บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประเภท ที่มา ของตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาศึกษา

อาหารหมัก	แหล่งที่มา
ไตปลา	ตลาดสดเมืองปัตตานี จ.ปัตตานี
ปลาจิ้งจั้งหมัก	ตลาดสดเมืองปัตตานี จ.ปัตตานี
บูดู	สถานประกอบการ อ. สายบุรี จ.ปัตตานี จำนวน 4 แห่ง และ ที่จำหน่ายในตลาดสดเมืองปัตตานี จ.ปัตตานี

Prince of Songkla University Pattani Campus

1.2 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา

Staphylococcus aureus DMST 8840 และ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- de Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck)
- Nutrient agar (NA, Himedia)
- Nutrient broth (NB, Himedia)
- Tryptic soy agar (TSA, Himedia)
- Tryptic soy broth (TSB, Himedia)
- Plate Count Agar (PCA)
- Agar (Himedia)

- Calcium carbonate ($CaCO_3$)
- Sodium Chloride (NaCl, Lab scan)
- Sodium hydroxide (NaOH, Lab Scan)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Hydrogenperoxide (H_2O_2, Merck)
- Potasium cromate (KCr_2O_3)
- Silver Nitrate ($AgNO_3$)
- Catalase Enzyme (Merck)

1.4 เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ

- หลอดทดลอง (tube)
- จานเพาะเชื้อ (plate)
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวงแบบแก้ว (cylinder)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- ปิเปต (pipette)
- แผ่นสไลด์ (slide).
- กระจกปิดสไลด์ (cover slide)
- บิวเรต (burette)
- หลอดดักแก๊ส (durham tube)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- Disc ยาปฏิชีวนะ tetracycline 30 μg/ disc

1.5 อุปกรณ์

- เครื่องชั่งสาร แบบ 4 ตำแหน่ง (Balance, Mettler ToledoPG5002-5)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope, Olympus)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Biochrom)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Eutech Instrument)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Astell)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave, SANYO)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Gallenkamp)
- ตู้อบเครื่องแก้ว (BINDER)

2 วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่าง

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาจิ้งจั้งหมัก ไตปลา และบูดู จากแหล่งผลิตและตลาดสดในเขตจังหวัดปัตตานี นำมาวัดค่า pH ด้วย pH meter และหาค่าความเข้มข้น NaCl โดยดัดแปลงตามวิธีการ rapid test (A.O.A.C., 2000) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข้อ 1

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

นำตัวอย่างปลาจิ้งจั้งหมัก ไตปลา และบูดู ปริมาณ 10 กรัม มาเจือจางในสารละลาย NaCl 0.9% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และเตรียมการเจือจางตามลำดับจนถึง 10^{-3} นำสารละลายเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมา pour plate บนอาหาร MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ 1% และผสมด้วย NaCl 3% และ 6% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Chen *et al.*, 2006a) คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบ ๆ แล้วนำมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์จึงนำมาย้อมสีแบบแกรมดูลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) โดยใช้ 3% H_2O_2 ดังภาคผนวก ข้อ 3 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บในอาหารวุ้นเอียง MRS agar ที่มี NaCl 3% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 สัปดาห์

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย agar spot method

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วย agar spot method (Trias *et al.*, 2008) โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์จำนวน 1 ลูป เพาะเชื้อลงในอาหาร MRS agar ที่มีความเข้มข้น NaCl 3% หรือ 6% ขึ้นกับแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ซึ่งมีวุ้น 0.75% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* DMST 8840 เท่ากับ 10^5 CFU/มิลลิลิตร โดยการเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข้อ 2 และการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค plate count รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับหน้าแข็งตัว จึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณใสซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ

2.4 การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว

2.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 จากการทดสอบด้วย agar spot method มา steak ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อ จำนวน 1 ลูป เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี NaCl 3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำเป็นกล้าเชื้อ

2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (ที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.4.1) ปริมาตร 1% (w/v) ลงในอาหารลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี NaCl 3% ปริมาตรของอาหาร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และไม่เขย่าวัดค่า pH แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนใส (cell-free supernatant: CFS) นำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.5 – 7.0 ด้วย

Prince of Songkla University Pattani Campus

1N NaOH เติมเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303

2.4.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.4.3.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย disc diffusion method (Yang *et al.,* 2012)

นำสารละลายส่วนใสที่เตรียมไว้ (ในข้อ 2.4.2) มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303 โดยนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด เลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง แล้วมาปรับให้มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/ มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard และจากการนับจำนวนเชื้อ ด้วยเทคนิค plate count นำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar แล้วเกลี่ยกระจายให้ทั่วจานอาหาร หยด CFS ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปวางลงบนผิวหน้าอาหาร โดยชุดควบคุมจะใช้อาหารส่วนใส MRS broth ที่ปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และ tetracycline (30 μg/disc) เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4.3.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย agar well diffusion method (Ohmomo *et al.*,1998)

นำแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303 เลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง แล้วนำมาผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy agar (TSA) 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีวุ้น 0.75% ให้มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/ มิลลิลิตรโดยเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard และจากการนับจำนวนเชื้อ ด้วยเทคนิค plate

Prince of Songkla University Pattani Campus

count แล้วนำมาเททับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งแล้วเจาะหลุม (well) ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยด CFS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม ชุดควบคุมจะใช้อาหารส่วนใส MRS broth ที่ปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และ tetracycline (30 μg/disc) เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ หลุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากการทดสอบด้วย agar spot method เพาะลงใน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 3% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบลักษณะต่างๆ ดังนี้

2.5.1 ผลของ NaCl ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีความเข้มข้น NaCl 3, 6, 9, 18 และ 21% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (+) หมายถึงเชื้อแบคทีเรียเจริญ หรือลบ (-) หมายถึงเชื้อแบคทีเรียไม่เจริญ

2.5.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 3% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (+) หมายถึงเชื้อแบคทีเรียเจริญ หรือลบ (-) หมายถึงเชื้อแบคทีเรียไม่เจริญ

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.5.3 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงใน MRS broth ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 3% pH เท่ากับ 5.0, 7.0 และ 9.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (+) หมายถึงเชื้อแบคทีเรียเจริญ หรือลบ (-) หมายถึงเชื้อแบคทีเรียไม่เจริญ

2.5.4 การสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่มีกลูโคส มีความเข้มข้นของ NaCl 3% ลงในหลอดขนาดฝาเกลียวที่มี durham tube นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้นใน durham tube

Prince of Songkla University Pattani Campus