บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบมี 4 ชนิด ดังนี้ เชื้อบริสุทธิ์ *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 (Tokyo University of Marine Science and Technology ประเทศญี่ปุ่น) เชื้อบริสุทธิ์ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 เชื้อบริสุทธิ์ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และเชื้อบริสุทธิ์ *Escherichia coli* ATCC 25922 (ห้องปฏิบัติการวิจัยและการทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 พื้นผิวทดสอบและสวอบ

พื้นผิวทดสอบ 3 แบบ ดังนี้ stainless steel ชนิด 304 No. 2B (บริษัท เอส.ซี. เซอร์วิส แอนด์ ซัพพลาย จำกัด) polyesterurethane (บริษัท ต้าเหรียญ อินดัสทรีส์ จำกัด) และ polyesterurethane ที่ใช้งานมาแล้ว 5 ปี (บริษัท เบทาโกร จำกัด)

สวอบ 4 ชนิด ดังนี้ สวอบสำลีและผ้าก๊อซ (บริษัท ไทยก๊อซ จำกัด) สวอบโฟมพอลิยูรีเทนและฟองน้ำเซลลูโลส (บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar coarse powder (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Bacto Peptone (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

Baird-Parker agar base (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

Trypticase Soy Broth (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Nutrient agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

PALCAM agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

Xylose Lysine Deoxycholate agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

Violet Red Bile agar with MUG (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

3.2.3 สารเคมี

Antiseptic (AR grade)

Disodium hydrogen phosphate (AR grade)

Sodium chloride (AR grade)

Potassium dihydrogen phosphate (AR grade)

3.2.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่อง pH meter (Eutech รุ่น Cyber Scan pH 1000 Bench, Singapore)

เครื่อง Vortex (Labnet รุ่น VX100, USA)

เครื่อง Autoclave (TOMY Autoclave รุ่น SS-320, Japan)

เครื่อง Autoclave (SANYO Labo Autoclave รุ่น MLS-2400, Japan)

เครื่อง Water bath shaker (GFL รุ่น 1083)

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert รุ่น 600, Germany)

เตาให้ความร้อน (Hot plate) (Framo®-Geratetechnik รุ่น M 21/1)

เครื่อง Spectrophotometer (JAS.CO รุ่น V-530, Japan)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100S, Germany)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น A2005, Germany)

ตู้บ่มเพาะเชื้อ Incubator (Heraeus instrument รุ่น B6)

ตู้บ่มเพาะเชื้อ Incubator (Memmert รุ่น 500, Germany)

เครื่อง Colony counters (Suntex, Taiwan)

ตู้ Larminar flow cabinet (BVT-123, Thailand)

Scraper ปลอดเชื้อ ขนาดใบปาดกว้าง 20 mm ด้ามจับยาว 290 mm

(Spllifesciences, Korea)

เครื่องแก้วต่างๆที่จำเป็น

1312347117

3.3 การวิเคราะห์ลักษณะของสวอบและพื้นผิวสัมผัสอาหาร

3.1.1 ศึกษาลักษณะพื้นผิวและสวอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ศึกษาลักษณะภายนอกของสวอบและพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) Nikon DXM1200F ที่กำลังขยาย 150x โดยอุปกรณ์สวอบศึกษาขนาดรูและความหนา ส่วนพื้นผิวศึกษาขนาดรู

3.1.2 ศึกษาความขรุขระและลักษณะโครงสร้าง 3 มิติของพื้นผิว

นำพื้นผิวไปวิเคราะห์ความขรุขระ (Roughness, Ra) และถ่ายภาพโครงสร้างสามมิติของพื้นผิวด้วยเครื่อง Surfcom 1400A-3DF/590A-3D ที่บริษัท Toyo Seikan Kaisha จังหวัดโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวโดยใช้เข็มขนาดเล็กลากผ่านผิวทดสอบตามแนวขวางเป็นระยะ 1 cm จำนวน 3 ครั้งและนำมาเฉลี่ยเป็นค่าความขรุขระ รูปโครงสร้างสามมิติของพื้นผิวที่ได้จากการลากเข็มตามแนวขวางผ่านผิวทดสอบหลายครั้ง

3.4 การเตรียมแบคทีเรีย พื้นผิวและสวอบ

3.4.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -20°C (stock) มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy agar (TSA) ในจานเพาะเชื้อ โดย S. Typhimurium *S. aureus* และ *E. coli* เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และ *L. monocytogenes* เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มนำเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ใช้สำหรับเตรียมเชื้อในการทดสอบซึ่งเก็บไว้ไม่เกิน 4 สัปดาห์ แล้วจึงถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่

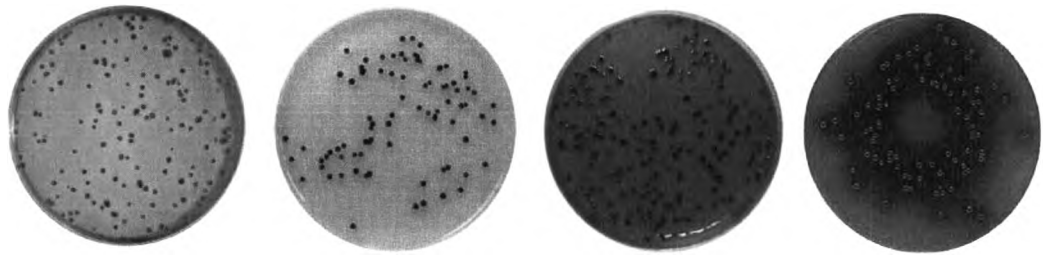
เตรียมเชื้อก่อนการทดสอบโดยถ่ายเชื้อ 1 ลูปจากเชื้อที่เจริญเติบโตอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth (TSB) 10 มิลลิลิตร บ่มนาน 24 ชั่วโมงตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละตัว จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 ลูปจากหลอดที่บ่มแล้ว ลงในหลอดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 10 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อตามอุณหภูมิที่เหมาะสม นาน 16-18 ชั่วโมง จะได้เชื้อที่ระดับ 10^8-10^9 CFU/ml เจือจางเชื้อสำหรับทดสอบด้วยสารละลาย peptone water 0.1% ให้มีปริมาณเชื้อที่ระดับ 10^5-10^6 CFU/ml

การตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากหลอดที่บ่มแล้ว 16-18 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย peptone water 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางเชื้อจนได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นใช้วิธี spread plate technique โดยปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ selective media ตามตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 ดังนี้ *L. monocytogenes* – PALCAM agar, *S.* Typhimurium – XLD agar, *S. aureus* – Baird-parker agar และ *E. coli* – VRBA-MUG agar ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยทั่ว

ผิวหน้าอาหาร ปิดฝาและคว่ำจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสมนาน 24-48 ชั่วโมง (*S.* Typhimurium *S. aureus* และ *E. coli* บ่มที่ 37°C ส่วน *L. monocytogenes* บ่มที่ 30°C) หลังจากบ่มแล้วนำมานับจำนวนโคโลนีที่มีจำนวนอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี และนำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อในสารละลาย 1 มิลลิลิตร การทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3. 1 ปัจจัยที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิด

แบคทีเรีย	อุณหภูมิ (°C)	Selective media	เวลา (h)
E. coli	37	VRBA-MUG agar	24
S. aureus	37	Baird-parker agar	24
S. Typhimurium	37	XLD agar	24
L. monocytogenes	30	PALCAM agar	48



รูปที่ 3. 1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดบน selective agar

3.4.2 การเตรียมสวอบ

สวอบที่ใช้ในการทดลองมี 4 ชนิด ดังนี้ สวอบสำลี (cotton) สวอบโฟมพอลิยูรีเทน (PU foam) และฟองน้ำเซลลูโลสแบบแห้ง (sponge) เป็นแบบปลอดเชื้อเก็บในถุงหรือหลอดพร้อมใช้ทดสอบ ส่วนผ้าก๊อซ (gauze) เตรียมโดยตัดผ้าก๊อซให้มีขนาด 15 cm x 15 cm พับให้มีความหนาเท่ากันจนมีขนาด 5 cm x 5 cm นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที (autoclave) และอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ในการทดสอบนี้สวอบสำลี และสวอบโฟมพอลิยูรีเทนใช้สวอบเก็บเชื้อในพื้นที่ขนาด 10 cm x 10 cm และฟองน้ำเซลลูโลสแบบแห้งและผ้าก๊อซใช้สวอบเก็บเชื้อในพื้นที่ขนาด 30 cm x 30 cm ในการทดสอบนี้ได้กำหนดขนาดพื้นผิวให้เหมาะสมกับขนาดและชนิดของ สวอบตามที่ U.S. Food and Drug Administration ได้แนะนำไว้

สวอบสำลีและสวอบโฟมพอลิยูรีเทนที่จุ่มอยู่ในหลอดปลอดเชื้อที่มีสารละลาย Buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ก่อนการทดลองให้ดึงสวอบขึ้นมาแตะกับด้านในของ

หลอดทดลองและบิดก้านสวอบไปมาจนหัวสวอบเปียกหมาดๆแล้วดึงออกจากหลอด ส่วนผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลสจุ่มในถุงปลอดเชื้อที่มี BPW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บิดสวอบให้หมาดก่อนแล้วค่อยนำออกจากถุง

3.4.3 การเตรียมตัวอย่างพื้นผิว

อ้างอิงจากวิธีของ Chaturongkasumrit et al. (2011) ในการทดลองใช้พื้นผิว 3 แบบ คือ เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) เกรด 304 พื้นผิว 2B และพอลีเอสเทอร์ยูรีเทน (polyesterurethane, PUR) แบบเก่าและใหม่ นำมาตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 10 cm x 10 cm สำหรับใช้สวอบด้วยสวอบสำลีและสวอบโฟมพอลิยูรีเทน แผ่นขนาด 30 cm x 30 cm สำหรับใช้สวอบด้วยผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลส (U.S. Food and Drug Administration) และขนาด 5 cm x 5 cm สำหรับใช้ทดสอบการสวอบไบโอฟิล์ม แผ่นพื้นผิวทั้งหมดทำความสะอาดด้วยฟองน้ำ วางทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นสเตนเลสไปฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อน (hot air oven) อุณหภูมิ 170°C นาน 1 ชั่วโมง แผ่นพอลิเอสเทอร์ยูรีเทนนำเข้าเครื่องฆ่าเชื้อ (autoclave) อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที นำออกมาวางไว้ให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อที่เปิดรังสีอัลตราไวโอเลต อย่างน้อย 30 นาทีก่อนทำการทดสอบ

1312347117

3.5 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากสวอบหลังจากการใส่เชื้อลงบนสวอบโดยตรง (Van Horn et al., 2008)

การใส่เชื้อบนสวอบสำลีและสวอบโฟมพอลิยูรีเทน โดยนำหลอดสารละลายแบคทีเรียที่มีจำนวนเริ่มต้นอยู่ประมาณ 10^6 CFU/ml ปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนหัวสวอบแต่ละอันที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4 สวอบสำลีใส่ให้ตัดเอาแต่หัวสวอบใส่กลับลงในหลอดที่มีสารละลาย BPW หลอดเดิม สวอบโฟมพอลิยูรีเทนให้นำสวอบใส่กลับลงในหลอด BPW หลอดเดิม นำหลอดทดลองทั้งหมดไป vortex นาน 1 นาที

การใส่เชื้อบนผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลส โดยนำหลอดสารละลายแบคทีเรียที่มีเชื้อเริ่มต้นอยู่ประมาณ 10^5 CFU/ml ปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนสวอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4 นำสวอบแต่ละอันใส่กลับลงในถุงที่มีสารละลาย BPW ถุงเดิม และนำไปเข้าเครื่อง stomacher ที่ 230 rpm นาน 1 นาที เนื่องจากพื้นที่ที่ใช้สำหรับสวอบมีขนาดต่างกัน การทดลองจึงควบคุมปริมาณเชื้อที่ใส่ลงบนพื้นผิวก่อนทำการสวอบให้มีจำนวนเท่ากันที่ระดับ 10^5 CFU/coupon การทดลองควบคุมใช้สารละลาย BPW ใส่บนหัวสวอบแทนสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกปล่อยออกจากสวอบด้วยวิธี spread plate technique โดยปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตรจากหลอดหรือถุง ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย peptone water 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ selective agar เพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดลองที่ได้ไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร ปิดฝาและ

คว่ำจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสม นาน 24-48 ชั่วโมง หลังจากบ่มแล้วให้นำมานับจำนวนโคโลนีที่มีจำนวนอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี และนำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อในสารละลาย 1 มิลลิลิตร (log CFU/ml) การทดลองทั้งหมดเป็นแบบแฟคทอเรียล โดยแต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ และการคำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการปล่อยแบคทีเรียของสวอบ ตามสมการที่ (1) การทดลองควบคุมใช้สารละลาย peptone water 0.1% ใส่บนพื้นผิวแทนสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

$$\left(\frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากสวอบแต่ละชนิด (log CFU/ml)}}{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใส่ลงบนสวอบ (log CFU/ml)}}\right) \times 100 \qquad (1)$$

3.6 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่เก็บได้จากพื้นผิวโดยใช้สวอบชนิดต่างๆ

วิธีนี้อ้างอิงจาก Moore and Griffith (2002a) โดยใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ระดับเซลล์ 10^5 CFU/coupon ลงบนพื้นผิวทั้ง 3 แบบและเกลี่ยให้ทั่ว โดยพื้นผิวที่ใช้ในการทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ขนาดเพื่อให้เหมาะสมกับขนาดของอุปกรณ์สวอบ ดังนี้ พื้นผิวขนาด 10 cm x 10 cm สำหรับสวอบด้วยสวอบโฟมโพลิยูรีเทนและสวอบสำลี พื้นผิวขนาด 30 cm x 30 cm สำหรับสวอบด้วยฟองน้ำเซลลูโลสและผ้าก๊อซ (U.S. Food and Drug Administration) จากนั้นใช้สวอบเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวทันที (สภาวะพื้นผิวเปียก) หรือปล่อยพื้นผิวให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมงแล้วจึงใช้สวอบเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิว (สภาวะพื้นผิวแห้ง) นำจำนวนแบคทีเรียที่เก็บได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการใช้สวอบเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิว

3.6.1 การสวอบขณะพื้นผิวทดสอบเปียก

สวอบสำลีและสวอบโฟมพอลิยูรีเทน นำหลอดแบคทีเรียที่มีเชื้อเริ่มต้นอยู่ประมาณ 106 CFU/ml ปิเปตเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนพื้นผิวแต่ละชนิด (ปลอดเชื้อ) ขนาด 100 cm^2 ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้ทั่วพื้นผิว (105 CFU/coupon) นำสวอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4 สวอบบนพื้นผิว โดยถือสวอบทำมุม 30 องศาจากพื้นผิว ลูบในแนวตั้ง แนวนอน และแนวทแยงอย่างละ 10 ครั้ง ตามรูปที่ 2.4 และ 2.5 ตัดหัวสวอบสำลีใส่หลอด BPW หลอดเดิม ส่วนสวอบโฟมพอลิยูรีเทนให้ใส่กลับลงในหลอดเดิมเช่นเดียวกัน นำหลอดทดลองทั้งหมดไป vortex นาน 1 นาที

ผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลส นำหลอดแบคทีเรียที่มีเชื้อเริ่มต้นอยู่ประมาณ 10^5 CFU/ml ปิเปตสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร (105 CFU/coupon) ใส่ลงบนพื้นผิวแต่ละชนิด ขนาด 30 cm x 30 cm ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่ว แล้วใส่ถุงมือปลอดเชื้อจับสวอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4 สวอบบนพื้นผิวแบบเดียวกับการสวอบด้วยสวอบสำลีและสวอบโฟมพอลิยูรีเทน จากนั้นนำสวอบใส่กลับลงในถุงเดิม นำไปเข้าเครื่อง stomacher ที่ 230 rpm นาน 1 นาที และนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate technique จำนวนโคโลนีที่ได้จากสวอบ (log CFU/coupon) ไปคำนวณหา

1312347117

เปอร์เซ็นต์จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการใช้สวอบเก็บเชื้อจากพื้นผิวต่างๆ ตามสมการที่ (2) การทดลองควบคุมใช้สารละลาย BPW ใส่บนพื้นผิวแทนสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

$$\left[\frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากสวอบ (log CFU/coupon)}}{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใส่ลงบนพื้นผิว (log CFU/coupon)}}\right] \times 100 \qquad (2)$$

3.6.2 การสวอบขณะพื้นผิวทดสอบแห้ง

การทดสอบทำเหมือนข้อ 3.6.1 แต่ให้ทำการสวอบหลังจากใส่เชื้อดังกล่าวแล้วเกลี่ยให้ทั่วบนพื้นผิว ปล่อยให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมองไม่เห็นสารละลายบนพื้นผิว คำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของสวอบในการเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวตามสมการที่ (2)

3.7 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่เก็บได้จากไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นบนพื้นผิวโดยใช้สวอบชนิดต่างๆ

การทดสอบนี้อ้างอิงวิธีจาก Chaturongkasumrit et al. (2011) โดยการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแต่ละชนิดบนพื้นผิวสัมผัสอาหารขนาด 5 cm x 5 cm เตรียมสวอบ ดังนี้ สวอบสำลีและสวอบโฟมพอลิยูรีเทนเตรียมตามวิธีจากข้อ 3.4 ผ้าก๊อซ (gauze) เตรียมโดยตัดผ้าก๊อซให้มีขนาด 6 cm x 6 cm พับให้มีความหนาเท่ากันจนมีขนาด 2 cm x 2 cm นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที (autoclave) และอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ฟองน้ำเซลลูโลสแบบแห้งปลอดเชื้อ (sponge) เตรียมโดยใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดให้มีขนาดประมาณ 2 cm x 2 cm ผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลสแต่ละอันจุ่มลงในถุงปลอดเชื้อที่มี BPW ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บิดสวอบทั้งหมดให้หมาดก่อนแล้วค่อยนำออกจากถุงไปเก็บไบโอฟิล์มบนพื้นผิว จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการสวอบนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการใช้สวอบเก็บไบโอฟิล์มจากพื้นผิว

3.7.1 การสร้างไบโอฟิล์ม

เตรียมแผ่นพื้นผิวทั้ง 3 แบบขนาด 5 cm x 5 cm ตามข้อ 3.4 (ปลอดเชื้อ) นำแผ่นตัวอย่างที่เตรียมแล้วใส่ลงในจานเพาะเชื้อ สร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อย (minimal medium) ดังนี้ ไบโอฟิล์มของ *L. monocytogenes* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Welshimer's broth (MWB) (Chaturongkasumrit et al., 2011) *S.* Typhimurium และ *S. aureus* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M63 (Ausubel et al., 1994) และ *E. coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M9 (Oh, Jo, Yang, & Park, 2007) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ให้ท่วมแผ่นตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อที่ระดับ 10^8 CFU/ml ปริมาตร 200 µl ใส่ตามลงไปในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาและนำไปบ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังนี้

L. monocytogenes บ่มที่ 30°C *S.* Typimurium *S. aureus* และ *E. coli* บ่มที่ 37°C นำไปบ่มนาน 24 ชั่วโมง

เตรียมพื้นผิวก่อนการสวอบเก็บไบโอฟิล์ม โดยล้างแผ่นตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้คีมปลอดเชื้อคีบแผ่นตัวอย่างออกจากจานเพาะเชื้อเดิมและใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อใหม่ ปิดฝาและหมุนจานเพาะเชื้อตามเข็มนาฬิกา ทวนเข็มนาฬิกา ชั้นลง และซ้ายขวา อย่างละ 10 ครั้ง ใช้คีมปลอดเชื้อคีบแผ่นตัวอย่างใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลาย BPW ปลอดเชื้อใหม่ 20 มิลลิลิตร การทดลองควบคุมเตรียมเหมือนกับตัวอย่างการทดลองแต่ไม่ใส่เชื้อลงไปในสารละลาย BPW

3.7.2 การสวอบไบโอฟิล์ม

นำสวอบที่เตรียมไว้สำหรับเก็บไบโอฟิล์มมาสวอบโดยใช้คีมปลอดเชื้อคีบแผ่นตัวอย่างขึ้นจากสารละลาย BPW ใช้สวอบสวอบบนพื้นผิวทั้งสองด้านโดยถือสวอบทำมุม 30 องศาจากพื้นผิว ลูบในแนวตั้ง แนวนอน และแนวทแยงอย่างละ 5 ครั้ง ใส่สวอบสำลีและโฟมพอลิยูรีเทนที่สวอบบนพื้นผิวแล้วกลับลงในหลอดเดิมและนำหลอดทั้งหมดไป vortex นาน 1 นาที ส่วนผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลสให้ใส่กลับลงในถุงเดิม นำไปเข้าเครื่อง stomacher ที่ 230 rpm นาน 1 นาที และนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate technique ส่วนแผ่นตัวอย่างที่สวอบแล้วให้ใส่คืนลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลาย BPW จากนั้นใช้ตัวขูด (scraper) ขูดบนผิวตัวอย่างทั้งสองด้าน ด้านละ 25 ครั้ง นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ไปนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate technique นำจำนวนเชื้อที่ได้จากสวอบและจากพื้นผิวไปคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการใช้สวอบเก็บไบโอฟิล์มจากพื้นผิว ตามสมการที่ (3) ดังนี้

$$\left(\frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากสวอบ (log CFU/coupon)}}{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากสวอบ (log CFU/coupon) + จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากพื้นผิว (log CFU/coupon)}}\right) \times 100 \qquad (3)$$

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองเป็นแบบ factorial design วิเคราะห์ข้อมูลด้วย SPSS version 17 นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ โดยเปรียบเทียบตัวแปรดังนี้ ชนิดของพื้นผิว (สเตนเลส พอลิเอสเทอร์ยูรีเทนเก่าและใหม่) ลักษณะพื้นผิวขณะสวอบ (เปียกและแห้ง) และชนิดของสวอบ (สำลี โฟมพอลิยูรีเทน ผ้าก๊อซและฟองน้ำเซลลูโลส) มีผลต่อการเก็บแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด คือ *S.* Typimurium *S. aureus E. coli* และ *L. monocytogenes*