บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

จากงานวิจัยเรื่อง " การรอดชีวิตของแบคทีเรียก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อ ในการหมักผักกาดเขียวปลีโดนใช้เชื้อบริสุทธิ์" ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาและออกแบบการทดลอง เพื่อให้การวิจัยเป็นไปตามจุดประสงค์ที่วางไว้ จึงได้แบ่งขั้นตอนของงานวิจัยออกเป็น 4 ขั้นตอนโดยดำเนินการตามลำดับดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาคุณภาพทางเคมี,ปริมาณของแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์ และรา ในผักกาดเขียวปลีดอง

1.1 การสำรวจ และเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจ และเก็บตัวอย่างผักกาดเขียวปลีดอง (จำนวน 2 ครั้ง) จากตลาด 9 อำเภอในจังหวัดพิษณุโลก ได้แก่

1.1.1 อำเภอเมือง

1.1.2 อำเภอนครไทย

1.1.3 อำเภอชาติตระการ

1.1.4 อำเภอบางระกำ

1.1.5 อำเภอบางกระทุ่ม

1.1.6 อำเภอพรหมพิราม

1.1.7 อำเภอวัดโบสถ์

1.1.8 อำเภอวังทอง

1.1.9 อำเภอเนินมะปราง

1.2 วิเคราะห์คุณภาพของผักกาดเขียวปลีดอง

1.2.1 ศึกษา pH จากน้ำตัวอย่างผักกาดเขียวปลีดอง โดยนำตัวอย่างน้ำผักกาดเขียวปลีดอง 10 มิลลิลิตร ไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH meter ยี่ห้อ HORIBA รุ่น F-21 S/N 816007 บันทึกผลการทดลองที่ได้

1.2.2 ศึกษาปริมาณกรดแลกติก ที่มีอยู่ในน้ำผักกาดเขียวปลีดอง โดยนำน้ำผักกาดเขียวปลีดอง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วหยดด้วย phenolphthalein (ภาคผนวก ง) ลงไปประมาณ 3-4 หยด เพื่อใช้เป็น indicator นำไปไตเตรตกับสารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) มาตรฐาน 0.1 N (ภาคผนวก ง) บันทึกผลปริมาณของ Sodium hydroxide (NaOH) ที่ใช้ในการไตเตรตจนสารละลายตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำผลที่ได้
มาคำนวณหาปริมาณกรดแลกติก โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณกรดแลกติก} = \frac{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times \text{normality ของ NaOH} \times 90.80 \times 100}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง} \times 100}$$

1.2.3 ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผักกาดเขียวปลีดอง โดยนำตัวอย่างน้ำผักกาดเขียวปลีดอง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 0.1 % sterile peptone water (ภาคผนวก ค) 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วไปทำ serial dilution ในระดับที่เหมาะสม จากนั้นนำ 1.0 มิลลิลิตรของแต่ละ dilution มา pour plate ลงในอาหาร plate count agar (PCA) (ภาคผนวก ค) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและบันทึกผลการทดลองที่ได้ (อารีรัตน์ เทียนรัตน์, 2542)

1.2.4 ศึกษาจำนวนแบคทีเรียแลกติก ที่สามารถทนเกลือน้ำดี 1.5 เปอร์เซนต์ได้ โดยนำ 1.0 มิลลิลิตรของแต่ละ dilution ในข้อ 1.2.3 มา pour plate ลงในอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค) ที่มี oxgall 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและบันทึกผลการทดลองที่ได้

1.2.5 ศึกษาจำนวนยีสต์และราทั้งหมดโดยนำ 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละ dilution ในข้อ 1.2.3 มา spread ลงบนอาหาร Rose – bengol chloramphenical agar (ภาคผนวก ค) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด และบันทึกผลการทดลองที่ได้

1.3 การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์และแยกเชื้อบริสุทธิ์

หลังจากนับโคโลนี แบคทีเรียแลกติก ทั้งหมดในแต่ละ plate แล้ว เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ๆ โดยเก็บทุกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน นำมา streak ลงบน MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ในแต่ละ plate มาอีกครั้งเมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บเชื้อไว้ใน MRS slant เพื่อนำไปศึกษาต่อไป โดยนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อทุก 15 วัน

ตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพในการหมักและ ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักสูงสุด

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพการหมักโดยนำแบคทีเรียแลกติก ที่ได้จากข้อ 1.3 มาลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรดด่างเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.1 และนำไปหาปริมาณกรดทั้งหมดเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.2 เก็บเชื้อที่มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดไว้ใน MRS slant โดยทำ เช่นเดียวกับข้อ 1.3

2.2 ศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลกติก ที่มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดจากข้อ 1

1.2.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ย้อมแกรม , การสร้างสปอร์ , การจัดเรียงตัว , รูปร่าง และลักษณะโคโลนี (ภาคผนวก จ) (บุญทา วรินทร์รักษ์, ม.ป.ป.)

1.2.2 ตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ IMVic test , catalase , Oxidase , Oxidation fermentation test , Urease , Lipase , Gelatin , triple sugar Iron , Nitrate Reduction Test , Starch , Sugar Fermentation Test , Motility (ภาคผนวก จ) (eter H.A. Sneat et al., 1986.)

ตอนที่ 3 ศึกษาการหมักผักกาดเขียวปลีแบบธรรมชาติและการหมักโดยใช้แบคทีเรียแลกติก

3.1 การหมักผักกาดเขียวปลีโดยวิธีธรรมชาติ

นำผักกาดเขียวปลีล้างและมาตัดส่วนที่เสียออก นำผักใส่ตะแกรงผึ่งให้เหี่ยวประมาณครึ่งวัน นำผักกาดเขียวปลีจำนวน 100 กรัม มาใส่ในสารละลายเกลือ 400 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของเกลือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำซาวข้าว (สัดส่วนข้าวต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1) 3 เปอร์เซ็นต์ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยให้สารละลายท่วมผัก พยายามให้ผักจมน้ำ ปิดฝาให้แน่น (งามจิตร, ม.ป.ป.)

3.2 การหมักผักกาดเขียวปลีโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1.1 แยกจากผักกาดเขียวปลีดอง 9 อำเภอในจังหวัดพิษณุโลก ที่มีประสิทธิภาพในการหมักสูงสุดจากการตอนที่ 2 ข้อที่ 1

3.2.1.2 ได้จากศูนย์การศึกษารวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์แห่งภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ (Bangkok MIRCENS) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย รหัส TISTR No. 877

3.2.2 การเตรียมแบคทีเรียแลกติก

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS broth (ภาคผนวก ค) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารชนิดเดียวกัน 2 ครั้ง โดยใช้เวลาบ่มเชื้อครั้งละ 24 ชั่วโมง นำเชื้อซึ่งถ่ายครั้งสุดท้ายไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร เจือจางให้มีค่า O.D. ประมาณ 0.3 (อรนุช อุตรพิชาติ, 2530) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที (Giridaran J. Veeramuthu et al., 1998. p. 171-175) ละลาย pallet ด้วยสารละลายเกลือที่ใช้ดองผักกาดเขียวปลี

3.2.3 การหมักผักกาดเขียวปลีโดยใช้แบคทีเรียแลกติก

3.2.3.1 ทำการหมักผักกาดเขียวปลีเช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยใส่แบคทีเรียแลกติกในข้อ 3.2.1 ลงไป ประมาณ 10^8 CFU/ml. ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.3.2 วิเคราะห์คุณภาพผักกาดเขียวปลีดอง ทุก 6 ชั่วโมง

3.2.3.2.1 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากน้ำตัวอย่างผักกาดเขียวปลีดอง เช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.1

3.2.3.2.2 ศึกษาปริมาณกรดแลกติก ที่มีอยู่ในน้ำผักกาดเขียวปลีดองเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.2

3.2.3.2.3 ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.3

3.2.3.2.4 ศึกษาจำนวนแบคทีเรียแลกติก เช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.4

3.2.3.2.5 ศึกษาจำนวน *E. coli* โดยนำตัวอย่างน้ำผักกาดเขียวปลีดองมาทำ serial dilution ในระดับที่เหมาะสม จากนั้นนำ 1.0 มิลลิลิตรของแต่ละ dilution มา pour plate ลงในอาหาร EMB agar (ภาคผนวก ค) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด บันทึกผลการทดลองที่ได้

3.2.3.2.6 ศึกษาจำนวน *Salmonella* sp. โดยนำตัวอย่างน้ำผักกาดเขียวปลีดองมาทำ serial dilution ในระดับที่เหมาะสม จากนั้นนำ 1.0 มิลลิลิตรของแต่ละ dilution มา pour plate ลงในอาหาร SS agar (ภาคผนวก ค) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด บันทึกผลการทดลองที่ได้

ตอนที่ 4 ศึกษาการหมักผักกาดเขียวปลีโดยใช้แบคทีเรียแลกติก และ การรอดชีวิตของ *Escherichia coli* ETEC และ *Salmonella* sp.gr.Eในกระบวนการหมัก

4.1 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย

E. coli ETEC (รหัสการทดลอง E) และ *Salmonella* sp.gr.E (รหัสการทดลอง S) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์จังหวัดพิษณุโลก

4.2 การเตรียมแบคทีเรียแลกติก , *E. coli* (ETEC) และ *Salmonella* sp. gr.E

เลี้ยงแบคทีเรียแลกติกใน MRS broth (ภาคผนวก ค) ส่วน *E. coli* (ETEC) และ *Salmonella* sp.เลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ค) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารชนิดเดียวกัน 2 ครั้ง โดยใช้เวลาบ่มเชื้อครั้งละ 24 ชั่วโมง นำเชื้อซึ่งถ่ายครั้งสุดท้ายไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร เจือจางให้มีค่า O.D. ประมาณ 0.3 (อรนุช อุตรพิชาติ,

2530) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที (Giridaran J. Veeramuthu e tal., 1998. p. 171-175) ละลาย pallet ด้วยสารละลายเกลือที่ใช้ดองผักกาดเขียวปลี

4.3 การหมักผักกาดเขียวปลีโดยใช้แบคทีเรียแลกติก และการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* (ETEC) หรือ *Salmonella* sp. gr.E

4.3.1 ทำการหมักผักกาดเขียวปลีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ข้อ 3.1 โดยใส่แบคทีเรียแลกติก, *E. coli* (ETEC) หรือ *Salmonella* sp. gr.E ในข้อ 1 ลงไป ประมาณ 10^8 CFU/ml. ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.3.2 วิเคราะห์คุณภาพผักกาดเขียวปลีดอง ทุก 6 ชั่วโมงดังนี้

4.3.2.1 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากน้ำตัวอย่างผักกาดเขียวปลีดองเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.1

4.3.2.2 ศึกษาปริมาณกรดแลกติก ที่มีอยู่ในน้ำผักกาดเขียวปลีดองเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.2

4.3.2.3 ศึกษาจำนวน แบคทีเรียแลกติก เช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 1.2.4

4.3.2.4 ศึกษาจำนวน *E. coli* (ETEC) เช่นเดียวกับตอนที่ 3 ข้อ 3.2.3.2.5

4.3.2.5 ศึกษาจำนวน *Salmonella* sp. gr.E เช่นเดียวกับตอนที่ 3 ข้อ 3.2.3.2.6

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ pH, ปริมาณกรดทั้งหมด และจำนวนจุลินทรีย์ จะนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ และใช้ DMRT หาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสิ่งทดลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์