

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำการวิจัยประกอบด้วย ดังต่อไปนี้

1. ตัวอย่าง ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1.1 วัตถุดิบ

1.1.1. เนื้อไก่สด

1.1.2. เครื่องแกง

1.1.3. ผักสด

1.2 ผลิตภัณฑ์แกงป่าไก่ หลังจากปรุงเสร็จในระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

1.3 ภาชนะอุปกรณ์สัมผัสอาหาร

1.3.1. ถาดหลุม

1.3.2. ถ้วยพร้อมฝา

1.3.3. ช้อน

1.3.4. หม้อ

1.3.5. ทัพพี

1.3.6. มีด

1.3.7. เขียง

1.4 มือผู้สัมผัสอาหาร มือทั้ง 2 มือของผู้สัมผัสอาหารทั้ง 6 คน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1. EMB agar (Merck : Germany)

2.2. EC medium (Merck : Germany)

2.3. Plate count agar (Merck : Germany)

2.4. Lauryl tryptose broth (Merck : Germany)

2.5. Brilliant green bile 2% broth (Merck : Germany)

3. สารเคมี

- 3.1. Butterfield's phosphate buffer
- 3.2. แอลกอฮอล์ 70%
- 3.3. แอลกอฮอล์ 90%
- 3.4. $\text{KH}_2(\text{PO})_4$
- 3.5. H_2SO_4
- 3.6. NaOH

4. วัสดุสำหรับห้องปฏิบัติการ

- 4.1. แก๊ส
- 4.2. น้ำกลั่น
- 4.3. ไม้พันสำลี
- 4.4. สำลี/ผ้าก๊อซ
- 4.5. กระดาษฟอยล์
- 4.6. ถังพลาสติกปั่นอาหาร
- 4.7. ถังพลาสติกสำหรับใส่หลอดและจานในการอบฆ่าเชื้อ

อุปกรณ์

1. เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)ผลิตภัณฑ์ภายในประเทศ รุ่น cc – 2
2. เครื่องปั่นอาหาร (Stomacher) ยี่ห้อ Seward
3. เทอร์โมมิเตอร์ ชนิดปรอท 100, 150 °C
4. หลอดดัดก้ำซ (Durham tube)
5. pH มิเตอร์ ยี่ห้อ WTW
6. เครื่องอุลตราโซนิก ยี่ห้อ Elma
7. เครื่องอ่างน้ำ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert
8. ตู้อบความร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Contherm
9. ตู้สำหรับเชี่ยเชื้อ ยี่ห้อ Super clean รุ่น 120 BSD
10. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm
11. เครื่องชั่งไฟฟ้า (digital balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Scaltec

วิธีดำเนินการ

แบ่งวิธีการเป็น 3 ขั้นตอน

1. ตรวจสอบวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร ภาชนะอุปกรณ์สัมผัสอาหาร และมีผู้สัมผัสอาหาร ทางจุลชีววิทยา ก่อนใช้ระบบ HACCP

2. จัดทำระบบ HACCP ทั้ง 7 หลักการ 12 ขั้นตอน คือ

2.1 จัดตั้งคณะทำงาน HACCP

การจัดตั้งคณะทำงาน HACCP เป็นผู้ที่มีความเข้าใจในตัวผลิตภัณฑ์เป็นอย่างดี และเป็นผู้เกี่ยวข้องในการปฏิบัติงานในหน่วยงานนั้นๆ

2.2 บรรยายรายละเอียดของผลิตภัณฑ์

การบรรยายลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่จะจัดทำแผน HACCP เพื่อเป็นข้อมูลในการระบุอันตรายทั้งหมดที่เกิดขึ้นจริงกับผลิตภัณฑ์

2.3 ระบุวัตถุประสงค์การใช้

การระบุวัตถุประสงค์ในการใช้ผลิตภัณฑ์ จะช่วยให้คณะทำงานสามารถระบุอันตรายที่มีโอกาสเกิดขึ้นจริงสำหรับผลิตภัณฑ์นั้นๆ

2.4 จัดทำแผนภูมิการผลิต

การสร้างแผนภูมิการผลิตเพื่อให้เข้าใจถึงขั้นตอนการผลิตได้โดยง่าย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อคณะทำงาน HACCP ในการวิเคราะห์อันตรายต่างๆ และกำหนดจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม

2.5 ทวนสอบแผนภูมิการผลิตที่จุดการผลิตจริง

การทวนสอบแผนภูมิการผลิต เพื่อยืนยันความถูกต้องทั้งหมด การทวนสอบนี้ควรทำในช่วงเวลาผลิตจริงๆ ที่จุดการผลิต

2.6 ระบุอันตรายทั้งหมดที่มีโอกาสเกิดขึ้นในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตรวมทั้งวัตถุดิบทุกตัว พร้อมทั้งพิจารณามาตรการควบคุม

เพื่อที่จะช่วยให้คณะทำงาน HACCP สามารถระบุอันตรายที่เกิดขึ้นจริงได้อย่างถูกต้องทุกขั้นตอนการผลิต พร้อมทั้งกำหนดมาตรการควบคุมได้อย่างเหมาะสม

2.7. กำหนดจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม

เพื่อป้องกันหรือขจัดอันตรายที่มีต่อความปลอดภัยของอาหารหรือลดอันตรายจนถึงระดับที่ยอมรับได้ โดยใช้ผังการตัดสินใจ (The CCP decision tree)

2.8 กำหนดค่าวิกฤตสำหรับจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมแต่ละจุด

ค่าวิกฤตคือค่าที่เป็นเกณฑ์แบ่งแยกระหว่างการยอมรับได้และยอมรับไม่ได้ทางด้านความปลอดภัยของอาหาร เป็นค่าที่ใช้ตัดสินใจการควบคุมการผลิต ณ จุด CCP ว่าสามารถผลิตอาหารที่ปลอดภัยได้หรือไม่ คณะทำงานจึงต้องกำหนดค่าวิกฤต สำหรับ CCP ที่จะเกิดขึ้นและค่าวิกฤตที่กำหนดขึ้นนี้สามารถควบคุมอันตรายที่ระบุได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.9 จัดทำระบบตรวจติดตามสำหรับจุดวิกฤตที่ต้องการแต่ละจุด

คณะทำงานจำเป็นต้องเข้าใจความแตกต่างของการควบคุม มาตรการควบคุม และการตรวจติดตาม เพื่อจะได้กำหนดการตรวจติดตามได้อย่างเหมาะสม

2.10 กำหนดวิธีการแก้ไข

การกำหนดวิธีการแก้ไขควรกำหนดไว้ล่วงหน้าสำหรับแต่ละขั้นตอนที่เป็น CCP

2.11 กำหนดกระบวนการทวนสอบ

เป็นกิจกรรมที่จัดทำขึ้นเพื่อยืนยันว่าระบบ HACCP ที่จัดทำขึ้นมีการนำไปปฏิบัติจริงและดำเนินการไปอย่างถูกต้อง รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัยอย่างสม่ำเสมอด้วย

2.12 จัดทำระบบเอกสารและการจัดเก็บบันทึก

มีระบบการจัดทำและควบคุมเอกสาร บันทึกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติงานและวิธีปฏิบัติ

นำระบบ HACCP เข้าสู่การปฏิบัติ โดยมีการอบรมชี้แจงให้ความรู้แก่ผู้ปฏิบัติงานในโรงครัว แล้วปฏิบัติตามแผนการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

3. ตรวจวิเคราะห์อาหาร ภาชนะอุปกรณ์สัมผัสอาหารและมือผู้สัมผัสอาหารทางจุลชีววิทยา หลังนำระบบ HACCP มาใช้

การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. การเก็บตัวอย่างอย่างกระทำโดยวิธีการปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) แล้วนำส่งเพื่อทำการตรวจที่ห้องปฏิบัติการ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ การนำส่งตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในสภาพแช่เย็น เก็บตัวอย่างโดยใช้ถุงพลาสติก มัดปากถุงให้แน่นแล้วแช่ ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง ใช้เวลาในการนำส่งไม่เกิน 2 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างดังนี้

1.1 วัตถุดิบหลัก ในการปรุงแกงป่าไก่ ได้แก่ เนื้อไก่ ผัก และเครื่องแกง โดยเก็บตัวอย่างละอย่างน้อย 50 กรัม



ภาพที่ 6 เนื้อไก่สด เลาะหนัง ตัดกระดูก



ภาพที่ 7 มะเขือสด ผ่าซีก



ภาพที่ 8 เครื่องแกงและ เครื่องปรุงรส

1.2 แกงป่าไก่ โดยการเก็บตัวอย่างอาหารหลังจากปรุงสุกแล้ว ในช่วงเวลา 0,1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตัวอย่างละอย่างน้อย 50 กรัม



ภาพที่ 9 แกงป่าไก่ หลังปรุงสุกพร้อมเสิร์ฟ

1.3 พนักงานผู้สัมผัสอาหาร จำนวน 6 คน โดยการสวมมือผู้สัมผัสอาหารทั้ง 2 ข้าง ตั้งแต่นิ้วข้อที่ 2 นอกจากหัวแม่มือให้สวมไปถึงข้อที่ 1 ด้วยไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในหลอดแก้วที่มี Phosphate buffer solution ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำมาตรวจในห้องปฏิบัติการ

1.4 ภาชนะอุปกรณ์ ที่สัมผัสอาหาร โดยการสวม ภาชนะอย่างละ 5 ชิ้น โดย

- ถ้วย : สวมครั้งนิ้วจากขอบบนทั้งภายนอกและภายใน
- ถาดหลุม, หม้อ : สวมพื้นผิวที่สัมผัสอาหารประมาณ 4 ตารางนิ้ว
- ช้อน, ทัพพี, มีด : สวมพื้นผิวที่สัมผัสอาหารประมาณ 4 ตารางนิ้ว
- เขียง : สวมด้านที่ใช้งาน

ด้วยไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในหลอดแก้วที่มี Phosphate buffer solution ในสภาพปลอดเชื้อแล้วนำมาตรวจในห้องปฏิบัติการ

2. การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาสำหรับวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แกงป่าไก่ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ Total bacteria count, Total coliform bacteria, Fecal coliform bacteria และ *Escherichia coli* (FAO, 1992) ส่วนภาชนะอุปกรณ์และมือผู้สัมผัสอาหาร ตรวจวิเคราะห์เฉพาะ Total bacteria count ทำการวิเคราะห์จำนวน 2 ซ้ำทั้งก่อนและหลังการนำระบบ HACCP เข้าสู่การปฏิบัติซึ่งมี รายละเอียดดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Pour plate (FAO, 1992) โดยนับโคโลนีทั้งหมด จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard plate count) เป็นการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง โดยประมาณว่าจำนวนโคโลนีทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในการเพาะเชื้อคือจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำตัวอย่างอาหารที่ถูกเจือจางแล้วมาเลี้ยงบนจานอาหาร แล้วคำนวณเชื้อจุลินทรีย์โดยเอาจำนวนนับที่ได้คูณด้วยจำนวนเท่าที่ได้เจือจางรายงานผลเป็น colony forming unit per ml (CFU/g)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total coliform bacteria) (FAO, 1992) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือการตรวจสอบครั้งแรก (Presumptive test) และขั้นตอนการยืนยัน (Confirmatory test) นำผลที่ได้ในการตรวจสอบขั้นยืนยันมาหาค่า MPN (Most Probable Number) จากตารางดัชนีหาค่า MPN โคลิฟอร์มแบคทีเรีย ค่าที่ได้ถือว่าเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total coliform bacteria) มีหน่วยเป็น MPN coliform/กรัม

2.3 การวิเคราะห์ฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform bacteria) (FAO, 1992) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือการตรวจสอบครั้งแรกและขั้นตอนการยืนยัน นำผลที่ได้ในการตรวจสอบขั้นยืนยัน มาหาค่า MPN ค่าที่ได้ถือเป็นฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) มีหน่วยเป็น MPN fecal coliform/กรัม

2.4 การวิเคราะห์ *Escherichia coli* (FAO, 1992) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การตรวจสอบครั้งแรกและขั้นตอนการยืนยัน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth แล้วนำหลอดที่ให้ผลบวกมาฉีดเลี้ยงเชื้อบน Levine EMB agar แล้วถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย ซึ่งมีจุดดำตรงกลาง มีหรือไม่มี Metallic sheen นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี IMViC test นำผลที่ได้ผลบวก มาหาค่า MPN จากตารางดัชนีค่า MPN ซึ่งค่าที่ได้ถือเป็น *Escherichia coli* มีหน่วย เป็น MPN *Escherichia coli* /กรัม

วิธีการดำเนินการตรวจวิเคราะห์โดยละเอียด

1. การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total bacterial count)

มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1.1 เตรียมจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) โดยทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการอบในตู้อบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 180 °C นาน 3 ชั่วโมง

1.2 เจือจางตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัม ใส่ในถุงปั่นอาหารพร้อมสารละลายบัฟเฟอร์ 250 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่อง Stomacher 30 วินาทีแล้วจะได้ตัวอย่างอาหารความเข้มข้น 1:10 (10^{-1})

1.3 ใช้ไมโครปิเปต ดูดตัวอย่างที่ถูกเจือจางเป็น 10^{-1} จากข้อ 1.2 มาปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Stirrer) เขย่าให้เข้ากัน จะได้ความเจือจางเป็น 10^{-2}

1.4 เขย่าหลอดตัวอย่างที่ถูกเจือจางที่ระดับ 10^{-2} ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างอาหารใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร 2 จาน พร้อมเขียนสัญลักษณ์บนจาน

1.5 ทำซ้ำตามข้อ 1.3 และ 1.4 จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-3}

1.6 เท Plate count agar ลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วหมุนจานในทิศทางที่เป็นรูป เลข 8 เพื่อให้ตัวอย่างกระจายไปทั่วจานเลี้ยงเชื้อปล่อยให้อาหารแห้งประมาณ 15 นาที แล้วคว่ำจานนำเข้าในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C นาน 48 ชั่วโมง

1.7 หลังจากครบกำหนด นำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมานับจำนวนโคโลนีแล้ว คำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรโดยมีหน่วย CFU/g

2. การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total coliform bacteria)

2.1 การตรวจสอบครั้งแรก (Presumptive test)

2.1.1 เตรียมหลอดทดลอง (Test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham tube) วางคว่ำในหลอดทดลอง ในที่วางหลอดทดลอง แบบ 3 แถว เขียนสัญลักษณ์

2.1.2 ดูดตัวอย่างอาหารที่ผ่านการปั่นแล้ว โดยใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ Phosphate buffer solution หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน

หลอดที่ 1 เขย่าแล้วดูจากหลอดที่ 1 ใส่ในหลอดที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} ตามลำดับ

2.1.3 ดูตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแถว 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

2.1.4 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใส่ตัวอย่างอาหารเสร็จแล้วด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ เพื่อให้ส่วนผสมต่างๆ เข้ากันด้วยดี

2.1.5 นำหลอดอาหารดังกล่าวไปบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.1.6 อ่านผลโดยการเขย่าหลอดอาหาร ตรวจสอบความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดมีก๊าซเกิดขึ้น ไม่ว่าจะมากหรือน้อย แสดงว่าผลในการทดสอบขั้นแรกให้ผลเป็นบวกบันทึกผล แล้วทำการตรวจสอบในขั้นยืนยัน ทุกหลอด

2.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed test)

2.2.1 นำหลอดทดลองที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรกทุกหลอดมาทำการยืนยันในขั้นต่อไป

2.2.2 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซเพื่อบรรจุอาหารเหลว Brilliant green lactose broth 2 % ตามสูตร แล้วบรรจุสารละลายลงในหลอดทดลอง จำนวน 9 มิลลิลิตร พร้อมใส่หลอดดักก๊าซคว่ำลง ปิดฝาหลอด นำไปนิ่งในหม้ออัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2.3 เขียนสัญลักษณ์และความเข้มข้นของตัวอย่าง บนหลอดอาหารดังกล่าว ให้เท่ากับจำนวน Lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก

2.2.4 นำหลอดที่เกิดก๊าซจากการตรวจสอบขั้นแรก เขย่าเบาๆ แล้วใช้ห่วงขี้เชื้อ (Wire loop) ซึ่งลนไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายจากหลอดที่ให้ผลบวก Lauryl tryptose broth ลงใน BGLB หลอดต่อหลอด โดยลนไฟ loop ใหม่ทุกครั้งที่ใช้

2.2.5 เขย่าหลอด BGLB ที่ถ่ายเชื้อลงไปให้ผสมเข้ากันได้ดี นำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.2.6 อ่านผลการทดลอง จากหลอดที่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ บันทึกให้ผลบวก

2.2.7 นำผลของหลอดที่ให้ผลบวกไปคำนวณหาค่าโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จากตาราง MPN (Most Probable Number Index)

3. การตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria)

3.1 การตรวจสอบขั้นแรก ใช้เทคนิคเดียวกับการวิเคราะห์หาโคลิฟอร์มทุกประการ

3.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน ใช้อาหารเหลว EC Medium แทน BGLB และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°C ในเครื่องอ่างน้ำ (water bath) นาน 48 ± 2 ชั่วโมง

4. การตรวจหาเชื้ออีโคไล (*Escherichia coli*)

4.1 การตรวจสอบขั้นแรก ใช้เทคนิคเดียวกับการวิเคราะห์หาโคลิฟอร์มทุกประการ

4.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน ใช้อาหารเหลว EC Medium เหมือนการวิเคราะห์ฟีคัล โคลิฟอร์มและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 °C ในเครื่องอ่งน้ำ นาน 48 ± 2 ชั่วโมง แล้วนำหลอดที่ให้ผลบวกมาขีดเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Levine EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ใน ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย ซึ่งมีจุดดำตรงกลาง มีหรือไม่มี Metallic sheen นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี IMViC test แล้ว นำผลที่ได้มาหาค่า MPN (Most Probable Number) จากตารางดัชนีค่า MPN ค่าที่ได้ถือเป็น *Escherichia coli* มีหน่วยเป็น MPN *E.coli* /กรัม

การทดสอบ IMViC Test

IMViC Test เป็นการทดสอบ 4 ชนิดด้วยกันคือ

I = Indole Test

M = Methyl Red Test (MR Test)

V = Voges – Proskauer Test (VP Test)

C = Citrate Test

1. Indole Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน Tryptophan เป็น Indole ได้หรือไม่ ซึ่ง Tryptophan เป็น Amino Acid ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำพวก

Peptone Casein

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ใน 1% Peptone Broth
2. Inoculate ที่ 35 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง
3. หยด Kovac'Reagent 5 หยด
4. เขย่าหลอดทดลองเบาๆ 2 – 3 ครั้ง
5. สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของ Medium

การแปลผล

ผลบวก : มีสีแดงที่ผิวของ Medium (Red Ring)

ผลลบ สีเหมือน Kovac'Reagent คือสีเหลือง

2. Methyl Red Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose ได้มากหรือน้อย โดยการตรวจดู pH ของอาหารนั้น เชื้อที่สร้างกรดได้มากจะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสี Indicator ของ Methyl Red เป็นสีแดงได้

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ใน MR/VP Broth
2. Inoculate ที่ 35 ° C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง
3. หยด Methyl Red Test Reagent 5 หยด
4. สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของ Medium ทันทีหลังจากหยด Indicator

การแปลผล

ผลบวก : Medium เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ : Medium มีสีเหลือง

3. Voges – Proskauer Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง Acethyl Methyl Carbinol จาก Glucose ได้หรือไม่

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ใน MR/VP Broth
2. Inoculate ที่ 35 ° C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง
3. หยด 5% Naphthol ลงไป 6 หยดแล้วเขย่า
4. หยด 40% KOH ลงไป 2 หยด
5. เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 10 –15 นาที
6. สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของ Medium

การแปลผล

ผลบวก : Medium เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ : Medium เป็นสีเหลือง

4. Citrate Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ Citrate เพียงอย่างเดียว เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon Source) ได้หรือไม่

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดยการ Streak บนผิว Simmon's Citrate Aga
2. Inoculate ที่ 35 ° C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง
3. สังเกตการเปลี่ยนสีของ Medium และการเติบโตของแบคทีเรีย

การแปลผล

ผลบวก : มีแบคทีเรียขึ้นและ Medium เปลี่ยนเป็นสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : ไม่มีแบคทีเรียขึ้นและ Medium ไม่เปลี่ยนสี (สีเขียว)