ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ลักษณะทางด้านกายภาพ

1. การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) (Sprint Novasina TH-500, Switzerland)
2. can สำหรับวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างปลาสลิดแดดเดียวที่จะทำการวัดโดยบดให้ละเอียดแล้วใส่ลงใน can ประมาณ ½ ของความสูงของ can
2. เปิดเครื่องและรอให้เครื่อง warm จนกว่าเครื่องจะขึ้นคำว่า NOVASINA จึงเริ่มทำการวัดตัวอย่างได้
3. ใช้ปากคีบตัวอย่างใส่ลงไปในเครื่อง ปิดฝาเครื่องให้สนิทแล้วกดปุ่ม start ค้างไว้
4. เมื่อไฟสีเหลืองกระพริบที่ Analyzing รอให้เครื่องวัดตัวอย่างต่อไปจนไฟสีเหลืองเปลี่ยนมาขึ้นที่ O.K.
5. จดค่า a_w ที่เครื่องทำการวัดค่าได้ถ้าต้องการวัดตัวอย่างใหม่ให้กดปุ่มที่ stop แล้วทำการเปลี่ยนตัวอย่าง และทำตามข้อ 3 และข้อ 4 ต่อไป
6. เมื่อวัดตัวอย่างเรียบร้อยแล้วทำความสะอาดและปิดเครื่องให้เรียบร้อย

ภาคผนวก ข
วิธีการตรวจสอบทางด้านจุลินทรีย์

1. การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (BAM online 2001)

1.1 ชั่งตัวอย่างปลาสลิดแดดเดียวมา 50 กรัม เติมสารละลาย 0.1 % Peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:10 ตีป่นอาหารโดยใช้ stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ 1:100 และ 1:1000

1.2 ดูดตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ความเข้มข้นละ 2 จาน

1.3 ทำการ Pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar (PDA) แล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

1.4 นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 15-150 โคโลนี จดบันทึกโคโลนีที่นับได้ทั้งหมด และระดับความเจือจางที่นับได้ คำนวณ และรายงานผลเป็นจำนวนยีสต์และราต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g)

2 การตรวจวิเคราะห์ *Escherichia coli* (*E.coli*) โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM online 2002)

2.1 ชั่งตัวอย่างปลาสลิดแดดเดียวมา 50 กรัม เติมสารละลาย 0.1 % Peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:10 ตีป่นอาหารโดยใช้ stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ 1:100 และ 1:1000

2.2 ปิเปตตัวอย่างอาหารครั้งละ 1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ใส่ในหลอด Lauryl sulfate tryptose broth : LSTB (พร้อมหลอดดักก๊าซ ที่ความเข้มข้น 1 เท่า) โดยใช้ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 ตรวจดูการเจริญโดยสังเกตความขุ่นและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

2.5 นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือ หลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซอย่างน้อย ¼ ของหลอดดักก๊าซ

2.6 ทำการตรวจวิเคราะห์ และหาค่า MPN ของแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้ loop ถ่ายตัวอย่างในหลอดที่ให้ผลบวก ลงในอาหาร EC broth พร้อมหลอดดักก๊าซ จำนวน 1 loop โดยถ่าย 1 หลอดที่ให้ผลบวก ต่อหนึ่งหลอดของ EC broth

2.7 บ่มที่อุณหภูมิ 44.5 ±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.8 ตรวจดูการเจริญโดยสังเกตความขุ่น และการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

2.9 นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือ หลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซอย่างน้อย ¼ ของหลอดดักก๊าซ

2.10 นำมาหาค่า MPN โดยนับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละระดับความเจือจางจากจำนวนหลอดที่ทดสอบทั้งหมด ตัวเลขที่ได้จะเป็นเลข 3 ตัว โดยเรียงผลของชุดความเข้มข้นที่มากที่สุดไปหาน้อยที่สุด

2.11 นำตัวเลขไปเทียบเคียงในตาราง MPN เพื่อหาค่า MPN ของแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม

2.12 ทำการตรวจวิเคราะห์และหาค่า MPN ของแบคทีเรีย *E.coli*

2.13 Streak เชื้อจากหลอด EC broth ทุกหลอดที่ให้ผลบวกลงอาหาร EMB agar (Eosin methylene blue agar)

2.14 บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.15 สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีผิวหน้าเรียบ แห้ง สีน้ำตาลอมดำ อาจมีเงาโลหะ (metallic sheen) ปรากฏ

2.16 เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบ IMViC Test และย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) โดย *E.coli* จะให้ผลการทดสอบ IMViC Test เป็น + + - - หรือ - + - - และติดสีแกรมลบ ท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์

2.17 หาค่า MPN ของ *E.coli* โดยนับจำนวนหลอดที่ให้ลักษณะโคโลนีของ *E.coli* ใน EMB agar และให้ผลทดสอบ IMViC Test เป็น + + - - หรือ - + - - และติดสีแกรมลบ ท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์

2.18 นำตัวเลขที่ได้ไปเปิดตาราง MPN เพื่อหาค่า MPN ของ *E.coli*

3. การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (BAM online 2001)

3.1 ชั่งตัวอย่างปลาสลิดแดดเดียวมา 50 กรัม เติมสารละลาย 0.1 % Peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:10 ตีป่นอาหารโดยใช้ stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างจนถึง 10^{-6}

3.2 ดูดตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird-Parker Egg Yolk-Tellurite Medium

3.3 ทำการ spread plate แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4 สังเกตลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหาร Baird-Parker Egg Yolk-Tellurite Medium ซึ่งจะมีสีเทา ดำ นูน กลม ขอบเรียบ มี Opaque zone แล้วล้อมรอบด้วย Clear zone 2-3 mm

3.5 ทำการทดสอบ Coagulase test โดยนำโคโลนีที่สงสัยเลี้ยงในอาหาร BHI 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาเติม coagulase plasma อีก 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มต่ออีก 6-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาดูผลการแข็งตัวของ coagulase plasma

*** การอ่านผล : Negative ไม่มีการแข็งตัว
1 – Positive มีตะกอนเล็กน้อย
2 – Positive มีการ clot เล็กน้อย
3 – Positive มีการ clot มากขึ้น
4 – Positive มีการ clot ทั้งหลอด คว่ำหลอดแล้วไม่มีการไหลออกมา

3.6 คำนวณ และรายงาน S. *aureus* ต่อกรัม ของตัวอย่างอาหาร