รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2541. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย SPSS for Windows. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 213 – 234. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์. 2538. วิธีรวดเร็วในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในกุ้งกุลาดำ PENAEUS MONODON FABICIUS สด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ และมรณี ตุ้ยเต็มวงศ์. 2537. Rapid Methods และ Automation สำหรับจุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน. 2528. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมไก่สดเยือกแข็ง (มอก. 590 – 2528). กรุงเทพมหานคร: กระทรวงอุตสาหกรรม.

วิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, สำนัก. 2542. ไก่เนื้อ : ปริมาณการผลิต การบริโภค และ การส่งออก ปี 2531 – 2541. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิจัยสินค้าและการตลาด 2, กอง. 2538. ไก่เนื้อ. วารสารเศรษฐกิจการพาณิชย์. กรุงเทพมหานคร : กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2536. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: New Touch Media Corporation.

ศุลกากร, กรม. 2541. ไก่เนื้อ : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกไก่สดแช่เย็นแช่แข็ง ปี 2537 – 2540 แยกรายประเทศ. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงพาณิชย์.

สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร, บรรณาธิการ. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ศิริยอด (ประเทศไทย) จำกัด.

ภาษาอังกฤษ

Ang, C. Y. W. , Liu, F. , Townsend, W. E. , and Fung, D. Y. C. 1994. Sensitive catalase test for end-point temperature of heated chicken meat. J. Food Sci. 59(3): 494 - 497.

Asru, K. 1972. Colorimetric assay of catalase. Anal. Biochem. 47: 389 – 394.

Ayres , J. C. , Ogilvy , W. S. , and Stewart , G. F. 1950. Postmortem changes in stored Meats I. microorganisms associated with development of slime on eviscerated cut-up poultry. Food Tech. 4: 199 – 203.

Beishir, L. 1991. Microbiology in Practice. 4th ed. New York: Harper Collins Publisher.

Boismenu, D. , Lepine, F. , Gagnon, M. , and Dugas, H. 1989. Heat inactivation of catalase from cod muscle and from psychrophilic bacteria. J. Food Sci. 55(2): 581 - 582 .

Boismenu, D. , Lepine, F. , Thibault, C. , Gagnon, M. , Charbonneau, R. , and Dugas, H. 1991. Estimation of bacterial quality of cod fillets with the disc flotation method. J. Food Sci. 56(4): 958 – 961.

Bonnichsen, R. K. 1947. A comparative study of the blood and liver catalase from the horse. Archives of Biochem. and Biophys. 12: 83 – 94.

Bonnichsen, R. K. , Chance, B. , and Theorell, H. 1947. Catalase activity. Acta Chemica Scand. 1: 685 – 709.

Brown, M. H. , ed. 1982. Meat Microbiology. London : Applied Science Publishers Ltd.

Chance, B. 1952. The effect of pH upon the equilibria of catalase compounds. J. Biol. Chem. 194: 483 – 494.

Chance, B. , and Herbert, D. 1950. The Enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxides. Biochem. J. 46: 402 - 414.

Charbonneau, R. , Therrien, J. and Gagnon, M. 1975. Detection and measurement of Bacterial catalase by the disk-flotation method using the catalasemeter. Can. J. Microbiol. 21: 580 - 582.

Cohen, G. , Dembiec, D. , and Marcus, J. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 34: 30 – 38.

Dodds, K. L. , Holley, R. A. , and Kemoton, A. G. 1983. Evaluation of the catalase and limulus amoebocyte lysat test for rapid determination of the microbial quality of vacuum–packed cooked turkey. Can. Ins. Food Sci. and Tech. J. 16: 167 – 172.

Finn, G. J. , and Condon, S. 1975. Regulation of catalase synthesis in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 123: 570 – 579.

Fung, D. Y. C. 1993. Handbook for Rapid Method and Automation in Microbiology Workshop. July, 16 - 23. Manhattan: Kansas State University.

Fung, D. Y. C. 1994. Rapid methods for measurement and enumeration of microbial contamination. In A. M. Pearson and T. R. Dutson (ed.), Advance in Meat Research Vol. 9 : Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products, pp. 404 – 440. London: Chapman & Hall.

Fung, D. Y. C. , and Petrishko, D. T. 1973. Capillary tube catalase test. J. Appl. Microbiol. 26(4): 631 – 632.

Gagnon, M. , Baril, M. Gros D 'Aillon, F. , and Savoie, C. 1977. Catalasimeter with Time Measuring Curcuitry for Determining Reaction Concentration Level. U.S. Patent 4015121

Gagnon, M. , Hunting, W. M. , and Esselen, W. B. 1959. New method for catalase determination. Anal. Chem. 31: 144 – 146.

George, P. 1948. A comparison of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase, ferrous and ferric ions. Haemin and ferrous phthalocyanine. Biochem. J. 43: 287 – 295.

Gill, C. O. 1986. The control of microbial spoilage in fresh meats. In A. M. Pearson and T. R. Dutson (ed.), Advances in Meat Research Vol. 2 : Meat and Poultry Microbiology, pp. 49 – 88. Connecticut: The AVI Publishing.

Gill, C. O. , and Newton, K. G. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. 43: 189 – 195.

Gottschalk, G. 1986. Bacterial Metabolism. 2nd ed. New York: Springer – Verlag Inc.

Hassan, H. M. , and Fridovich. , I. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 253: 6445 – 6450.

Holt, J. G. , ed. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins.

Jones, P. , and Suggett, A. 1968. The catalase – hydrogen peroxide system. J. Biochem. 110: 621 – 629.

Kraft, A. A. 1986. Psychrotrophic organisms. Advances in Meat Research Vol. 2: Meat and Poultry Microbiology, pp. 191 – 208. Connecticut: The AVI Publishing.

Kustyawati, M. E. 1991. Application of the catalase test for microbial estimation of ground beef and fermented food. Master's Thesis, Department of Animal Sciences and Industry, Kansas State University.

Lie, J. T. 1967. Urinary catalase testing : A simple screening test for significant bacteriuria. The Medical J. of Aus. 9: 497 – 499.

Lonne, D. C. 1969. A rapid test for determining the quality of raw refrigerated milk. The Aus. J. Dairy Tech. 24: 66 – 68.

Marie, A. , and Parak, F. 1980. Factors affecting the growth and catalase synthesis in *Micrococcus luteus* cells. Hoppe – Seyler's Zeitschrift fur Physiol. Chemie. 361: 603 – 606.

Nagel, C. W. , Simpson, K. L. , Ng, H. , Vaughn, R. H. , and Stewart, G. F. 1960. Microorganisms associated with spoilage of refrigerated poultry. Food Technol. 14: 21 – 23.

Patterson, J. T. 1972. Microbiological sampling of poultry carcasses. J. Appl. Bacteriol. 35: 569 – 575.

Strother, G. K. and Ackerman, E. 1961. Physical factors influencing catalase rate constants. Biochem. et Biophys. Acta. 47: 317 – 326.

Thomas, C. J. , and McMeekin, T. A. 1980. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures : an electron microscopic study. Appl. Environ. Microbiol. 40(1): 133 – 144.

Voneuler, H. , and Josephson, K. 1926. The catalase. J. Justus Liebigs Annalen. de Chemie. 450: 158 - 181.

Walker, H. W. , and Ayres, J. C. 1956. Incidence and kinds of microorganisms associated with commercially dressed poultry. J. Appl. Microbiol. 4: 345 – 349.

Walsh, C. 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms. pp. 488 – 495. San Francisco: W. H. Freeman and Company.

Wang, G. I. J. , and Fung, D. Y. C. 1986. Feasibility of using catalase activity as an index of microbial loads on chicken surfaces. J. Food Sci. 51(6): 1442 – 1444.

Whitaker, J. R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.

Whittenbury, R. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol. 35: 13 – 26.

Willitts, R. E. 1965. An evaluation of the catalase test for the detection of mastitis milk Diss. Abstr. 26(2): 586.

Willitts, R. E. , and Babel, F. J. 1965. Disc flotation test for measurement of catalase activity in milk. J. Dairy Sci. 48: 1287 – 1289.

Wong, D. W. S. 1995. Food Enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman & Hall.

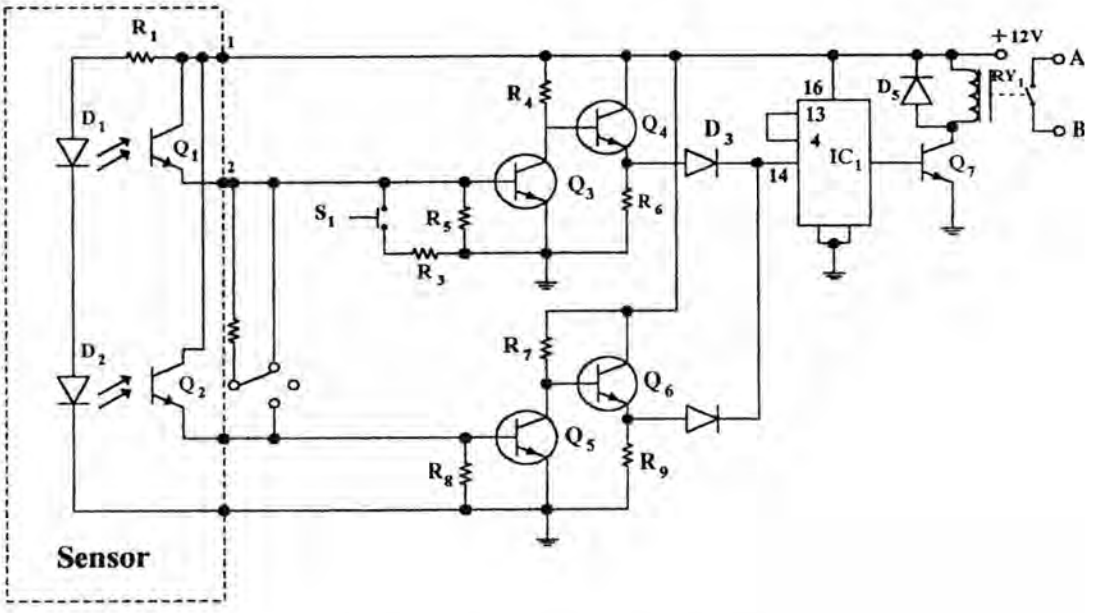
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Catalasemeter

ก 1 รายละเอียดของส่วนประกอบของเครื่อง Catalasemeter

1. ชุด Sensor และ วงจร Control



รูปที่ 16 ชุด Sensor และวงจร Control ของ Catalasemeter

สัญลักษณ์อุปกรณ์

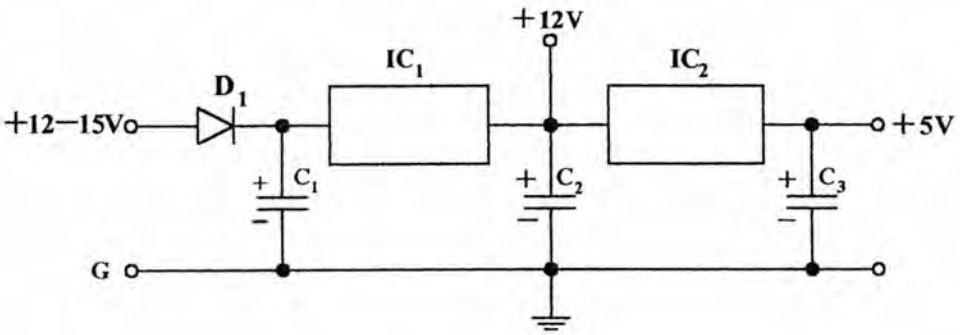
Q_1 , Q_2	Photo transistor
Q_3 - Q_7	Transistor
D_1 , D_2	Infrared Diode
D_3 , D_4 , D_5	Diode

IC_1	ไอซี
Ry_1	Relay
R_1 - R_9	Resistor
S_1	Start/Stop Switch
S_2	3 Way Selector Switch

การทำงานของชุด Sensor และชุด Control

การทำงานแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ชุด Sensor 1 ส่วน และชุด Control อีก 2 ส่วนโดยรับสัญญาณจากชุด Sensor จะมี Selector Switch เป็นตัวเลือกว่าจะใช้ Sensor ตัวไหนทำงาน ถ้าเป็นตำแหน่ง A ก็จะกำหนดให้จุด A ทำงาน ตำแหน่ง AB และที่ตำแหน่ง B ก็จะทำงานเฉพาะ B เมื่อมีสัญญาณเข้ามาที่ตำแหน่ง 2,3 Q_3 , Q_4 , Q_5 , Q_6 ทำงานก็จะทำให้มีสัญญาณผ่าน D_3 , D_4 ป้อนเข้าขา 14 ของ IC_1 จะทำงานเป็น 2 จังหวะคือ เมื่อมีสัญญาณเข้ามาตรงขา 14 ครั้งแรก Q_7 จะ On และทำงานค้างไว้จนกว่าจะมีสัญญาณเข้ามาอีกครั้งจึงจะ Off

2. ชุด Regulator

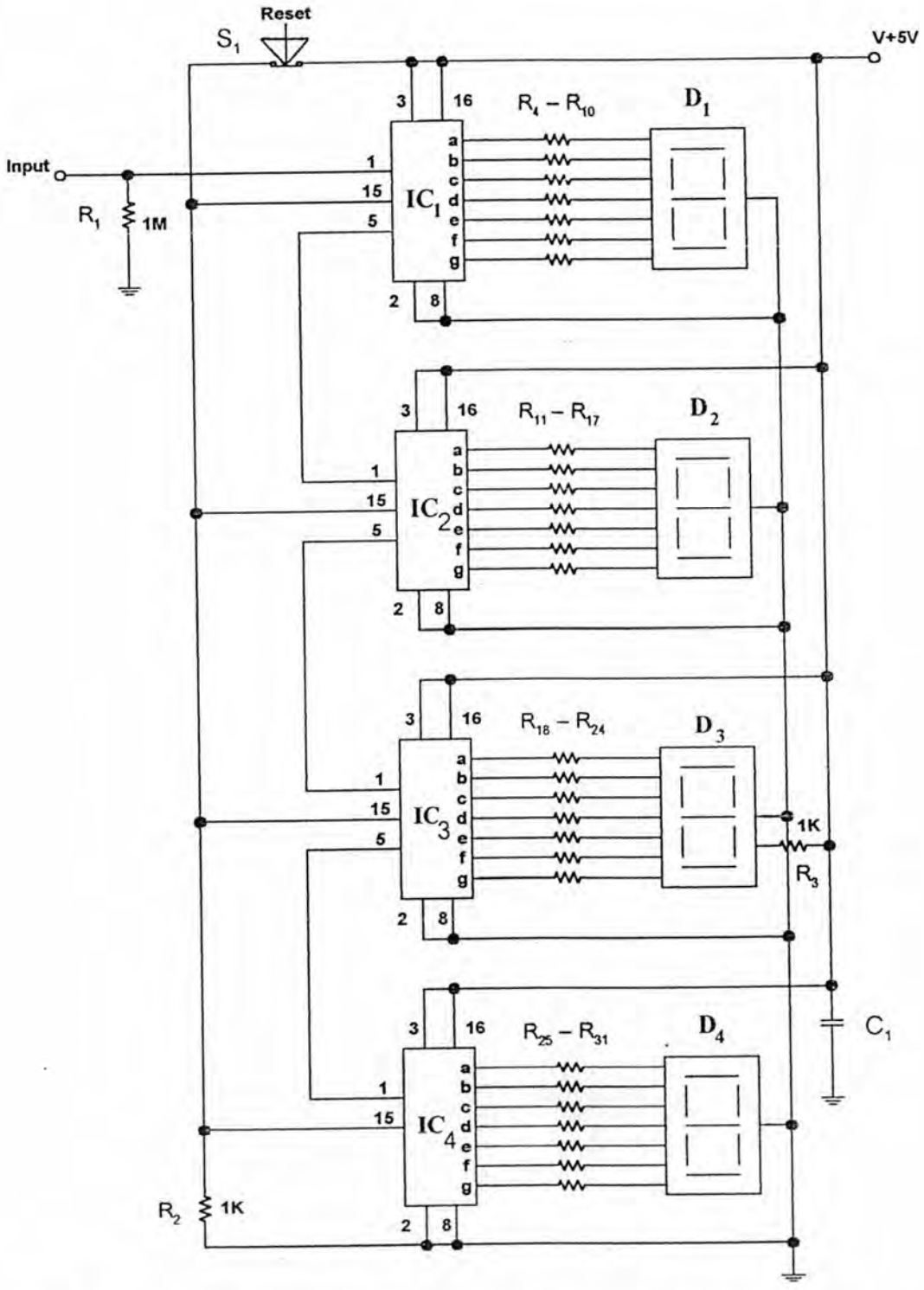


รูปที่ 17 ชุด Regulator ของ Catalasemeter

สัญลักษณ์อุปกรณ์

D_1	Diode
IC_1 - IC_2	ไอซี
C_1 , C_2 , C_3	Capacitor

3. วงจรนับและแสดงผล (Counter and Display)



รูปที่ 18 วงจรนับและแสดงผล (Counter and Display) ของ Catalasemeter

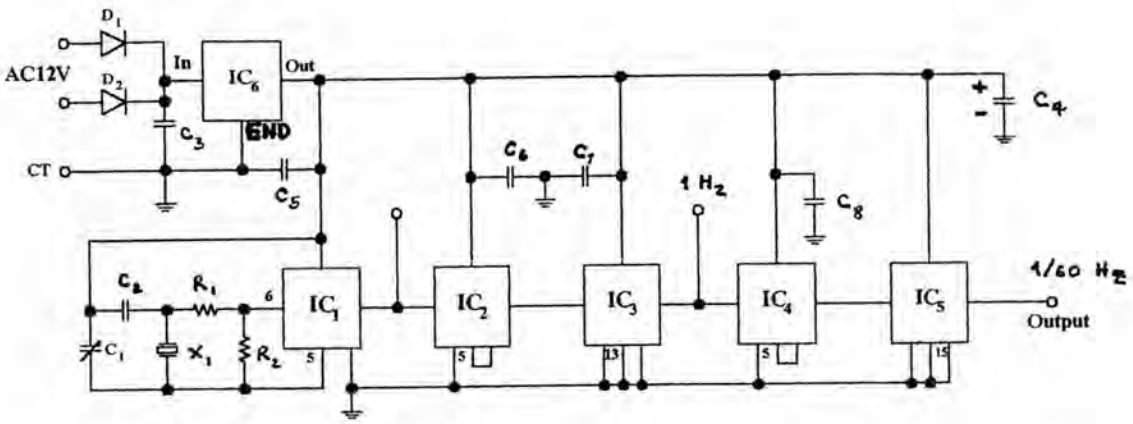
สัญลักษณ์อุปกรณ์

$IC_1 - IC_4$	ไอซี
$D_1 - D_4$	7 Segment LED Display Common Cathode
$R_1 - R_{31}$	Resistor
C_1	Capacitor
S_1	Switch

การทำงานของวงจรนับและแสดงผล

ไอซี (IC_{1-4}) จะทำหน้าที่เป็นตัวนับสัญญาณที่เข้ามาทางขา 1 ของ IC_1 ซึ่งสามารถนับได้จำนวน 999.99 หลัก โดยมี R_3 เป็นตัวป้อนกำหนดหลักทศนิยม และ S_1 ทำหน้าที่ reset วงจร

5. วงจรกำเนิดความถี่สัญญาณนาฬิกา (Clock Generator)



รูปที่ 19 วงจรกำเนิดความถี่สัญญาณนาฬิกา (Clock Generator) ของ Catalasemeter

สัญลักษณ์อุปกรณ์

IC_1 - IC_6	ไอซี
D_1 , D_2	Diode
R_1 , R_2	Resistor
X_1	X-tal
C_1 - C_8	Capacitor

การทำงานของวงจรกำเนิดความถี่สัญญาณนาฬิกา

เมื่อป้อนไฟ AC 12 V ผ่าน IC_6 IC_6 ก็จะทำการ Regulate ให้แรงไฟคงที่ เพื่อป้อนให้กับอุปกรณ์ตัวอื่นๆต่อไป IC_1 จะเป็นตัวกำเนิดความถี่ออกมาตรงขา 1 60 Hz โดยมี IC_2 และ IC_3 เป็นตัวหารความถี่ให้เหลือ 1 Hz และ IC_4 กับ IC_5 จะเป็นตัวหารความถี่ให้เหลือ 1/60 Hz เพื่อจะป้อนให้กับวงจรนับเพื่อแสดงผลต่อไป

ก 2 วิธีการใช้เครื่องมือ Catalasemeter

- วางหลอดทดสอบซึ่งบรรจุสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในช่องวางหลอดของเครื่องมือ
- เปิดเครื่อง /ON
- กดปุ่ม RESET ให้ตัวเลขบอกเวลาเป็น 0000
- ใช้ micropipette ดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแอคติวิตีของคะตะเลสแล้วถ่ายลงสู่แผ่น paper disc
- หย่อนแผ่น paper disc ที่ดูดซับสารละลายตัวอย่างแล้ว ลงในหลอดทดสอบของเครื่องมือ โดยควรหย่อนในแนวตั้งฉากกับผิวหน้าของสารละลายในหลอดทดสอบ เพื่อลดแรงต้าน ช่วยให้แผ่น paper disc จมตัวลงสู่ก้นหลอดทดสอบได้ดี เครื่องจะเริ่มจับเวลาเมื่อแผ่นpaper disc ผ่าน sensor beam
- เมื่อเวลาของเครื่องหยุดเดิน จะสิ้นสุดการวัดแอคติวิตี ตัวเลขที่อ่านได้คือFlotation Time (FT) มีหน่วยเป็นวินาที

<u>หมายเหตุ</u> : เมื่อใช้ทดสอบตัวอย่างไปจำนวนหนึ่ง ให้สังเกตว่า ถ้าเริ่มมีฟองก๊าซจับอยู่บริเวณด้านในของหลอดทดสอบมาก ควรเปลี่ยนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในหลอดใหม่ เพื่อป้องกันไม่ให้ฟองก๊าซเหล่านี้รบกวนการจมและลอยของแผ่น paper disc ซึ่งจะทำให้การจับเวลาคลาดเคลื่อนได้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ข 1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1) บอริก-ซิตริก-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.0-12.0

สารละลาย A : สารละลาย H_3BO_3 ความเข้มข้น 0.20 โมลต่อลิตร

สารละลาย $H_3C_6H_5O_7.H_2O$ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร

สารละลาย B : สารละลาย $Na_3PO_4.12H_2O$ ความเข้มข้น 0.10 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามตารางที่ ข 1

ตารางที่ ข 1 การเตรียมสารละลายบอริก – ซิตริก ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ จากสารละลายที่เตรียมไว้สองชนิด

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
2.0	975	25
3.0	880	120
4.0	775	225
5.0	670	330
6.0	590	410
7.0	495	505
8.0	425	575
9.0	345	655
10.0	270	730
11.0	220	780
12.0	85	915

2) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0-8.0

สารละลาย A : สารละลาย $Na_2HPO_4.12H_2O$ ความเข้มข้น 0.20 โมลต่อลิตร

สารละลาย B : สารละลาย $NaH_2PO_4.H_2O$ ความเข้มข้น 0.20 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามตารางที่ ข 2

ตารางที่ ข 2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH ต่าง ๆ จากสารละลายที่เตรียมไว้สองชนิด

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
6.0	123	877
7.0	610	390
8.0	947	53

หมายเหตุ - ปรับ pH ให้แน่นอน โดยใช้สารละลาย A หรือ B ของบัฟเฟอร์แต่ละชนิด

- นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข 2 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ดัดแปลงจากวิธีของ Dodds , Holley และ Kemoton (1983) มีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 10^{-6} โมลต่อลิตร โดยละลาย EDTA 14.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2) เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เติมสารละลาย EDTA ที่เตรียมในข้อ 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อจนได้ 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3

ภาคผนวก ค

การเตรียมตัวอย่าง

ค 1 การเตรียมคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดชิ้นตัวอย่างเนื้อไก่โดย aseptic technique เอาเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อภายใน
2. ปั่นใน blender ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยความเร็วสูงนาน 3 นาที โดยรักษาอุณหภูมิของ blender ให้เย็นอยู่เสมอด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ได้ไว้ แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปผสมในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมตัวอย่าง
4. นำ slurry ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยง แยกเอาเฉพาะส่วนใส

ค 2 การเตรียมคะตะเลสจากเลือดไก่ มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้เข็มเจาะเลือด เจาะเลือดจากไก่ที่มีสุขภาพดี
2. เจือจางโดยใช้ sterile normal saline (0.85% NaCl solution) อัตราส่วน 1 : 10

ค 3 การเตรียมแบคทีเรียสำหรับตรวจสอบสมบัติของคะตะเลส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จาก stock ในหลอดอาหารเอียง ลงเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ง

การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

ง 1 การเตรียม dilution fluid : 0.1% peptone saline solution

ชั่ง peptone จำนวน 1 กรัม และ sodium chlorice จำนวน 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ง 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้วิเคราะห์

ชั่งผงอาหาร Standard Plate Count Agar สำเร็จรูป (Oxoid, England) 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร (pH 7.0 $\pm$ 0.2) นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ก่อนใช้

ง 3 วิธีการ

1) การเก็บตัวอย่าง และ การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่าง

1. จุ่มส่วนปลายของ forceps บริเวณที่จะใช้คีบตัวอย่างลงใน alcohol แล้วยกขึ้น จุดไฟไล่ alcohol ให้หมด
2. ใช้ forceps ที่ sterile แล้วนี้ คีบชิ้นตัวอย่างใส่ลงในถุงพลาสติก sterile โดยระวังไม่ให้ตัวอย่างสัมผัสกับบริเวณปากถุง
3. นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักไว้เพื่อคำนวณหาปริมาตรของ dilution fluid ที่จะต้องเติมลงไป
4. เติม dilution fluid ที่ใช้คือ 0.1 % peptone saline solution (วิธีเตรียม แสดงในภาคผนวก ง 1) ลงในถุงตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1 กรัมตัวอย่าง ต่อ dilution fluid 1 มิลลิลิตร

5. เขย่าอย่างแรง พร้อมทั้งใช้มือตีนวดตัวอย่างในถุงไปด้วยนาน 2 นาที จะได้ตัวอย่างเข้มข้น 1:2 นำไปหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และใช้ทดสอบแอคติวิตีของคะตะเลสต่อไป

2) การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total plate count)

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างในถุงปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เข้มข้น 1: 2) ลงในสารละลาย dilution fluid (0.1 % peptone saline solution) 5 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10
2. ทำ ten fold dilution ต่อไปเป็น 1:100,1:1000,...
3. pour plate ด้วย plate count agar (PCA)
4. บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3) การหาจำนวน total psychrotroph count

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างในถุงปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เข้มข้น 1:2) ลงในสารละลาย dilution fluid (0.1 % peptone saline solution) 5 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10
2. ทำ ten fold dilution ต่อไปเป็น 1:100,1:1000,...
3. pour plate ด้วย plate count agar (PCA)
4. บ่มที่อุณหภูมิ 7-10 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

ภาคผนวก จ

การจัดกลุ่มแบคทีเรีย

จ 1 การสุ่มตัวอย่างโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

1. นำ suspension ที่แยกจากตัวอย่างตามวิธีการในภาคผนวก ง 3 ข้อ 1) มาทำการเจือจาง แล้วเพาะเชื้อโดยวิธี spread plate
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง เลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีในช่วงที่เหมาะสม คือ 30 – 300 โคโลนี
3. สังเกตลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น สุ่มตัวอย่างมาเพื่อทดสอบ จำนวนร้อยละ 10 ของจำนวนโคโลนีทั้งหมดในจานนั้น โดยเขี่ยเชื้อไปทำการ streak plate ใหม่ให้โคโลนีเดี่ยว
4. เขี่ยเชื้อเก็บไว้ในหลอดอาหารเอียง เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

จ 2 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการทำ Gram's stain (Beishir , 1991)

มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ loop เขี่ยเชื้อมา smear บน slide ที่สะอาด
2. ปล่อยให้แห้ง แล้ว heat fixed
3. หยด crystal violet ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
4. หยด iodine solution ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
5. ล้างด้วย 95% ethanol โดยเอียง slide หยด ethanol ให้ไหลผ่านจนสีเริ่มจางลง แล้วล้างด้วยน้ำ
6. หยด Saffranin O ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
7. ซับให้แห้ง

นำ slide ที่ได้ไปส่องดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

จ 3 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

Oxidase test (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้วลากไปมาบนกระดาษกรองที่อิ่มด้วย 1% tetramethyl –p- phenylenediamine dihydrochloride

ผลบวก เกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Oxidation – Fermentation Test (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

อาหารทดสอบที่ใช้ คือ Hugh and Leifson's O – F medium ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้

ส่วน basal medium ประกอบด้วย

Peptone	2.0 กรัม
K_2HPO_4	0.3 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
Agar	3.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบของ basal medium ทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.1 แล้วเติม Bromthymol blue 1.6 % จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงไปเป็น indicator เติม glucose 10 กรัม ลงผสมในอาหาร สีของอาหารจะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน บรรจุใส่หลอดทดสอบ หลอดละประมาณ 6 – 7 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

การทดสอบทำโดยปลูกเชื้อลงในอาหารโดยการแทงตรงลงไป ตัวอย่างละ 2 หลอด หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในภาวะไม่มีอากาศ โดยเทพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดทับผิวหน้าอาหาร สูงประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มตัวอย่างทั้ง 2 หลอด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง ดูผลการเปลี่ยนสีของ indicator ในอาหารดังนี้

อาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลืองเฉพาะหลอดที่มีอากาศ(ไม่ได้เทพาราฟินทับ)= oxidation

อาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลืองทั้ง 2 หลอด= fermentation

ภาคผนวก ฉ

การวัดระดับการสร้างคะตะเลสของแบคทีเรีย
โดยวิธี Capillary tube catalase test (Fung และ Petrishko, 1973)

มีวิธีการดังนี้

1) บรรจุสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 3 ในหลอด capillary ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยจุ่มหลอด capillary ลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลาย สารละลายจะไหลเข้าสู่หลอด capillary ด้วย capillary force ให้มีปริมาตรสารละลายในหลอดสูงประมาณ 20 มิลลิเมตร
2) แตะปลายหลอด capillary ที่เตรียมไว้ลงบนโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอด อ่านผลเป็น
   +++ = มีฟองก๊าซเกิดขึ้นเต็มหลอด capillary
   ++ = มีฟองก๊าซเกิดขึ้นประมาณ 1/2 ของหลอด capillary
   + = มีฟองก๊าซเกิดขึ้นประมาณ 1/4 ของหลอด capillary
   - = ไม่เกิดฟองก๊าซ

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ทิพา สายดาราสมุทร เกิดเมื่อวันที่ 7 เมษายน พ.ศ. 2516 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2537 และ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538