนะที่ไม่ได้เปิด

4.2 ถ้าตัวอย่างอาหารบรรจุในภาชนะขนาดใหญ่ การเก็บตัวอย่างทำได้โดยทำความสะอาดผิวนอกของภาชนะบรรจุโดยการล้างหรือเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ในกรณีที่บรรจุเป็นกระดาษให้แกะเอาชั้นนอกออก หลังจากนั้นเปิดภาชนะด้วยเครื่องเปิดที่ปราศจากเชื้อ ในกรณีที่อาหารเป็นก้อนใหญ่ไม่สามารถผสมส่วนต่าง ๆ ให้เข้ากันได้ง่ายให้สุ่มตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ให้ทั่วภาชนะ ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวให้กวนหรือเขย่าให้เข้ากันให้ดีก่อนการเก็บตัวอย่าง

4.3 บันทึกอุณหภูมิของตัวอย่างและห้องขณะเก็บตัวอย่าง

5. ลงรายการ (labeling)

ลงรายการบนภาชนะบรรจุตัวอย่างอาหารทั้งหมดทันทีที่บรรจุตัวอย่างและต้องไม่ลบเลือนได้ง่ายตัวอย่างไหนต้องเก็บในตู้เย็นให้ลงรายการไว้ด้วย

6. การขนส่งตัวอย่าง

6.1 ตัวอย่างต้องถึงห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดเท่าที่เร็วได้

6.2 ตัวอย่างอาหารที่เน่าเสียง่ายและไม่ได้แช่แข็งให้เก็บที่อุณหภูมิ 0 – 5 °C

6.3 อาหารแช่แข็งต้องอยู่ในสภาพแช่แข็งจนกระทั่งจะวิเคราะห์

6.4 บันทึกรายการต่าง ๆ เกี่ยวกับตัวอย่างและส่งไปพร้อมตัวอย่าง

7. การบันทึกรายการต่าง ๆ สำหรับตัวอย่าง

7.1 ชื่อและที่อยู่ของผู้เก็บตัวอย่าง

7.2 วัน เวลา และสถานที่เก็บตัวอย่าง

7.3 เหตุผลในการเก็บตัวอย่าง

7.4 ลักษณะของอาหาร ชื่อผู้ผลิต ผู้นำเข้า ผู้จัดจำหน่าย

7.5 หมายเลขและเครื่องหมายของลอท (lot)

7.6 สถานที่ส่งและปลายทางที่รับตัวอย่าง

7.7 วิธีการเก็บตัวอย่าง

7.8 ขนาดและจำนวนตัวอย่างที่เก็บ

7.9 อุณหภูมิของตัวอย่างขณะเก็บ

7.10 ข้อมูลอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์

วิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

อาหารแช่แข็ง ต้องทำให้ละลายก่อน ส่วนใหญ่ทำให้ละลายโดยการเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่ temp 0 – 4.4 ^{o}C นานไม่เกิน 8 ชั่วโมงก่อนนำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียอาหารที่เป็นของแข็งมีขนาดใหญ่ ใช้มีดและปากคีบปราศจากเชื้อตัดอาหารจากส่วนต่าง ๆ หลาย ๆ บริเวณมาผสมกันเพื่อใช้เป็นตัวแทนตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ แต่ถ้าหากอาหารแข็งมีขนาดไม่ใหญ่จนเกินไปให้ใช้วิธีผสมอาหารทั้งหมดในเครื่องปั่นนาน 2 นาที เพื่อนำตัวอย่างไปใช้วิเคราะห์

อาหารที่เป็นของเหลว ผสมทุกส่วนให้เข้ากันโดยเขย่าภาชนะบรรจุ 25 ครั้ง นำไปใช้ในการวิเคราะห์ทันที (อย่าให้เกิน 3 นาที)

อาหารบรรจุในภาชนะให้ทำความสะอาดภาชนะบรรจุภายนอก โดยใช้แอลกอฮอล์ 70% ก่อนเปิดภาชนะบรรจุ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *B. cereus* ตามวิธีของ AOAC

3.1 วัสดุ – อุปกรณ์

1. ปิเปตขนาด 1 ml
2. Anaerobic jar
3. Vortex mixture
4. แท่งแก้วงอฆ่าเชื้อ (Spreader)
5. Inoculating loop ขนาด 2 mm, 3mm
6. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ petri dish 100 × 15 mm
7. หลอดทดลอง
8. staining rack
9. ตู้บ่มเชื้อ 35 °C
10. แอลกอฮอล์ 95%
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
13. ชุดน้ำยาย้อมสีแกรม
14. กล้องจุลทรรศน์
15. ปากกา marker

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Manitol – Egg Yolk – Polymysin (MYP) agar
2. Nutrient agar slant
3. Phenol red – dextrose broth
4. Nitrate broth
5. Nutrient broth with lysozyme
6. Nutrient agar with L – tyrosine
7. Modified Voges – Proskauer(VP) medium

3.3 สารเคมี

1. Butter field' s buffered phosphate diluent
2. Nitrite test reagents
3. Voges – Prokauer (VP) test reagent
4. Basic fuchsin stain

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. Nitrate reagent A (ละลาย sulfanilic acid 8 g ใน 5 N CH_3COOH 1 ลิตร)
6. Nitrate reagent B (ละลาย α - naphtnol 2.5 g ใน 5 N CH_3COOH 1 ลิตร)
7. 40% KOH
8. 5% alcohol α - naphtnol solution
9. crystals creatine

3.4 การเจือจางตัวอย่างอาหาร ใช้วิธีการ aceptic technique

1. ปิเปตตัวอย่าง 1 mL ใส่ลงในขวดบรรจุ 0.1% peptone solution 9 mL จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:10 (10^{-1}) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1ml ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1% peptone solution 9 ml เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:100
3. ทำให้ตัวอย่างอาหารมีความเจือจางในระดับ 1:1000 (10^{-3}) ด้วยวิธีการเดียวกัน
4. เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex mixer

3.5 วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. จัดเตรียมพื้นที่ที่จะปฏิบัติงานและจัดเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานให้เรียบร้อย
2. label ชื่อตัวอย่างและระดับความเจือจางแต่ละระดับลงบนจานเพาะเชื้อด้วยปากกา marker
3. ฉีดแอลกอฮอล์ บริเวณโต๊ะที่จะปฏิบัติงาน มือทั้ง 2 ข้างของผู้ปฏิบัติงาน และจุดตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เจือจางตัวอย่างอาหาร ตามวิธีข้างต้นให้มีระดับความเจือจาง $10^{-1} - 10^{-6}$
5. ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแต่ละระดับความเจือจางมา 0.1 ml หยดลงบน MYP agar
6. จุ่มแท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อในแอลกอฮอล์ 95% นำมาผ่านไฟ ทิ้งไว้สักครู่เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้แท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อให้ทั่ว
7. บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 °C เวลา 24 hr. ถ้าเห็นโคโลนีไม่ชัดเจนให้บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 hr.
8. นับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *B. cereus* ซึ่งจะมีสีชมพู(ไม่สามารถหมัก manitol) ถูกล้อมรอบด้วยบริเวณสีขาวขุ่น (lecithinase production)

3.6 การรายงานผล

การนับโคโลนี (presumptive *B. cereus*) ให้นับจำนวนโคโลนีมีสีชมพูรอบ ๆ โคโลนีมีตะกอนขุ่นสีขาว คำนวณจำนวน *B. cereus* ในหน่วย cfu/ml

3.7 การยืนยันผลเชื้อ *B. cereus*

3.7.1 เขี่ยเชื้อจาก presumptive *B. cereus* จำนวน 5 โคโลนีจาก MYP agar ไปย้อมสีแกรมตามขั้นตอน ดังนี้

3.7.1.1 นำโคโลนีของ *B. cereus* เกลี่ยให้เป็นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ทิ้งให้แห้ง

3.7.1.2 วางแผ่นสไลด์ให้เหนือน้ำเดือดและย้อมด้วย 5% malachite green 2 นาที ล้างด้วยน้ำและซับให้แห้ง ย้อมทับด้วย 0.3% Sudan black ใน 70% alcohol 15 นาที ล้างด้วย xylol และซับให้แห้ง ย้อมด้วย 0.5% safranin 20 วินาที ล้างและทิ้งไว้ให้แห้ง

3.7.1.3 สปอร์ของ *B. cereus* จะมีรูปร่างรูปไข่อยู่ที่ตรงกลางเซลล์หรือค่อนไปทางส่วนปลายของเซลล์ ไม่ทำให้เซลล์พอง สปอร์ติดสีเขียว

3.7.2 เขี่ยเชื้อจาก presumptive *B. cereus* จำนวน 5 โคโลนีจาก MYP agar ถ่ายเชื้อลงใน nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 hr. จากนั้นนำไปทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีดังนี้

3.7.2.1 Phenol red dextrose broth: anaerobic growth

ใช้ loop ลนไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant แล้วจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว phenol red dextrose broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 24 hr.ใน Gas Pak anaerobic jar เมื่อบ่มเสร็จแล้วให้เขย่า tube และดูการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง แสดงว่ามีการย่อยของ dextrose ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน

3.7.2.2 Nitrate broth : การรีดิวซ์ไนเตรต

ใช้ loop ลนไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant ถ่ายเชื้อลงในหลอด Nitrate broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 24 hr. หลังจากนั้นเติม 0.25 ml ของ nitrate reagent A และ nitrate reagent B ถ้ามีสีส้มเกิดขึ้นภายในเวลา 10 นาทีแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์

3.7.2.3 Modified VP medium : การทดสอบวีพี

ใช้ loop ลนไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 48 hr. เมื่อบ่มเสร็จปิเปต 1 ml ใส่ในหลอดทดลองเติม สารละลาย 40% KOH 0.2 ml, 5% alcohol α - naphtnol solution 0.6 ml และ crystals creatine เล็กน้อยตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงจะมีตะกอนสีชมพูเกิดขึ้น

3.7.2.4 Nutrient agar with L – tyrosine : การย่อยสลาย tyrosin

ใช้ loop ลนไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar with L – tyrosine โดยการ streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 48 hr.ดูบริเวณ รอบโคโลนีจะใสแสดงว่ามีการย่อยสลาย tyrosin หากพบว่าบริเวณรอบโคโลนียังเกิดขึ้นไม่ชัดเจนให้นำไปบ่มอีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปทิ้ง

3.7.2.5 Nutrient broth with lysozyme : การเจริญใน 0.001 % lysozyme

ใช้ loop ลนไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant ถ่ายเชื้อลงใน Nutrient broth ที่มี 0.001% lysozyme ผสมอยู่ด้วย ทำ control โดยใช้ loop ลนไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant ถ่ายเชื้อลงใน Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 24 hr. สังเกตดูการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อมีการเจริญให้รายงานผลเป็น positive หากหลอดที่เป็น negative ให้นำไปบ่มต่ออีก 24 hr. ก่อนนำไปทิ้ง

Flow chart การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus*

1. การเจือจางตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหาร 1 ml + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}

↓

ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2}

↓

เจือจางระดับ $10^{-3} - 10^{-6}$ ด้วยวิธีเดียวกัน

** เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex mixer และปฏิบัติงานด้วยวิธี aceptic technique

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus*

ปิเปตตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง (10^{-1} – 10^{-6}) 0.1 ml

↓

หยดลงบน MYP agar

↓

เกลี่ยตัวอย่างอาหารด้วยแท่งแก้วงอ

↓

บ่ม temp 37 °C, 24 hr.

↓

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีชมพูและถูกล้อมรอบ
ด้วยบริเวณสีขาวขุ่น (lecithinase production)

↓

นับ plate ที่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะ 100 – 150 โคโลนี
ด้วยเครื่องตรวจนับ

↓

ถ้าเห็นโคโลนีไม่ชัดให้บ่มต่ออีก 24 hr.

↓

เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *B. cereus* 5 โคโลนี

↓

ทำการยืนยันเชื้อ *B. cereus*

↓

คำนวณจำนวน *B. cereus* (cfu/ ml) ของตัวอย่างอาหาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การยืนยันเชื้อ *B. cereus*

เขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *B. cereus* 5 โคโลนี

↓

ขีดลงบนผิวหน้าของ nutrient agar slant (5 หลอด)

↓

บ่ม temp 30 °C, 24 hr

↓

นำไปทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

3.1 Phenol red dextrose broth : การเจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant

↓

จุ่มลงใน phenol red dextrose broth

↓

บ่ม temp 35 °C, 24 hr ใน Gas pak anarobic jar

↓

เขย่า tube ดูการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ้าเปลี่ยนจากแดง → เหลือง แสดงว่ามีการย่อยของ dextrose

3.2 Nitrate broth

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant

↓

ถ่ายเชื้อลงใน Nitrate broth

↓

บ่มที่ temp 35 °C, 24 hr.

↓

เติม nitrate reagent A และ nitrate reagent B 0.25 ml

↓

ถ้าสีส้มเกิดขึ้นภายใน 10 นาที แสดงว่า

ไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 Modified VP medium : การทดสอบ VP

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant

↓

ถ่ายเชื้อลงใน VP medium

↓

บ่มที่ temp 35 °C, 24 hr.

↓

ปิเปต 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง

↓

เติมสารละลาย 40%KOH 0.2 ml + 5% alcohol ∝-naphtnol solution

0.6 ml + crystals creatine เล็กน้อย

↓

ตั้งทิ้งไว้ 1 hr.

↓

เกิดตะกอนสีชมพู

3.4 Nutrient agar with L – tyrosine : การย่อยสลาย tyrosine

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant

↓

streak ลงบน nutrient agar with L – tyrosine

↓

บ่มที่ temp 35 °C, 43 hr.

↓

สังเกตบริเวณรอบโคโลนีจะใส

แสดงว่ามีการย่อย tyrosine

↓

ถ้าเห็นไม่ชัดให้บ่มต่ออีก 72 hr.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 Nutrient broth with lysozyme

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant

↓

ถ่ายเชื้อลงใน Nutrient broth ที่มี 0.001% lysozyme

↓

ถ่ายเชื้อลงใน Nutrient broth เพื่อเป็น control

↓

บ่ม 35 °C, 24 hr

↓

ดูการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อมีการเจริญให้รายงานผลเป็น positive

หลอดที่เป็น negative บ่มต่ออีก 24 hr. ก่อนทิ้ง

ตาราง 2 สรุปผลทดสอบการยืนยัน *B. cereus* โดยปฏิกิริยาชีวเคมี

การทดสอบ	ผลการเปลี่ยนแปลง
การย่อย dextrose	เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง
การลดลงของ nitrate	เกิดสีส้มภายใน 10 นาที
การทดสอบ VP	มีตะกอนสีชมพูเกิดขึ้น
การย่อยสลาย tyrosin	บริเวณรอบ ๆ โคโลนีจะใส
การย่อยสลาย lysozyme	เชื้อเจริญ รายงานผลเป็น positive

3.8 การรายงานผลขั้นยืนยัน

การคำนวณจำนวนโคโลนี *B. cereus* ที่ให้ผลเป็นขั้นยืนยัน ดังตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณ

- นับจำนวนโคโลนีที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 65
- เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *B. cereus* 5 โคโลนี พบว่า 4 โคโลนีเป็น *B. cereus*

ดังนั้น จำนวน *B. cereus* (cell/g) $= \frac{65 \times 4 \times 10000 \times 10}{5}$

$= 5{,}200{,}000$ cfu/ml

** ตัวอย่างอาหารที่ใช้คือ 0.1 ml

4. วิธีการวิเคราะห์จำนวน *S. aureus* โดยวิธี plate count

4.1 วัสดุ – อุปกรณ์

1. แอลกอฮอล์ 95%
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. ปิเปต
4. แท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อ (Spreader)
5. หลอดทดลอง
6. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
7. Staining rack
8. ตู้บ่มเชื้อ 35 - 37 °C
9. Inoculating loop
10. Vortex mixer
11. กระจกปิดสไลด์
12. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
13. ปากกา marker

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. 0.1% peptone water
2. Baird – parker medium
3. Nutrient agar slant
4. Rabbit plasma (EDTA) reagent
5. Dnase agar
6. 1 N HCl

4.3 การเจือจางตัวอย่างอาหาร ใช้วิธีการ aceptic technique

1. ปิเปตตัวอย่าง 1 mL ใส่ลงในขวดบรรจุ 0.1% peptone solution 9 mL จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:10 (10^{-1}) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1ml ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1% peptone solution 9 ml เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:100(10^{-2})
3. ทำให้ตัวอย่างอาหารมีความเจือจางในระดับ 1:1000 (10^{-3}) ด้วยวิธีการเดียวกัน
4. เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. จัดเตรียมพื้นที่ที่จะปฏิบัติงานและจัดเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานให้เรียบร้อย
2. Label ชื่อผลิตภัณฑ์ที่จะทำการตรวจวิเคราะห์และระดับความเจือจางแต่ละระดับลงบนจานเพาะเชื้อด้วยปากกา marker
3. ฉีดแอลกอฮอล์ บริเวณโต๊ะที่จะปฏิบัติงาน มือทั้ง 2 ข้างของผู้ปฏิบัติงาน และจุดตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เจือจางตัวอย่างอาหาร ตามวิธีข้างต้นให้มีระดับความเจือจาง $10^{-1} – 10^{-6}$
5. ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแต่ละระดับความเจือจางมา 0.1 ml หยดลงบน Baird – parker medium
6. จุ่มแท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อในแอลกอฮอล์ 95% นำมาผ่านไฟ ทิ้งไว้สักครู่
7. เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้แท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อให้ทั่วทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
8. บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 hr.
9. สังเกตโคโลนีที่มีสีดำ เงา โค้ง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 1.5 mm รอบ ๆ โคโลนีจะเห็นเป็นสีขาวขุ่นกว้าง 2 – 5 mm และมีวงใส ๆ อยู่รอบนอกชั้นหนึ่ง วงขาวขุ่นจะปรากฏภายในระยะเวลา 48 hr. เท่านั้น

4.5 การรายงานผล

นับเชื้อโดยเลือกนับจานที่มีโคโลนีประมาณ 30-300 cfu/ ml คูณด้วยแฟกเตอร์ในการเจือจาง (Dilution factor) ของจานที่นับโคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนี/ มิลลิลิตรของอาหารเหลว (colonies forming units หรือ cfu/ ml) เช่น ถ้านับจำนวนโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเจือจาง 10^{-3} ได้ 150 โคโลนี ก็คำนวณได้เป็น $150 \times 1,000 = 150,000$ cfu/ml หรือ 1.5×10^{5} cfu/ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.6 การยืนยันผล โดยทดสอบคุณสมบัติทางเคมี มักนิยมใช้ 2 วิธีดังนี้

เขี่ยเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *S. aureus* ขีดลงบนผิวหน้า nutrient agar slant บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 24 hr. นำมาทำการทดสอบดังนี้

4.5.1 การทดสอบ Coagulase test

ใช้ loop ลนไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *S. aureus* 1 – 2 โคโลนี ลงบนกระจกปิดสไลด์หยดน้ำ 1 หยดผสมให้เข้ากันจากนั้นหยด rabbit plasma (EDTA) reagent ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าเชื้อจุลินทรีย์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ Coagulase จะปรากฏตะกอนขึ้นภายใน 10 – 20 วินาที

ข้อควรระวัง ควรจะใช้น้ำแทนน้ำเกลือเพราะ *S. aureus* มีความไวต่อเกลือมากและไม่ควรจะใช้ปริมาณ plasma มากเกินพอ จะทำให้การอ่านผลเป็นผลบวกเทียม (false positive) ในการทดสอบทุกครั้งควรจะมี plasma control โดยการตรวจสอบกับ Standard S. aureus congulase positive strain

4.5.2 ทดสอบ Dnase test

ใช้ loop ลนไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *S. aureus* 1 – 2 โคโลนี จาก nutrient agar slant ขีดลงบน Dnase agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน อ่านผลโดยการเท 1 N HCl ให้ท่วม โคโลนีจะเกิดตะกอนสีขาวขุ่นรอบ ๆ โคโลนี แสดงว่าเป็น *S. aureus* สายพันธุ์ที่มี เอนไซม์ Dnase

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Flow chart การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus*

1. การเจือจางตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหาร 1 ml + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}

↓

ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2}

↓

เจือจางระดับ $10^{-3} - 10^{-6}$ ด้วยวิธีเดียวกัน

** เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex mixer และปฏิบัติงานด้วยวิธี aceptic technique

2. การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus*

ปิเปตตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 ml

↓

หยดลง Bair – parker medium

↓

เกลี่ยตัวอย่างอาหารด้วยแท่งแก้วงอ

↓

บ่มที่ temp 35 °C , 24 hr.

↓

นับจำนวนโคโลนีลักษณะสีดำ ∅ 1 –1.5 mm. รอบ ๆ โคโลนีเป็นสีขาวขุ่น
กว้าง 2 –5 mm. มีวงใส ๆ อยู่รอบนอกชั้นหนึ่ง วงขาวขุ่นปรากฏ 48 hr. เท่านั้น

↓

เขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *S. aureus* 5 โคโลนีเพื่อทำการยืนยัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การยืนยันเชื้อ *S. aureus*

เขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *S. aureus* 5 โคโลนี

↓

ขีดลงบนผิวหน้า nutrient agar slant (5 หลอด)

↓

บ่มที่ temp 37 °C, 24 hr.

↓

ทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยัน

3.1 ทดสอบ Coagulase test

เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant 1 – 2 โคโลนี

↓

บนกระจกปิดสไลด์ + น้ำ 1 หยด

↓

ผสมให้เข้ากัน

↓

หยด rabbit plasma (EDTA) reagent

↓

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

↓

ถ้าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ Coagulase
จะปรากฏตะกอนภายใน 10 –20 วินาที

* ในการทดสอบต้องมี plasma control โดยตรวจสอบกับ Standard S. aureus congulase positive strain

3.2 ทดสอบ Dnase test

เขี่ยเชื้อจาก nutrient agar slant 1 – 2 โคโลนี

↓

ขีดลงบน Dnase agar

↓

บ่มที่ temp 37 °C ข้ามคืน

↓

เท 1 N HCl ให้ท่วม

↓

โคโลนีเกิดตะกอนสีขาวขุ่นรอบ ๆ โคโลนี

แสดงว่าเป็น *S. aureus* สายพันธุ์ที่มีenzyme Dnase

ตาราง 3 สรุปผลทดสอบการยืนยัน *S. aureus* โดยปฏิกิริยาชีวเคมี

การทดสอบ	ผลการเปลี่ยนแปลง
Congulase test	ปรากฏตะกอนภายใน 10 – 20 วินาที
Dnase test	โคโลนีถูกล้อมรอบด้วยตะกอนสีขาวขุ่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. วิธีการวิเคราะห์จำนวน *S. aureus* โดยใช้แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 3M Petrifilm™ Rapid S. aureus Count

Petrifilm™ Rapid S. aureus Count(RSA) ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ แผ่น Petrifilm™ RSA ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลง Baird – Parker และเจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น อีกส่วนคือแผ่นปฏิกิริยา (TNase reactive disk) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ (DNA) โทลูอิดีนบลูโอ (Toluidine Blue – O) และเตตระโซเดียมอินดิเคเตอร์ (Tetrazolium indicator) ช่วยในการนับและยืนยันผลจากเอนไซม์ชนิดความร้อนของแสตฟฟีโลคอคคัส (Staphylococcus thermostable nuclease)

TNase เป็นเอนไซม์ ที่ผลิตโดยสแตฟออเรียสซึ่งทนความร้อน การตรวจหา TNase เป็นวิธียืนยันว่ามี แสตฟฟีโลคอคคัสอยู่ในตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหาเอนไซม์โคอกูเลส บนแผ่น Petrifilm™ RSA ปฏิกิริยา TNase จะปรากฏเป็นบริเวณสีชมพูรอบโคโลนีสีเหลืองหรือน้ำเงิน

Petrifilm™ RSA ต้องใช้ร่วมกับแผ่นปฏิกิริยา TNase การใช้ Petrifilm™ RSA อย่างเดียวจะไม่ปรากฏโคโลนีและบริเวณสีชมพูให้เห็น เพราะอินดิเคเตอร์ทั้งหมดถูกบรรจุอยู่ในแผ่นปฏิกิริยา TNase ในแผ่น Petrifilm™ RSA จะไม่มีอินดิเคเตอร์อยู่เลย

5.1 วัสดุ – อุปกรณ์

1. ปิเปต 1 ml.
2. Spreader
3. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 35 °C (±1 °C)
4. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 62 °C (±2 °C)
5. ฟอร์เซ็พ
6. แท่งแก้วรูปตัวแอล
7. ปากกา marker
8. แอลกอฮอล์ 95%
9. ตะเกียงแอกอฮอล์
10. หลอดทดลอง
11. Staining rank
12. vortex

5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แผ่น Petrifilm™ Rapid S. aureus Count(RSA)
2. 0.1% peptone water

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

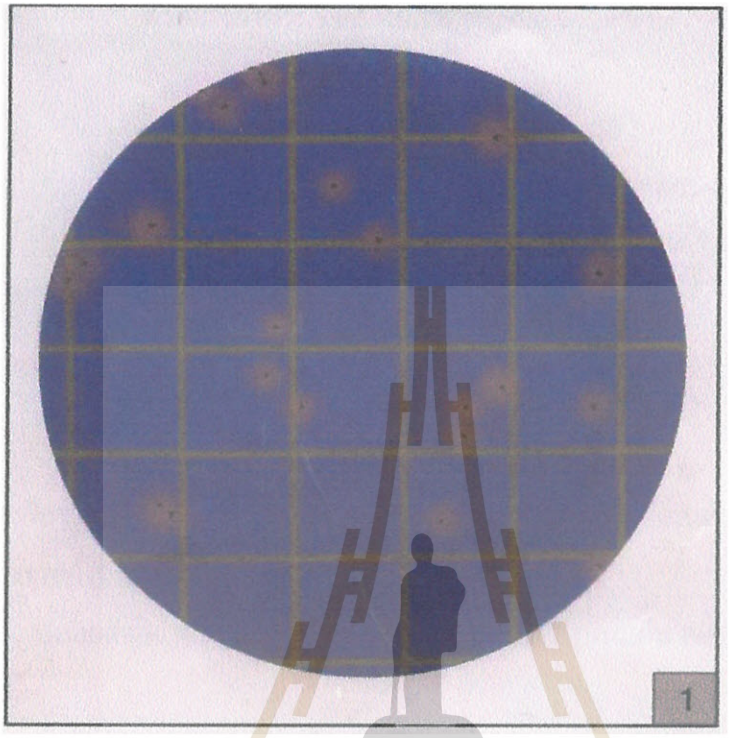
5.3 การเจือจางตัวอย่างอาหาร ใช้วิธีการ aceptic technique

1. ปิเปตตัวอย่าง 1 mL ใส่ลงในขวดบรรจุ 0.1% peptone solution 9 mL จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:10 (10^{-1}) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1ml ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1% peptone solution 9 ml เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:100
4. ทำให้ตัวอย่างอาหารมีความเจือจางในระดับ 1:1000 (10^{-3}) ด้วยวิธีการเดียวกัน
5. เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex

5.4 วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. จัดเตรียมพื้นที่ที่จะปฏิบัติงานและจัดเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานให้เรียบร้อย
2. label ชื่อผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์, วันที่และจะดับความเจือจางลงบนแผ่น Petrifilm ด้วยปากกา marker
3. ฉีดแอลกอฮอล์ 95% รอบ ๆ บริเวณที่จะปฏิบัติงาน, มือและจุดตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เจือจางตัวอย่างอาหารตามวิธีข้างต้นให้มีระดับความเจือจาง $10^{-1} - 10^{-3}$
5. วางแผ่น Petrifilm™ บนพื้นโต๊ะระนาบเปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบน ปล่อยตัวอย่าง 1 มล. จากปิเปต ลงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่าง ขณะปล่อยให้แท่งปิเปตอยู่ในแนวตั้งฉากกับแผ่น Petrifilm™
6. ค่อย ๆ ปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมาระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ อย่าปล่อยให้แผ่นฟิล์มตกลงมาเอง
7. วาง spreader บนแผ่น Petrifilm™ ใช้นิ้วชี้กดพอประมาณจนตัวอย่างกระจายเต็มวงกลมภายในขอบโฟม อย่าเลื่อนหรือบิดหรือยก spreader ขึ้น ปล่อยแผ่น Petrifilm™ อยู่กับที่ไว้ 1 – 2 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัวก่อนเคลื่อนย้าย
8. บ่ม Petrifilm™ ในตู้บ่มเชื้อโดยวางแผ่นให้ด้านใสหันหน้าขึ้น ซ้อนแผ่นได้ไม่เกิน 10 แผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C (±1 °C)
9. หลังการบ่มเชื้อ อาจจะมีโคโลนีขึ้นแล้วแต่ยังมองไม่เห็น ทั้งนี้เพราะอินดิเคเตอร์ไม่ได้อยู่ในแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่อยู่ในแผ่นปฏิกิริยา
10. นำแผ่น Petrifilm™ ไปบ่มต่อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 1 – 4 hr.
11. ใช้ฟอร์เซ็พที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นปฏิกิริยาดึงเฉพาะส่วนวงกลมออกมา เปิดแผ่น Petrifilm™ ด้านบนขึ้น วางแผ่นปฏิกิริยาลงในหลุมภายในขอบโฟม แล้วปิดแผ่นฟิล์มลงมา
12. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลหรืออุปกรณ์อื่นที่รูปทรงเหมาะสม รีดแผ่นฟิล์มให้แนบกับแผ่นปฏิกิริยาและไล่ฟองอากาศ การทำเช่นนี้เพื่อให้แน่ใจว่าแผ่นปฏิกิริยาสัมผัสกับเนื้อเจลเต็มที่
13. นำแผ่น Petrifilm™ กลับไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C (±1°C) เป็นเวลา 1 – 3 hr.

14. นับโคโลนีโดยใช้เครื่องนับแบบมาตรฐานหรือแว่นขยายที่มีไฟแบบอื่น ๆ โดยนับทุกโคโลนีที่มีสีชมพูล้อมรอบเป็น *S. aureus* จุดโคโลนีอาจเป็นสีแดงหรือน้ำเงิน



S. aureus count = 22

ภาพ 1 : ภาพนี้แสดงลักษณะปกติของโคโลนี *S. aureus* ที่เจริญบน Petrifilm™ RSA plate ให้นับทุกโคโลนีที่มีสีชมพูล้อมรอบเป็น *S. aureus* จุดโคโลนีอาจเป็นสีแดงหรือน้ำเงิน

15. สามารถเก็บโคโลนีไปตรวจวิเคราะห์ต่อไปโดยเปิดแผ่นฟิล์มขึ้นและใช้เหล็กปลายแหลมเขี่ยโคโลนีจากเนื้อเจล

5.5 การรายงานผล

นับเชื้อโดยเลือกนับแผ่น petrifilm ที่มีโคโลนีประมาณ 30-300 cfu/ ml คูณด้วยแฟกเตอร์ในการเจือจาง (Dilution factor) ของแผ่น petrifilm ที่นับโคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนี/มิลลิลิตรของอาหารเหลว (colonies forming units หรือ cfu/ ml) เช่น ถ้านับจำนวนโคโลนีในแผ่น petrifilm ซึ่งมีความเจือจาง 10^{-3} ได้ 150 โคโลนี ก็คำนวณได้เป็น $150 \times 1,000 = 150,000$ cfu/ ml หรือ 1.5×10^{5} cfu/ ml

Flow chart การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus*

1. การเจือจางตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหาร 1 ml + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}

↓

ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2}

↓

เจือจางระดับ 10^{-3} ด้วยวิธีเดียวกัน

** เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex mixer และปฏิบัติงานด้วยวิธี aceptic technique

3. การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus*

ปล่อยตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 ml ลงบนแผ่น Petrifilm

↓

ค่อย ๆ ปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา

↓

วาง spreader บนแผ่น petrifilm ใช้นิ้วชี้กดแรงพอประมาณ

↓

บ่มที่ Temp 35 °C, 24 hr.

↓

บ่มต่อในตู้บ่มเชื้อ temp 62 °C, 1-4 hr.

↓

วางแผ่นปฏิกิริยาลงในหลุมภายในขอบโฟม

↓

ใช้แท่งแก้วงอรีดแผ่นฟิล์มให้แนบกับแผ่นปฏิกิริยา

บ่มที่ Temp 35 °C , 1 - 3 hr.

↓

นับโคโลนีโดยใช้เครื่องนับแบบมาตรฐาน

สามารถเก็บโคโลนีไปตรวจวิเคราะห์ต่อไปได้โดยเปิดแผ่นฟิล์มขึ้น

และใช้เหล็กแหลมเขี่ยโคโลนีจากเนื้อเจล

มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์

6. การวิเคราะห์จำนวน *C. perfringens* โดยวิธี plate count

6.1 วัสดุ – อุปกรณ์

1. ตะเกียงแอลกอฮอล์
2. แอลกอฮอล์ 95%
3. แท่งแก้วงอปลอดเชื้อ
4. Inoculating loop
5. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
6. หลอดทดลอง
7. rank
8. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 35 – 37 °C
9. vortex mixer
10. ปิเปต
11. เข็มปลายงอปลอดเชื้อ
12. Anaerobic jar
13. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
14. ชุดน้ำยาย้อมสีแบบแกรม
15. ปากกา marker

6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. TSC agar (tryptose – sulfite cycloserine agar)
2. EY – free TSC agar
3. Motility – nitrate medium
4. Lactose gelatin medium
5. Buffered TPGY broth
6. Thioglycollate medium

6.3 สารเคมี

1. 0.1% peptone water
2. 0.5% alpha – naphtol reagent
3. Sulfanilic acid reagent

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.4 การเจือจางตัวอย่างอาหาร_ ใช้วิธีการ aceptic technique

1. ปิเปตตัวอย่าง 1 mL ใส่ลงในขวดบรรจุ 0.1% peptone solution 9 mL จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:10 (10^{-1}) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1ml ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1% peptone solution 9 ml เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางในระดับ 1:100
3. ทำให้ตัวอย่างอาหารมีความเจือจางในระดับ 1:1000 (10^{-3}) ด้วยวิธีการเดียวกัน
4. เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex mixer

6.5 วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. จัดเตรียมพื้นที่ที่จะปฏิบัติงานและจัดเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานให้เรียบร้อย
2. Label ชื่อผลิตภัณฑ์ที่จะทำการตรวจวิเคราะห์และระดับความเจือจางแต่ละระดับลงบนจานเพาะเชื้อด้วยปากกา marker
3. ฉีดแอลกอฮอล์ บริเวณโต๊ะที่จะปฏิบัติงาน มือทั้ง 2 ข้างของผู้ปฏิบัติงาน และจุดตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เจือจางตัวอย่างอาหาร ตามวิธีข้างต้นให้มีระดับความเจือจาง $10^{-1} - 10^{-3}$
5. ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแต่ละระดับความเจือจางมา 0.1 ml หยดลงบน TSC agar
6. จุ่มแท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อในแอลกอฮอล์ 95% นำมาผ่านไฟ ทิ้งไว้สักครู่
7. เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยใช้แท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อให้ทั่วทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง แล้วเททับด้วย EY – Free TSC agar อย่างน้อย 5 ml
8. นำไปบ่มโดยไม่ต้องกลับจานเพาะเชื้อในสภาพปลอดอากาศที่อุณหภูมิ 35 – 37 °C , 18 - 20 hr.
9. เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีดำ (ระหว่าง 20 – 200) ซึ่งอาจมีแถบฝ้ารอบล้อมบนอาหาร TSC agar (ไม่มีแถบฝ้าในอาหาร EY – free TSC agar) นับโคโลนีสีดำ

6.6 การรายงานผล

นับเชื้อโดยเลือกนับจานที่มีโคโลนีประมาณ 30-300 cfu/ml คูณด้วยแฟกเตอร์ในการเจือจาง (Dilution factor) ของจานที่นับโคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนี/มิลลิลิตรของอาหารเหลว (colonies forming units หรือ cfu/ml) เช่น ถ้านับจำนวนโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเจือจาง 10^{-3} ได้ 150 โคโลนี ก็คำนวณได้เป็น $150 \times 1,000 = 150,000$ cfu/ml หรือ 1.5×10^5 cfu/ml

6.7 การยืนยันเชื้อ *C. perfringens*

เลือกโคโลนี 5 โคโลนีจาก TSC agar แล้วใช้เข็มปลายงอแทงเชื้อ (stab) ลงในอาหาร motility – nitrate และ lactose gelatin พร้อม ๆ กัน เพื่อทดสอบการเคลื่อนที่และการย่อยเจลาติน และถ้าจำเป็นให้ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นหนาแน่นหรือมีการปนเปื้อนด้วยเชื้ออื่น ๆ ลงใน fluid thioglycollate พร้อมทั้งขีดเชื้อลงบน TSC agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

3.7.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

ทดสอบโดยถ่ายเชื้อจากโคโลนีสีดำที่เลือกแต่ละโคโลนีลงในหลอดที่มี buffered broth หรือ fluid thioglycollate บ่มนาน 4 hr. ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 46 °C หรือที่ 35 – 37 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นย้อมแกรมดู gram – positive rods ที่มีปลายทู่ ขีดเชื้อลงบน TSC agar แล้วบ่มในสภาพที่ไม่มีอากาศที่ 35 –37 °C นาน 24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีเดี่ยว ๆ ซึ่งจะมีสีเทาเหลือง ขนาด 1 – 2 มม. และจะล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นฝ้า โคโลนีเหล่านี้อาจถ่ายใส่ fluid thioglycollate medium

6.7.2 การทดสอบการเคลื่อนที่

ทดสอบโดยแทงเชื้อที่อยู่ใน thioglycollate mediumลงใน motility nitrate medium ซึ่งมี glycerol galactose อย่างละ 0.5% บ่มที่ 35 – 37 °C นาน 24 hr. ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ เชื้อ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จึงควรมีการเจริญของเชื้อตามรอยเข็มแทงเท่านั้น ไม่มีการแพร่กระจาย

นอกจากนี้ ให้ทดสอบการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ โดยเติม 0.5 ml sulanilic acid reagent และ 0.2 ml 0.5% alpha – Naphtol reagent ถ้าได้สีแดงหรือสีส้มแสดงว่า ไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนไตรท ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีให้เติมสังกะสีลงไป ถ้ายังมีไนเตรทอยู่(เชื้อไม่เปลี่ยนให้เป็นไนไตรท์) จะเป็นสีม่วง

6.7.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน

ทดสอบโดยการแทงเชื้อจากโคโลนีที่แยกได้ลงใน lactose gelatin medium บ่มที่ 35 – 37 °C นาน 24 – 44 hr. *C. perfringents* จะใช้น้ำตาลแลคโตสเกิดก๊าซและกรด ทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ส่วนเจลาตินจะถูกย่อยเป็นของเหลวใน 24 –44 hr.

Flow chart การตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens*

1. การเจือจางตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหาร 1 ml + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}

↓

ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} + 0.1% peptone water 9 ml

↓

เขย่าให้เข้ากัน ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2}

↓

เจือจางระดับ 10^{-3} ด้วยวิธีเดียวกัน

** เขย่าทุกความเจือจางด้วยความระมัดระวังด้วย vortex mixer และปฏิบัติงานด้วยวิธี aceptic technique

2. การตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens*

ปิเปตตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 ml

↓

หยดลง TSC agar

↓

เกลี่ยตัวอย่างอาหารด้วยแท่งแก้วงอ ทิ้งไว้ให้แห้ง

↓

เททับด้วย EY – free TSC agar 5 ml

↓

บ่มโดยไม่ต้องกลับจานในสภาพปลอดอากาศ

บ่มที่ temp 35-37 °C , 18-20 hr.

↓

เขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *C.perfringens* 5 โคโลนีเพื่อทำการยืนยัน

3. การยืนยันเชื้อ *C. perfringens*

3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

เขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *C. perfringens*

↓

buffered broth หรือ fluid thioglycollate

↓

บ่มที่ 4 h.ในอ่างน้ำอุ่น 46 °C หรือ 35 – 37 °C ข้ามคืน

↓

ย้อมแกรมดู gram – positive rod ที่มีปลายทู่

↓

ขีดเชื้อลงบน TSC agar

↓

บ่มในสภาพไม่มีอากาศ 35 – 37 °C , 24 hr.

↓

โคโลนีเดี่ยว ๆ มีสีเทาเหลืองขนาด 1 – 3 มม. ล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นฝ้า

↓

ถ่ายใส่ใน fluid thioglycollate medium

3.2 การทดสอบการเคลื่อนที่

เขี่ยเชื้อใน fluid thioglycollate medium

↓

แทงใน motility nitrate medium ซึ่งมี glycerol galactose 0.5%

↓

บ่ม 35 – 37 °C, 24 hr.

↓

ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ

↓

เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จึงมีการเจริญของเชื้อตามรอยเข็มแทงเท่านั้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทดสอบ การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์

sulananilic acid reagent 0.5 ml. + 0.5% alpha – Naphtol reagent 0.2 ml

↓

motility nitrate medium

↓

ถ้าได้สีแดงหรือสีส้ม แสดงว่าไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนไตรท

↓

ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้เติมสังกะสีลงไป

มีไนเตรทอยู่จะเป็นสีม่วง

ทดสอบ ความสามารถในการย่อยเจลาติน

แทงเชื้อจากโคโลนีที่แยกได้ใน lactose galactic medium

↓

บ่มที่ 35 – 37 °C , 24 – 44 hr.

↓

อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลือง

เนื่องจาก *C. perfringens* ใช้น้ำตาลแลคโตสเกิดก๊าซและกรด

↓

เจลาตินจะถูกย่อยเป็นของเหลวใสภายใน 24 – 44 hr.

ตาราง 4 ผลการทดสอบการยืนยันเชื้อ *C. perfringens* ทางชีวเคมี

การทดสอบ	ผลการเปลี่ยนแปลง
ทดสอบการเคลื่อนที่	เชื้อเจริญตามรอยเข็มแทง ไม่มีการแพร่กระจาย
การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท	อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดงหรือสีส้ม
ความสามารถในการย่อยเจลาติน	เจลาตินถูกย่อยเป็นของเหลวใน 24 – 44 hr.

บทที่ 3
สรุปผลการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานในบริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด ในแผนกควบคุมคุณภาพ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์นั้น ส่งผลให้เกิดผลประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ดังนี้

1. ด้านสังคม

- ได้เข้าใจถึงลักษณะของการทำงานจริงและชีวิตประจำวันในการทำงานในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมีความแตกต่างจากการใช้ชีวิตในมหาวิทยาลัย
- ได้รู้จักบุคคลต่าง ๆ มากขึ้นทั้งในแผนกและต่างแผนกซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านวัยวุฒิและคุณวุฒิ รู้จักที่จะปรับตัวให้สามารถอยู่ร่วมกับบุคคลส่วนใหญ่ในสังคมนั้นๆ ได้
- ได้รู้จักการควบคุมตัวเอง บังคับตัวเองให้อยู่ในกฎเกณฑ์ของสังคมขนาดใหญ่มากขึ้น และรู้จักการพึ่งพาตนเองมากขึ้น
- ได้เรียนรู้การปฏิบัติตัวในสังคม เรียนรู้มารยาทของการเข้าสังคม และรู้จักวางตัวให้เหมาะสมกับสถานะภาพของตนเอง

2. ด้านทฤษฎี

- ได้รับความรู้ใหม่เพิ่มเติมในเรื่องการวิเคราะห์ค่าพื้นฐานทางด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณเกลือ เป็นต้น
- ได้รู้จักลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่ทางบริษัทผลิตขึ้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวบางชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ที่มิได้มีขายตามท้องตลาด และเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นที่นิยมในต่างประเทศ (ประเทศญี่ปุ่น)
- ได้เรียนรู้เกี่ยวกับการค้นคว้าในเรื่องต่างๆ และเข้าใจเนื้อหาของเรื่องดังกล่าว เพื่อที่สามารถจะนำความรู้ที่ได้ค้นคว้ามาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์

3. ด้านปฏิบัติ

- ได้ฝึกทักษะการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านต่างๆ เช่น การตรวจคุณภาพทางเคมี การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยา
- ได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ของทางบริษัท
- ได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต
- ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการตรวจวัดคุณภาพของวัตถุดิบและคู่มือโปรแกรมทำความสะอาดของโรงงาน

บทที่ 4
ปัญหาและข้อเสนอแนะ

จากการปฏิบัติงานในตำแหน่งผู้ช่วย QC Supervisor บริษัท ดับเบิลฟลาวเวอริ่ง คาเมลเลีย จำกัด นั้น เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นั้นได้รับความรู้ต่างๆ ที่เป็นประสบการณ์ที่ดีอย่างมากและยังได้รับความรู้ใหม่ๆ เพิ่มเติมอีกมากมายซึ่งเป็นประสบการณ์ที่ดีที่จะนำไปปรับปรุงในการทำงานจริงให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคตได้ ซึ่งในระหว่างปฏิบัติงานพบปัญหาและอุปสรรคบางประการ ได้แก่

- เนื่องจากเป็นการปฏิบัติงานจริงเป็นครั้งแรกในสถานประกอบการหรือบริษัท ทำให้ช่วงแรกทำงานได้ไม่เต็มที่นัก เกิดความบกพร่องและติดขัดในการทำงานอยู่พอสมควรต่อมาเมื่อสามารถปรับตัวและได้รับคำแนะนำจาก Job Supervisor ก็สามารถลดข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้
- เนื่องจากบุคลากรในแผนกควบคุมคุณภาพมีน้อยเกินไปแต่งานที่ต้องปฏิบัติในแต่ละวันมีค่อนข้างมาก ดังนั้นหากมีบุคลากรเพิ่มขึ้น ก็น่าจะทำให้งานมีประสิทธิภาพมากขึ้นตามมาด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม (Reference)

ปิยะวรรณ กาสลัก (2544). **บทปฏิบัติการจุลชีววิทยา : Food Microbiology Laboratory.** สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2539). **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร.** คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์ (2539). **จุลชีววิทยา.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545). **จุลชีววิทยาทางอาหาร: Food Microbiology.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรม ศาสตร์. 470 หน้า

สุรีลักษณ์ รอดทอง (2538). **จุลินทรีย์และโรคซึ่งเกิดจากอาหาร: Microorganism and Foodborne Diseases.** สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บริษัท 3 เอ็ม ประเทศไทยจำกัด ชั้น 9 อาคารเสริมมิตรทาวเวอร์ 159 ถนนอโศก (สุขุมวิท 21) กรุงเทพ

Andrew, H. W. 1995. Chapter 17 Microbiological Methods. In **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 16th edition. Volume I. Edited by Cunniff, P. Published Maryland.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Baird Parker – Medium

Basal medium

Tryptone	10.0 g
Beef extract	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
Sodium pyruvate	10.0 g
Glycine	12.0 g
Lithium Chloride $6H_2O$	5.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1 litter

ถ่ายอาหาร 95 ml ใส่ขวดจุกเกลียวนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ปรับ pH สุดท้ายให้ได้ 7.0±0.2 หลังจากออกจากหม้อนึ่งถ้าจะใช้อาหารนี้เลยต้องทำให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 48 –50 °C ก่อน จึงเติม EY telluride enrichment 5 ml. ที่อุ่นจนมีอุณหภูมิ 45 – 50 °C เขย่าให้เข้ากันเท 15 – 18 ml./ จาน ทำให้อาหารแข็งก่อนใช้

Buffered TPGY broth

Trypiticase or Tryptone	50.0 g
Peptone	5.0 g
Yeast extract	20.0 g
Glucose	4.0 g
Disodium phosphate	5.0 g
Sodium thioglycollate	1.0 g
Distilled water	1 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.3 ถ่ายใส่หลอดขนาด 20×150 mm. หลอดละ 15 ml. ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 8 นาที (ถ้าปริมาตรมากกว่านี้ใช้เวลา 15 นาที) เก็บในตู้เย็นจนกว่าจะใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Fluid Thioglycollate Medium

Pancreatic digest of casein USP	15.0 g
L – cystine	0.5 g
Dextrose	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium chloride	2.5 g
Sodium thioglycollate	0.5 g
Agar	0.75 g
Resazurin	0.001 g
Distilled water	1 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นพร้อมให้ความร้อน ปรับ pH ให้เป็น 7.1±0.2 ถ่ายใส่หลอดอย่างน้อย 2/3 ของหลอด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที ก่อนใช้ให้ความร้อนจนเดือดหรือนึ่งไล่อากาศนาน 10 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนทำให้เย็นอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิที่จะบ่ม

Lactose Gelatin Medium

Tryptose	15.0 g
Yeast extract	10.0 g
Lactose	10.0 g
Gelatin	120.0 g
Phenol red (as solution)	0.05 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสม (ยกเว้น Gelatin และ phenol red) ในน้ำ 400 ml โดยให้ความร้อนช้า ๆ ละลาย gelatin ในน้ำเย็น 600 ml ให้กระจายทั่วแล้วให้ความร้อนเพื่อละลายที่อุณหภูมิ 50 – 60°C ในอ่างน้ำอุ่น พร้อมคนบ่อย ๆ เมื่อ gelatin ละลายแล้วให้รวมอาหารทั้ง 2 ส่วน ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 1 NaOH เติม phenol red คนให้เข้ากันดี ถ่ายอาหาร 10 ml ลงในหลอดที่จุกเกลียวขนาด 16 ×125 mm ฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 10 นาที ถ้าไม่ใช้ภายใน 8 ชั่วโมง ไล่อากาศในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50 - 70°C นาน 2 – 3 hr. ก่อนใช้

Motility – Nitrate Medium (Buffered)

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Potassium nitrate	1.0 g
Disodium phosphate	2.5 g
Agar	3.0 g
Galactose	5.0 g
Glycerol	5.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสม (ยกเว้นวุ้นผง) ในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.4 เติมผงวุ้นแล้วต้มให้ความร้อนพร้อมคนเพื่อละลายวุ้น ถ่ายอาหาร 11 ml ลงในหลอดขนาด 125×16 mm ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ทำให้เย็นโดยเร็วในน้ำเย็น ถ้าไม่ใช้ภายใน 4 hr. หลังการเตรียมให้ทำให้ร้อนในน้ำเดือดหรือไอน้ำ 10 นาที แล้วทำให้เย็นก่อนใช้

MYP agar

Beef extract	1.0 g
Peptone	10.0 g
D – mannitol	10.0 g
NaCl	10.0 g
Phenol red (as solution)	0.025 g
Agar	15.0 g
Distilled water	900 ml

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นพร้อมกับให้ความร้อนปรับ pH เป็น 7.2 แบ่งใส่ใน flask ขนาด 500 ml flask ละ 225 ml ฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำอุ่นให้มีอุณหภูมิ 50°C เติม egg yolk emulsion 12.5 ml และ polymyxin B solution 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน เทใส่ petri dish ขนาด 100 × 15 mm ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนใช้ต้องทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Nitrate broth

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
KNO_3	1.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ± 0.1 แบ่งใส่หลอดขนาด 125 × 16 mm หลอดละ 15 ml ฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

Nutrient agar slant and plate

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นพร้อมกับให้ความร้อนแบ่งใส่หลอด Screw – cap tube ขนาด 125 × 16 mm หลอดละ 6.5 ml ฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที โดยให้เอียงหลอดไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว สำหรับ plate ให้ใส่ในขวดหรือ flask 100 – 500 ml ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาทีแล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำให้มีอุณหภูมิ 55°C เทใส่ sterile petri dish ขนาด 100 × 15 mm ประมาณ 15 –20 ml ทิ้ง plate ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 24 – 48 ชั่วโมง ก่อนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar with L – tyrosine

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 litter
L – tyrosine	0.5 g
Distilled water	10 ml.

เตรียม nutrient agar แบ่งใส่ขวด 100 ml ฆ่าเชื้อ 121°C, 15 นาทีทำให้เย็นโดยใส่อ่างน้ำอุณหภูมิ 45 °C เติมL – tyrosine 0.5 g ละลายในน้ำ 10 ml ในหลอดผสมให้เข้ากัน ใส่หลอดขนาด 100 × 13 mm หลอดละ 3.5 ml เอียงหลอดและทำให้เย็นอย่างรวดเร็วเตรียม L – tyrosine โดยเติม L – tyrosine 0.5 g ในหลอดขนาด 150 × 20 mm ละลายในน้ำ 10 ml ฆ่าเชื้อ 121 °C นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Nutrient broth with lysozyme

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวด ขวดละ 99 ml ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ปรับ pH 6.8 ± 0.1 ผสมสารละลาย 0.1% lysozyme 1.0 ml ลงในขวดผสมให้เข้ากัน แล้วใส่หลอดขนาด 100 × 13 mm หลอดละ 2.5 ml

Peptone water Dilluent 0.1%

Peptone	1.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลาย peptone ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดที่จะทำการเจือจาง โดยเผื่อปริมาตรจะหายระหว่างการฆ่าเชื้อ โดยทำการฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

Phenol red – dextrose broth

Proteose peptone NO.3	10.0 g
Beef extsact	1.0 g
NaCl	5.0 g
Phenol red	0.018 g
Dextrose	5.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ± 0.1 แบ่งใส่หลอดขนาด 100 × 13 mm หลอดละ 3.0 ml ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Trypticase – soy polymyxin broth

Trypticase	17.0 g
Phytone peptone	3.0 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	2.5 g
Dextrose	2.5 g
Distilled water	1 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นพร้อมกับให้ความร้อน 2 นาที แบ่งใส่หลอดขนาด 150 × 20 mm หลอดละ 15 ml ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ปรับ pH ให้ได้ 7.3 ± 0.1 ก่อนใช้ให้เติม 0.15% polymyxin 0.1 ml ลงในแต่ละหลอดผสมให้เข้ากัน

TSC agar (Tryptone – sulfite Cycloserine (TSC) agar)

Tryptose	15.0 g
Soytone	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium bisulfite (meta)	1.0 g
Ferric ammonium citrate	1.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1.0 litter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปรับ pH ให้ได้ 7.6 ± 0.2 ฆ่าเชื้อนาน 10 นาที ที่ 121 °C ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50 °C เติมสารละลาย D – Cycloserine 4.0% ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10.0 ml จะได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมล. (ได้เป็น EY – free TSC agar)

แล้วเติมไข่แดง 50% ในสารละลายเกลือ (0.85%) ต่ออาหาร 500 มล.เทอาหารใส่จานเพาะเชื้อสำหรับ surface plating ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ให้เตรียมอาหารใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

VP Medium

Proteose peptone	7.0 g
Dextrose	5.0 g
NaCl	5.0 g
Distilled water	1.0 liter

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแบ่งใส่หลอดขนาด 150 × 20 mm หลอดละ 5 ml ฆ่าเชื้อ 121 °C นาน 10 นาที ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ± 0.1

สารเคมี

0.5% alpha – naphtol reagent

Alpha – naphtol	1.0 g
5 N acetic acid	200.0 ml

ละลาย alpha – naphtol 1 กรัมใน 5 N acetic acid 200.0 ml

Basic fuchsin stain

ละลาย basic fuchsin 0.5 กรัม ใน alcohol ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำ กรองสารละลายด้วย fine paper

Bufferfield' s buffered phosphate diluent

1. Stock solution

   ละลาย KH_2PO_4 34 กรัม ในน้ำ 500 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.2 แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ทำความเย็น

2. Diluent

   เจือจาง stock solution 1.25 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 1.25 ml ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

Coagulase plasma

1. Desiecated coagnlase plasma (rabbit) with EDTA : เตรียมตามวิธีของผู้ผลิต
2. ถ้าหา plasma ที่มี EDTA ไม่ได้ให้ผสม disiecated rabbit plasma กับน้ำ แล้วเติม Na_2H_2EDTA ให้ได้ความเข้มข้น 0.1%

Nitrite test reagents

1. Reagent A : ละลาย sulfanilic acid 8 กรัม ลงใน 5 N CH_3COOH, 1 ลิตร
2. Reagent B : ละลาย ∝ - naphthol 2.5 กรัม ลงใน 5 N CH_3COOH 1 ลิตร

Sulfanilic acid reagent

Sulfanilic acid	1.0 g
5 N acetic acid	125.0 g

ละลาย Sulfanilic acid 1.0 กรัมใน 5 N acetic acid 125 ml ผสมให้เข้ากัน

Voges – Proskauer (VP) test reagents

1. alpha – naphthol solution 5% : ละลาย ∝ - naphthol 5 กรัมปรับปริมาตรด้วย absolute alcohol ให้ครบ 100 ml
2. Potassium hydroxide solution 40% : ละลาย KOH 40 กรัม ในน้ำปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 ml.
3. Creatine crystals

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี