เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ
Total Coliforms & *Escherichia coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็ง

นางสาว ทัศนีย์ กองแก้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546
ISBN 974-17-3746-7
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF CONVENTIONAL METHOD AND RAPID METHODS FOR THE ENUMERATION OF TOTAL PLATE COUNT AND TOTAL COLIFORMS & *Escherichia coli* IN FROZEN CHICKEN, SHRIMP AND SURIMI

Miss Thassanee Kongkaeow

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003
ISBN 974-17-3746-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อการแจงนับจุลินทรีย์รวม และ Total Coliforms & *Escherichia coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิ แช่เยือกแข็ง
โดย	นางสาว ทัศนีย์ กองแก้ว
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

…… กรรมการ
(นาง เพ็ญศรี รอดมา)

…… กรรมการ
(นาง ศศิธร สุวรรณสนธิชัย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทัศนีย์ กองแก้ว : เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *Escherichia coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็ง (COMPARISON OF CONVENTIONAL METHOD AND RAPID METHODS FOR THE ENUMERATION OF TOTAL PLATE COUNT AND TOTAL COLIFORMS & *Escherichia coli* IN FROZEN CHICKEN, SHRIMP AND SURIMI) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 104 หน้า. ISBN 974-17-3746-7.

วัตถุประสงค์ในการวิจัยที่สำคัญมี 2 ประการ คือ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของขั้นตอนการแช่เยือกแข็งในการลดปริมาณจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็ง และเพื่อเปรียบเทียบวิธีมาตรฐาน (Plate Count Agar, PCA) กับวิธีรวดเร็ว ได้แก่ SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator (STPC-CI) และ Petrifilm™ Aerobic Count Plate (PAC) เพื่อแจงนับปริมาณจุลินทรีย์รวม รวมทั้งเปรียบเทียบวิธีมาตรฐาน(Most Probable Number, MPN) กับวิธีรวดเร็ว ได้แก่ SimPlate™ Total Coliform & *E. coli* (SCEc), Petrifilm™ *E. coli*/ Coliform Count Plate (PEC), Chromocult™ Coliform Agar (CCA) ในการแจงนับ Coliforms & *E. coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็งเพื่อนำผลไปประเมินและประยุกต์ใช้วิธีรวดเร็วในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม

การแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งจำนวน 300 ตัวอย่าง พบว่าขั้นตอนการแช่เยือกแข็งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ จุลินทรีย์ปนเปื้อน ในการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วโดยวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอยเชิงเส้น พบว่าวิธีดังกล่าวมีปฏิสัมพันธ์กันในระดับสูง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการแจงนับจุลินทรีย์รวมมีค่า 0.95-0.96, slopes มีค่า 0.98-1.04 และตัดแกน Y ที่จุด 0.04-0.27 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในการแจงนับ Coliforms & *E. coli* มีค่า 0.79-0.89, slopes มีค่า 0.80-0.91 และตัดแกน Y ที่จุด 0.65-1.30 นอกจากนี้การแจงนับ Coliforms พบผลบวกเท็จ 3.56%, 7.56%, 4.76% และ 6.40% ส่วนการแจงนับ *E. coli* พบผลบวกเท็จ9.95%, 13.68%, 3.98% และ 25.56% ในวิธี MPN, SCEc, PEC และ CCA ตามลำดับ

ดังนั้น วิธีรวดเร็วเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* และสามารถทดแทนวิธีมาตรฐานในการแจงนับจุลินทรีย์ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็งได้

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....
สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....-.....

4372271023 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEY WORD: TOTAL COLIFORMS / *Escherichia coli* / TOTAL PLATE COUNT / CONVENTIONAL METHOD / RAPID METHOD

THASSANEE KONGKAEOW : COMPARISON OF CONVENTIONAL METHOD AND RAPID METHODS FOR ENUMERATION OF TOTAL PLATE COUNT AND TOTAL COLIFORMS & *Escherichia coli* IN FROZEN CHICKEN, SHRIMP AND SURIMI. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph. D.,104 pp. ISBN 974-17-3746-7.

Two main purposes of this study are firstly to assess the efficiency of the freezing procedure whether it can decrease total bacteria and total Coliforms & *E. coli* in frozen chicken, shrimp and surimi. Secondly to compare the conventional pour-plate to rapid methods including SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator (STPC-CI) and Petrifilm™ Aerobic Count Plate (PAC) for enumerating total bacteria especially aerobic bacteria and to compare the three-tube MPN to rapid methods including SimPlate™ Total Coliform & *E. coli* (SCEc), Petrifilm™ *E. coli*/ Coliform Count Plate (PEC) and Chromocult™ Coliform Agar (CCA) for enumerating total Coliforms & *E. coli* in frozen chicken, shrimp and surimi in order to evaluate the applicability of rapid methods.

Enumeration of total bacteria and total Coliforms & *E. coli* from 300 naturally contaminated samples before and after frozen procedures revealed that the freezing procedure was capable to reduce contaminated microorganisms. In comparison of the correlation coefficient (r) between conventional and rapid methods by a linear regression analysis, the data showed high correlation among all methods. The correlation coefficients of total count between conventional and rapid techniques were 0.95-0.96, slopes= 0.98-1.04 and Y-intercepts= 0.04-0.27. Whereas, for total Coliforms the correlation coefficients were 0.79-0.89, slope= 0.80-0.91 and Y-intercepts= 0.65-1.30. Moreover, the false positives for Coliforms were 3.56%, 7.56%, 4.76% and 6.40% and for *E. coli* were 9.95%, 13.68%, 3.98% and 25.56% in MPN, SCEc, PEC and CCA, respectively.

These results suggested that the rapid methods are a suitable alternative for quantitation of total bacteria and Coliforms & *E. coli* and could replace the standard methods in the enumeration of microorganisms contaminated in frozen chicken, shrimp and surimi.

Department……Microbiology…...……Student's signature…….

Field of study……..Industrial Microbiology……Advisor's signature…….

Academic year ……..2003……Co-advisor's signature……....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นและให้โอกาสที่ยิ่งใหญ่ในชีวิตที่จะก้าวต่อไปอย่างเข้มแข็ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ และขอกราบขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้คำแนะนำ ในระหว่างการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ, คุณเพ็ญศรี รอดมา ผู้เชี่ยวชาญพิเศษระดับ 9 และคุณ ศศิธร สุวรรณสนธิชัย นักวิทยาศาสตร์ 7 จากสำนักคุ้มครองผู้บริโภค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บริษัทจักรมาร์ตีน จำกัด และ บริษัท 3 M จำกัด ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อชุดตรวจสำเร็จรูปในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ บริษัทสตาร์ฟิช จำกัด บริษัทฟาร์มกรุงเทพ จำกัด และบริษัท รอแยล ฟรอเซน ฟู้ด จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างแช่เยือกแข็งในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในระหว่างศึกษา

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณพี่ที่แสนดี คุณอรอนงค์ พริ้งศุลกะ คุณธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ คุณวีรวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร และคุณอุรัจฉวี อุณหเลขกะ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษาและเป็นกำลังใจเสมอ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ ให้คำแนะนำ และอยู่เคียงข้าง

ขอขอบคุณเพื่อนแท้อย่าง จิราภรณ์ โพธิ์เวชกุล ฐิติวรดา นินทนาวงศา และอภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจเวลาที่ท้อและอยู่เคียงข้างเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนที่เป็นยิ่งกว่าเพื่อน ปวีณา รัตนเสนา ที่เป็นทุกอย่างและเป็นกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ที่ทำให้ประสบความสำเร็จในทุกวันนี้และมีแรงที่จะก้าวต่อไปในอนาคต

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้ชีวิต ความมุ่งมั่น และเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูป.....ฌ

คำย่อ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1

2 การตรวจเอกสาร.....6

3 วิธีดำเนินการวิจัย.....33

4 ผลการทดลอง.....48

5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....61

รายการเอกสารอ้างอิง.....68

ภาคผนวก ก.....84

ภาคผนวก ข.....90

ภาคผนวก ค.....93

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....104

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 หน่วยงานอ้างอิงและกำหนดเกณฑ์ทางจุลชีววิทยาในอาหารแต่ละประเภท.....13

2 วิธีที่ใช้ในการตรวจและแจงนับ Coliforms & *E. coli*.....21

3 วิธีรวดเร็วที่ใช้ในการตรวจหาและแจงนับ Coliforms & *E. coli*.....22

4 ตัวอย่างสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-D-Galactosidase และ β-D-Glucuronidase 24

5 อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตโดยบริษัทต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจหา Coliforms & *E. coli*.....25

6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Colifoms & *E. coli* โดยวิธีมาตรฐาน.....52

7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมโดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน.....54

8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับ Total Coliforms โดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน.....54

9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับ *E. coli* โดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน.....55

10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสอดคล้องในการแจงนับ *E. coli* ของวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน.....55

11 เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน Colifoms 59

12 เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน *E. coli* โดยวิธีทางชีวเคมี (IMViC).....60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 ปฏิกิริยารีดักชันของ Redox dye……..17

2 ขั้นตอนการแจงนับจุลินทรีย์รวมด้วย SimPlate™ Total Plate Count (STPC-CI) ….37

3 แสดงขั้นตอนการแจงนับจุลินทรีย์รวมด้วย Petrifilm™ Aerobic Count (PAC)…....38

4 การแจงนับ Total Coliforms & *E. coli* ด้วย SimPlate™ Total Coliform & *E. coli* (SCEc)…….42

5 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms & *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coi*l Coliform Count Plate (PEC)…….43

6 การแจงนับ Total Coliforms & *E. coli* ด้วย Chromocult™ Coliform Agar(CCA)….44

7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับโดยวิธีมาตรฐาน……51

8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับโดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน.....52

9 Linear Regression Line ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจงนับจุลินทรีย์รวม……..56

10 Linear Regression Line ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจงนับ Total Coliforms……57

11 Linear Regression Line ระหว่างวิธีรวดเร็วในการแจงนับ Total Coliforms……58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

PCA = Plate Count Agar

MPN = Most Probable Number

STPC-CI = SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator

SCEc = SimPlate™ Total Coliforms & *E. coli*

PAC = Petrifilm™ Aerobic Count Plate

PEC = Petrifim™ *E. coli* / Coliform Count Plate

CCA = Chromocult™ Coliform Agar

CFU = Colony Forming Unit

LST = Lauryl Sulphate Tryptose broth

BGLB = Brilliant Green Lactose Bile broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารอาจเป็นตัวพาของโรคไปสู่ผู้บริโภคได้ โดยมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การติดเชื้อที่ปะปนในอาหาร (Food infection) ด้วยปริมาณที่สูงพอ (10^5-10^6 CFU/ กรัม หรือมิลลิลิตรของอาหาร) จุลินทรีย์ดังกล่าวจะเพิ่มจำนวนในบริเวณลำไส้และให้สารพิษ (Toxin) ชนิดใดชนิดหนึ่ง กล่าวคือ Gram positive bacteria จะให้ Exotoxin ในขณะที่ Gram negative bacteria จะให้ Endotoxin เมื่อจุลินทรีย์เจริญเพิ่มมากขึ้นจะบุกรุกเยื่อบุลำไส้ ทำลายเซลล์บริเวณผิวหน้า และนำไปสู่การติดเชื้อที่ลุกลามสู่ระบบเลือดได้ ประเภทที่สองได้แก่ การได้รับสารพิษที่ปะปนในอาหาร (Food intoxication) ซึ่งหมายถึง ภาวะที่ผู้บริโภคได้รับสารพิษที่สร้างโดยจุลินทรีย์ที่ปะปนในอาหาร สารพิษดังกล่าวก่อให้เกิดพยาธิสภาพโดยตรงต่อลำไส้ (Enterotoxin) และสารพิษบางชนิดส่งผลทางอ้อมต่อระบบประสาท มีผลให้ผู้บริโภคเสียชีวิตแบบเฉียบพลันได้ (Cliver, 1990)

จุลินทรีย์ที่ปะปนในอาหารสามารถเจริญเพิ่มปริมาณและเป็นจุดอันตรายใน HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) ที่ต้องควบคุมอย่างเข้มงวด โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกวัตถุดิบมาเตรียมอาหาร ขั้นตอนการเตรียมและในอาหารที่เตรียมพร้อมบริโภค ทั้งนี้เพื่อให้อาหารปราศจากสิ่งปนเปื้อน มีสภาพปลอดภัยต่อผู้บริโภคและให้ผลดีต่อสุขภาพ ดังคำกล่าวที่ว่า " สุขภาพดีเริ่มที่อาหารปลอดภัย " (Safe Food Good Health) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในนโยบายเร่งด่วนของกระทรวงสาธารณสุขไทย ในการดำเนินการเพื่อส่งเสริมสุขภาพอนามัยของประชาชน ในโครงการนี้มีการแจ้งให้กลุ่มร้านอาหารเข้าร่วมโครงการเพื่อขอการรับรอง Safe Food Good Health โดยมีจุดมุ่งหมายให้ประชาชนบริโภคอาหารที่ปลอดภัย และลดความเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารที่บริโภคเป็นประจำทุกวัน ปัจจุบันทางกระทรวงสาธารณสุขได้ประกาศเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาชนะ และผู้สัมผัสอาหาร โดยข้อกำหนดค่ามาตรฐานความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาที่ปนเปื้อนในอาหารตามประเภทอาหาร ยกตัวอย่างเช่น อาหารดิบต้องมีค่า Most Probable Number (MPN) ของ *Escherichia coli* ต่อกรัมอาหาร <50 อาหารทะเลที่บริโภคดิบ เช่น กุ้ง ต้องมีค่าจุลินทรีย์รวมต่อกรัมอาหาร <$1x10^6$ MPN ของ Fecal coliforms ต่อกรัมอาหาร <20 อาหารปรุงสุกแช่เยือกแข็งต้องอุ่นก่อนบริโภค เช่น ผลิตภัณฑ์จากซูริมิ ต้องมีค่าจุลินทรีย์รวมต่อกรัมอาหาร <$1x10^5$ MPN ของ Fecal coliforms ต่อกรัมอาหาร <500 และ MPN ของ *Escherichia coli* ต่อกรัมอาหาร <3 เป็นต้น

ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารใช้วัดผลที่ได้จากการตรวจตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เข้าร่วมระบบ Good Manufacturing Practices (GMP) ทุกโรงงานอุตสาหกรรมจะมีเกณฑ์ทางจุลชีววิทยาที่เรียกว่า ข้อจำกัด (Limit) หรือ ช่วงอ้างอิง (Reference ranges) มาตรฐานทางจุลชีววิทยาเป็นรายละเอียดที่ถูกบังคับใช้ในแต่ละประเทศ ประกอบด้วยข้อจำกัดทางจุลินทรีย์ก่อโรค สารพิษ หรือสิ่งที่จุลินทรีย์ผลิต แต่ในการค้าระหว่างประทศยังมีข้อถกเถียงเกี่ยวกับมาตรฐานทางจุลชีววิทยาที่ใช้ต่างกัน ดังนั้นจึงมีการใช้ข้อกำหนด (Criterion) และค่าอ้างอิง (Reference values) เป็นเกณฑ์และมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ (Mossel and Netten, 1991) ในทศวรรษหน้าการตกลงขององค์กรการค้าโลก (WTO) จะอ้างถึงปัจจัยในการพัฒนาการวัดภาวะสุขาภิบาลแบบใหม่สำหรับตลาดการค้าอาหารนานาชาติ โดยเพิ่มข้อมูลด้านความเสี่ยงที่เกิดจากจุลินทรีย์ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาหารชนิดต่างๆ และสุขอนามัยทางอาหาร ในระบบ GMP จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งขณะนี้ทั่วโลกให้การยอมรับว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคในมนุษย์ โดยแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ก่อโรคพบได้ทั้งในวัตถุดิบและอาหารสำเร็จรูป ดังนั้นอันตรายที่เกิดจากจุลินทรีย์ควรมีการกำหนดระดับที่ยอมรับได้ การตระหนักถึงกฎข้อบังคับที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ประกอบการรับรองระบบ Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) และการยอมรับจากคณะกรรมาธิการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission : CAC) (Hathaway and Cook, 1997)

Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) เป็นระบบการจัดการความปลอดภัยของอาหาร โดยวิเคราะห์และควบคุมอันตรายสาเหตุจากทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมีที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์อาหารที่เตรียมจากกระบวนการ ในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าวให้ปลอดภัย จึงต้องพิจารณาตรวจอันตรายโดยเริ่มจากการตรวจสอบวัตถุดิบ ขั้นตอนในการผลิต และผลิตภัณฑ์ให้ถูกต้องตามเกณฑ์ โดยเริ่มจากอันตรายทางชีวภาพที่ตรวจพบบ่อยในผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง ได้แก่ เชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* โดยในระบบ HACCP เชื้อดังกล่าวจัดเป็นอันตราย (Hazards) และเป็นจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Critical Control Point: CCP) ในขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง กระบวนการติดตามเชื้อก่อโรคที่เป็นดัชนีแสดงภาวะอันตรายนั้นต้องการทราบผลการตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากวัตถุดิบดังกล่าวต้องนำไปเตรียมในขั้นตอนของสายการผลิตและเวลาในแต่ละขั้นตอนการผลิตที่จำกัด วิธีการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ใช้จึงต้องรวดเร็วและแม่นยำ โดยทั่วไปข้อกำหนดทางจุลชีววิทยามีบทบาทในการยืนยันความถูกต้องโดยรวมของระบบ HACCP (NACMCF, 1998) ดังนั้นในอุตสาหกรรมอาหารจึงต้องการวิธีที่

สามารถตรวจสอบได้ผลรวดเร็วและเชื่อถือได้ในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร เพื่อบ่งชี้คุณภาพ, อายุการเก็บรักษาหรือการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรค

วิธีมาตรฐาน (Conventional method) ถูกใช้อย่างกว้างขวาง แต่สิ้นเปลืองอาหารเลี้ยงเชื้อ เวลา และเงินจำนวนมาก เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาวิธีและเทคนิคใหม่ๆ ขึ้น โดยใช้ข้อกำหนดด้านจุลชีววิทยาเช่นเดียวกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย 1) จุลินทรีย์ปนเปื้อนและตัวบ่งชี้ (Indicator and spoilage organisms) 2) จุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogenic microorganisms) 3) ราและสารพิษที่ราผลิต (Molds and mycotoxins) ประสิทธิภาพและความถูกต้องของวิธีรวดเร็วอาจเท่ากับหรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน แต่ข้อได้เปรียบของวิธีรวดเร็ว คือ ใช้เวลาน้อยในการรายงานผล อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญต่อการยอมรับวิธีรวดเร็ว คือ การขาดเกณฑ์มาตรฐานในการตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) และการรับรองวิธีเหล่านั้น ซึ่งวิธีที่ถูกคิดค้นขึ้นใหม่ต้องถูกประเมินและเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานก่อนการเผยแพร่เพื่อนำไปใช้จริง (van der Zee and in't Veld, 1997) ดังนั้นภาคอุตสาหกรรม สถานศึกษา และรัฐบาลจำเป็นต้องร่วมมือกันเพื่อพัฒนาวิธีที่เหมาะสมซึ่งตั้งอยู่บนพื้นฐานความถูกต้องทางวิทยาศาสตร์ การให้ผลการตรวจสอบที่ได้ผลรวดเร็วและแม่นยำทำให้ทางภาคอุตสาหกรรมสามารถนำผลที่ได้ไปเน้นใช้ในการป้องกันและปรับปรุงกระบวนการผลิต ส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์มากขึ้น (Swanson and Anderson, 2000)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีทางสุขาภิบาล 2 ประเภท ได้แก่การแจงนับจุลินทรีย์รวม และ Total Coliforms & *Escherichia coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็ง

2. เพื่อเปรียบเทียบผลของวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *Escherichia coli*

3. เพื่อประเมินผลกระทบของขั้นตอนการแช่เยือกแข็งต่อความไวและความแม่นยำจากการตรวจด้วยวิธีรวดเร็ว

4. เพื่อนำผลที่ได้มาเป็นแหล่งอ้างอิงและประเมินการใช้วิธีรวดเร็วในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

ขอบเขตของการวิจัย

1. ซูริมิก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จำนวนอย่างละ 50 ตัวอย่าง
2. ไก่สดก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จำนวนอย่างละ 50 ตัวอย่าง
3. กุ้งสดก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จำนวนอย่างละ 50 ตัวอย่าง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ปัจจุบันประเทศไทยส่งสินค้าออกประเภทอาหารแช่เยือกแข็งติดอันดับ 1 ใน 10 ของโลก และมีมูลค่านับแสนล้านบาทในปี พ.ศ. 2545 (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2546) ผู้ประกอบการของไทยจึงต้องปรับปรุงคุณภาพของสินค้าให้ใหม่สด ปราศจากสิ่งปนเปื้อน ให้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามสากลเพื่อให้แข่งขันในตลาดการค้าโลกได้ การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในเกณฑ์กำหนดของแต่ละกลุ่มประเทคู่ค้าจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้การตรวจสอบความถูกต้อง แม่นยำ ราคาต้นทุนต่ำ และให้การรายงานผลรวดเร็วทันกำหนดต่อการส่งสินค้า ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์ ได้แก่ วิธีมาตรฐาน เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน 7-10 วัน จึงทราบผล ต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ใช้อุปกรณ์เครื่องแก้วและเนื้อที่ในตู้บ่มเชื้อค่อนข้างมากและยังต้องตรวจสอบยืนยันการทดสอบทางชีวเคมีที่ต้องอ่านผลโดยผู้เชี่ยวชาญต้องการแรงงาน และเวลาในทุกขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง จนกระทั่งทำความสะอาดเครื่องแก้วและเนื้อที่บริเวณปฏิบัติการ ส่งผลให้มีข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่างที่จะนำมาตรวจต่อวัน การรายงานผลจึงล่าช้า ทำให้การจัดส่งสินค้าไม่ทันตามเวลาที่กำหนด บริษัทผู้ส่งออกถูกปรับค่าสินไหมและอาจเสียประเทศคู่ค้าไปในที่สุด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอ้างอิงและประเมินความเป็นไปได้ในการใช้วิธีรวดเร็วแทนการใช้มาตรฐานในโรงงานอุตสาหกรรมที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็ง เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์รวดเร็ว เชื่อถือได้ ทำให้สามารถแข่งขันในตลาดการค้าระดับนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli* ในซูริมิก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็ว

2. ตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli* ในไก่สดก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็ว

3. ตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli* ในกุ้งสดก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็ว

4. ยืนยันชนิด Coliforms & *E. coli* ที่แยกได้ด้วยวิธีทางชีวเคมี

5. รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นของสองตัวแปร โดยใช้ Standard Linear Regression method วิเคราะห์ค่า Correlation coefficients, Slopes และ Y-intercepts

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

อาหารประเภทเนื้อเป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย ถ้าไม่ผ่านกระบวนการผลิต, การบรรจุภัณฑ์, การเก็บรักษาและการขนส่งที่ถูกต้อง รวมถึงสาเหตุที่เกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Jackson *et al*, 1997) ยิ่งการปนเปื้อนด้วยเชื้อก่อโรคแม้จะมีในปริมาณน้อยก็สามารถเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคทางเดินอาหารได้ (Buchanan and Whiting, 1989) แต่จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนนั้น สามารถถูกทำให้ลดปริมาณลงได้ด้วยกระบวนการต่างๆ (Miller *et al,* 1998)

การเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำ

Jay (1992) ได้แบ่งช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารไว้ 3 ช่วง ได้แก่

1. Chilling temperature เป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บในตู้เย็น คือ 5 – 7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิแวดล้อมประมาณ 10 – 15 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสำหรับการเก็บผักและผลไม้

2. Refrigerator temperature เป็นอุณหภูมิระหว่าง 0 – 7 องศาเซลเซียส

3. Freezer temperature เป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส

กระบวนการแช่เย็นและแช่เยือกแข็งอาหาร

อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีส่วนใหญ่จะขึ้นกับอุณหภูมิ กล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิต่ำลงอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีจะลดลงด้วย เนื่องจากการปนเปื้อนในอาหารมักจะเป็นผลมาจากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนและเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหาร แต่การยืดอายุของอาหารสามารถทำได้โดยการเก็บอาหารนั้นในอุณหภูมิต่ำ การใช้วิธีแช่เย็นและแช่เยือกแข็งในการเก็บอาหารก็ถูกใช้อย่างกว้างขวางหลังจากกระบวนการแช่เย็นและการทำน้ำแข็งเริ่มในช่วงปี 1830

การแช่เย็น (Chilling)

การแช่เย็นเป็นการเก็บรักษาอาหาร ณ อุณหภูมิที่ใกล้กับจุดเยือกแข็งของอาหารนั้นๆ โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0 - 5 องศาเซลเซียส ตัวอย่างได้แก่ เนื้อและปลาสด และผลิตภัณฑ์นม การเก็บแบบแช่เย็นมีผลเหนี่ยวนำต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Mesophiles รวมไปถึงในกลุ่ม Psychrotrophs

จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำได้ เนื่องมาจากองค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์พลาสมา (Plasma membrane) ขณะที่อุณหภูมิต่ำลงผนังเซลล์พลาสมาจะมีการเปลี่ยนแปลงเฟสจากขั้นผลึกของเหลว (Liquid crystalline state) ไปสู่ขั้นเจลแข็ง (Rigid gel) ซึ่งการส่งผ่านของเหลวจะถูกจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่ม Psychrotrophs และ Psychrophiles มีระดับของกรดไขมันสายสั้นๆและไขมันไม่อิ่มตัวในระดับที่สูงในส่วนประกอบของไขมันในชั้นเยื่อเซลล์ ส่วน Mesophiles จะไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิแช่เย็น แต่ยังคงสภาพชีวิตและไม่ตาย การแช่เย็นจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า “Cold shock” ซึ่งเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์ตายและบาดเจ็บ ผลของปรากฏการณ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียแกรมลบจะอ่อนแอกว่าแบคทีเรียแกรมบวก) ระยะการเจริญ (เซลล์ช่วงล็อก (Log phase) จะอ่อนแอกว่าช่วงสเตชันนารี (Stationary phase)) การเปลี่ยนอุณหภูมิและอัตราการทำความเย็น และอาหารเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ที่อยู่ในอาหารที่ซับซ้อน (Complex medium) จะทนได้มากกว่า) เนื่องจากการแช่เย็นไม่ใช่ขั้นตอนการฆ่าแบคทีเรีย ดังนั้นการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดีและการขนส่งที่ถูกหลักอนามัยจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตอาหารแช่เย็นที่ปลอดภัย แบคทีเรียกลุ่ม Mesophiles ที่มีชีวิตในขั้นตอนการแช่เย็น แม้ว่าจะอยู่ในระยะบาดเจ็บก็สามารถอยู่ในอาหารนั้นได้เป็นเวลานานและสามารถจะกลับมาเจริญได้ถ้าอุณหภูมิเหมาะสม ดังนั้นการแช่เย็นเป็นเพียงการป้องกันการเพิ่มความเสี่ยงจากเชื้อก่อโรคกลุ่ม Mesophiles เท่านั้น แต่มีเชื้อก่อโรคบางกลุ่มสามารถเจริญได้ในบางอุณหภูมิของขั้นตอนการแช่เย็น ดังนั้นโรงงานผลิตอาหารจึงต้องเอาใจใส่ทุกขั้นตอนของกระบวนการแช่เย็น (Adams and Moss, 2000)

การแช่เยือกแข็ง (Freezing)

การแช่เยือกแข็งเป็นเทคนิคที่ประสบความสำเร็จอย่างมากในการถนอมอาหารในระยะเวลายาว เนื่องจากปริมาณของสารอาหารส่วนใหญ่ยังคงมีอยู่และผลิตภัณฑ์คล้ายคลึงกับของสด

อาหารแช่เยือกแข็งแบ่งได้เป็น 4 ประเภท ตามการเน่าเสียได้ง่ายเมื่อเก็บในภาวะที่ไม่ได้แช่เยือกแข็ง (Ayres *et al*, 1980)

1. อาหารดิบที่เน่าเปื่อยได้ (Perishable raw foods) ได้แก่ เนื้อแดงทั้งหมด, สัตว์ปีก, ปลา และขนมปังดิบ, ผลไม้และน้ำผลไม้, ผักบางชนิด และไข่ที่มีรอยร้าว

2. อาหารที่ปรุงสำเร็จที่เน่าเปื่อยได้ (Perishable heated or cooked foods) ได้แก่ ผักที่ลอกเปลือกออกทั้งหมด, เนื้อและพายผลไม้, อาหารทะเล, มันฝรั่งทอดและหอมทอด

3. อาหารที่เน่าเปื่อยได้บางส่วน (Semiperishable foods) คืออาหารที่มีอายุการเก็บสั้น แต่สามารถยืดอายุได้หากเก็บในอุณหภูมิแช่เย็น เช่น ขนมปัง, เนยแข็งและเนยเหลว

4. อาหารที่ไม่เน่าเปื่อย (Nonperishable food) ได้แก่ อาหารแห้ง เช่น ถั่ว แต่เก็บแบบแช่เยือกแข็งเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือการเปลี่ยนสีและการสูญเสียน้ำมัน

การแช่เยือกแข็งทำให้แบคทีเรียตายได้ 10-60 % และถ้าเพิ่มเวลาการเก็บแบบแช่เยือกแข็งก็สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตายได้มากขึ้น แต่มีแบคทีเรียบางพวกที่สามารถทนได้ เรียกว่า " Freeze – resistant bacteria " ซึ่งสามารถทนต่อการเก็บแบบแช่เยือกแข็งได้นานถึง 10 ปี เซลล์แบคทีเรียจำนวนมากจะถูกทำลายระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็ง แต่ไม่ถึงกับทำให้ตาย แต่เมื่อนำอาหารนั้นมาทำให้อุ่นขึ้น (Thawing) แบคทีเรียจะซ่อมแซมตัวเองในเวลา 1-6 ชั่วโมง โดยจะเริ่มสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) ที่ประมาณ 5 ชั่วโมง ขณะที่แบคทีเรียก่อโรคจะไม่มีการเจริญจนกระทั่งอุณหภูมิบริเวณโดยรอบจะเพิ่มจนถึงประมาณ 10 องศาเซลเซียส

Ingram (1951) ได้สรุปสิ่งที่เกิดขึ้นกับจุลินทรีย์ระหว่างขั้นตอนการแช่เยือกแข็งไว้ 4 ข้อ คือ

1. เกิดการตายอย่างทันที แต่ขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์

2. อัตราส่วนของเซลล์ที่รอดชีวิต (Survival ratio) ทันทีหลังขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จะเป็นอิสระต่ออัตราการแช่เยือกแข็ง

3. เซลล์ที่มีชีวิตทันทีหลังการแช่เยือกแข็ง จะค่อยๆ ตายหลังจากอยู่ในภาวะแช่เยือกแข็งต่อไป

4. เซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งซึ่งอยู่ประมาณ -2 องศาเซลเซียส แต่อัตราการลดลงของเซลล์จะช้าลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส

Jay (1992) ได้แบ่งเหตุการณ์ที่จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะแช่เยือกแข็ง ดังนี้

- น้ำในภาวะแช่เยือกแข็ง เรียกว่า " Free water " ซึ่งจะเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) และขณะเดียวกันเซลล์ก็จะสูญเสียน้ำภายในเซลล์
- การแช่เยือกแข็งมีผลทำให้สารภายในเซลล์มีความหนืดเพิ่มขึ้นและเกิดการสูญเสียก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในส่วนไซโตพลาสซม

- การแช่เยือกแข็งมีผลต่อพีเอชของสารภายในเซลล์เปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของสารละลายที่นำไฟฟ้าได้ภายในเซลล์ เปลี่ยนแปลงของสารคอลลอยด์ในโปรโตพลาสและการเสียสภาพของโปรตีนในเซลล์

- การแช่เยือกแข็งมีผลชักนำให้เกิดการช็อกต่ออุณหภูมิในบางจุลินทรีย์และเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงกลไกบางอย่างในเซลล์

Geiges (1996) รายงานว่าช่วงอุณหภูมิต่ำสุดที่แบคทีเรียในอาหารสามารถแบ่งตัวได้ คือ -5 ถึง -8 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสามารถแบ่งตัวและเจริญได้ถึง 3 -5 หน่วยล็อก (Log units) ต่อกรัม แต่แบคทีเรียจะมีช่วงระยะเลค (Lag phase) ที่ยาวกว่าปกติ ซึ่งอาจเป็นเพราะแบคทีเรียต้องการเวลาที่จะปรับตัวเองเพื่อให้มีชีวิตอยู่ในภาวะนั้นๆ ได้ และในอาหารที่มีความหนืดสูงและมีโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และไขมันเป็นส่วนประกอบจะช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียได้มากกว่าอาหารที่มีเกลือและกรดสูง

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการแจงนับแบคทีเรียในอาหารที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง ได้แก่

1. ความเร็วของการแช่เยือกแข็ง

กระบวนการแช่เยือกแข็งที่ทำอย่างรวดเร็วจะสามารถรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์, เกิดผลึกน้ำแข็งที่เล็ก, ยับยั้งเมตาบอลิสมและการปรับตัวของแบคทีเรีย ทั้งยังทำให้แบคทีเรียกลุ่ม Mesophiles ตายในทันที (Jay, 1992)

2. อุณหภูมิที่ใช้เก็บ

การเก็บที่อุณหภูมิต่ำช่วยลดปริมาณแบคทีเรียดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง (Russell, 1995; Bailey, 2000)

3. เวลาในการเก็บ

มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของอาหาร และปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อน (Brenton *et al*, 2001; Kuo and Gunasekaran, 2003)

4. ลักษณะเฉพาะของอาหาร

- ส่วนประกอบ เช่น ไขมัน, เกลือ, น้ำตาล, โปรตีน เป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียและบางครั้งยังเป็น “Cryoprotective agent” อีกด้วย (Doyle, 1997)

- ค่า a_w อาหารที่มีค่า a_w สูงแสดงถึงมีความชื้นสูงซึ่งจะทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าอาหารที่มีค่า a_w ต่ำ (Jay, 1992)

- ค่าพีเอช อาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น น้ำผลไม้ จะช่วยลดปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนได้ (Lang *et al*, 1999)

- สารอื่นๆ ที่ถูกเติมในอาหาร เช่น น้ำตาลกลูโคสและกรดแลคติก ถูกใช้ในบางเมตาบอลิสมของแบคทีเรีย (Lambropoulou *et al*, 1996) แต่โซเดียมคลอไรด์มีผลในการยับยั้งการเจริญ (Graham *et al,* 1996) และมีผลต่อปริมาณของสารที่แบคทีเรียผลิต เช่น AHLs ที่ผลิตโดย Enterobacteriaceae (Flodgaard *et al*, 2003)

5. จุลินทรีย์ปนเปื้อน (Adam and Moss, 2000)

- องค์ประกอบของจุลินทรีย์ เช่น พวก Psychrophiles จะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายสั้นๆในส่วนประกอบไขมันของเยื่อเซลล์ (Cell membrane) เป็นส่วนใหญ่ จึงสามารถเจริญในอุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าพวก Mesophiles

- จำนวนจุลินทรีย์ ขึ้นกับว่าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นมีปริมาณเท่าไร

- ระยะการเจริญ โดยเซลล์ในช่วงล็อกจะอ่อนแอกว่าเซลล์ในช่วงสเตชันนารี

6. ชนิดของการบรรจุ จะมีผลต่อความชื้นของอาหาร และการเจริญของแบคทีเรีย (Gonzalez-Fandos *et al*, 2000)

7. ความเร็วของอุณหภูมิในช่วงลดสู่อุณหภูมิที่ใช้แช่เยือกแข็ง ขึ้นกับจุดเยือกแข็งของอาหารแต่ละชนิด ยิ่งมีค่าต่ำก็ยิ่งใช้เวลานานกว่าจะถึงอุณหภูมิที่ใช้แช่เยือกแข็ง (Doyle *et al*, 1997)

8. วิธีที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย (Murray *et al*, 2001)

- วิธีที่เสริมการมีชีวิตใหม่ของจุลินทรีย์ (Resuscitation)

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ โดยใช้อาหารที่เหมาะกับการแยกแบคทีเรียแต่ละชนิด

- อุณหภูมิในการบ่ม ควรเลือกอุณหภูมิบ่มที่เหมาะกับแบคทีเรียที่จะแยก

การตรวจสอบทางด้านจุลชีววิทยา

การตรวจหาและแยกจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นมีความซับซ้อนทั้งวิธีการตรวจหาโดยตรงยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง ดังนั้นจึงต้องอาศัยการตรวจหาโดยวิธีทางอ้อมด้วยจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม ได้แก่ การตรวจหา Index microorganisms ซึ่งคือ จุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่บ่งชี้ถึงเชื้อก่อโรคที่จำเพาะ และการตรวจหา Indicator microorganisms ซึ่งคือ จุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่บ่งชี้ว่าอาหารนั้นๆ อยู่ในภาวะที่มีความเสี่ยงสูง ซึ่งอาจจะถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อก่อโรคหรืออยู่ภายใต้ภาวะที่จะชักนำให้เชื้อก่อโรคเจริญได้ การตรวจแบ่งได้เป็น การตรวจเชิงคุณภาพ คือ

บอกได้แค่ว่ามีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่สนใจหรือไม่ และการตรวจเชิงปริมาณ คือ ตรวจหาว่าจุลินทรีย์นั้นปนเปื้อนอยู่ในปริมาณเท่าไร (Buchanan, 2000)

การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาถูกใช้ในการประเมินคุณภาพและความปลอดภัยของวัตถุดิบ, กระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์ (Valdimarson *et al,* 1998; Phillips *et al*, 2001; Fang *et al*, 2003; Fluckey *et al,* 2003; Mohamed *et al*, 2003) ทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการทวนสอบระบบ HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) ในโรงงานอุตสาหกรรม (NACMCF, 1998) รวมไปถึงการประกันคุณภาพ (Quality Assurance) ของห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร (Bolton, 1998) และในปัจจุบันยังถูกใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า “Predictive Food Microbiology (PFM)“ อีกด้วย (Wijtzes *et al*, 1998; McDonaald and Sun, 1999)

ประโยชน์ของข้อมูลด้านจุลินทรีย์

นักจุลชีววิทยาและการทดสอบทางจุลชีววิทยามีบทบาทสำคัญในโปรแกรมวิเคราะห์อันตรายและจุดควบคุมวิกฤต (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) ซึ่งข้อมูลด้านจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดสอบถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ดังนี้ (Kvenberg and Schwalm, 2000)

- ใช้กำหนดวิธีปฏิบัติการมาตรฐาน (Standard Operating Procedure: SOPs)
- ประเมินความน่าจะเป็นของอันตรายที่จะเกิดขึ้น
- กำหนดข้อจำกัดวิกฤต
- บ่งชี้สาเหตุของความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารและภาวการณ์ติดเชื้อจนเกิดโรคทางเดินอาหาร
- ใช้ในโปรแกรมปฏิบัติการแก้ไข (Corrective action program)
- ใช้ตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) และทวนสอบ (Verification) ระบบ HACCP

นอกจากนี้การทดสอบทางจุลชีววิทยาและข้อมูลที่ได้ยังเชื่อมโยงไปสู่การประเมินความเสี่ยง ซึ่งกระบวนการประเมินความเสี่ยง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน (Hoornstra *et al*, 2001) คือ

1) การบ่งชี้อันตราย (Hazard identification)

2) ลักษณะของอันตราย (Hazard characterization)

3) การประเมินการได้รับสัมผัส (Exposure assessmen)

4) ลักษณะของความเสี่ยง (Risk characterization)

สำหรับแบบจำลองเชิงปริมาณในการประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์ในขั้นการประเมินการได้รับสัมผัส (Exposure assessment) ยังต้องการข้อมูลด้านจุลินทรีย์เพื่อวิเคราะห์สาเหตุการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค, ความหนาแน่นหรือระดับที่ตรวจพบ, การแพร่กระจายของจุลินทรีย์ทั้งในอาหารและสิ่งมีชีวิต, และใช้วิเคราะห์หาตัวแปรที่มีผลต่อการเจริญและการลดลงของจุลินทรีย์ รวมไปถึงการเก็บข้อมูลด้านการบริโภคอีกด้วย (Coleman and Marks, 1999)

เกณฑ์ทางจุลชีววิทยา

เกณฑ์ทางด้านจุลชีววิทยาจะถูกกำหนดโดยรัฐบาล, หน่วยงานตัวแทนของรัฐ, บริษัท, องค์กรการค้าหรือสมาคมทางวิทยาศาสตร์ แบ่งได้เป็น 3 เกณฑ์ (Smittle, 2000)

1. เกณฑ์มาตรฐาน (Standard)

หมายถึง เกณฑ์ที่รัฐบาลบังคับใช้ โดยสารพิษหรือสารที่ทำให้เกิดการติดเชื้อซึ่งไม่อนุญาตให้มีในอาหารก็ถูกจัดอยู่ภายใต้เกณฑ์นี้ด้วย

2. เกณฑ์เฉพาะอย่าง (Specificity)

หมายถึง เกณฑ์ที่ผู้ซื้อสินค้าจะยอบรับสินค้านั้นบังคับใช้ มักใช้ในการซื้อขายโดยบริษัทหนึ่งกับอีกบริษัทหนึ่ง

3. เกณฑ์ที่มีแนวทางกำหนด (Guideline)

หมายถึง เกณฑ์ที่ถูกใช้โดยผู้ผลิต เพื่อประเมินกระบวนการผลิต แต่บางครั้งก็ถูกกำหนดโดยหน่วยงานของรัฐเพื่อใช้ประเมินคุณภาพอาหารในตลาดการค้าด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 หน่วยงานอ้างอิงและกำหนดเกณฑ์ทางจุลชีววิทยาในอาหารแต่ละประเภท (United State) (Smittle, 2000)

ผลิตภัณฑ์	หน่วยงานอ้างอิง
All types	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
Starch and sugar	National Food Processors
Granulate sugar	American Bottler of Carbonated Beverages
Liquid sugar	American Bottler of Carbonated Beverages
Dairy products	U. S. Public Health Service
Certified milk	American Association of Medical Milk Comm., Inc.
Milk for manufacturing and processing	USDA
Dry milk	U. S. Public Health Service, USDA and American Dry Milk Institute, Inc.
Frozen desserts	U. S. Public Health Ordinance Code
Tomato juice and products	FDA
All processed food pathogens	FDA and USDA
All foods in international trade	Codex Alimentarius Commission and FAO/WHO

การตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *Escherichia coli* โดยวิธีมาตรฐาน

1. การตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมโดยวิธีมาตรฐาน

การตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวม แบ่งได้เป็น 4 วิธี ดังนี้

1. Standard Plate Count (SPC) เป็นการกระจายตัวอย่างที่จะตรวจบนอาหารวุ้น ที่ไม่มีสารยับยั้งหรือเสริมการเจริญของจุลิทรีย์เฉพาะกลุ่ม จึงนิยมใช้ Glucose Tryptone Yeast Agar หรือ Plate Count Agar มากกว่าอาหารอื่น (Harrigan and McCance, 1976) บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม เช่น ที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนี รายงานเป็น CFU ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร (Banwart, 1989)

2. Most Probable Number (MPN) เป็นวิธีที่ใช้ตัวอย่างที่ความเจือจางต่อเนื่องกัน 3 หรือ 5 ระดับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นอ่านค่าที่ได้โดยใช้ตารางเปรียบเทียบค่าทางสถิติ รายงายเป็น MPN ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร วิธีนี้มีข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองเครื่องแก้ว, ไม่สามารถดูลักษณะของแบคทีเรียได้ ทั้งยังขาดความเที่ยงตรงและให้ค่าที่มากกว่าความเป็นจริง (Jay, 1992)

3. Dye reduction test เป็นการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ Dye indicator เป็นวิธีที่ง่าย, รวดเร็ว, ไม่แพง ทั้งยังหาปริมาณได้เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นจึงให้ค่าที่ใกล้เคียงกับความจริง (Robinson *et al*, 2000)

4. Direct Microscopic Counts เป็นการกระจายตัวอย่างบนสไลด์ย้อมด้วยสี จากนั้นนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถึงแม้จะเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ นับจำนวนเซลล์ยากเนื่องจากถูกรบกวนด้วยตัวอย่างอาหาร , เซลล์อาจอยู่กันเป็นกลุ่ม และสีจะย้อมติดทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ทำให้ผลที่ได้มีค่ามากกว่าความเป็นจริง (Defiqueiredo and Splitstoesser, 1976)

การกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาทางอาหารหรือส่วนประกอบของอาหารใช้ในการประมาณอายุการเก็บหรือความเหมาะสมของอาหารสำหรับการบริโภค ทั้งในตลาดการค้าผู้นำเข้าอาหารมักจะไม่ทราบภาวะทางสุขาภิบาลหรือระยะเวลาการเก็บและการขนส่ง จึงอาศัย Aerobic Plate Count เพื่อตรวจสอบการสุขาภิบาลของสายการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ (ICMSF, 1978) ซึ่งการตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมโดยใช้ Aerobic Plate Count ถูกพัฒนาโดย AOAC และ APHA (FDA, 2001)

2. การตรวจหาและแจงนับ Total Coliforms & *Escherichia coli* โดยวิธีมาตรฐาน

ขั้นตอนการตรวจหา Coliforms & *E. coli* โดยวิธีมาตรฐาน (Most Probable Number, MPN) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (FDA, 2001) คือ

1. Presumptive test ใช้อาหาร Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST) บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. Confirm test ถ่ายผลบวกจาก LST มาลงอาหาร 2 ชนิด คือ Brilliant Green Lactose Bile broth (BGLB) บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และอาหาร EC บ่มที่อุณหภูมิ 45.5±0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. Complete test ถ่ายผลบวกจากอาหาร EC มาขีดบนอาหารวุ้น EMB และยืนยันผลบวกของ *E. coli* ด้วยการทดสอบ IMViC

หลักการของวิธี Most Probable Number (MPN) คือ เซลล์กระจายตัวอยู่อย่างอิสระในตัวอย่างและการเจริญของจุลินทรีย์ควรเกิดขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีเพียงหนึ่งเซลล์ก็ตาม (Kiss, 1984) การแปรผลอาศัยหลักการทางคณิตศาสตร์ ว่าด้วย ความน่าจะเป็นของโอกาสที่ผลบวกจะเกิดขึ้นเมื่อมีแบคทีเรียในตัวอย่างนั้น (Oblinger and Koburger, 1975) และเกิดเหตุการณ์สมมุติ 4 อย่าง (Garthright and Blodgett, 2003) คือ

1. ถึงแม้มีเซลล์เดียวในหลอดทดลอง ก็สามารถเห็นการเจริญและตรวจได้
2. จุลินทรีย์อยู่อย่างอิสระในตัวอย่าง
3. การทำระดับเจือจางเป็นสัดส่วนที่ถูกต้อง
4. จำนวนของจุลินทรีย์ในแต่ละหลอดทดลองไม่ขึ้นต่อกัน

ค่าที่ได้จะอ้างอิงค่าที่คำนวณจากค่าเปรียบเทียบกับภาวะมาตรฐานและค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

Family Enterobacteriaceae

หมายถึง แบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ เจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและเกิดกรด ผลิตเอนไซม์แคตตาเลสและใช้ไนเตรตได้ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลล่าแบบ Peritrichous หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ (Brenner, 1984)

Coliforms

หมายถึงแบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ เจริญได้ทั้งภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถใช้น้ำตาลแลคโทสเกิดกรดและแก๊ส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วย 4 จีนัส คือ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* และ *Klebsiella* (APHA, 2001)

Fecal coliforms

หมายถึงแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโทส เกิดเป็นกรดและแก๊ส ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 44.5-45.5 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงในอาหาร EC แต่มักใช้ที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจในตัวอย่างอาหาร บางครั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกเรียกว่า " Thermo- tolerant Coliforms " ซึ่งมี *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter* spp. และ *Citrobacter freundii* (APHA, 2001)

Escherichia colli

เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นท่อน ติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่และไม่มีสปอร์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลิตเอนไซม์แคตตาเลส แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส มีค่า D-value ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.1 นาที (Robinson *et al*, 2000) สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด ตามการทดสอบ IMViC คือ ชนิดที่ 1 ให้รูปแบบเป็น + + - - และชนิดที่ 2 ให้รูปแบบเป็น - + - - (APHA, 2001)

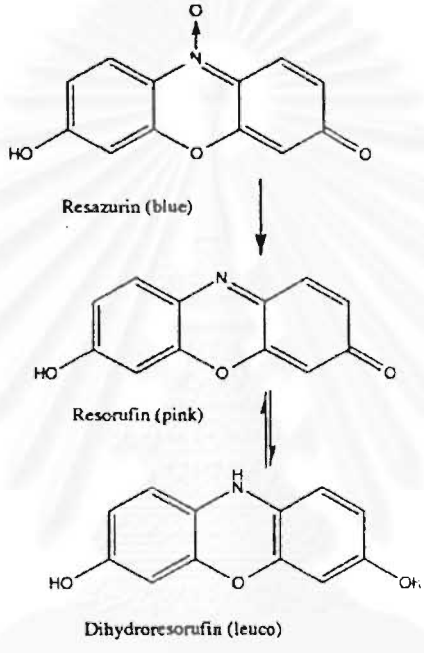
การตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *Escherichia coli* โดยวิธีรวดเร็ว

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีตรวจหาจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *Escherichia coli* มากมาย เช่น วิธีที่อาศัยหลักการ " Optical-based system " วิธีนี้จะวัดการเปลี่ยนสีของอาหารซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ โดย Semisolid- fluid layer ในหลอดแก้วที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะสะท้อนสีที่เปลี่ยนไปของอาหารไปยังเครื่องวัดและแปรผลเป็น " Optical units " (Russell, 2001; Odumeru and Belvedere, 2002) หรือ Solid-phase cytometry ซึ่งอาศัยหลักการที่เซลล์แบคทีเรียจะติดสารเรืองแสงเมื่อกรองผ่านแผ่นกรอง จากนั้นนับเซลล์ที่เรืองแสงด้วย Laser scanning device (D' Htaese and Nelis, 2002) แต่วิธีดังกล่าวต้องมีอุปกรณ์และเครื่องมือจำเพาะซึ่งมีราคาแพง จึงไม่เหมาะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการที่ต้องตรวจเป็นประจำ

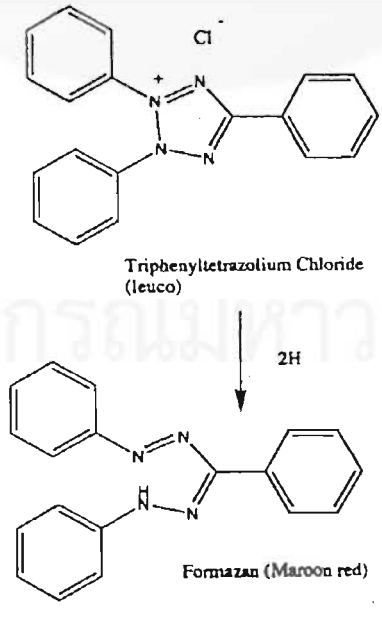
1. การตรวจหาและแจงนับจุลินทรีย์รวมโดยวิธีรวดเร็ว

วิธีรวดเร็วส่วนใหญ่ในปัจจุบันจะอาศัยหลัก Dye reduction test โดยแบคทีเรียจะใช้ออกซิเจนในอาหาร เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน- รีดักชัน ทำให้ Redox dye เปลี่ยนสีเนื่องจากการรับอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าว (Richardson, 1985) สีที่ใช้ เช่น Tetrazolium phenazine methosulfate (Coudron *et al*, 1983), Acridin orange (Sierra *et al*, 1997), 3-(4, 5- dimethylthiazol- 2- yl)- 2, 5- diphenyl tetrazoliumbromide (Mshana *et al*, 1998) และ Resazurin (Venkitanorayanan *et al*, 1997; Guerin *et al*, 2001)

ก.



ข.



รูปที่ 1 ปฏิกิริยารีดักชันของ Redox dye ก. Resazurin ข. Triphenyltetrazolium Chloride

1.1 Petrifilm™ Aerobic Count Plate (PAC)

มีลักษณะเป็นแผ่น ในแผ่นฟิล์มด้านล่างประกอบด้วยสารอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียและเจลที่ละลายน้ำได้ ส่วนฟิล์มด้านบนมีสี 2,3,5- Triphenyltretazolium chloride และเจลที่ละลายน้ำได้เคลือบอยู่ ผลบวกจะนับโคโลนีที่ติดสีแดงทั้งหมด (Curiale *et al,* 1990) และ Petrifilm Aerobic Count Plate (PAC) ยังได้รับการรับรองเป็น AOAC Official Method 990.12 โดย AOAC International (AOAC, 1995)

Jordano และคณะ (1995) ได้เปรียบเทียบการใช้ PAC กับวิธีมาตรฐาน (Plate Count Agar, PCA) ในการตรวจหา Mesophilic aerobic bacteria ในนมพาสเจอร์ไรส์ โยเกิร์ต ไข่ เนื้อบด สตอเบอรี่สด และถั่วแช่เยือกแข็ง วิเคราะห์ด้วย Linear regression ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.897

Blackburn และคณะ (1996) ได้เปรียบเทียบการใช้ PAC กับวิธี PCA ในอาหารต่างๆ ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.989 โดยข้อดีของ PAC คือประหยัดเวลา แรงงาน และพื้นที่ในการใช้บ่ม

Park และคณะ (2001) หาปริมาณจุลินทรีย์รวมในเนื้อหมู เนื้อวัวและเนื้อไก่ โดยใช้ PAC เทียบกับวิธี PCA ผลการทดลองแสดงถึงปฏิสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี โดยมีค่า Correlation coefficient (r) = 0.99 0.95 และ 0.94 ในเนื้อหมู เนื้อวัวและเนื้อไก่ตามลำดับ กล่าวได้ว่า PAC สามารถใช้แทนวิธีมาตรฐานในการตรวจจุลินทรีย์รวมในผลิตภัณฑ์เนื้อได้

Ellis และ Meldrum (2002) เปรียบเทียบการหาจุลินทรีย์รวมในตัวอย่างอาหารและนม โดยใช้ PAC เทียบกับวิธี Spiral plate count ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.80

Rosmini และคณะ (2003) เปรียบเทียบการใช้ PAC กับวิธี PCA ในการหาปริมาณจุลินทรีย์รวมในนมดิบแช่เย็น ผลการทดลองได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.92 ทั้ง PAC ยังสามารถทดสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากในเวลาเดียวกันด้วย

1.2 SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator (STPC-CI)

IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME, USA ได้พัฒนา SimPlate Total Plate Count (STPC) ซึ่งเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปใช้ในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์รวมในอาหาร มี 2 ขนาด คือ Normal Counting Range ขนาด 84 หลุม มีพิสัยการอ่านผลได้ 738 MPN และ high counting range ขนาด 198 หลุม มีพิสัยการอ่าน 1,659 MPN เริ่มแรก STPC ใช้หลักการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์หลายชนิด (Multiple Enzyme Technology) ที่ตรวจพบตามปกติในจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสับสเตรทซึ่งถูกไฮโดรไลต์ด้วยเอนไซม์

ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร ทำให้ได้สาร 4-Methylumbilliferone ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ใช้เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการนับหลุมที่เรืองแสง นำมาเทียบกับค่า Most Probable Number (MPN) จากตารางที่แนบมา (Townsend *et al*, 1996; Townsend *et a*l, 1998)

Townsend และ Nagui (1998) ได้เปรียบเทียบการหาแบคทีเรียในอาหาร 15 ชนิด เช่น ไอศกรีม แฮมเบร์เกอร์ ช็อกโกแลต และน้ำแอ็ปเปิ้ล เป็นต้น ระหว่าง STPC และ PCA วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Linear Regression Analysis ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.95 ความไวในการตรวจจำนวนจุลินทรีย์รวมของ STPC เท่ากับ 96% เมื่อเทียบกับ PCA

Beuchat และคณะ (1998) ได้เปรียบเทียบการใช้ STPC กับ Petrifilm™ Redigel™ และ วิธี PCA ซึ่ง STPC มีปฏิสัมพันธ์และความไวเทียบเท่ากับวิธีอื่นๆ โดยมีค่า $r \geq 0.95$ slope ≥ 0.96 และ Y-intercept ≤ 0.80 ข้อดีของ STPC คือ ง่ายในการเตรียมและทดสอบ อ่านผลในพิสัยที่กว้าง (> 1,600 MPN) ลดปัญหาการกระจายของโคโลนี ใช้เวลาบ่มเพียง 24 ชั่วโมง แต่ได้ผลเทียบเท่ากับวิธีอื่นซึ่งใช้เวลาบ่ม 48 ชั่วโมง แต่ถึงอย่างไร STPC ก็มีข้อเสีย คือ ใช้เทคนิค MPN ในการอ่านผล, ไม่สามารถแยกชนิดของจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้อาหารบางประเภท เช่น ตับ แป้งถั่ว และถั่ว มีเอนไซม์ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการเรืองแสงได้ ทำให้เกิดการอ่านผลบวกเท็จ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME, USA ได้พัฒนา SimPlate Total Plate Count- Color Indicator (STPC-CI) โดยใช้สี Resazurin ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Resazurin เป็น Oxazine หรือ Quinonimine dye จะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์เมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์ และสีของ Resazurin จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีชมพู (Resorufin) จนไม่มีสี (Dihydroresorufin) (Twigg, 1945) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ถูกรบกวนด้วยเอนไซม์เหมือนใน STPC เมื่อทำการเปรียบเทียบ STPC-CI กับ Standard Plate Count, Petrifilm™ Redigel™ และ Orange Serum Agar ได้ค่า Correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.91-0.97 Slope อยู่ระหว่าง 0.91-0.98 และ Y-intercept อยู่ระหว่าง 0.11-0.84 (Smith and Townsend, 1999)

Ogihara และคณะ (2002) เปรียบเทียบการใช้ STPC กับ PCA ในการหาปริมาณ จุลินทรีย์รวมในตัวอย่างอาหาร 150 ตัวอย่าง ผลการทดลองเมื่อวิเคราะห์ด้วย Linear regression ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.93 ซึ่ง STPC เป็นวิธีรวดเร็วและยังมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน

Nero และคณะ (2002) ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของ STPC-CI กับวิธี PCA ในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์รวมในนมพาสเจอไรส์ซึ่งแบ่งตามคุณภาพเป็น 3 ชนิด คือ A, B และ

C โดยใช้อุณหภูมิบ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.6811 หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมงและที่ 48 ชั่วโมง ได้ค่า r = 0.9126 แสดงถึงว่าประสิทธิภาพของ STPC-CI จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการบ่มเป็น 48 ชั่วโมง และคุณภาพของนมยังมีผลต่อประสิทธิภาพของ STPC-CI นอกจากนี้ยังพบผลลบเท็จที่เกิดจากตัวอย่างนมที่มีแบคทีเรียแกรมบวกปนเปื้อนในปริมาณที่สูง เพราะว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเจริญช้าและมีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันต่ำ

Feldsine และคณะ (2003) ได้เปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม STPC-CI กับวิธี PCA โดยอ้างอิงวิธีตาม AOAC คือ AOAC Official Method 966.23 ที่ใช้อุณหภูมิบ่มที่ 35 องศาเซลเซียสและวิธีตาม ISO คือ ISO method 4833 ที่ใช้อุณหภูมิบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร 6 ชนิด คือ พริกไทยดำ แป้ง เนื้ออัดเม็ด แฮมเบอร์เกอร์ ผลไม้แช่เยือกแข็งและผักสด ผลการทดลองแสดงถึง Repeatability และ Reproducibility ที่ไม่ต่างกัน ดังนั้น STPC-CI จึงสามารถใช้ได้ทั้งในวิธีที่อ้างอิงตาม AOAC และ ISO

2. การตรวจหาและแจงนับ Total Coliforms & *E. coli* โดยวิธีรวดเร็ว

ตั้งแต่อดีตมีการคิดค้นอาหารจำเพาะที่ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียกลุ่ม Fecal coliforms (Qadri *et al*, 1974; Yoovidhya and Fleet, 1981; Rowre, 1981; Garcia *et al*, 1995) ทั้งยังมีอาหารจำเพาะในการแยก Total Enterobacteriaceae, Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ออกจากกัน โดยอาศัยคุณลักษณะเฉพาะของสารที่เติมลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น Boric acid ในอาหาร Boric acid lactose broth, Triphenylmethane dye และ Brilliant green ซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก หรือการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ เช่น การเกิด Hydrogen sulphide ใน Deoxycholate hydrogen sulphite lactose agar เป็นต้น (Blood and Curtis, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 วิธีที่ใช้ในการตรวจหาและแจงนับ Coliforms & *E. coli* (Jay, 1992)

Methods	Time for results (h)	Sensitivity
Direct counts		
VRBA plating		
Presumptive results	18-24	~10/g
Confirmed results	24-48	~10/g
Anderson and Baird – Parker	24	~10/g
British roll tube	24	1/g
Dry medium plates		
VRB	24	~10/g
EC count	24	~10/g
Broth culture methods		
Classical MPN, presumptive	24-48	<1/100 ml
Classical MPN, confirmed	24-48	-
Classical MPN, for fecals	24	<1/100 ml
Membrane/other filter methods		
Standard membrane method	24	<1/g
M-FC method	24	<1/g
M-7 h FC method	7	<1/g
Coli-count sampler	24	≥10/g
HGMF method	24	1/g
HGMF-ELA	24	10/g
Fluorogenic substrate methods		
LST + MUG	20	1 cell
X – GLUC plating	24	~10/g
MUGal plating	6	1/ 100 ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 วิธีรวดเร็วที่ใช้ในการตรวจหาและแจงนับ Coliforms & *E. coli* (de Bore and Beumer, 1999)

Methods	Detection limit (cfu/ml or g)	Time before results	Specificity
Plating techniques	1	1-3 day	Good
Bioluminescence	10^4	½ h	No
Flow cytometry	10^2-10^3	½ h	Good
DEFT	10^3-10^4	½ h	No
Impedimetry	1	6-24 h	Moderate/good
Immunological methods	10^5	1-2 h	Moderate/good
Nucleic acid-based assays	10^3	6-12 h	Excellent

การตรวจหา Coliforms & *E. coli* โดยอาศัยสารให้สี (Chromogenic substrates) และสารเรืองแสง (Fluorogenic substrate)

สารให้สี (Chromogenic substrates) เป็นสารประกอบที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จำเพาะ และเกิดการเปลี่ยนสี

สารเรืองแสง (Fluorogenic substrates) โดยทั่วไปประกอบด้วยสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อเอนไซม์นั้นๆ เช่น น้ำตาล หรือ กรดอะมิโนและ สารเรืองแสง เช่น 4- Methylumbelliferone (Manifi, 2000)

ทั้งสารให้สีและสารเรืองแสงถูกใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารแยกเชื้อจำเพาะ สำหรับการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยเฉพาะ Coliforms & *E. coli* (Manifi and Kneifel, 1991; Frampton and Restaino, 1993) ซึ่งสามารถแยกบนเพลทได้โดยตรง ดังนั้นจึงเป็นการลดขั้นตอนการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Subculture media) และการทดสอบทางชีวเคมี (Manifi, 199) โดยสารให้สีและสารเรืองแสงจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จำเพาะหรือสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (de Boer, 1998)

สารให้สีและสารเรืองแสงสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามการเกิดปฏิกิริยา (Manifi *et al*, 1991)

1. ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น อนุพันธ์ของสารคูมาลิน (Coumarin derivatives) ได้แก่ 4- Methylumbelliferone (4-MU) หรือ 7-Amino-4 methylcoumarin (7-AMC) , เอสเทอร์ของ o-Nitrophenol (ONP) หรือ p-Nitrophenol (PNP) และเอสเทอร์ของ indoxyl หรือ 5-Bromo-4-chrolo-3-indoxyl เป็นต้น

2. การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงหรือค่าการดูดกลืนแสงของ Fluorescent pH indicator เช่น 4- MU

3. การเปลี่ยนแปลงของความเข้มของการเรืองแสง อันเป็นผลมาจากการยึดเกาะของสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent dye) บนส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย เช่น Acridine orange (AO) เกาะกับ DNA, 8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) เกาะกับโปรตีน การอ่านผลโดยวิธีนี้ต้องใช้อุปกรณ์จำเพาะ คือ Epifluorescence microscope, Direct epifluorescents filter technique และ Flow cytometry (FCM)

การแยก Coliforms & *E. coli* ด้วยเอนไซม์จำเพาะ

β-D-Galactosidase (GAL) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียกลุ่ม Coliforms ผลิตเพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลแลคโทสไปเป็นกาแลคโทสและกลูโคส จึงมีการตรวจหาการแสดงออกของเอนไซม์นี้เพื่อแจงนับ Coliforms

β-D-Glucuronidase (GUD) ใช้ในการแจงนับ *E. coli* แยกออกจากกลุ่ม Coliforms เนื่องจาก 94-96 % ของ *E. coli* ผลิตเอนไซม์นี้ โดยเอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอนุพันธ์ของ β-D-Glucopyranosiduronic (GLR) ไปเป็น Aglycons และ D-Glucuronic acid (Manifi *et al*, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ตัวอย่างสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-D-Galactosidase และ β-D-Glucuronidase

Enzymes	Substrates	References
β-D-Galactosidase	**Chromogenic substrates**	
	o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)	Manifi *et al*, 1991
	p- nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (PNPG)	
	6-bromo-2-naphthyl--β-D-galactopyranoside (BNGAL)	
	6-chloroindolyl-β-D-galactoside	Ferguson and Lakewood, 1995
	4,6-dichloroindolyl-β-D-galactoside	
	6,7- dichloroindolyl-β-D-galactoside	
	4,6,7-trichloroindolyl-β-D-galactoside	
	chlorophenol red -β-D-galactopyranoside (CPRG)	Townsend *et al* , 1998
	naphtholbenzein-β-D-galactopyranoside (PNB-GAL)	James *et al*, 2000
	6-chloro-3-indoxyl-β-D-galactoside (Salmon-Gal)	Turner *et al*, 2000
	Fluorogenic substrates	
	4- methylumbelliferryl-β-D-galactopyranoside (MUGAL)	Manifi *et al*, 1991
	ethyl-7-hydroxycoumarin-3-caboylate--β-D- galactoside (EHC-GAL)	Chilvers *et al*, 2001
β-D-Glucuronidase	**Chromogenic substrates**	
	6-chloroindolyl-β-D-glucuronide	Ferguson and Lakewood, 1995
	4,6-dichloroindolyl-β-D-glucuronide	
	6,7- dichloroindolyl-β-D-glucuronide	
	4,6,7-trichloroindolyl-β-D-glucuronide	
	hydroxyquinoline-β-D-glucuronide	Larinkari and Rautio, 1995
	Fluorogenic substrates	
	Phenolphthalein-mono-β-D-glucuronide (PHEGLR)	Manifi *et al*, 1991
	p-nitrophenol-β-D-glucuronide (PNPGLR)	
	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC or BCIG)	
	4-methylumbilliferyl-β-D-glucuronide (MUGLR)	
	ELF-97-β-D-glucuronide	Zhou *et al*, 1996

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นจึงมีการตรวจหาและแจงนับ Coliforms & *E. coli* ด้วยคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ GAL และ GUD (Van Poucke and Nelis, 2000) ทั้งในตัวอย่างอาหาร (Weiss and Humber, 1988) และในตัวอย่างน้ำ (Warren *et al,* 1978; Berg and Fiksdal, 1988; Havemeister, 1991; Edberg *et al*, 1991; Caruso *et al*, 2002)

ตารางที่ 5 อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตโดยบริษัทต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจหา Coliforms & *E. coli* (Manifi, 2000)

Medium	Substrate / colour		Manufacturer
	Coliforms	*E. coli*	
Liquid media			
Fluorocult® LMX broth	XGAL/blue-green	MUG/blue fluorescence	Merck (Germany)
Readycult coliforms	XGAL/MUG	MUG/blue fluorescence	Merck (Germany)
ColiLert	ONPG/Yellow	MUG/blue fluorescence	IDEXX (USA)
Coloquick	ONPG/Yellow	MUG/blue fluorescence	Hach (USA)
Colisure	CPRG-red	MUG/blue fluorescence	IDEXX (USA)
Solid Media			
Fluorocult® agar	-	MUG/blue fluorescence	Merck (Germany)
TBX-agar	-	BCIG/blue	Oxoid (UK), Merck(Germany)
Uricult Trio	-	HOQ/black	Orion (Finland)
EMX-agar	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Biotest (Germany)
C-EC-MF-agar	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Biolife (Italy)
Chromocult	SalmonGal/red	XGLUC/blue-violet	Merck (Germany)
Coli ID	XGAL/blue	SalmonGlu/Rose-violet	BioMerieux (France)
ChroMagar ECC	SalmonGal/red	XGLUC/purple	Chromagar (France)
Rapid' *E. coli* 2	XGAL/blue	SalmnGlu/purple	Sanofi (France)
E. coli/ Coliforms	SalmonGal/red	XGLUC/purple	Oxoid (UK)
ColiScan	SalmonGal/red	XGLUC/purple	Microbilogy Lab. (USA)
MI-agar	MUGal/blue fluorescence	Indoxyl/blue	Brenner *et al*, (1993)
HiCrome ECC	SalmonGal/red	XGLUC/blue	Union Carbide (USA)
Other systems			
ColiComplete	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Biocontrol (USA)
ColiBag	XGAL/blue-green	MUG/blue fluorescence	Oceta (Canada)
Pathogel	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Charm Sci. (USA)
E. colite	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Charm Sci. (USA)
m-Coliblue	TTC/red	XGLUC/blue	Hach (USA)

2.1 Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plate (PEC)

Dry rehydratable film หรือ Petrifilm สำหรับนับจำนวน Coliforms & *E. coli* โดย Coliforms จะให้โคโลนีสีแดง ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของสี Triphenyltetrazolium Chloride ร่วมกับการเกิดฟองก๊าซจากการหมักแลคโทส ในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย violet red bile (VRB) , เจลที่ละลายน้ำได้ และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG) ซึ่งถูกย่อยโดยเอนไซม์ Glucuronidase ที่พบใน *E. coli* ทำให้โคโลนีของ *E. coli* เป็นสีน้ำเงินคราม และมีฟองก๊าซ บ่ม 24 ชั่วโมงในการบันทึกจำนวน Coliforms และ 48 ชั่วโมง สำหรับ *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี MPN แสดงถึง Repeatability และ Reproducibility ที่ดีกว่า (Curiale *et al*, 1991) และ Petrifilm EC ยังได้รับการรับรองจาก AOAC เป็น AOAC Official Method 991.14 (AOAC, 1995) ทั้งนี้ PEC ถูกใช้ในการตรวจหาและแจงนับ Coliforms & *E. coli* ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร (Eisel *et al*, 1977; Sumner *et al*, 2003) และในอุตสาหกรรมนม (Gran *et al*, 2002; Gran *et al,* 2002; Lues *et al*, 2003)

Ingram และ Moody (1990) ได้เปรียบเทียบการใช้ PEC กับวิธี MPN เพื่อตรวจสอบคุณภาพของกระบวนการผลิตปู (*Callinectes sapidus*) ผลการทดลองแสดงถึงการตรวจ *E. coli* ของ PEC มีความไวกว่าวิธี MPN เมื่อในตัวอย่างมีจำนวน *E. coli* เกิน 10 เซลล์ต่อกรัม

Jordano และคณะ (1995) เปรียบเทียบการใช้ PEC กับวิธี Violet red bile agar (VRBA) ในนมพาสเจอร์ไรส์ โยเกิร์ต ไข่ เนื้อบด สตอเบอรี่สด และถั่วแช่เยือกแข็ง โดยค่าเฉลี่ยของจำนวน Coliforms & *E. coli* ที่ตรวจโดย PEC ให้ค่าที่สูงกว่า VRBA และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Linear Regression ให้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.861

Blackburn และคณะ (1996) เปรียบเทียบการใช้ PEC กับวิธี VRBA ผลการทดลองได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.872 และ PEC ยังแสดงถึง repeatability ที่ดีกว่า

Silk และคณะ (1997) หาปริมาณ Coliforms & *E. coli* ในน้ำแอ็ปเปิ้ลหมัก โดยใช้ PEC VRBA และ Tryptic Soy Agar ที่เททับด้วย VRBA ในการแจงนับ Coliforms ผลการทดลองไม่ต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่การแยก Coliforms จากแบคทีเรียอื่นใน VRBA ทำได้ยากและเสียเวลามากกว่าใน PEC และใช้ PEC กับ Eosin Methylene Blue Agar (EMB) ในการแจงนับ *E. coli* ผลการทดลองแสดงว่า EMB ไม่เหมาะในการใช้หา *E. coli* ในน้ำแอ็ปเปิ้ลหมักที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ ทั้งยังให้ผลบวกเท็จเนื่องจากโคโลนีส่วนใหญ่ที่แยกบน EMB จะให้

metallic sheen ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของ *E. coli* แต่ PEC จะให้โคโลนีสีน้ำเงินครามพร้อมด้วยฟองก๊าซ จึงง่ายแก่การแยก *E. coli* ออกจากแบคทีเรียอื่น

Chung และคณะ (2000) เปรียบเทียบการใช้ PEC กับ VRBA ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงใน BAM และ Desoxycholate Lactose Agar (DLA) ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงในกฎหมายด้านสุขอนามัยอาหารของเกาหลี ในการแจงนับ Coliforms และ *Serratia* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากซูริมิแช่เยือกแข็ง ผลการทดลองให้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.994 และ 0.996 ตามลำดับ โดยแบคทีเรียอ้างอิง คือ *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 และ *Enterobacter aerogenes* ATCC 29751 จะให้โคโลนีสีแดงพร้อมฟองก๊าซบน PEC เมื่อบ่มเพียง 14 ชั่วโมง แต่โคโลนีของ *Serratia* sp. จะให้ฟองก๊าซเมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบความจำเพาะของ PEC ต่อ Coliforms โดย *Salmonella* Enteritidis IFO 3313 จะให้โคโลนีสีแดงแต่ไม่เกิดฟองก๊าซ และ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกจะไม่เจริญบน PEC จึงกล่าวได้ว่า PEC เป็นวิธีรวดเร็วที่ใช้ในการตรวจหาและแจงนับ Coliforms

2.2 Chromocult™ Coliform Agar (CCA)

เป็นอาหารแข็งสำเร็จรูปใช้ในการตรวจหา Coliforms & *E. coli* ประกอบด้วย 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronide (X-GLUC หรือ BCIG) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ β-D-Glucuronidase และ 6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactoside (Salmon-Gal) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ β-D-Galactosidase การอ่านผลบน CCA นั้น *E. coli* ซึ่งผลิตทั้งเอนไซม์β-D-Glucuronidase และ β-D-Galactosidase จะให้โคโลนีสีน้ำเงินเข้มจนถึงม่วง ส่น Enterobacteriacae (*Citrobacter, Enterobacter* และ *Klebsiella*) ผลิตเฉพาะเอนไซม์ β-D-Galactosidase จะให้โคโลนีสีชมพูจนถึงสีแดง ส่วน *Shigella, Salmonella* และ *Yersinia* ซึ่งผลิตแต่เอนไซม์ β-D-Glucuronidase จะให้โคโลนีสีฟ้า กรณีแบคทีเรียที่ไม่ผลิตทั้งสองเอนไซม์โคโลนีจะไม่มีสีบน CCA (Ossmer, 1996)

Ogden และคณะ (1998) ตรวจจหา *E. coli* โดยเทียบประสิทธิภาพของ CCA กับวิธี MPN ผลการทดลองได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.83 และ CCA ไม่ถูกรบกวนด้วยตัวอย่าง ถึงแม้ว่า MPN จะมี Repeatability ที่ดีกว่า แต่ CCA ก็แสดงถึง Reproducibility ที่ดีกว่า

Byamukama และคณะ (2000) ตรวจหา Fecal coliforms ในน้ำบริเวณเขตร้อนของ Kampala ประเทศ Uganda โดยใช้ CCA พบผลบวกเท็จ 3% เมื่อยืนยันด้วยปฏิกิริยา Indole อย่างไรก็ตาม CCA มีประสิทธิภาพและเหมาะในการตรวจหา Fecal coliforms

Geissler และคณะ (2000) ตรวจ Coliforms & *E. coli* ในน้ำทะเล โดยเทียบประสิทธิภาพของ LMX broth, CCA และ CCA+cefsulodin กับวิธี MPN ผลการทดลองแสดงว่าถึงแม้ MPN จะมีความไวในการแจงนับ *E. coli* น้อยกว่าวิธีอื่น เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติทุกวิธีให้ผลไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีข้อสังเกต คือ วิธีรวดเร็วที่ใช้สมบัติของ β-D-Galactosidase จะพบผลบวกเท็จเนื่องจาก *Aeromonas* spp.

Perales (2000) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแจงนับ *E. coli* ของอาหารสำเร็จรูป 4 ชนิด คือ Tryptone Bile Agar (TBA, Oxiod) MacConkey CS Agar (MC, Difco) Tryptone Bile X-glucuronidase Agar (TBX, Oxoid) และ CCA (Merck) เมื่อนำอาหารบ่มในอาหาร EC ก่อนนำมาแจงนับบนอาหารสำเร็จรูปและบ่มที่อุณหภูมิ 44±1 องศาเซลเซียส พบว่า CCA มีค่า Relative recovery = 86.7% แต่วิธีอื่นพบเพียง 50-53% เท่านั้น อาจเนื่องจาก CCA ใช้ Tergitol®-7 แต่อาหารอื่นใช้ Bile salt ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ที่บาดเจ็บเมื่อบ่มที่ 44±1 องศาเซลเซียส การตรวจ *E. coli* โดยใช้ CCA มีความไว 97.1% ส่วน TBA และ MC มีความไว 92.1% และ 64.7% ตามลำดับ เมื่อทำการยืนยันผลบวก พบว่า CCA และ TBXให้ผล 100% แต่ TBA และ MC ให้ผลเพียง 72.1% และ 79.1% ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า CCA มีผลลบเท็จ 43.6%, TBA และ TBX มีผลลบเท็จ 16.7% และ 25.8% ส่วน MC ไม่พบผลลบเท็จ

Turner และคณะ (2000) เปรียบเทียบการตรวจ Coliforms & *E. coli* ในเนื้อสัตว์ โดยใช้ CCA และ PEC โดยวิธีทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยมีค่า Correlation coefficient (r) = 0.89 และ Slope = 1.19 สำหรับการตรวจ Coliforms และ Correlation coefficient (r) = 0.86 และ Slope = 1.09 สำหรับการตรวจ *E. coli* ถึงแม้ว่าระบบการคัดเลือกและความเข้มข้นของสารอาหารใน CCA จะมีผลทำให้การตรวจพบ Coliforms & *E. coli* ต่ำกว่า PEC แต่ CCA ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแจงนับ Coliforms & *E. coli* ในอาหาร

Ramteke และ Tewari (2002) ตรวจหา Thermotolerant *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่ม โดยใช้ Fluorocult Brilla Broth (BB) Fluorocult MacConkey agar (MCA) Fluorocult ECD agar (ECD) Fluorocult VRB agar (VRB) Fluorocult *E. coli* O157:H7 agar และ CCA พบว่า BB และ CCA มีความจำเพาะและความไวในการตรวจหา *E. coli* สูงกว่าวิธีอื่น

Finney และคณะ (2003) ตรวจหา Enterobacteriaceae จากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ โดยเทียบประสิทธิภาพระหว่าง CCA และ MacConkey agar ผลการทดลองให้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.86 โดยพบว่า CCA มีผลบวกเท็จในการแจงนับ *E. coli* 8.75% เนื่องจาก *Citrobacter* spp. และ *Enterobacter* spp. และผลลบเท็จของ CCA มีค่า 2.5%

2.3 SimPlate™ Total Coliforms & *E. coli* (SCEc)

เป็นวิธีรวดเร็วที่ถูกพัฒนาโดย IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME, USA ในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย Chlorophenol red β-D-Galactopyranoside (CPRG) และ 4-Methylumbilliferyl-β-D-Glucoronide (MUG) เพื่อตรวจหาปริมาณ Coliforms & *E. coli* ตามลำดับ โดย CPRG จะถูกย่อยเป็น Chlorophenol red (CPR) ด้วย β-D-Galactosidase ซึ่งผลิตโดย Coliforms ส่วน MUG จะถูกย่อยด้วย β-D-Glucuronidase ซึ่งผลิตโดย *E. coli* ได้เป็น 4-Methylumbilliferone (4-MU) ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

Townsend และคณะ (1998) ได้เปรียบเทียบ SCEc กับ PEC, MPN และ VRBA+MUG ในการแจงนับ Coliforms & *E. coli* ในอาหาร ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.95 0.91 และ 0.98 ตามลำดับ และ Slope $\geq$ 0.90 สำหรับการตรวจ Coliforms และ Correlation coefficient (r) = 0.90 และ 0.80 เมื่อเทียบ SCEc กับ PEC และ VRBA+MUG ตามลำดับ ในการตรวจหา *E. coli* นอกจากนี้ SCEc ซึ่งใช้ค่า MPN ในการอ่านผลยังสามารถแยก *E. coli* ได้ดีกว่าวิธีการนับโคโลนีซึ่งอ่านผลเป็น CFU ในกรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียในปริมาณสูง จึงกล่าวได้ว่า SCEc เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วโดยใช้เวลาบ่มเพียง 24 ชั่วโมง และให้ความถูกต้องในการตรวจหา *E. coli* ดีกว่าวิธีอื่นในตัวอย่างที่มี Coliforms และแบคทีเรียอื่นปนเปื้อนมาก

Ogihara และคณะ (2002) เปรียบเทียบการตรวจหา Coliforms ทั้งหมด โดยใช้ SCEc เทียบกับวิธี MPN ผลการทดลองแสดงถึงปฏิสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี และมีค่า Correlation coefficient (r) = 0.91

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากวิธีรวดเร็ว (Swaminathan and Feng, 1994; Fung, 1995; van der Zee and in't Veld, 1997)

1. วิธีตรวจโดยอัตโนมัติ (Automation) กล่าวคือ สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากในเวลาเดียวกัน

2. การได้รับความรู้ด้านเทคนิคจากบริษัทผู้ผลิต

3. ความถูกต้องของผลที่ได้ (Accuracy) ให้ผลที่ถูกต้องเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน

4. การทดสอบที่จำเพาะในจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม (Specificity) โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค

5. ค่าต่ำสุดที่ตรวจหาได้ (Low detection limit) สามารถตรวจหาจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยๆ ได้

6. ความรวดเร็วในการรายงานผล (Rapidity) ใช้เวลาทดสอบน้อยและให้ผลที่รวดเร็ว

7. ความง่ายต่อการทดสอบ (Easy to handle) แม้ผู้ที่มีทักษะด้านจุลชีววิทยาน้อยก็สามารถทำการทดสอบได้

8. ราคาไม่แพง (Low cost)

9. ความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ (Acceptability)

10. การตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ได้รับการประเมินและตรวจสอบความถูกต้องเทียบกับวิธีมาตรฐาน

การตรวจสอบความถูกต้องของชุดตรวจสำเร็จรูป

วัตถุประสงค์แรกเริ่มของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ใน Handbook for AOAC Members ปี 1989 กล่าวไว้ว่า "....ได้รับ, ปรับปรุง, พัฒนา, ทดสอบ, และประยุกต์วิธีการที่ถูกต้อง, เที่ยงตรงและสอดคล้องกัน เพื่อการวิเคราะห์อาหาร, วิตามิน, สารปรุงแต่งอาหาร, ยาฆ่าแมลง, ยา, เครื่องสำอาง, พืช, อาหารสัตว์, ปุ๋ย, สารพิษ, อากาศ, น้ำ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ สารหรือปรากฏการณ์ที่มีผลกระทบต่อสุขภาพและความปลอดภัยของสาธารณชนผู้บริโภค หรือป้องกันคุณภาพของสภาพแวดล้อม...." (AOAC, 1989)

นอกจากนี้ AOAC International ยังสนับสนุนการวัดคุณภาพและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบในสาขาวิทยาศาสตร์วิเคราะห์ โดยวิธีทดสอบที่ถูกตรวจสอบความถูกต้องและได้รับการยอมรับเพื่อนำมาใช้ จะถูกรียกว่า " AOAC Official Methods "

AOAC ได้เริ่มการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางจุลชีววิทยาในปี ค.ศ. 1939 และในปี ค.ศ. 1986 ก็ได้เริ่มทำการตรวจสอบความถูกต้องของชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจเพื่อความรวดเร็ว, บ่งชี้ หรือแจงนับจุลินทรีย์ต่างๆ ถึงแม้ว่าชุดตรวจหา *Salmonella* จะถูกให้ความสำคัญมาก แต่ชุดตรวจ *Listeria,* Coliforms, (รวมไปถึง *Escherichia coli*) Aerobic Plate Count และสารพิษที่ผลิตโดย *Staphylococcus* ก็ได้รับการพัฒนาไปพร้อมๆ กันด้วย นั่นแสดงถึงการให้

ความสำคัญต่อการตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ของชุดตรวจสำเร็จในอนาคตนั่นเอง (Andrews, 1996)

ในการตรวจสอบความถูกต้อง ต้องคำนึงถึง 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ

1. ความเที่ยงตรง (Precision) แสดงถึง Reproducibility ของวิธี ทั้งภายในและระหว่างห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบ ตัวแปรความเที่ยงสำหรับวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ ได้แก่ ความไว (Sensitivity) คือ สัดส่วนของตัวอย่างบวกที่ถูกตรวจพบ และความจำเพาะ (Specificity) คือ สัดส่วนของตัวอย่างลบที่ถูกตรวจพบ ตัวแปรความเที่ยงสำหรับวิธีเชิงปริมาณ ได้แก่ การทำซ้ำ (Repeatability) คือ ความแปรปรวนของผลการทดสอบเมื่อถูกทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียวโดยผู้ทดสอบเพียงคนเดียวด้วยตัวอย่างที่เหมือนกัน และการทำใหม่ (Reproducibility) คือ ความแปรปรวนของผลการทดสอบ เมื่อทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการมากกว่าหนึ่งแห่ง

2. ความถูกต้อง (Accuracy) แสดงถึงขั้นตอนในการทำว่าถูกต้อง หรือให้ค่าที่เป็นจริงแค่ไหน

ทั้งความเที่ยงและความถูกต้องนั้นถูกนำมาใช้วิเคราะห์เฉพาะในข้อมูลที่เป็นลักษณะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณเท่านั้น ซึ่งถูกใช้อย่างกว้างขวางเมื่อจำเป็นต้องแจงนับจำนวนของจุลินทรีย์ปนเปื้อนหรือจุลินทรีย์บ่งชี้ เช่น จุลินทรีย์กลุ่ม Coliforms เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดทางจุลชีววิทยา เพราะเหตุผลที่ว่าเชื้อก่อโรคส่วนใหญ่ถูกกำหนดว่าต้องตรวจไม่พบ หรือกล่าวว่าต้องอยู่ในระดับ “ Zero tolerance ” นั่นเอง วิธีตรวจเชิงปริมาณจึงถูกใช้เพื่อแสดงให้เห็นว่าไม่มีเชื้อก่อโรคนั้นจริงๆ (Andrews, 1996; De Smedt, 1998)

McClure (1990) กล่าวถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีตรวจเชิงปริมาณไว้ 4 ปัจจัย คือ

1. ความไว (Sensitivity) คือ ความเป็นไปได้ที่วิธีตรวจให้ตัวอย่างทดสอบเป็นบวกรายงานว่าตัวอย่างทดสอบเป็นผลบวกจริง

2. ความจำเพาะ (Specificity) คือ ความเป็นไปได้ที่วิธีตรวจให้ตัวอย่างทดสอบเป็นลบรายงานว่าตัวอย่างทดสอบเป็นผลลบจริง

3. ผลบวกเท็จ (False positive: pf+) คือ ความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างทดสอบที่เป็นผลลบจริง แต่ถูกรายงานว่าเป็นบวกโดยวิธีทดสอบ

$$\text{ผลบวกเท็จ} = \frac{\text{จำนวนผลลบจริงที่ถูกรายงานว่าเป็นผลบวก}}{\text{จำนวนผลบวกทั้งหมด}}$$

4. ผลลบเท็จ (False negative: pf-) คือ ความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างทดสอบที่เป็นผลบวกจริง แต่ถูกรายงานว่าเป็นลบโดยวิธีทดสอบ

$$\text{ผลลบเท็จ} = \frac{\text{จำนวนผลบวกจริงที่ถูกรายงานว่าเป็นผลลบ}}{\text{จำนวนผลลบทั้งหมด}}$$

โดยผลบวกและผลลบจริงนั้นถูกแปรผลตามตัวอย่างทดสอบที่ถูกรายงานว่าเป็นบวกหรือลบโดยวิธีอ้างอิง

เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธีปฏิบัติการมาตรฐาน (Standardized Operating Procedures : SOPs) ที่ถูกบรรยายอย่างละเอียดตามวิธีของ AFNOR AOAC BSI IDF ISO Nordic Comite PHLS (London) และองค์กรการค้าต่างๆ ก็มีปัจจัยจำกัดในการทดสอบ คือ ลักษณะอาหารภายใต้ภาวะที่ทดสอบ จะมีผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ ซึ่งอาจเกิดจาก 2 สาเหตุด้วยกัน ได้แก่

1. Biotic จำนวนโคโลนีที่นับได้ (Colony Forming Unit: CFU) ลักษณะและกิจกรรมทางชีวเคมีของจุลินทรีย์อื่นๆ (background flora)

2. Abiotic คุณสมบัติทางธรรมชาติของอาหาร เช่น พีเอช ค่า a_w ลักษณะที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ที่ถูกเติมในอาหาร และรูปแบบของกระบวนการผลิต

นอกจากปัจจัยเหล่านี้จะมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ที่ต้องการหายังส่งผลทางอ้อมต่อความถูกต้อง ความเที่ยง และความสอดคล้องของผลวิเคราะห์อีกด้วย (Struijk, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น SS 325 ของบริษัท TOMY Seiko CO.,Japan
2. เครื่องปั่นผสมอาหาร (Stomacher Lab-Blender 400) รุ่น BA 7021 ของบริษัท Seward., UK
3. ตู้บ่มจุลินทรีย์ (Incubator) รุ่น 800 ของบริษัท Memmert., Germany
4. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น 368A ของบริษัท Precision Scientific., USA
5. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Promotion Co., LTD., Switzerland

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ชุดตรวจสำเร็จรูป SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator (STPC – CI) ของบริษัท BioControl, USA

2. ชุดตรวจสำเร็จรูป SimPlate™Total Coliforms & *E. coli* (SCEc) ของบริษัท BioControl, USA

3. ชุดตรวจแบบแผ่นสำเร็จรูป Petrifilm™ Aerobic Count (PAC) ของบริษัท 3M, USA

4. ชุดตรวจแบบแผ่นสำเร็จรูป Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count (PEC) ของบริษัท 3M, USA

5. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Chromocult™ Coliform Agar ของบริษัท Merck, Germany

6. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว Brilliant Green Lactose Bile broth ของบริษัท Difco, USA

7. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว Lauryl Sulfate Tryptose broth ของบริษัท Difco, USA

8. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว EC ของบริษัท Difco, USA

9. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว Tryptic Soy broth ของบริษัท Difco, USA

10. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว MR-VP บริษัท Difco, USA

11. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Nutrient Agar ของบริษัท Difco, USA

12..อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์วุ้นมาตรฐาน (PCA) ของบริษัท Difco, USA

13. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง EMB agar ของบริษัท Difco, USA

14. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Simmon citrate agar ของบริษัท Difco, USA

จุลินทรีย์สำหรับอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาและการเก็บรักษา

1. Coliforms ได้รับความเอื้อเฟื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ *Enterococcus aerogenes* ATCC 1415 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 โดยเลี้ยงบน Nutrient agar (NA) slant บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุก 3 เดือน

2. *Escherichia coli* ได้รับความเอื้อเฟื้อจากกองอาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สายพันธุ์ที่ใช้คือ *E. coli* ATCC 25922 โดยเลี้ยงบน Nutrient agar (NA) slant บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุก 3 เดือน

<u>หมายเหตุ</u> : จุลินทรีย์อ้างอิงนำมาใช้ในการตรวจสอบอาหารและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจสอบยืนยัน *E. coli* เพื่อความแน่ใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง

การเตรียมตัวอย่างแช่เยือกแข็ง

- เกณฑ์ตัวอย่างแช่เยือกแข็ง

ได้ทำหลักเกณฑ์นำตัวอย่างที่ได้ผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งและเก็บไว้นาน 1 เดือน และเป็นตัวอย่างที่ผลิตจากตัวอย่าง Lot No. เดียวกันกับตัวอย่างที่นำมาเป็นตัวแทนตัวอย่างก่อนการผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง

- แหล่งที่มาของตัวอย่างแช่เยือกแข็ง คือ

ตัวอย่างซูริมิ จากบริษัทสตาร์ฟิช จำกัด

ตัวอย่างไก่ จากบริษัทฟาร์มกรุงเทพ จำกัด

ตัวอย่างกุ้ง จากบริษัทไทยรอแยล ฟรอเซนฟู้ด จำกัด

ตัวอย่างแช่เยือกแข็งที่ใช้ในการศึกษา คือ ซูริมิ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งอย่างละ 50 ตัวอย่าง เนื้อไก่ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งอย่างละ 50 ตัวอย่าง กุ้งกุลาดำ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งอย่างละ 50 ตัวอย่าง

สุ่มแบ่งตัวอย่างแช่เยือกแข็งมา 5 จุด น้ำหนัก 25 กรัม ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ใส่ในถุงที่ปราศจากเชื้อ (Stomacher bag) เติม Butterfield's phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 2 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างระดับละ 10 เท่า (Ten-fold serial dilution) โดยใช้ Butterfield's phosphate buffer pH 7.2

การแจงนับปริมาณจุลินทรีย์รวม

1. การแจงนับปริมาณจุลินทรีย์รวมด้วยวิธีมาตรฐาน

ถ่ายตัวอย่างแขวนลอยที่ระดับการเจือจางต่อเนื่องกัน 3 ค่า จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในเพลท ทำการกระจายเชื้อด้วยวิธี Pour plate โดยเททับด้วยอาหารวุ้นเหลว PCA ทำสามซ้ำต่อระดับการเจือจางเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลในช่วง 30-300 โคโลนีและบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เพื่ออ่านผลสำหรับบันทึก

2. การแจงนับปริมาณจุลินทรีย์รวมด้วยวิธีรวดเร็ว

2.1 SimPlate™ Total Plate Count -Color Indicator (STPC-CI)

2.1.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อผง 1 ขวดของชุด Multiple Test Medium ละลายใน Butterfield's phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อ สารละลายอาหารดังกล่าวสามารถนำมาใช้ทดสอบได้ 10 ตัวอย่าง โดยใช้ SimPlate device ชนิด Normal Counting Range (เพลทพลาสติกขนาด 84 หลุม)

2.1.2 ปิเปตตัวอย่างแขวนลอยที่ระดับการเจือจางต่อเนื่อง 2 ค่า ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หรือ 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร หรือ 9 มิลลิลิตรตามความเหมาะสมในหลอดทดลอง เพื่อให้ปริมาตรสุทธิต่อเพลทเป็น 10±0.2 มิลลิลิตร โดยใช้ 2 SimPlate ต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

2.1.3 ถ่ายสารละลายตัวอย่างในข้อ 2.1.2 ลงตรงกลางของ SimPlate device ปิดฝา วนเพลทเบาๆ เพื่อให้สารละลายกระจายลงทุกหลุมในเพลท เคาะเพลทเบาๆ ในกรณีที่เกิดฟองอากาศในหลุม เทสารละลายที่เหลือออก โดยเอียงเพลทไปด้านที่มีฟองน้ำอยู่

2.1.4 คว่ำเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง อ่านผลบวกของการทดสอบ โดยสังเกตหลุมที่มีการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู บางครั้งอาจสังเกตผลบวกเป็นสีส้ม ชมพูอมส้ม น้ำตาลแดง น้ำตาล จนถึงสีขาวก็ได้ นับจำนวนหลุมที่ให้ผลบวก นำไปเทียบเป็นค่า MPN โดยใช้ SimPlate Conversion Table (ภาคผนวก ข) และคำนวณเป็นปริมาณจุลิทรีย์รวม MPN ต่อกรัมตัวอย่าง

2.2 Petrifilm™ Aerobic Count Plate (PAC)

2.2.1 เปิดแผ่นบนของ PAC ขึ้น ปิเปตตัวอย่างแขวนลอย 1 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจางต่อเนื่อง 2 ค่า ถ่ายตัวอย่างลงตรงกลางของแผ่นล่าง ใช้ 2 แผ่นต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

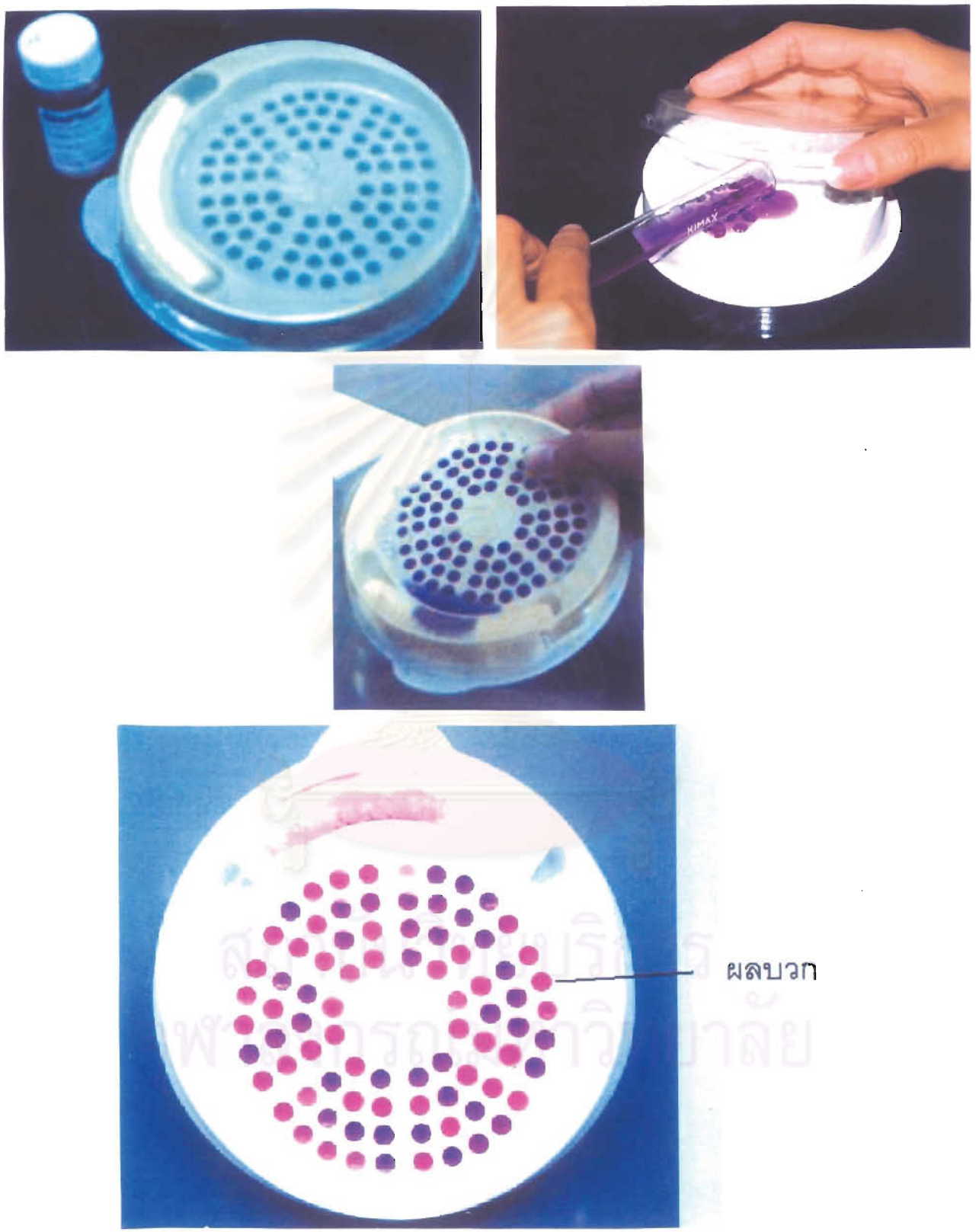
2.2.2 ปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา

2.2.3 ใช้แท่นพลาสติกกดทับลงตรงกลางของแผ่นฟิล์มเบาๆ เพื่อกระจายตัวอย่าง

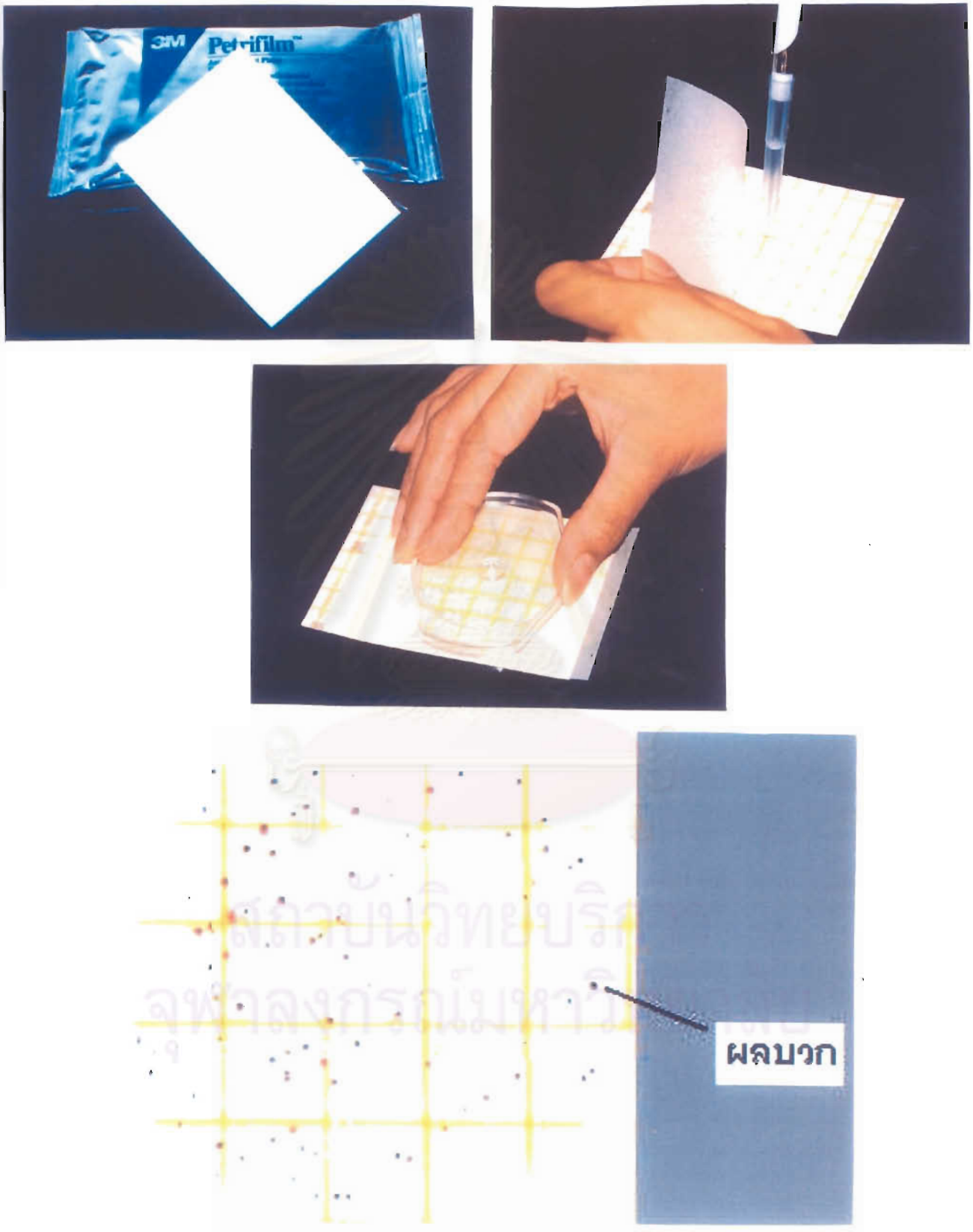
2.2.4 นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง

2.2.5 อ่านผลโดยนับจำนวนโคโลนีสีแดงทั้งหมดในช่วง 15-150 โคโลนีบนแผ่นฟิล์ม และคำนวณเป็นปริมาณจุลินทรีย์รวม CFU ต่อกรัมตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 ขั้นตอนการตรวจหาจุลินทรีย์รวมด้วย SimPlate™ Total Plate Count -Color Indicator (STPC-CI)



รูปที่ 3 ขั้นตอนการตรวจหาจุลินทรีย์รวมด้วย Petrifilm™ Aerobic Count Plate (PAC)

การแจงนับปริมาณ Total Coliforms & *E. coli*

1. การแจงนับปริมาณ Total Coliforms & *E. coli* ด้วยวิธีมาตรฐาน (Most Probable Number: MPN)

1.1 Presumptive test

ถ่ายตัวอย่างแขวนลอยที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LST โดยใช้ 3 หลอดต่อระดับการเจือจาง หลอดละ 1 มิลลิลิตร แปรผัน 3 ระดับการเจือจางต่อเนื่อง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลบวกคือ สีอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและสังเกตเห็นฟองก๊าซที่ถูกดักอยู่ใน Durham tube เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโทสในอาหาร LST เกิดเป็นกรดและก๊าซ

<u>หมายเหตุ</u> : ในการทดลองนี้ได้เติมสี Bromocresol Purple เพื่อเพิ่มเกณฑ์ในการตัดสินใจในการอ่านผลการเจริญของ Total Coliforms เพราะบางทีก๊าซที่ดักอยู่ใน Durham tube เห็นไม่ชัดเจน ทำให้เกิดความไม่แน่ใจในการอ่านผลบวก ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงใช้เกณฑ์การอ่านผลบวกจากหลอดที่มีผลของความขุ่น การสร้างก๊าซ และกรดที่เกิดจากการหมักน้ำตาลแลคโทสในอาหาร LST โดยกรดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ Bromocresol Purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง (AHPA, AWWA and WEF, 1998)

1.2 Confirm test

1.2.1 ถ่ายจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกจากข้อ 1.1 จำนวน 3 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลบวกคือ Coliforms จะสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโทสในอาหาร BGLB เกิดก๊าซซึ่งถูกดักอยู่ใน Durham tube นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปเทียบกับตาราง MPN รายงานเป็นจำนวน Coliforms ทั้งหมด MPN ต่อกรัมตัวอย่าง

1.2.2 ถ่ายจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกจากข้อ 1.1 จำนวน 3 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC บ่มที่อุณหภูมิ 45.5±0.2าเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลบวกคือ Fecal coliforms จะสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโทสในอาหาร EC เกิดก๊าซซึ่งถูกดักอยู่ใน Durham tube นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ข) รายงานเป็นจำนวน Fecal Coliforms MPN ต่อกรัมตัวอย่าง

1.3 Complete test

นำหลอดที่ให้ผลบวกจากข้อ 1.2.2 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเป็น *E. coli* โคโลนีที่ปรากฏจะมีลักษณะเป็นสีม่วงเข้มและอาจจะสะท้อนแสงคล้ายโลหะ (Metallic sheen) หรือไม่ก็ได้ หลังจากนั้นเขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาลงในอาหารเหลว Tryptic

Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC) เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าเป็น *E. coli* นำค่าที่ได้ไปเทียบกับตาราง MPN รายงานเป็นจำนวน *E. coli* MPN ต่อกรัมตัวอย่าง

2. การแจงนับปริมาณ Total Coliforms & *Escherichia coli* ด้วยวิธีรวดเร็ว

2.1 SimPlate™ Total Coliforms & *E. coli* (SCEc)

2.1.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อผง 1 ขวดของชุด Multiple Test Medium ละลายใน Butterfield's phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อ สารละลายอาหารดังกล่าวสามารถนำมาใช้ทดสอบได้ 10 ตัวอย่าง โดยใช้ SimPlate device ชนิด Normal Counting Range

2.1.2 ปิเปตตัวอย่างแขวนลอยที่ระดับการเจือจางต่อเนื่อง 2 ค่า ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เพื่อให้ปริมาตรสุทธิต่อเพลทเป็น 10±0.2 มิลลิลิตร โดยใช้ 2 SimPlate ต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

2.1.3 ถ่ายสารละลายตัวอย่างในข้อ 2.1.2 ลงตรงกลางของ SimPlate device ปิดฝา วนเพลทเบาๆ เพื่อให้สารละลายกระจายลงทุกหลุมในเพลท เคาะเพลทเบาๆ ในกรณีที่เกิดฟองอากาศในหลุม เทสารละลายที่เหลือออก โดยเอียงเพลทไปด้านที่มีฟองน้ำอยู่

2.1.4 คว่ำเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง อ่านผลบวกของการทดสอบ โดยสังเกตหลุมที่มีการเปลี่ยนสีของสารละลาย นับเป็นจำนวนหลุมบวกของ Coliforms ทั้งหมด และนำเพลทดังกล่าวไปดูผลภายใต้หลอดอุลตร้าไวโอเลต (365 นาโนเมตร) นับจำนวนหลุมที่เรืองแสงเป็นผลบวกของ *E. coli* จากนั้นนำจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกทั้งสองไปเทียบเป็นค่า MPN โดยใช้ SimPlate Conversion Table (ภาคผนวก ข)

2.1.5 ทำการทดสอบยืนยันผลบวกอีกครั้ง โดยใช้ลูปเขี่ยหลุมที่ให้ผลบวกไปขีดบนอาหารวุ้นแข็ง EMB บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC)

2.2 Petrifilm™ *E. coli* Count Plate (PEC)

2.2.1 เปิดแผ่นบนของ PEC ขึ้น ปิเปตตัวอย่างแขวนลอย 1 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจางต่อเนื่อง 2 ค่า ถ่ายตัวอย่างลงตรงกลางของแผ่นล่าง ใช้ 2 แผ่นต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

2.2.2 ปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา พยายามให้เกิดฟองอากาศน้อยที่สุด

2.2.3 ใช้แท่นพลาสติกกดทับลงตรงกลางของแผ่นฟิล์มเบาๆ เพื่อกระจายตัวอย่างให้ทั่วพื้นผิวอาหาร โดยไม่ให้ตัวอย่างแผ่ล้นขอบอาหารออกไป

2.2.4 นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง

2.2.5 อ่านผลบวกโดยนับจำนวนโคโลนีสีแดงและสีน้ำเงินที่มีฟองก๊าซเกิดรอบโคโลนีทั้งหมดบนแผ่นฟิล์ม รายงานเป็นจำนวน Colliforms ทั้งหมด และนับเฉพาะจำนวนโคโลนีสีน้ำเงินที่มีฟองก๊าซรอบโคโลนี รายงานเป็นจำนวน *E. coli* ทั้งนี้โคโลนีสีแดงและสีน้ำเงินที่ไม่มีฟองก๊าซรอบโคโลนีจะไม่นับว่าเป็น Coliforms & *E. coli* ควรนับแผ่นฟิล์มที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 15-150 โคโลนี

2.2.6 ทำการตรวจสอบยืนยันผลบวก โดยใช้ลูปเขี่ยโคโลนีผลบวกที่อยู่ในเจลของแผ่นฟิล์มด้านบน เลือก 2-3 โคโลนีต่อ 1 แผ่นฟิล์ม ไปขีดลงบนอาหารวุ้นแข็ง EMB นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC)

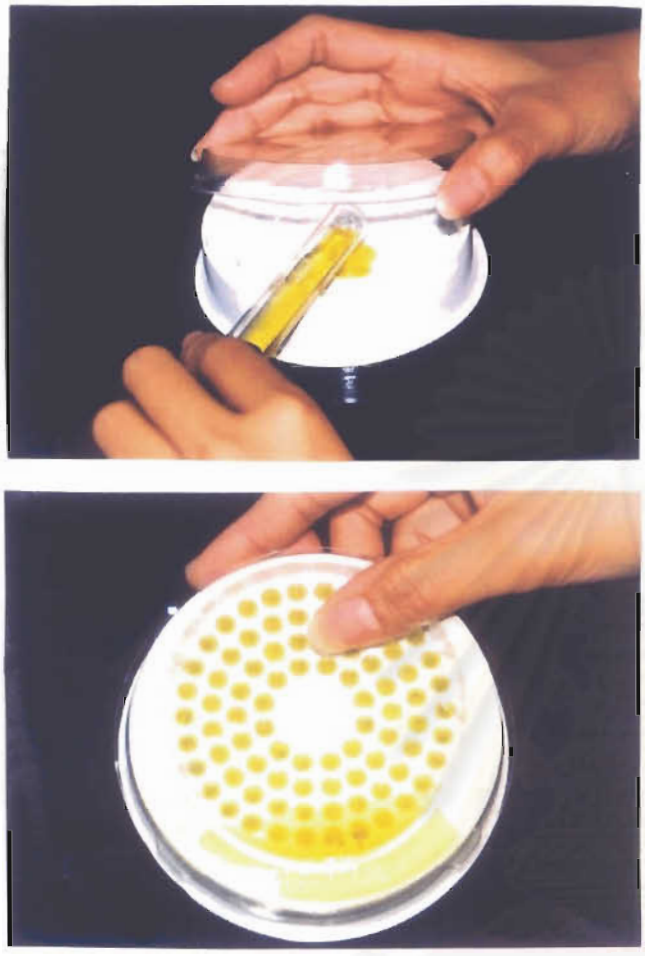
2.3 Chromocult^{TM} Coliform Agar (CCA)

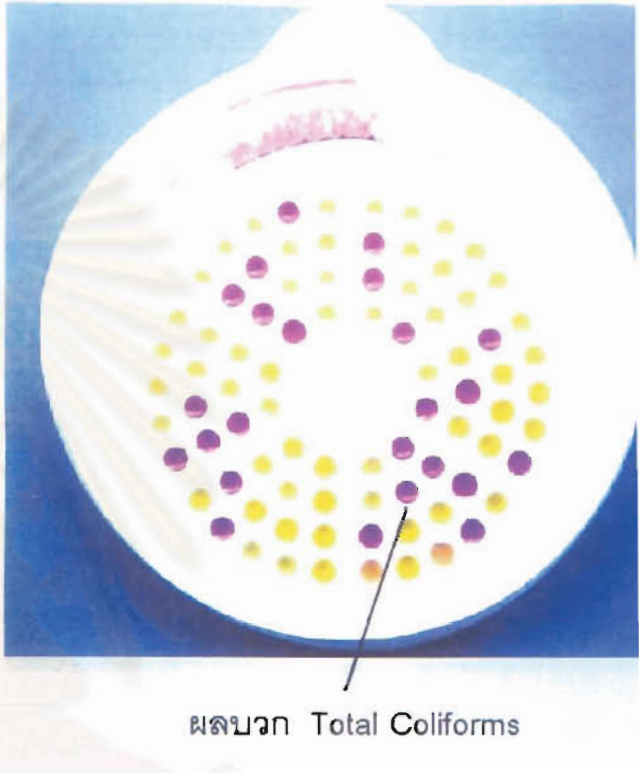
2.3.1 ปิเปตตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร กระจายลงบนอาหารวุ้นแข็ง CCA โดยใช้ 3 เพลทต่อหนึ่งระดับการเจือจาง บ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

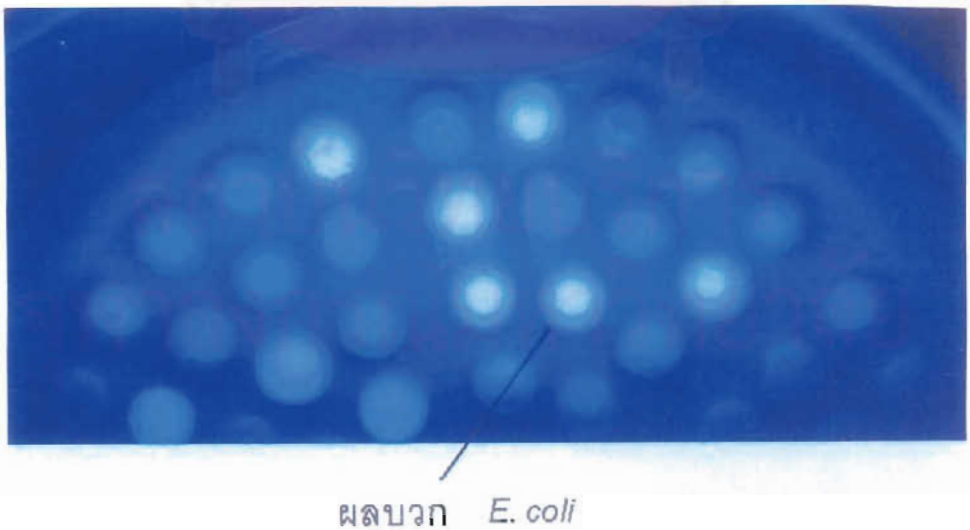
2.3.2 อ่านผลบวกของการทดสอบ โดยนับโคโลนีสีแดงและสีน้ำเงินทั้งหมดรายงานเป็นจำนวน Coliforms ทั้งหมด และนับเฉพาะจำนวนโคโลนีสีน้ำเงินม่วง รายงานเป็นจำนวน *E. coli* ควรนับจำนวนโคโลนีระหว่าง 15-150 โคโลนี

2.3.3 ทำการตรวจสอบยืนยันผลบวก โดยใช้ลูปเขี่ยโคโลนีผลบวก เลือก 2-3 โคโลนีต่อ 1 เพลท ไปขีดลงบนอาหารวุ้นแข็ง EMB นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC)

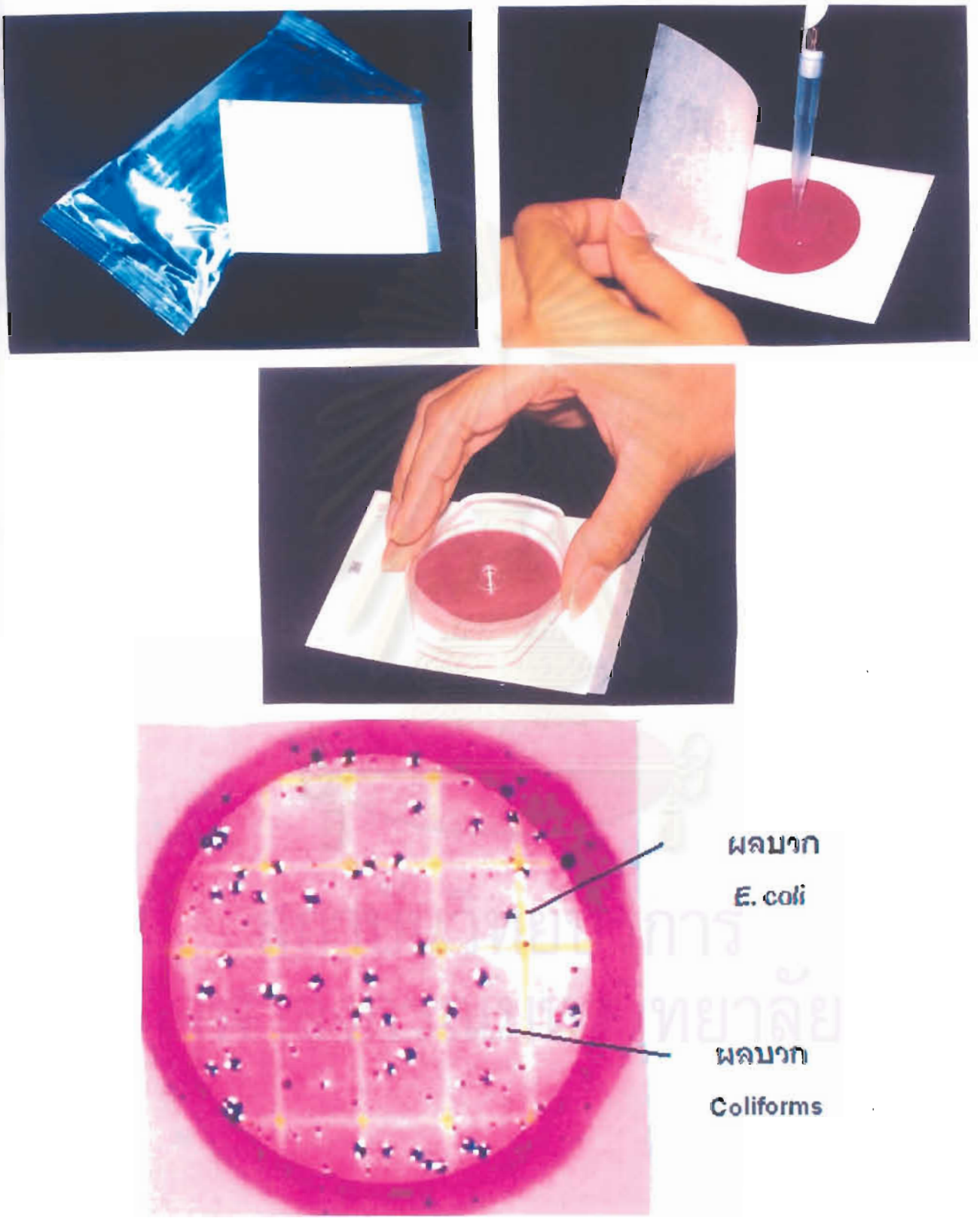
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



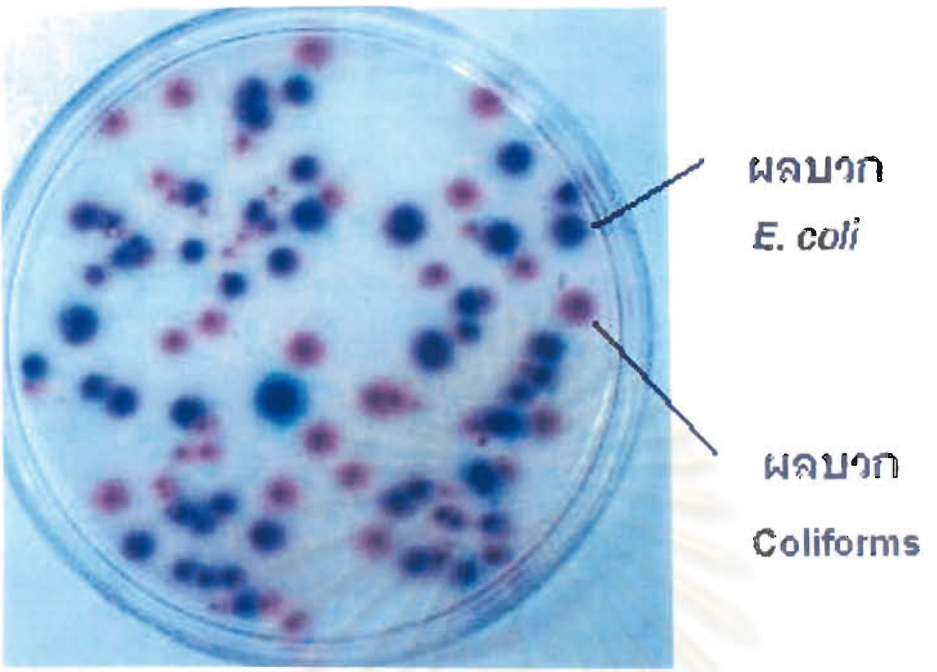




รูปที่ 4 การแจงนับ Total Coliforms & *E. coli* ด้วย SimPlate™ Total Coliform & *E. coli* (SCEc)



รูปที่ 5 ขั้นตอนการตรวจหา Total Coliforms & *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plate (PEC)



รูปที่ 6 การตรวจหา Total Coliforms & *E. coli* ด้วย Chromocult^{TM} Coliform Agar (CCA)

ประเมินประสิทธิภาพของขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับ (Mean $\log_{10}$) ของจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli* โดยวิธีมาตรฐานในเนื้อแช่เยือกแข็งก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง

เปรียบเทียบการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli* ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

แปรผลการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli* ให้อยู่ในรูปล็อกกาลิธึม ($\log_{10}$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับ (Mean $\log_{10}$) ที่ได้จากวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน

เปรียบเทียบความสอดคล้องระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจง *E. coli*

ความสอดคล้องของการทดสอบระหว่างวิธีรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน หมายถึง ร้อยละของอัตราส่วนความสามารถในการตรวจตัวอย่างของทั้งสองวิธีเปรียบเทียบกัน (Keith, 1997)

$$\text{ความสอดคล้อง (\%)} = \frac{\text{ผลบวกของวิธีรวดเร็ว} \times 100}{\text{ผลบวกของวิธีมาตรฐาน}}$$

เปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีทดสอบในการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms

ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติดูความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวแปร 2 ตัวแปร (Linear Regression Analysis) เพื่อเปรียบเทียบค่า Correlation coefficient

หมายเหตุ : การแปรผลทางสถิติที่วิเคราะห์ด้วย Linear Regression Analysis โดยดูความสัมพันธ์ของตัวแปรสองตัวแปรจากค่า Correlation coefficients (r) (ธวัชชัย งามสันติวงศ์, 2544)

0.00-0.20 ตัวแปรไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน

0.20-0.40 ตัวแปรมีความสัมพันธ์ต่อกันในระดับต่ำ

0.40-0.60 ตัวแปรมีความสัมพันธ์ต่อกันในระดับกลาง

0.60-0.80 ตัวแปรมีความสัมพันธ์ต่อกันในระดับค่อนข้างสูง

0.80-1.00 ตัวแปรมีความสัมพันธ์ต่อกันในระดับสูง

เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน Coliforms & *E. coli* ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

1. การทดสอบยืนยัน Coliforms โดยนำผลบวกที่ได้จากการทดสอบว่าเป็น Coliforms มาถ่ายลงในอาหารเหลว BGLB เพื่อดูความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโทส (Nelson *et al*, 1984) และทดสอบด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase ซึ่ง Coliforms จะให้ผลลบต่อปฏิกิริยานี้

หมายเหตุ : ตรวจหาเอนไซม์ DNase ในอาหาร DNase Agar ของบริษัท Difco, USA โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วมาแตะบนอาหารวุ้น DNase Agar นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยเท 1 N HCl ลงบนผิวหน้าวุ้น ดีเอ็นเอสายคู่ในอาหารจะตกตะกอน ส่วนจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ DNase จะสามารถย่อยดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งไม่ตกตะกอนเมื่อเททับด้วย 1 N HCl ทำให้เห็นเป็นวงในรอบโคโลนีนั้น (Brenner, 1984)

2. การทดสอบยืนยัน *E. coli* โดยนำผลบวกที่ได้จากการทดสอบว่าเป็น *E. coli* มาทำการทดสอบทางชีวเคมี (IMViC) (FDA, 2001)

3. ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีทดสอบ ควรมีการรายงานผลบวกเท็จและผลลบเท็จที่ต่ำหรือไม่มีเลย (McClure, 1990)

$$\text{ผลบวกเท็จ (\%)} = \frac{\text{จำนวนผลลบจริงที่ถูกรายงานว่าเป็นบวก} \times 100}{\text{จำนวนผลบวกทั้งหมด}}$$

$$\text{ผลลบเท็จ (\%)} = \frac{\text{จำนวนผลบวกจริงที่ถูกรายงานว่าเป็นลบ} \times 100}{\text{จำนวนผลลบทั้งหมด}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ของวิธีทดสอบโดยใช้ Linear Regression Analysis เทียบค่า Correlation coefficients (r), Slopes และ Y- intercepts ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MS Excel 2002 และวิเคราะห์ความต่างของค่าเฉลี่ย (mean $\log_{10}$) เพื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน โดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.07

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปแผนภาพรวมของการดำเนินการวิจัย

1. ประเมินประสิทธิภาพของขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง

จุลินทรีย์รวม : PCA

Coliforms & *E. coli* : MPN

<u>ตัวอย่างแช่เยือกแข็ง</u>

ไก่ก่อนและหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

กุ้งก่อนและหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

ซูริมิก่อนและหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

2. เปรียบเทียบและประเมินการใช้วิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

<u>วิธีมาตรฐาน</u>

จุลินทรีย์รวม : PCA

Coliforms & *E. coli* : MPN

<u>วิธีรวดเร็ว</u>

SimPlate : STPC

: SCEc

Petrifilm : PAC

: PEC

Chromocult™ Coliform Agar : CCA

<u>หมายเหตุ</u> จากตัวอย่างได้ทำการทดสอบเบื้องต้นจนทำให้ทราบระดับการเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่าง ทำให้การใช้อุปกรณ์ในวิธีรวดเร็วประหยัดขึ้น

ในการทดลองนี้ : PCA ทำซ้ำ 3 เพลทต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

STPC-CI ทำซ้ำ 2 เพลทต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

PAC ทำซ้ำ 2 แผ่นต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

SCEc ทำซ้ำ 2 เพลทต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

PEC ทำซ้ำ 2 แผ่นต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

CCA ทำซ้ำ 3 เพลทต่อหนึ่งระดับการเจือจาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ประเมินประสิทธิภาพของขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง

เปรียบเทียบการแจงนับจุลินทรีย์รวมในตัวอย่างไก่ กุ้งและซูริมิ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง รูปที่ 7ก ค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมของเนื้อก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งทั้ง 3 ชนิด แตกต่างจากค่าเฉลี่ยการแจงนับของเนื้อหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งทั้ง 3 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เหมือนกัน แต่จากตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าปริมาณจุลินทรีย์รวมในตัวอย่างหลังจากผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งลดลงเพียงเล็กน้อย ขณะที่ในกุ้งและซูริมิหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งปริมาณจุลินทรีย์รวมลดลงประมาณ 1.5 log คือจาก 6.61±0.12 ลดลงเป็น 4.92±0.12 ในกุ้ง และจาก 7.17±0.11 ลดลงเป็น 5.61±0.11 ในซูริมิ

เปรียบเทียบการแจงนับ Total Coliforms ในตัวอย่างไก่, กุ้งและซูริมิ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง รูปที่ 7ข แสดงให้เห็นว่ามีเพียงค่าเฉลี่ยการแจงนับของกุ้งก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งเท่านั้นที่แตกต่างจากหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ยการแจงนับของไก่และซูริมิก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยปริมาณ Total Coliforms ในกุ้ง หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งลดลงประมาณ 0.5 log คือจาก 1.49±0.09 เป็น 1.08±0.09 (ตารางที่ 6)

เปรียบเทียบการแจงนับ *E. coli* ในตัวอย่างไก่,กุ้ง และซูริมิก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง พบว่าค่าเฉลี่ยการแจงนับของซูริมิก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งแตกต่างจากหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยปริมาณ *E. coli* ลดลงประมาณ 1.2 log คือจาก 3.30±0.16 เป็น 2.06±0.12 (ตารางที่ 6) ส่วนในตัวอย่างไก่พบว่าค่าเฉลี่ยการแจงนับลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ตรวจไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่างกุ้งทั้งก่อนและหลังผ่านขั้นตอนแช่เยือกแข็ง

2. เปรียบเทียบการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms และ *E. coli* ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

เปรียบเทียบการแจงนับจุลินทรีย์รวมระหว่างวิธีทดสอบในตัวอย่างไก่ กุ้งและซูริมิ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จากรูปที่ 8ก ในตัวอย่างไก่หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง วิธี STPC-CI และ PAC มีค่าเฉลี่ยการแจงนับแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน (PCA) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ค่าเฉลี่ยการแจงนับระหว่าง STPC-CI กับ PAC ไม่แตกต่างกัน($p>0.05$)

โดยมีค่า 4.77±0.08 และ 4.86±0.08 ใน STPC-CI และ PAC ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยการแจงนับของ PCA มีค่า 4.54±0.08 และในตัวอย่างซูริมิหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง วิธี STPC-CI ให้ค่าเฉลี่ยการแจงนับแตกต่างจากวิธี PCA อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยวิธี STPC-CI มีค่า 6.07±0.12 ส่วนวิธี PCA มีค่า 5.61±0.11 นอกนั้นให้ค่าเฉลี่ยการแจงนับไม่แตกต่างกันระหว่างแต่ละวิธีทดสอบ (ตารางที่ 7)

เปรียบเทียบการแจงนับ Total Coliforms ระหว่างวิธีทดสอบในตัวอย่างไก่ กุ้ง และซูริมิก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จากรูปที่ 8ข วิธี SCEc และ CCA มีค่าเฉลี่ยการแจงนับต่างจากวิธี MPN และ PEC อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ในตัวอย่างซูริมิก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งมีเพียง CCA เท่านั้นที่ต่างจากวิธีอื่นๆ ส่วนในตัวอย่างซูริมิหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือแข็งไม่พบความต่างของค่าเฉลี่ยการแจงนับระหว่างวิธีทดสอบ ค่าเฉลี่ยการแจงนับดังแสดงในตารางที่ 8

เปรียบเทียบการแจงนับ *E. coli* ระหว่างวิธีทดสอบในตัวอย่างไก่ กุ้ง และซูริมิ ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง จากรูปที่ 8ค พบว่าในตัวอย่างไก่ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งวิธี SCEc และ CCA มีค่าเฉลี่ยการแจงนับต่างจากวิธี MPN อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในตัวอย่างไก่หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งค่าเฉลี่ยการแจงนับของวิธี MPN , SCEc และ PEC ให้ค่าไม่แตกต่างกัน ในตัวอย่างซูริมิก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งค่าเฉลี่ยการแจงนับของแต่ละวิธีให้ค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่วิธีรวดเร็วทุกวิธีให้ค่าเฉลี่ยการแจงนับต่างจากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างซูริมิหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) ค่าเฉลี่ยการแจงนับดังแสดงในตารางที่ 9

3. เปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทดสอบในการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms

ในการแจงนับจุลินทรีย์รวมเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Linear Regression พบว่าวิธี PCA, STPC-CI และ PEC มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในระดับสูง โดยระหว่างวิธี PCA กับ STPC-CI มีค่า r = 0.95 Slope = 1.04 และ Y-intercept = 0.04 ระหว่างวิธี PCA กับ PAC มีค่า r = 0.96 Slope = 0.98 และ Y-intercept = 0.27 และระหว่างวิธี PAC กับ STPC-CI มีค่า r = 0.96 Slope = 1.03 และ Y-intercept = -0.10 (รูปที่ 9)

ในการแจงนับ Total Coliforms เมื่อเปรียบเทียบวิธี SCEc, PEC และ CCAกับวิธี MPN พบว่าระหว่างวิธี MPN กับ SCEc มีค่า r = 0.82, Slope = 0.83 และ Y-intercept = 1.01 วิธี MPN กับ PEC มีค่า r = 0.89 Slope = 0.86 และ Y-intercept = 0.42 และวิธี MPN กับวิธี CCA มีค่า r = 0.79 Slope = 0.80 และ Y-intercept = 1.30 (รูปที่ 10)

ส่วนการแจงนับ Total Coliforms เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีรวดเร็วพบว่า วิธี PEC กับ SCEc มีค่า r = 0.85 Slope = 0.91 และ Y-intercept = 0.81 วิธี PEC กับวิธี CCA มีค่า r = 0.84 Slope = 0.90 และ Y-intercepct = 1.04 และวิธี SCEc กับ CCA มีค่า r = 0.85 Slope = 0.86 และ Y-intercept = 0.65 (รูปที่ 11)

4. เปรียบเทียบความสอดคล้องระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจงนับ *E. coli*

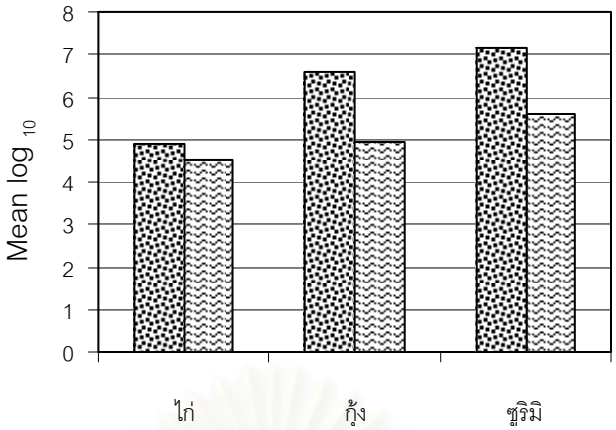
ความสอดคล้องในการแจงนับ *E. coli* ระหว่างวิธี SCEc, CCA และ PEC เทียบกับวิธี MPN มีค่า 77.78% 34.57% และ 41.98% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

5. เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน Coliforms และ *E. coli* ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

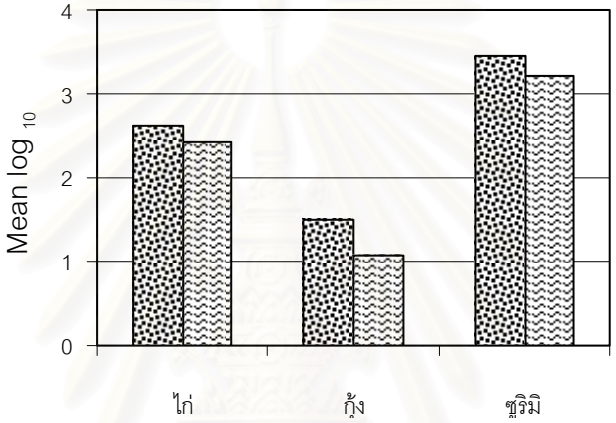
ตรวจสอบยืนยัน Coliforms และ *E. coli* ที่ให้ผลบวกจากวิธีทดสอบ โดยการยืนยันผลบวกของ Coliforms ที่ตรวจพบโดยวิธี MPN, SCEc, CCA และ PEC โดยดูจากความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโทส มีค่า 96.35% 92.44% 93.60% และ 95.24% ตามลำดับ มีผลบวกเท็จเท่ากับ 3.65% 7.56% 6.40% และ 4.76% ตามลำดับ การยืนยันผลบวกของ Coliforms ที่ตรวจพบโดยวิธี MPN, SCEc, CCA และ PEC โดยการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase ซึ่ง Coliforms จะให้ผลลบในปฏิกิริยานี้ พบว่าการยืนยันผลบวกของ Coliforms มีค่า 83.20% 64.41% 69.59% และ 76.09% ตามลำดับ กล่าวได้ว่ามีผลบวกเท็จเท่ากับ 16.80% 35.59% 30.41% และ 30.00% ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ส่วนการยืนยันผลบวกของ *E. coli* ที่ตรวจพบโดยวิธี MPN, SCEc, CCA และ PEC โดยการทดสอบทางชีวเคมี (IMViC) มีค่า 90.05% 86.32% 74.44% และ 96.02% ตามลำดับ มีผลบวกเท็จเท่ากับ 9.95% 13.68% 25.56% และ 3.98% ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

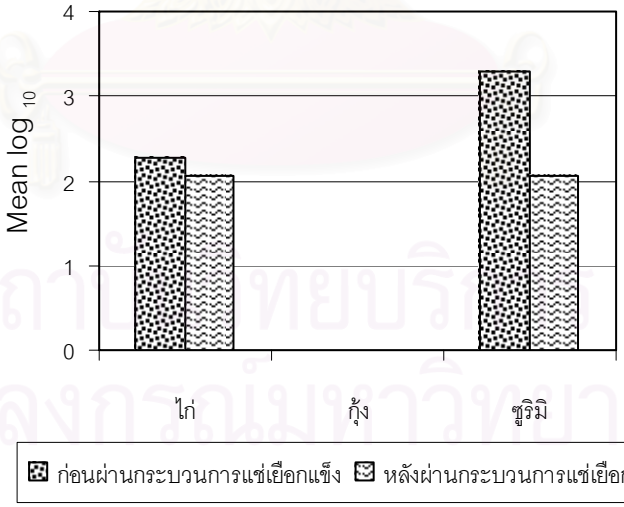
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับโดยวิธีมาตรฐาน ก) จุลินทรีย์รวม ข) Total Coliforms ค) *E. coli*

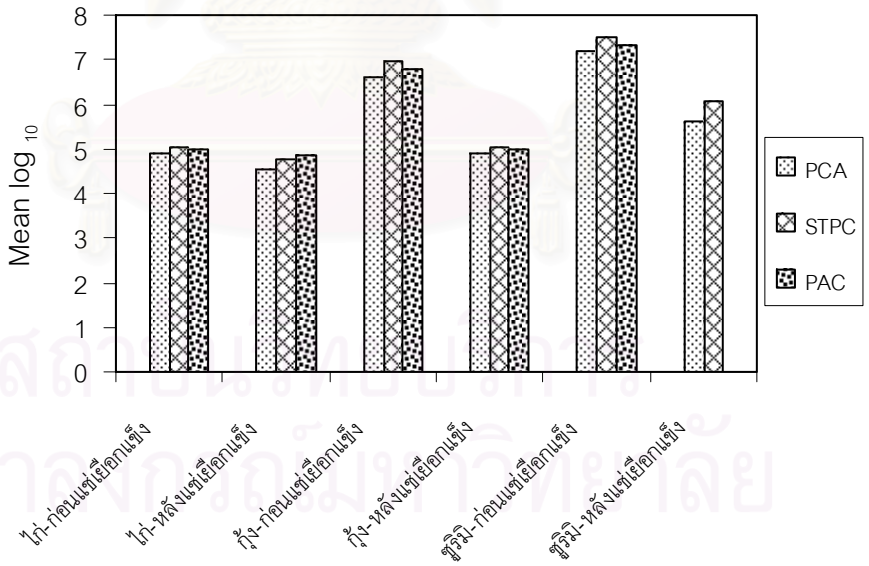
หมายเหตุ : * หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E. coli*

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์รวม Mean log±SE (จำนวนตัวอย่าง)		Total Coliforms Mean log±SE (จำนวนตัวอย่าง)		*E. coli* Mean log±SE (จำนวนตัวอย่าง)	
	ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง	หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง	ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง	หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง	ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง	หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง
ไก่	4.88±0.08 (48)	4.54±0.08 (48)	2.63±0.13 (48)	2.42±0.09 (48)	2.27±0.12 (29)	2.06±0.09 (25)
กุ้ง	6.61±0.12 (48)	4.92±0.12 (45)	1.49±0.09 (49)	1.08±0.09 (45)	nd	nd
ซูริมิ	7.17±0.11 (38)	5.61±0.11 (50)	3.46±0.09 (39)	3.22±0.12 (50)	3.30±0.16 (14)	2.06±0.12 (13)

หมายเหตุ : nd = non-detected

ก)



รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับโดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน ก) จุลินทรีย์รวม

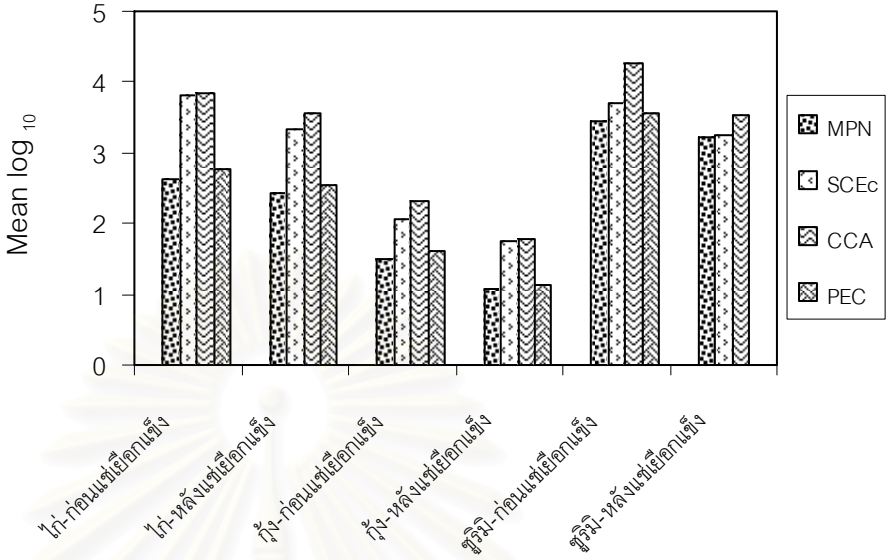
หมายเหตุ : * หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

PCA = Plate Count Agar

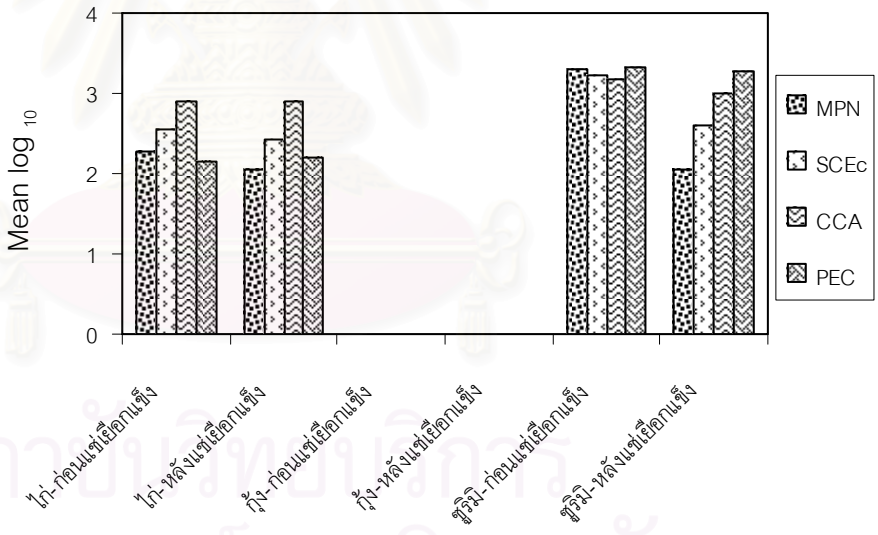
STPC-CI = SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator

PAC = Petrifilm™ Aerobic Count

ข)



ค)



รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับโดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

ข) Total Coliforms ค) *E. coli*

หมายเหตุ : * หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

MPN = Most Probable Number

SCEc = SimPlate™ Total Coliform & *E. coli*

CCA = Chromocult™ Coliform Agar

PEC = Petrifilm™ *E. coli* / Coliform Count Plate

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมโดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์รวม Mean log±SE % CV (จำนวนตัวอย่าง)					
	ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง			หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง		
	PCA	STPC-CI	PAC	PCA	STPC-CI	PAC
ไก่	4.88±0.08 12.05 % (48)	5.02±0.09 12.57 % (48)	4.98±0.09 12.05 % (48)	4.54±0.08 12.06 % (48)	4.77±0.08 11.20 % (48)	4.86±0.08 11.69 % (48)
กุ้ง	6.61±0.12 12.78 % (48)	6.96±0.15 14.96 % (49)	6.76±0.13 13.63 % (49)	4.92±0.12 16.01 % (45)	5.02±0.13 18.03 % (45)	4.97±0.12 15.86 % (45)
ซูริมิ	7.17±0.11 9.05 % (38)	7.52±0.09 7.46 % (38)	7.33±0.13 10.55 % (38)	5.61±0.11 13.61 % (50)	6.07±0.12 13.88 % (50)	ND

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับ Total Coliforms โดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่าง	Total Coliforms Mean log±SE % CV (จำนวนตัวอย่าง)							
	ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง				หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง			
	MPN	SCEc	CCA	PEC	MPN	SCEc	CCA	PEC
ไก่	2.63±0.13 33.47 % (48)	3.81±0.15 26.38 % (48)	3.84±0.12 22.13 % (48)	2.76±0.11 27.15 % (48)	2.42±0.09 25.49 % (48)	3.44±0.10 21.59 % (48)	3.56±0.09 17.85 % (48)	2.54±0.07 17.97 % (48)
กุ้ง	1.49±0.09 44.63 % (49)	2.06±0.08 28.07 % (49)	2.32±0.08 23.78 % (45)	1.60±0.07 30.53 % (49)	1.08±0.09 53.59 % (45)	1.74±0.110 39.90 % (45)	1.77±0.11 40.55 % (45)	1.12±0.08 46.24 % (45)
ซูริมิ	3.46±0.09 16.51 % (39)	3.71±0.09 15.85 % (39)	4.26±0.08 12.12 % (39)	3.55±0.09 16.56 % (39)	3.22±0.12 26.39 % (50)	3.24±0.14 30.67 % (50)	3.53±0.13 26.39 % (50)	ND

หมายเหตุ : ND = Not Done

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแจงนับ *E. coli* โดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน

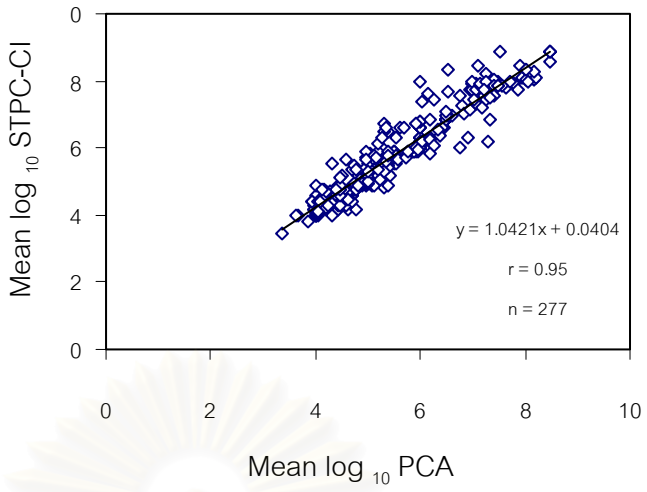
ตัวอย่าง	*E. coli* Mean log±SE (จำนวนตัวอย่าง)							
	ก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง				หลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง			
	MPN	SCEc	CCA	PEC	MPN	SCEc	CCA	PEC
ไก่	2.27±0.12 (29)	2.54±0.12 (29)	2.89±0.14 (20)	2.15±0.11 (21)	2.06±0.09 (25)	2.43±0.18 (17)	2.91±0.16 (6)	2.20±0.11 (7)
ซูริมิ	3.30±0.16 (14)	3.22±0.09 (9)	3.18±0.00 (1)	3.32±0.24 (5)	2.06±0.12 (13)	2.59±0.14 (8)	3.00±0.00 (1)	3.27±0.00 (1)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสอดคล้องในการแจงนับ *E. coli* ของวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน

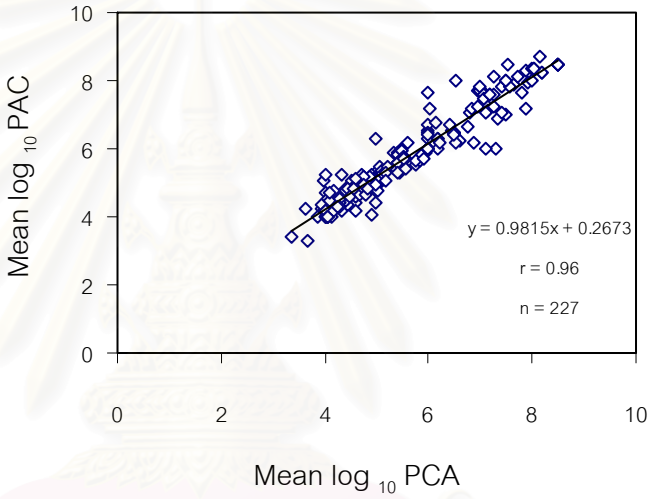
ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างผลบวก				จำนวนตัวอย่างผลลบ			ความสอดคล้องกับ MPN (%)		
	MPN	SCEc	CCA	PEC	SCEc	CCA	PEC	SCEc	CCA	PEC
ไก่	54	46	26	28	8	28	26	85.18	48.15	51.85
ซูริมิ	27	17	2	6	10	26	21	62.96	7.41	22.22
รวม	81	63	28	34	18	53	47	77.78	34.57	41.98

หมายเหตุ :
PCA = Plate Count Agar
STPC-CI = SimPlate™ Total Plate Count- Color Indicator
PAC = Petrifilm™ Aerobic Count
MPN = Most Probable Number
SCEc = SimPlate™ Total Coliform & *E. coli*
CCA = Chromocult™ Coliform Agar
PEC = Petrifilm™ *E. coli* / Coliform Count Plate

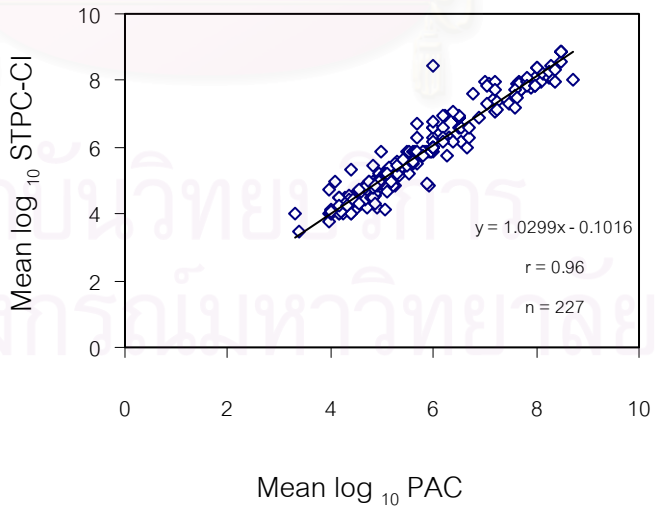
ก)



ข)



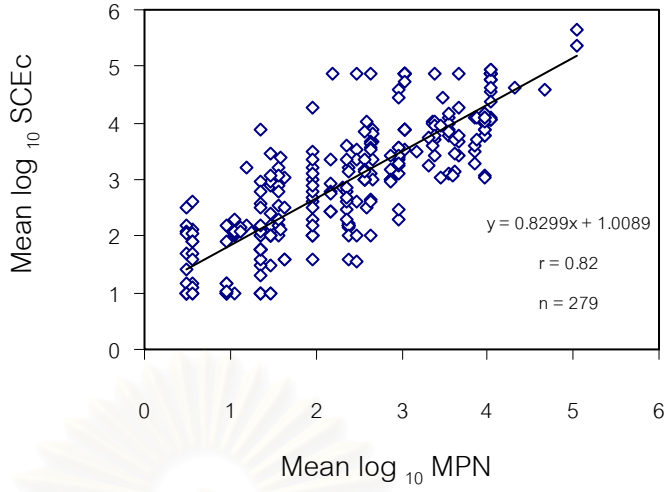
ค)



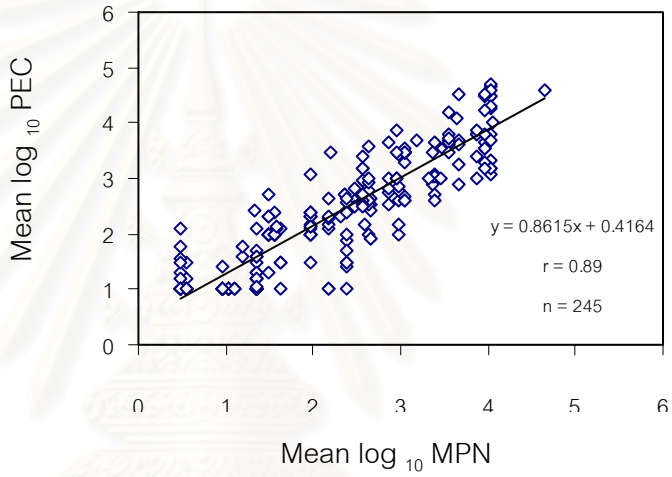
รูปที่ 9 Linear Regression Line ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจงนับจุลินทรีย์รวม

ก) PCA vs STPC-CI ข) PCA vs PAC ค) PAC vs STPC-CI

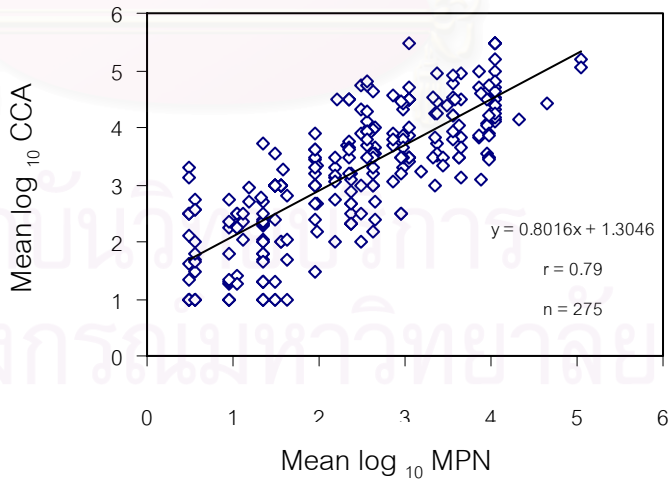
ก)



ข)



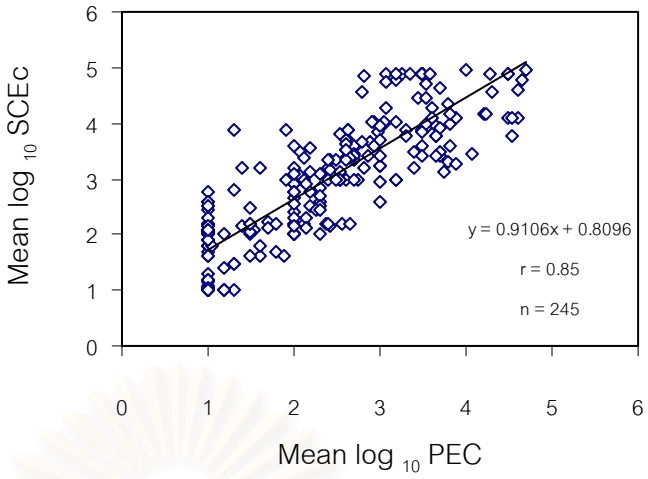
ค)



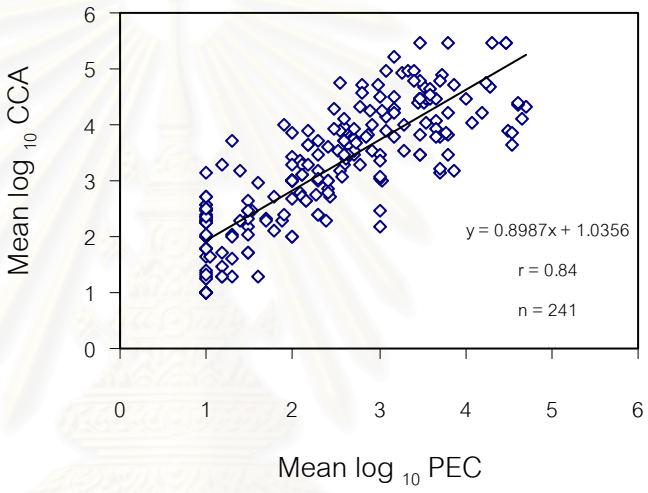
รูปที่ 10 Linear Regression Line ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจงนับ Total Coliforms ก) MPN vs SECe ข) MPN vs PEC ค) MPN vs CCA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

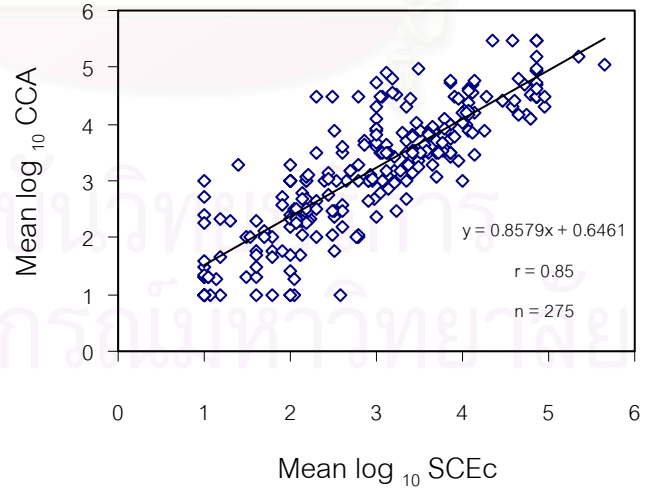
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 11 Linear Regression Line ระหว่างวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐานในการแจงนับ Total Coliforms ก) PEC vs SCEc ข) PEC vs CCA ค) SCEc vs CCA

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน Coliforms

วิธีทดสอบ	ตัวอย่าง	Coliforms			Coliforms		
		จำนวนผลบวกที่นำมาทดสอบ	ยืนยันผลบวกทางชีวเคมี *		จำนวนผลบวกที่นำมาทดสอบ	ยืนยันผลบวกด้วย DNase Test	
			ยืนยันผลบวก	ผลบวกเท็จ		ยืนยันผลบวก	ผลบวกเท็จ
MPN	ไก่	394	378 (95.94%)	16 (4.06 %)	100	83 (83.00 %)	17 (17.00 %)
	กุ้ง	311	304 (97.75 %)	7 (2.25 %)	100	87 (87.00 %)	13 (13.00 %)
	ซูริมิ	310	296 (95.48 %)	14 (4.52 %)	50	38 (76.00 %)	12 (24.00 %)
	รวม	1015	978 (96.35 %)	37 (3.65 %)	250	208 (83.20 %)	42 (16.80 %)
SCEc	ไก่	200	192 (96.00 %)	8 (4.00 %)	80	63 (75.75 %)	17 (21.25 %)
	กุ้ง	150	145 (96.67 %)	5 (3.33 %)	45	36 (80.00 %)	9 (20.00 %)
	ซูริมิ	1038	94 (91.14 %)	92 (8.86 %)	170	91 (53.53 %)	79 (46.47 %)
	รวม	1388	1283 (92.44 %)	105 (7.56 %)	295	190 (64.41 %)	105 (35.59 %)
CCA	ไก่	250	234 (93.60 %)	16 (6.40 %)	80	62 (77.50 %)	18 (22.5 %)
	กุ้ง	150	146 (97.33 %)	4 (2.67 %)	50	36 (72.00 %)	14 (28.00 %)
	ซูริมิ	490	453 (92.45 %)	37 (7.55 %)	171	119 (69.59 %)	52 (30.41 %)
	รวม	890	833 (93.60 %)	57 (6.40 %)	301	217 (72.09 %)	84 (27.91 %)
PEC	ไก่	65	64 (98.46 %)	1 (1.54 %)	50	40 (60.00 %)	10 (20.00 %)
	กุ้ง	50	49 (98.00 %)	1 (2.00 %)	38	30 (78.95 %)	8 (21.05 %)
	ซูริมิ	95	87 (91.58 %)	8 (8.42 %)	50	35 (70.00 %)	15 (30 %)
	รวม	210	200 (95.24 %)	10 (4.76 %)	138	105 (76.09 %)	33 (23.91 %)

* ความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโทส

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน *E. coli*

วิธีทดสอบ	ตัวอย่าง	*E. coli*		
		จำนวนผลบวกที่นำมาทดสอบ	ยืนยันผลบวกทางชีวเคมี (IMViC)	
			ยืนยันผลบวก	ผลบวกเท็จ
MPN	ไก่	75	68 (90.67 %)	7 (9.3 %)
	กุ้ง	-	-	-
	ซูริมิ	116	104 (89.66 %)	12 (10.34 %)
	รวม	191	172 (90.05 %)	19 (9.95 %)
SCEc	ไก่	30	25 (83.33 %)	5 (16.67 %)
	กุ้ง	-	-	-
	ซูริมิ	65	57 (87.69 %)	8 (12.31 %)
	รวม	**95**	**82 (86.32 %)**	**13 (13.68 %)**
CCA	ไก่	50	37 (74.00 %)	13 (26.00 %)
	กุ้ง	-	-	-
	ซูริมิ	83	62 (74.70 %)	21 (25.30 %)
	รวม	**133**	**99 (74.44 %)**	**34 (25.56 %)**
PEC	ไก่	26	25 (96.15 %)	1 (3.85 %)
	กุ้ง	-	-	-
	ซูริมิ	150	144 (96.00 %)	6 (4.00 %)
	รวม	**176**	**169 (96.02 %)**	**7 (3.98 %)**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* ในตัวอย่างไก่ กุ้ง และซูริมิก่อนและหลังการผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง พบว่าการแจงนับจุลินทรีย์ดังกล่าวในตัวอย่างหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งให้ค่าที่ต่ำกว่าในตัวอย่างก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง กล่าวได้ว่าขั้นตอนการแช่เยือกแข็งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณจุลินทรีย์ ซึ่งในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะตอบสนองต่อภาวะอุณหภูมิต่ำที่แตกต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างภายในเซลล์ (Ingraham and Bailey, 1958) โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อการหายใจและการมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรับออกซิเจน (Oxygen uptake) และกระบวนการดังกล่าวยังสะท้อนถึงความสามารถของเซลล์ในการขนส่งสารต่างๆ ณ อุณหภูมินั้นๆ (Morita, 1975) นอกจากนี้อุณหภูมิยังส่งผลต่อการรับสารเข้าสู่ภายในเซลล์ (Solute uptake) เมื่อแบคทีเรียอยู่ในภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญ สารภายนอกเซลล์จะไม่สามารถถูกขนส่งผ่าน Cytoplasmic membrane เนื่องจากมีการเพิ่มการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในส่วนปรกอบของเนื้อเยื่อเซลล์ ทำให้โครงสร้าง Cytoplasmic membrane เสียสภาพ เมื่อผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็งจะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า “Cold shock” คือ เมื่อ Cytoplasmic membrane เสียสภาพ จะเกิดการสูญเสียสารโมเลกุลต่ำจากภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายทันที (Rose, 1968)

ในการแจงนับจุลินทรีย์รวมในตัวอย่างกุ้งและซูริมิก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง พบว่าปริมาณจุลินทรีย์รวมลดลงประมาณ 1.5 log แต่ไม่พบความแตกต่างในตัวอย่างไก่ อาจเนื่องจากชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างกุ้งและซูริมิมีความไวต่อขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อปรากฏการณ์ Cold shock มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียในระยะ log จะตายง่ายกว่าในระยะสเตชันนารี แต่ถ้าในอาหารมีสารอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญ แบคทีเรียสามารถเพิ่มการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อไขมันได้ ส่งผลให้อัตราการตายลดลง (Farrell and Rose, 1968) อาหารแต่ละประเภทจะมีสารอาหารที่แตกต่างกัน และในตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นตัวอย่างไก่ กุ้งและซูริมิซึ่งอุดมด้วยโปรตีน ไขมัน เกลือแร่และวิตามิน ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ยังขึ้นกับสารชนิดอื่นที่เติมลงไปในเนื้อเพื่อประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น ยืดระยะเก็บรักษา การคงสภาพสี เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวยังส่งผลต่อการเจริญและชนิดของแบคทีเรียด้วย(Ray, 2001) ในตัวอย่างเนื้อที่เก็บในอุณหภูมิต่ำ มักพบแบคทีเรียพวก *Pseudomonas* เป็นส่วนใหญ่ และยังมีแบคทีเรียกลุ่มอื่น ได้แก่ *Acinetobacter* spp, *Moraxella* spp, *Enterobacter* spp. และ *Microbacterium thermosphactum* โดยทั่วไปแบคทีเรียแต่ละชนิดจะสามารถใช้สารอาหารในเนื้อด้วยอัตราเร็ว

และบริเวณที่แบคทีเรียอาศัยที่ต่างกัน ขึ้นกับธรรมชาติของแบคทีเรียนั้น ๆ เช่น พวก Facultative anaerobes จะอยู่บริเวณผิวหน้ามากกว่าภายในเนื้อ และแบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถเจริญได้ดีในตัวอย่างเนื้อที่มีพีเอชต่ำ โดยพบว่าระยะเลค (Lag phase) ของการเจริญจะนานกว่าปกติ กลไกดังกล่าวเป็นการปรับตัวของแบคทีเรียเพื่อให้อยู่ในภาวะแวดล้อมได้ (Gill and Newton, 1977)

ในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด การปนเปื้อนด้วย Coliforms และ *E.coli* ในตัวอย่างกุ้งมีปริมาณ Total Coliforms น้อยที่สุด ไม่พบการปนเปื้อนด้วย *E.coli* ซึ่งแสดงถึงกระบวนการผลิตที่ถูกหลักอนามัย ทั้งการเก็บรักษายังมีประสิทธิภาพที่ดี ในตัวอย่างซูริมิจะตรวจพบจุลินทรีย์รวมและ Total Coliforms & *E.coli* ในปริมาณสูง แต่ขั้นตอนการแช่เยือกแข็งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *E.coli* ประมาณ 1.2 log ในขณะที่ปริมาณ Total Coliforms ลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากซูริมิเป็นเนื้อปลาบดที่ผ่านการล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดไขมันออกไป ดังนั้นองค์ประกอบส่วนใหญ่จึงเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังเติมสารป้องกันโปรตีนเสียสภาพ ได้แก่ น้ำตาล 4%, ซอร์บิทอล 4% และสารประกอบฟอสเฟต 0.2-0.3% ดังนั้นด้วยธรรมชาติของตัวอย่างจะช่วยเสริมการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนได้ดี ทำให้การแจงนับปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างซูริมิมีค่าสูง ส่วนในตัวอย่างไก่ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงน้อยกว่า 1 log ซึ่งแสดงถึงกรรมวิธีการเตรียมตัวอย่าง การเก็บรักษาและการผลิตที่มีประสิทธิภาพต่ำและไม่ถูกหลักอนามัยเท่าที่ควร ซึ่งปริมาณการแจงนับจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันนั้นอาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการผลิตและเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนและหลังขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง (Hanna *et.al*, 1982) ทั้งยังรวมไปถึงการขาดประสิทธิภาพของขั้นตอนการแช่เย็นในการเก็บตัวอย่างก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง ส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนเริ่มต้นมีค่าสูงในตัวอย่างก่อนผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง (Sheridan and Lynch, 1988)

<u>ข้อสังเกต</u>

ในการแจงนับ Coliforms & *E. coli* โดยวิธี MPN นั้นในขั้นตอน Presumptive test ซึ่งใช้อาหาร LST บางครั้งเกิดความสับสนในการอ่านผลบวกโดยดูจากความขุ่นและก๊าซที่ถูกดักอยู่ใน Durham tube ซึ่งอาจเกิดก๊าซเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีการเติมสี Bromcresol Purple ลงในอาหาร LST เพื่อดูการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจากกรดที่เกิดขึ้นจากการหมักน้ำตาลแลคโทสในอาหารโดย Coliforms (AHPA, AWWA and WEF,1998) ดังนั้นในขั้น Presumptive test จึงได้ใช้เกณฑ์การตัดสินใจในการอ่านผลบวกเพิ่มเป็น 3 กรณี คือ ความขุ่น ก๊าซในหลอด Durham tube และการเปลี่ยนสีของ Bromcresol Purple เพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจในการอ่านผลบวกได้อย่างถูกต้องยิ่งขึ้น

ในการเปรียบเทียบการแจงนับจุลินทรีย์รวมด้วยวิธีรวดเร็วกับมาตรฐานพบว่า วิธี STPC-CI และ PAC ให้ค่าเฉลี่ยการแจงนับต่างจากวิธี PCA อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดย STPC-CI และ PAC เป็นวิธีรวดเร็วใช้คุณสมบัติของ Redox dye ในการแจงนับจุลิทรีย์รวม โดยทั่วไปสีที่ใช้ในทางจุลชีววิทยามักใช้ควบกับคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสีและชนิดของจุลินทรีย์ เช่น Resazurin ซึ่งใช้เป็น Redox dye ใน STPC-CI จะไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ แต่จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด (Fung and Miller, 1973) จากการทดลอง STPC-CI ใช้เวลาในการบ่มเพียง 24 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี PCA และ PAC ใช้เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง แต่ค่าเฉลี่ยการแจงนับที่ได้จาก STPC-CI ต่างจากวิธี PCA อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ขณะที่ Beloti (2002) แจงนับจุลินทรีย์รวมในนมพาสเจอร์ไรส์ พบว่า STPC-CI หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมงมีค่าการแจงนับต่ำกว่าวิธี PCA ที่บ่ม 48 ชั่วโมง แต่ STPC-CI ให้ค่าที่เท่ากับ PCA เมื่อเพิ่มเวลาบ่มเป็น 48 ชั่วโมง สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าประสิทธิภาพการแจงนับจุลินทรีย์รวมโดยวิธี STPC-CI จะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้นๆ ด้วย และ Nero (2002) ใช้ STPC-CI ในการแจงนับจุลินทรีย์รวมพบว่าที่ 24 ชั่วโมง วิธี STPC-CI เทียบกับวิธี PCA ให้ค่า $r = 0.68$ แต่ค่าดังกล่าวเพิ่มเป็น 0.91 หลังจากใช้เวลาบ่มเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง โดยพบว่าผลลบเท็จที่เกิดใน STPC-CI เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก เพราะมีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันต่ำ จากผลการทดลองค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมในตัวอย่างทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยการแจง) นับ ตั้งแต่ประมาณ 5 ขึ้นไป ซึ่งอาจเป็นปริมาณที่มากพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน ทำให้ STPC-CI ให้ผลที่ไม่ต่างจากวิธี PCA Venkitanarayanan และคณะ (1997) ได้รายงานไว้ว่า resazurin จะมีประสิทธิภาพดีในการแจงนับจุลินทรีย์ปนเปื้อนในเนื้อที่มีปริมาณตั้งแต่ 10^6 CFU/cm^2 ขึ้นไป ทั้งนี้ STPC-CI อาศัยเทคนิค MPN ทำให้ลดปัญหาการนับผลไม่ได้เหมือนในวิธีที่รายงานเป็นจำนวนโคโลนี (CFU) เนื่องจากวิธีดังกล่าวจะนับจำนวนหลุมผลบวกและคิดค่าทางสถิติ นอกจากนี้วิธี STPC-CI ยังใช้เวลาบ่มเพียง 24 ชั่วโมงแต่ให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน กอปรกับเทคนิค MPN มีความไวมากกว่าเทคนิคการรายงานผลจากการนับโคโลนี (Smith and Townsend, 1999) ส่วนวิธี PAC ซึ่งใช้ Redox dye ชนิด 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride ก็มีค่าเฉลี่ยการแจงนับไม่ต่างจากวิธี PCA ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับที่เคยรายงานโดย Linton และคณะ (1997) ที่แจงนับปริมาณจุลินทรีย์รวมในเนื้อหมู ในปี 1999 Beloti ได้รายงานว่ามีแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถย่อย 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride ได้หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกถึง 98.71% ทั้งนี้การใช้วิธีรวดเร็วซึ่งใช้คุณสมบัติของ Redox dye ต้องคำนึงถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ผลจะแตกต่างกันไปในแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และพีเอช ที่ให้ผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยตรงด้วย (Learoyd

et al, 1992) สังเกตผลการแจงนับจุลินทรีย์รวมในบางตัวอย่างพบการแผ่ของโคโลนีในวิธี PCA ทำให้ไม่สามารถนับจำนวนได้ แต่ไม่พบเหตุการณ์ดังกล่าวในวิธี PAC ซึ่งอาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบของอาหารและลักษณะภายนอกที่เป็นแผ่นฟิล์ม ทำให้แบคทีเรียมีพื้นที่จำกัดในการสร้างโคโลนี ทั้งการสัมผัสกับอากาศก็น้อยกว่าวิธี PCA ทำให้โคโลนีบนแผ่นฟิล์มมีขนาดเล็ก ผลดังกล่าวสอดคล้องกับที่รายงานโดย Blackburn และคณะ (1996)

การแจงนับ Total Coliforms โดยวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่า วิธี SCEc และ CCA ให้ค่าเฉลี่ยการแจงนับที่สูงกว่าวิธี MPN และ PEC อาจจะเป็นเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกันในแต่ละวิธี โดยวิธี CCA มี Tergitol®-7 เป็นองค์ประกอบซึ่งจะไม่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียที่อ่อนแอเหมือนกับ Bile salt ที่ใช้ในวิธี MPN และ PEC ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บ (Perales, 2000) ส่วนวิธี SCEc ในอาหารสำเร็จรูปจะประกอบด้วยสารอาหารที่เสริมการเจริญของ Coliforms และสารเรืองแสงสำหรับตรวจ *E. coli* (Townsend *et al*, 1998) ในปี 1998 Himelbloom และ Pfutzenreuter รายงานว่า การแจงนับ Total Coliforms โดยอาศัยคุณสมบัติของสารเรืองแสง เช่น MUG จะเกิดการอ่านผลบวกเท็จจาก *Shigella, Salmonella, Klebsiella, Streptococcus* และ *Straphylococcus* นอกจากนี้ยังเกิดจากตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อปลาซาลมอนอีกด้วย ส่วนการอ่านผลบวกของ *E. coli* จากคุณสมบัติของเอนไซม์ β-Glucuronidase ก็อาจเกิดผลบวกเท็จได้ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่แล้วในอาหารดิบบางประเภท (de Boer, 1998) Venkateswaran และคณะ (1996) จึงแนะนำว่าควรนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการกำจัดสารเรืองแสงก่อนนำมาทำการทดสอบ ส่วนวิธี PEC ที่ได้ค่าเฉลี่ยการแจงนับที่ต่ำอาจเป็นผลมาจากโอกาสในการอ่านผลบวกผิดมีสูง เพราะผลบวกนับเฉพาะโคโลนีที่มีฟองก๊าซเกิดรอบโคโลนี ซึ่งในตัวอย่างที่มีปริมาณจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนมากขณะที่ Coliforms มีอยู่ในปริมาณน้อยจะยากแก่การอ่านผล (Blackburn *et al*, 1996) และบางครั้งการสร้างก๊าซอาจถูกยับยั้งโดยไม่ทราบสาเหตุ ทำให้เกิดการอ่านผลลบเท็จได้ (Kinneberg, 2002) นอกจากนี้ในปี 1998 Ogden ยังรายงานว่า PEC ให้ผลการแจงนับที่ต่ำเนื่องจากถูกยับยั้งด้วย Undiluted mussel homogenate Tryland และ Fiksday (1998) รายงานว่าผลบวกเท็จที่เกิดจากการใช้คุณสมบัติของเอนไซม์ β-Galactosidase และ β-Glucuronidase ในการแจงนับ Total Coliforms & *E. coli* เป็นผลมาจากทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ แม้วิธี MPN เป็นวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อจำกัดในการตรวจ Total Coliforms & *E. coli* เนื่องจากถูกรบกวนได้ด้วยแบคทีเรียชนิดอื่น ขาดความจำเพาะและมีประสิทธิภาพต่ำในการตรวจแบคทีเรียที่เจริญช้าหรือในกลุ่ม VBNC (Viable but non-culturable microorganisms) (Rompre' *et al*, 2002) แต่วิธี

MPN มีความสามารถในการตรวจหาแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดีกว่าวิธีการนับโคโลนี (Tran and Hitchins, 1996) ดังในการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน จะเห็นได้ว่า ในบางตัวอย่างมีเพียงวิธี MPN และ SCEc เท่านั้นที่สามารถตรวจ Total Coliforms & *E. coli* ได้ แต่ไม่สามารถตรวจพบในวิธี PEC และ CCA ซึ่งอ่านผลบวกจากโคโลนีที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยการแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* โดยวิธีทางสถิติ (Linear Regression Analysis) พบว่าการแจงนับจุลินทรีย์รวมทั้งวิธี STPC-CI, PAC และ PCA มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในระดับสูง คือให้ค่า Correlatin coefficient (r) ระหว่าง 0.95-0.96 ซึ่งการเปรียบเทียบ PAC กับ PCA ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Jordano และคณะ (1995) ที่ได้ค่า r = 0.90 Blackburn และคณะ (1996) ได้ค่า r = 0.99 Park และคณะ (2001) ได้ค่า r = 0.94-0.99 เมื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อ Ellis และ Meldrum (2002) ได้ค่า r = 0.80 และ Romini และคณะ (2003) ได้ค่า r = 0.92 เมื่อตรวจในตัวอย่างนมดิบ ส่วนการเปรียบเทียบวิธี STPC-CI กับ PCA นั้นให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Ogihara ในปี 2002 ซึ่งได้ค่า r = 0.93 และการทดลองของ Smith และ Townsend (1999) เมื่อเทียบวิธี STPC-CI กับ PCA และ PAC ได้ค่า r อยู่ระหว่าง 0.91-0.97

ส่วนการแจงนับปริมาณ Coliforms & *E. coli* โดยวิธีรวดเร็วและวิธีมาตรฐาน พบว่าทั้ง 4 วิธี คือ MPN SCEc PEC และ CCA มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในระดับสูงเช่นกัน คือได้ค่า r อยู่ระหว่าง 0.79-0.89 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ingram และ Moody (1990), Ogden และคณะ (1998) Townsend และคณะ (1998) Perales (2000) Turner (2000) และ Ogihara และคณะ (2002)

ในการยืนยันผลบวกในการแจงนับ Coliforms ด้วยความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโทส พบว่าวิธี MPN ให้ผลบวกเท็จต่ำสุด (3.65%) และวิธี SCEc ให้ผลบวกเท็จสูงสุด (7.56%) ซึ่งผลบวกที่นำมาทดสอบการย่อยน้ำตาลแลคโทสอาจเป็นแบคทีเรียนอกกลุ่ม Coliforms แต่มีความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโทสได้เช่นกัน (Nelson *et al*, 1984) แต่ในการทดลองมิได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ให้ผลบวกเท็จ ในปี 2000 Geissler และคณะรายงานว่าผลบวกเท็จจากการแจงนับ Coliforms เกิดจาก *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. และ Finny และคณะ (2003) รายงานว่าผลบวกเท็จเกิดจาก *Hafnia* spp. *Kluyvera* spp. *Morganella* spp. *Salmonella* spp. และ *Pseudomonas* spp. อีกด้วย

ปัจจุบัน DNase test นิยมใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci โดยเฉพาะ *S. aureus* ที่ผลิต Enterotoxin (Tamini *et al*, 1976; Su and Wong, 1997) แต่ในภาวะเดียวกันจะมีการผลิตนิวคลีเอสทนร้อน (Thermo nuclease, DNase) ขึ้นด้วย (Lachica *et al*, 1969) จึงมีการตรวจหาเอนไซม์ DNase เพื่อยืนยันการปนเปื้อนด้วย *S. aureus* ขั้นต้น (Meyrand *et al*, 1999) ในการทดลองนี้จึงประยุกต์ใช้ DNase agar เพื่อยืนยันผลบวกการแจงนับ Coliforms โดยแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีเฉพาะ *Serratia* spp. เท่านั้นที่ให้ผลบวก แต่ Coliforms จะให้ผลลบต่อปฏิกิริยาดังกล่าว จากการทดลองพบว่าผลบวกเท็จจากการแจงนับ Coliforms มีค่าเพิ่มขึ้นในทุกวิธีทดสอบ โดยวิธี SCEc ให้ค่าผลบวกเท็จสูงสุด (35.59%) ดังนั้นในการยืนยันผลทางชีวเคมีควรทำมากกว่าหนึ่งปฏิกิริยาเพื่อให้ผลที่ถูกต้องยิ่งขึ้น และผลดังกล่าวนี้ยังแสดงถึงความจำเพาะในการแจงนับ Coliforms ของแต่ละวิธีอีกด้วย

ส่วนการยืนยันผลบวกของ *E. coli* โดยใช้วิธีทางชีวเคมี (IMViC) นั้น วิธี PEC ให้ผลบวกเท็จต่ำสุด (3.98%) และ CCA ให้ผลบวกเท็จสูงสุด (25.56%) การยืนยันผลบวก *E. coli* โดยทั่วไปใช้ผลการทดสอบทางชีวเคมี (IMViC) *E. coli* จะให้รูปแบบผลบวกเป็น + + - - เฉพาะ *E. coli* เท่านั้นที่ให้ผลบวกในปฏิกิริยา Indole (Anderson and Baird-Parker, 1975; Byamukama *et al,* 2000) แต่จากปฏิกิริยา IMViC อาจพบผลบวกเท็จได้เช่นกัน (APHA, 2001) ในปี 1991 Rice รายงานว่าการยืนยันผลบวกของ *E. coli* โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์ β-glucuronidase ของ *E. coli* นั้นให้ผลที่ถูกต้อง แต่ Lum และ Chang (1990) รายงานว่ามี *E. coli* บางสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้ Finny (2003) รายงานว่าผลบวกเท็จจากวิธีรวดเร็วที่อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ในการแยก *E. coli* เกิดจาก *Citrobacter* spp. และ *Enterobacter* spp.

จากการทดลองทั้งหมดกล่าวได้ว่า กระบวนการแช่เยือกแข็งมีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่างเนื้อให้อยู่ในเกณฑ์กำหนดทางจุลชีววิทยาเพื่อเป็นสินค้าส่งออกสู่ตลาดโลกและนำรายได้เข้าประเทศ นอกจากนี้การใช้วิธีรวดเร็วในการแจงนับปริมาณจุลินทรีย์รวมและ Coliforms & *E. coli* มีประสิทธิภาพเพียงพอและสามารถใช้แทนวิธีมาตรฐานได้ เพื่อการรายงานผลที่รวดเร็ว ทั้งยังสะดวกและสามารถตรวจตัวอย่างได้ในปริมาณมาก แต่การตัดสินใจใช้วิธีใดนั้นนอกจากเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีรวดเร็วด้านความไวและความจำเพาะแล้ว ยังต้องเปรียบเทียบตัวค่าใช้จ่าย ปริมาณตัวอย่างที่ตรวจได้ต่อครั้ง เวลาและความสะดวกในการนำไปใช้ (Bredie and de Boer, 1992; Suwansonthichai and Rengpipat, 2003) ผลงานวิจัยนี้สามารถนำมาพัฒนาผลการตรวจประกอบการตัดสินใจเลือกใช้วิธีรวดเร็วทดแทนวิธีมาตรฐานที่สามารถรายงานผลได้รวดเร็วเพื่อนำประยุกต์ใช้ในการจัดระบบ

HACCP ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ เพื่อนำไปสู่หลักประกันความปลอดภัยในอาหารดังการรณรงค์ของกระทรวงสาธารณสุขที่ให้ปี 2547-2548 เป็นปี Food Safety โดยมีคำขวัญว่า “Safe Food Good Health”

<u>สรุป</u>

Correlation coefficients (r)			
	PCA	STPC-CI	PAC
PCA	1.00		
STPC	0.95	1.00	
PAC	0.96	0.96	1.00

Correlation coefficients (r)				
	MPN	SCEc	PEC	CCA
MPN	1.00			
SCEc	0.82	1.00		
PEC	0.89	0.85	1.00	
CCA	0.79	0.85	0.84	1.00

วิธี	ข้อดี	ข้อเสีย
PCA	-เป็นวิธีมาตรฐาน - แยกชนิดและดูลักษณะโคโลนีได้	- พบการแผ่ของโคโลนี ทำให้อ่านผลลำบาก - เสียเวลาในการเตรียมเพลทอาหาร
STPC-CI	- สามารถอ่านผลได้หลังการบ่มเพียง 24 ชม. - มีความไวในการตรวจกรณีตัวอย่างมีจุลินทรีย์ ปนเปื้อนน้อย - อ่านผลได้ในช่วงกว้าง (1738 MPN) - การแผ่ของโคโลนีไม่มีผลต่อการอ่านผล	- ไม่สามารถแยกชนิดและดูลักษณะโคโลนีได้ - ต้องเตรียมบัฟเฟอร์เพิ่มเพื่อละลายผงอาหาร
PAC	- แยกชนิดและดูลักษณะโคโลนีได้ - สามารถลงตัวอย่างได้ทันที	- บางทีโคโลนีเล็กมาก เกิดการสับสนในการ อ่านผล

วิธี	ข้อดี	ข้อเสีย
MPN	-เป็นวิธีมาตรฐาน - มีความไวในการตรวจกรณีตัวอย่างมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อย	- เสียเวลาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด - ใช้เครื่องแก้วมาก - ใช้เวลานานในการรายงานผล
SCEc	- มีความไวในการตรวจกรณีตัวอย่างมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อย - สามารถอ่านผลได้หลังการบ่มเพียง 24 ชม. - อ่านผลได้ในช่วงกว้าง (1738 MPN) - อ่านผลสะดวก ไม่ถูกรบกวนโดยจุลินทรีย์อื่น	-ไม่สามารถแยกชนิดและดูลักษณะโคโลนีได้ - ต้องเตรียมบัฟเฟอร์เพิ่มเพื่อละลายผงอาหาร - การอ่านผล *E. coli* ต้องใช้หลอดยูวี
PEC	- แยก Coliforms & *E. coli* จากแบคทีเรียอื่นได้โดยดูจากสีของโคโลนีและการเกิดก๊าซ -สามารถลงตัวอย่างได้ทันที	- อ่านผลลำบาก เมื่อมีจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนมาก - อ่านผลได้ต่ำสุดเพียง 10 เซลล์ต่อกรัม
CCA	- แยก Coliforms & *E. coli* จากแบคทีเรียอื่นได้โดยดูจากสีของโคโลนี - สามารถอ่านผลได้หลังการบ่มเพียง 24 ชม.	- เสียเวลาเตรียมเพลทอาหาร - ใช้ตัวอย่างในการตรวจน้อย โอกาสในการรายงานผลผิดพลาดมีสูง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2546. สถิติการค้าระหว่างประเทศไทยปี. ศูนย์สารสนเทศและเทคโนโลยีการสื่อสาร. แหล่งที่มา http:www.moc.go.th. (2003)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2544. ความรู้เกี่ยวกับสารเคมี / จุลินทรีย์ในอาหาร : สุขภาพดีเริ่มต้นที่อาหารปลอดภัย (Safe Food Good Health). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี. 13 หน้า

ธวัชชัย งามสันติวงศ์. 2544. SPSS for Windows : หลักการและวิธีใช้คอมพิวเตอร์ในงานสถิติเพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 4. โรงพิมพ์ 21 เซ็นจูรี่ จำกัด. 739 หน้า

ภาษาอังกฤษ

Adams, M. R. and Moss, M. O. 2000. Methods for the microbiological examination of foods. *In* Food Microbiology. 2nd ed, pp. 95-101. The Royal Society of Chemistry: OK

Anderson, J. M. and Baird-Parker, A. C. 1975. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. J. Appl. Bacteriol. 39: 111-117

Andrews, W. H. 1996. Validation of modern methods in food microbiology by AOAC INTERNATIONAL collaborative study. Food Control. 7(1): 19-29

AOAC. 1989. Handbook for AOAC Member. 6th ed. Association of Officia Analytical Chemists, Arlington: VA

AOAC. 1989. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. Association of Officia Analytical Chemists, Arlington: VA

APHA. 2001. *Enteroacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. *In* Compendium of methods for the microbiological examination of foods . 4th ed. American Public Health Association: Washington, D. C.

APHA, AWWA and WEF. 1998. Standard method for the examination of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association: Washington, D. C.

Ayres, J. C., Mundt, J. O. and Sandine, W. E. 1980. Preservation by freezing. In Microbiology of foods, pp. 61-63. W. H. Freeman and Company: San Francisco

Bailey, J. S., Lyon, B. G., Lyon, C. E. and Windham, W. R. 2000. The microbiological profile of chilled and frozen chicken. J. Food Prot. 63(9): 1228-1230

Banwart, G. J. 1989. Basic Food Microbiology. 2nd ed. An AVI book: New York

Beloti, V. Barros, M. A. F., de Freitas, J. C., Nero, L. A., de Souza, J. A., Santana, E. H. W., Franco, B. D. G. M. 1999. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. Revista de Microbiol. 30(2): 137-140

Beloti, V. Barros, M. A. F., Nero, L. A., Pachemshy, J. A. S., Santana, E. H. W., Franco, B. D. G. M. 2002. Quality of pasteurized milk influences the performance of ready-to-use systems for enumeratin of aerobic microorganisms. Int. Dairy J. 12: 413-418

Berg, J. D. and Fiksdal, L. 1988. Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-β-D-galactoside. Appl. Environ. Microbiol. 54(8): 2118-2122

Beuchat, L. R., Copeland, F., Curiale, M. S., Danisavich, T., Gangar, V., King, B. W., Lawlis, T. L., Likin, R. O., Okwusoa, J., Smith, C. F. and Townsend, D. E. 1998. Comparison of SimPlate™ total plate count method with Petrifilm™, Redigel™, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. J. Food Prot. 61(1): 14-48

Blackburn, C. W., Baylis, C. L. and Petitt, S. B. 1996. Evaluation of Petrifilm methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in a wide range of foods. Lett. Appl. Microbiol. 22(2): 137-140

Blood, R. M. and Curtis, G. D. W. 1995. Media for 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 26: 93-115

Bolton, F. J. 1998. Quality assurance in food microbiology- a novel approach. Int. J. Food Microbiol. 45: 7-11

Bredie, W. L. P. and de Boer, E. 1992. Evaluaton of the MPN, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of Escherichia coli in foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 16: 197-208

Brenner, D. J. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1st ed. Williams & Wilkins, Baitomore: London

Brenton, C. E., Flick, G. J., Pierson, M. D., Croonenberghs, R. E. and Peirson, M. 2001. Microbiological quality and safety of quahog clams, *Mercenaria mercenaria*, during refrigeration and at elevated storage temperature. J. Food Prot. 64: 343-347

Buchanan, R. L. 2000. Acquisition of Microbiological data to enchance fod safety. J. Food Prot. 63(6): 832-838

Buchanan, R. L. and Whiting, R. C. 1986. Procedded meats as a microbial environment. Food Technol. 40: 134-138

Byamukama, D., Kansiime, F., Mach, R. L. and Farnleitner, A. H. 2000. Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. Appl. Environ. Microbiol. 66(2): 864-868

Caruso, G., Crisafi, E. and Mancuso, M. 2002. Development of an enzyme assay for rapid assessment of *Escherichia coli* in seawaters. J. Appl. Microbiol. 93(4): 548-556

Chilvers, K. F., Perry, J. D., James, A. L. and Reed, R. H. 2001. Synthesis and evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of bacterial β-galactosidase. J. Appl. Microbiol. 91: 1118-1130

Chung, H. S., Kim,C. N. and Namgoong, K. 2000. Evaluation of the Petrifilm rapid coliform count plate method for coliform enumeration from surimi-based imitation crab slurry. J. Food Prot. 63(1): 123-125

Cliver, D. O. 1990. Food Borne Diseases. Academic Press, Inc. Harcount Brace Javanovich Publishers

Coleman, M. E. and Mark, H. M. 1999. Qualitative and quantitative risk assessment. Food Control. 10: 289-297

Coudron, P. E., Ford, J. M. and Dalton, H. P. 1983. Tetrazolium reduction as an aid for streptococcal growth detection with agar dilution susceptibility testing. J. Clin. Microbil. 18(4): 765-769

Curiale, M. S., Son, T., McAllister, J. S., Halsey, B. and Fox, T. L. 1990. Dry rehydratable film for enumeration of total aerobic bacteria in foods: collaborative study. J. AOAC. Int. 73(2): 242-248

Curiale, M. S., Son, T., Mciver, D., Mcallister, J. S., Halsey, B., Roblee, D. and Fox, T. L. 1991. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: collaboratory study. J. AOAC Int. 74(4): 635-648

de Boer, E. 1998. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. . Int. J. Food Microbiol. 45: 43-53

de Boer, E. and Beumer, R. R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 50: 119-130

Defigueiredo, M. P. and Spliltatoesser, D. F. 1976. Coliforms, Enterococi, and other microbial indicators. *In* Food Microbiology Public Health and Spoilage Aspects. The AVI Publishing Company, Inc.: Westport

de Smedt, J. M. 1998. AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods. Int. J. Food Microbiol. 45: 25-28

D'Haese, E. and Nelis, H. J. 2002. Rapid detection of single cell bacteria as a novel approach in food microbiology. J.AOAC. Int. 85(4): 979-983

Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. ASM Press: Washington D. C.

Edberg, S. C., Allen, M. J. and Smith, D. B. 1991. Defined substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: collaborative study. J. AOAC. Int. 74(3): 526-529

Eisel, W. G., Linton, R. H. and Muriana, P. M. 1997. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. Food Microbiol. 14: 273-282

Ellis, P. and Meldrum, R. 2002. Comparison of the compact dry TC and 3M petrifilm ACP dry sheet media methods with the spiral plate method for the examination of randomly selected foods for obtaining aerobic colony count. J. Food Prot. 65(2): 423-425

Fang, T. J., Wei, Q. K., Liao, C. W., Hung M. J. and Wang T. H. 2003. Microbiological quality of 18 degrees C ready-to-eat food product sold in Taiwan. Int. J. Food Microbiol. 80(3): 241-250

Farrell, J. and Rose, A. H. 1968. Cold shock in a mesophilic and a psychrophilic pseudomonad. J. Gen. Microbiol. 50: 429-439

FDA. 1998. Aerobic plate count and *Escherichia coli* and Coliforms Bacteria. *In* Bacteriological Analysis Manual. 9th ed. AOAC International, Arlington: V. A.

FDA. 2001. Online Bacteriological Analysis Manual. From http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html

Feldsine, P. T., Leung, S. C., Lienau, A. H., Mui, L. A. and Townsend, D. E. 2003. Enumeration of total aerobic microorganisms in foods by SimPlate® Total plate count- color indicator methods and conventional culture methods: collaborative study. J. AOAC. Int. 86(2): 257-274

Ferguson, W. J. and Lakewood, O. H. 1995. Method, test media and chromogenic compounds for identifying and differentiating general coliforms and *Escherichia coli* bacteria. Biotechnol. Adv. 13: 753-754

Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S. and Storey, D. M. 2003. Evaluation of chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. J. Microbiol. Methods. 54: 353-358

Flodgaard, L. R., Christensen, A. B., Molin, S., Givskov, M. and Gram, L. 2003. Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-derived Enterobacteriaceae. Int. J. Food Microbiol. 84(2): 145-156

Fluckey, W. M., Sanchez, M. X., McKee, S. R., Smith, D., Pendleton, E. and Breshears, M. 2003. Establishment of a microbiological profile for an air-chilling poultry operation in the United States. J. Food Prot. 66(2): 272-279

Food and Drug Administration. 2001. Total Plate Count and *Escherichia coli* and Coliforms Bacteria. *In* Bacteriological Analysis Manual. 9th ed. AOAC International, Arlington: VA

Frampton, E. W. and Restaino, L. 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. J. Appl. Bacteriol. 74: 223-233

Fung, D. Y. C. 1995. What's needed in rapid detection of foodborne pathogens. Food Technol. 49: 64-67

Fung, D. Y. C. and Miller, R. D. 1973. Effect of dyes on bacterial growth. Appl. Microbiol. 25(5): 793-799

Garcia, G. R., Haymond, R. E., Sprague, D.M., Singleton, E. R., Peeler, J.T., Lancette, G. A. and Sofos, J. N. 1995. Comparison of a rapid plate count and MPN methods for enumeration of fecal coliforms and *Escherichia coli* in soft-shell clams. J. Food Prot. 58(11): 1197-1200

Garthright, W.E. and Blodgett, R. J. 2003. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. Food Microbiol. 20: 439-445

Geiges, O. 1996. Microbial processes in frozen food. Adv. Space Res. 18(12): 109-118

Geissler, K., Manafi, M., Amoros, I. and Alonso, J. L. 2000. Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. J. Appl. Microbiol. 88: 280-285

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

Gonzalez-Fandos, E., Gimenez, M., Olarte, C., Sanz, S. and Simon, A. 2000. Effect of packaging conditions on the growth of micro-organisms to the quality characteristics of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored at inadequate temperatures. J Appl. Microbiol. 89: 624-632

Graham, A. F., Mason, D. R. and Peck, M. W. 1996. Inhibitory effect of combinations of heat temperature, pH, and sodium chloride on growth from spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* at refrigeration temperature. Appl. Environ. Microbiol. 62(7): 2664-2668

Gran, H. M., Mutukumira, A. N., Wetlesen, A. and Narvhus, J. A. 2002. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. Food Control. 13: 41-47

Gran, H. M., Mutukumira, A. N., Wetlesen, A. and Narvhus, J. A. 2002. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: the production of fermented milk products with particular emphasis on sanitation and microbiological quality. Food Control. 13: 161-168

Guerin, T. F., Mondido, M., McClenn, B. and Peasley, B. 2001. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant- degrading micro-organisms. Letters Appl. Icrobiol. 32: 340-345

Hanna, M. O., Smith, G. C., Savell, J. W., MeKeith, F. K. and Vanderzant, C. 1982. Microbial flora of livers, kidneys and hearts from beef, pork and lamb: effects of refrigeration, freezing and thawing. J. Food Prot. 45(1): 63-73

Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1976. Laboratory methods in foods and dairy microbiology. Academic Press: London

Hathaway, S. C. and Cook, R. L. 1997. A regulatory perspective on the potential uses of microbial risk assessment in international trade. Int. J. Food Microbiol. 36: 127-133

Havemeister, G. 1991. Determination of totalcoliform and faecal coliform bacteria from bathing water with fluorocult-brila-broth. Acta Microbiol. Hung. 38(3-4): 257-264

Himelbloom, B. H. and Pfutzenreuter. 1998. False-positive fluorescence by pink salmon tissue and Staphylococci in a rapid test for *Escherichia coli*. J. Food Prot. 61(9): 1119-1122

Hoornstra, E., Northolt, M. D., Notermans, A. W. and Barendsz, A. W. 2001. The use of quantitative risk assessment in HACCP. Food Control. 12: 229-234

ICMSF. 1978. Indicator microorganisms. *In* Micro-organisms in Food 1: Their significance and methods of enumeration. 2nd ed. University of Toronto Press: Toronto

Ingraham, J. L. and Bailey, G. F. 1958. Comparative study of effect of temperature on metabolism of psychrophilic and mesophilic bacteria. J. Bacteriol. 59(7): 609-613

Ingram, M. 1951. The effect of cold on microorganisms in relation to food. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 14: 243

Ingram, S. C. and Moody, M. W. 1990. Enumeration of aerobic plate count and *E. coli* during blue crab processing by standard methods, Petrifilm™, and Redigel™. J. Food Prot. 53(5): 423-424

Jackson, T. C., Hardin, M. D. and Acuff, G. R. 1997. Heat resistance of Escherichia coli O157: H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storge and holding temperature. J. Food Prot. 59: 230-237

James, A. L., Chilvers, K. F., Perry, J. D., Armstrong, L. and Gould, F. K. 2000. Evalution of p-naphtholbenzein-β-D-galactoside as a substrate for bacterial β-galactosidase. Appl. Environ. Microbiol. 66(12): 5521-5523

Jay, J. M. 1992. Low- temperature food preservation and characteristics of psychrotrophic microorganisms and Indicators of food microbial quality and safety. *In* Modern Food Microbiology. 4th ed. Chapman & Hall: New York

Jordano, R., Lopez, C., Rodriguez, V., Cordoba, G., Medina, L. M. and Barrios, J. 1995. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, Escherichia coli and yeasts and molds in foods. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 42(3): 255-259

Keith, M. 1997. Evaluation of an Automate Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay System for the detection of Salmonella on foods. J. Food Prot. 60: 982-985

Kinneberg, K. M. 2002. Dry rehydratable film method for rapid enumeration of coliforms in foods (3M™Petrifilm™rapid coliform count plate): collaborative study. J. AOAC Int. 85(1): 56-71

Kiss, I. 1984. Development in Food Science 6: Testing methods in food microbiology. Elsevier: Amsterdam

Kuo, M. I and Gunasekaran, S. 2003. Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and nonpasta filata Mozzarella cheeses. J. Dairy Sci. 86: 1108-1117

Kvenberg, J. E. and Schwalm, D. J. 2000. Use of microbial data for hazard analysis and critical control point verification – food and drug administration perspective. J. Food Prot. 63(6): 810-814

Lachica, R. V. F., Weiss, K. F. and Deibel, R. H. 1969. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat stable deoxyribonuclease productin by *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 18(1): 126-127

Lambropoulou, K. A., Drosinos, E. H. an Nychas, G. J. E. 1996. The effect of glucse supplementation on the spoilage microflora and chemical composition o

minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 °C. Int. J. Food Microbiol. 30: 281-291

Lang, M. M., Ingram. S. C. and Ingram, B. H. 1999. Verifying apple cider plant sanitation and hazard analysis critical control point programs: choice of indicator bacteria and testing methods. J. Food Prot. 62(8): 887-893

Larinkari, U. and Rautio, M. 1995. Evaluation of a new dipslide with a selective medium for the rapid detection of beta-glucuronidase- positive *Escherichia coli*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14(7): 606-609

Learoyd, S. A., Kroll, R. G. and Thurston, C. F. 1992. An investigation of dye reduction by food-borne bacteria. J. Appl. Bacteriol. 72: 479-485

Linton, R. H., Eisel, W. G. and Muriana, P. M. 1997. Comparison of conventional plating method and petrifilm for recovery of microorganisms in a ground beef processing facility. J. Food Prot. 60(9): 1084-1088

Lues, J. F. R., Venter, P. and van der Westhuizen, H. 2003. Enumeration of potential microbiological hazards in milk from a marginal urban settlement in central South Africa. Food Microbiol. 20: 321-326

Lum, R. A. and Chang, G. W. 1990. Glucuronidase-negative Escherichia coli in the ECOR reference collection. J. Food Prot.53(11): 972-974

Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification test. Int. J. Food Microbiol. 31: 45-58

Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int. J. Food Microbiol. 60: 205-218

Manafi, M. and Kneifel, W. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates- a promising tool in microbiology. Acta Microbiol. Hung. 38(3-4): 293-304

Manafi, M., Kneifel, W. and Bascomb, S. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev. 55(3): 335-348

McClure, F. D. 1990. Design and analysis of qualitative collaborative studies: minimum collaborative program. J. AOAC Int. 73: 953-960

McDonald, K. and Sun, D. 1999. Preditive food microbiology for the meat industry: a review. Int. J. Food Microbiol. 52: 1-27

Meyrand, A., Atrache, V., Bavai, C., Montet, M. P. and Vernozy-Rozand. C. 1999. An automated method for the detection of staphylococcal heat stable deoxyribonuclease in dairy products. Lett. Appl. Microbiol. 29: 216-220

Miller, A. J., Smith, J. L. and Buchanan, R. L. 1998. Factors affecting the emergence of new pathogens and research strategies leading to their control. J. Food Safety. 18: 243-263

Mohamed, H. A., Maqbool, T. K. and Suresh, K. S. 2003. Microbial quality of shrimp products of export trade produced form aquacultured shrimp. Int. J food Microbiol. 82(3): 213-221

Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. Bacteriol. Rev. 39(2): 144-167

Mossel, D. A. and Netten, P. V. 1991. Microbiological reference values for foods: a European perspective. J. AOAC Int. 74(2): 420-432

Mshana, R. N., Tadesse, G., Abate, G. and Miorner, H. 1998. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5—diphenyl tetrazolium bromide rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbil. 36(5): 1214-1219

Murray, K. A., Gilmour, A. and Madden, R. H. 2001. Microbiological quality of chilled beef carcasses in Northern Ireland baseline survey. J. Food Prot. 64(4): 498-502

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1998. Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. J. Food Prot. 61(9): 1246-1259

Nelson, C. L., Fox, T. L. and Busta, F. F. 1984. Evauation of dye medium film (Petrifilm^{TM}VRB) for coliform enumeration. J. Food Prot. 7: 520-525

Nero, L. A., Beloti, V., Barros, M. D. F., de Santana, E. H. W., Pereira, M. S., Gusmao, W. and de Moraes, L. B. 2002. Assessment of the efficiency of SimPlate^{TM} total plate count color indicator (TPC-CI) to quantify mesophilic aerobic microorganisms in pasteurized milk. Brazil. J. Microbiol. 33(1): 44-48

Oblinger, J. L. and Koburger, J. A. 1975. Understanding and teaching the most probable number technique. J. Milk Food Technol. 38(9): 540-545

Odumeru, J. A. and Belvedere, J. 2002. Evaluation of the MicroFoss system for enumeration of total viable count, *Escherichia coli* and Coliforms in ground beef. J. Microbiol. Methods. 50: 33-38

Ogden, I. D., Brown, G. C., Gallacher, S., Garthwaite, P. H., Gennari, M., Gonzalez, M. P., JØrgensen, L. B., Lunestad, B. T., MacRae, M., Nunes, M. C., Petersen, A. C., Rosnes, J. T. and Vliegenthart, J. 1998. An interlaboratory study to find an alternative to the MPN technique for enumerating *Escherichia coli* in shellfish. Int. J. Food Microbiol. 40: 57-64

Ogihara, H., Furukawa, S. and Yamasaki, M. 2002. Enumeration of total plate count and total coliforms in type strain culture and foods, by SimPlate and conventional methods. J. Japan. Soc. Food Sci. Technol-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 49(8): 527-533

Ossmer, R. 1996. Simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* with chromocult® Coliform agar. Poster presentation during Health-Related Water Microbiology Symposium, 6-10 October, Spain

Park, Y. H., Seo, K. S., Ahn, J. S., Yoo, H. S. and Kim, S. P. 2001. Evaluation of the Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retaild meat samples. J. Food Prot. 64(11): 1841-1843

Perales, I., Ramos, F. and Audicana, A. 2000. Evaluation of chromogenic media for the detection and enumeratin of *Escherichia coli* in foods. www. Univie.ac.at/chromogenic/porales.htm

Phillips, D., Sumner, J., Alexander, J. F. and Dutton, K. M. 2001. Microbiology quality of Australian beef. J. Food Prot. 64(5): 692-696

Qadri, R. B., Buckle, K. A. and Edwards, R. A. 1974. Rapid methods for the determination of feacal contamination in oyster. J. Appl. Bacteriol. 37: 7-14

Ramteke, P. W. and Tewari, S. 2002. Comparative study of fluorogenic and chromogenic media for specific detection of environmental isolates of thermotolerant *Escherichia coli*. Environ. Monit. Assess. 79(2): 121-127

Ray, B. 2001. Fundamental Food Microbilogy. 2nd ed. CRC press: Boca Raton.

Rice, E. W., Allen, M. J., Brenner, D J. and Edberg, S. C. 1991.Assay for β-glucuroniddase in species of the genus *Escherichia coli* and its applications for drinking-water anslysis. Appl. Environ Microbiol. 57(2): 592-593l

Richardson, G. H. 1985. Standard methods for the examination of dairy product.15th. pp. 259-264. American Public Health Association: Washington, D. C.

Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patel, P. D. 2000. Enterobacteriacae, Coliforms and *E. coli. In* Encyclopedia of food microbiology. 1st ed. Academic Press: San Diego

Rompre', A., Servais, P., Baudar, J., de Roubin, M. and Laurent, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. J. Microbiol. Method. 49: 31-54

Rose, A. H. 1968. Physiology of micro-organisms at low temperatures. J. Appl. Bacteriol. 31: 1-11

Rosmini, M. R., Signorini, M. L., Schneider, J. C. and Bonazza, J. C. 2003. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. Food Control. In Press, Corrected Proof. Available online at www. Sciencedirect.com

Rowse, A. 1981. Evaluation of media used in rapid methods for the MPN enumeration of fecal coliforms in the Sydney Rock Oyster (*Crassostrea commercialis*). J. Food Prot. 44(2): 134-136

Russell, S. M. 1995. The effect of refrigerated and frozen storage on populations of mesophilic and coliform bacteria on fresh broiler chicken carcass. Poult. Sci. 74(12): 2057-2060

Russell, S. M. 2001. Evaluation of an optical microbiological method for rapidly estimated populations of aerobic bacteria, coliforms, and *Escherichia coli* inground pork. J. Food Prot. 64(5): 669-673

Sheridan, J. J. and Lynch, B. 1988. The influence of processing and refrigeration on the bacterial numbers on beef and sheep offals. Meat Sci. 24: 143-150

Sierra, M., Sheridan, J. J. and McGuire, L. 1997. Microbial quality of lamp carcasses during processing and the acridine orange direct count technique (a modified DEFT) for rapid enumeration of total viable counts. Int. J. Food Microbiol. 36: 61-67

Silk, T. M., Ryser, E. T. and Donnelly, C. W. 1997. Comparison of methods for determining coliform and *Escherichia coli* levels in apple cider. J. Food Prot. 60(11): 1302-1305

Smith, C. F. and Townsend, D. E. 1999. A new medium for determining the total plate count in food. J. Food Prot. 62(12): 1404-1410

Smittle, R. B. 2000. Foods, Quality Control. *In* Encyclopedia of Microbiology. 2nd. Vol. 2. Academic Press: San Diego

Struijk, C. B. 1996. Guidelines for method validation techniques used in the microbiological examination of food samples. Food Control. 7(1): 53-58

Su, Y. C. and Wong, C. L. 1997. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. J. Food Prot. 60(2): 195-202

Sumner. J., Petrenas, E., Dean, P., Dowsett, P., Weat, G., Wiering, R. and Raven, G. 2003. Microbial contamination on beef and sheep carcases in South Australia. Int. J. food Microbiol. 81: 255-260

Suwansonthichai, S. and Rengpipat, S. 2003. Enumeratin of coliforms and *Escherichia coli* in frozen blak tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. Int. J. Food Microbiol. 81(2): 113-121

Swaminathan, B. and Feng, P. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 48:401-426

Swanson, K. M. J. and Anderson, J. E. 2000. Industry perspectives on the use of microbial data for hazard analysis and critical control point validation and verification. J. Food Prot. 63(6): 815-818

Tamini, R. R., Cords, B. R. and Gramoli, J. 1976. Screening for staphylococcal enterotoxins in foods. Food Technol. 30:64-74

Townsend, D. E., Irving, R. L. and Naqui, A. 1998. Comparison of the SimPlate coliform and *Escherichia coli* test with Petrifilm, three-tube MPN, and VRBA+MUG methodsfor enumerating coliforms and *E. coli* in food. J. Food Prot. 61(4): 444-449

Townsend, D. E. and Naqui, A. 1998. Comparison of SimPlate™ total plate count test with plate count agar method for detection and Quantitation of bacteria in food. J. AOAC Int. 81(3): 563-569

Townsend, D. E., Smit, K. and Naqui, A. 1996. A new medium designed to detect and quantify the total viable bacterial count of food after only 24 hours of incubation. p. 382. Abstr. 96th Gen. Meet. Am. Soc. for Microbiol., New Orleans: L. A.

Townsend, D. E., Smit, K. and Naqui, A. 1998. A new medium designed to detect and quantify the total viable bacterial count of food after only 24 hours of incubation. (Personal communication)

Tran, T. T. and Hitchins, A. D. 1996. Evaluation of a selective environment most probable number enumeration method for viable *Listeria* spp. In diary products. J. Food Prot. 59(9): 928-931

Tryland, I. and Fiksdal, L. 1998. Enzyme characteristics of β-D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. Appl.Environ. Microbiol. 64(3): 1018

Turner, K. M., Restaino, L. and Frampton, E. W. 2000. Efficacy of chromocult coliform agar for coliform and *Escherichia coli* detection in foods. J. Food Prot. 63(4): 539-541

Twigg, R. S. 1945. Oxidation-reduction aspects of resazurin. Nature. 155: 401-402

Valdimarsson, G., Einarsson, H., Gudbjornsdottir, B. and Magnusson, H. 1998. Microbiology quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). Int. J. Food Microbiol. 45: 157-161

van der Zee, H. and in't Veld, J. H. J. H. 1997. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. J. AOAC Int. 80(4): 934-940

Van Poucke, S. O. and Nelis, H. J. 2000. Rapid detection of fluorescent and chemiluminescent total coliforms and *Escherichia coli* on membrane filters. J. Microbiol. Methods. 42: 23-244

Venkateswaran, K., Murakoshi, A. and Satake, M. 1996. Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of Coliforms and *Escherichia coli* in foods. Appl. Environ. Microbiol. 62(7): 2236-2243

Venkitanarayanan, C., Faustman, T., Hoagland, T. and Berry, B. W. 1997. Estimation of spoilage bacterial load on meat by fluorescein diacetate hydrolysis or resazurin reduction. J. Food Sci. 62(3): 601-604

Warren, L. S., Benoit, R. E. and Jessee, J. A. 1978. Rapid enumeration of fecal coliforms in water by a colorimetric β-galactosidase assay. Appl. Environ. Microbiol. 35(1): 136-141

Weiss, L. H. and Humber, J. 1988. Evaluation of a 24-hour fluorogenic assay for the enumeration of *Escherichia coli* from foods.J Food Prot. 51(1): 766-769

Wijtzes, T., van't Riet, K., Huis in't Veld, J. H. J. and Zwietering, M. H. 1998. A dicision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. Int. J. Food Micro. 42: 79-90

Yoovidhya, T. and Fleet, G. H. 1981. An evaluation of the A-1 most probable number and the Anderson and Baird-Parker plate count methods for enumerating *Escherichia coli* in the Sydney Rock Oyster, Crassostrea commercialis. J. Appl. Bacteriol. 50: 519-528

Zhou, M., Upson, R. H., Diwu, Z. and Haugland, R. P. 1996. A fluorogenic substrate for β-D-glucuronidase: applications in fluorometric, polyacrylamide gel and histochemical assays. J. Biochem. Biophys. Methods. 33: 197-205

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

องค์ประกอบอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. อาหารแข็งโครโมเคาท์โคลิฟอร์ม (Chromocult^{R} Coliforms Agar)

เปปโตน (Peptone)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.7	กรัม
ทริปโตแฟน (Tryptophan)	1.0	กรัม
โซเดียมไพรูเวท ($NaC_3H_3O_3$)	1.0	กรัม
เทอจิตอบเซเว่น (Tergitol^{R} 7)	0.15	กรัม
ซอร์บิทอล (Sorbitol)	1.0	กรัม
มีแลนจ์ โครโมจีน (Melange chromogene)	0.2	กรัม
วุ้น (Agar-agar)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8 ± 0.1	

2. เพทริฟิล์มอีโคไลเคาท์เพลท (Petrifilm *E. coli* / Coliform Count Plates) (แผ่นฟิล์มสำเร็จรูป)

ไวโอเลทเรดบายล์นิวเตรียนท์ (Violet red bile nutrient)

เจล (cold water soluble gelling agent)

เตตราโซเลียม (Tetrazolium indicator)

กลูคูโรนิเดส (glucuronidase indicator)

3. อาหารเหลวบริลเลียนกรีนบายล์แลคโตส (Brilliant Green Bile Lactose Broth)

เปปโตน (Peptone from meat)	10.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	20.0	กรัม
บริลเลียน (Brilliant)	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.2 ± 0.1	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. อาหารเหลวลอริลซัลเฟตทริปโตส (Lauryl Sulphate Tryptose Broth)

ทริปโตส (Tryptose)	20.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.75	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.75	กรัม
โซเดียมลอริลซัลเฟต (Sodium lauryl sulphate)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8± 0.2	

5. อาหารเหลวอีซี (EC Broth)

เปปโตน (Peptone from casein)	20.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	5.0	กรัม
บายล์ซอล์ท (Bile salt mixture)	1.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	4.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.9± 0.2	

6. อาหารเหลวทริปติเคสซอย (Trypticase Soy Broth) (TSB)

เปปโตน (Peptone from casein)	17.0	กรัม
เปปโตน (Peptone from soymeal)	3.0	กรัม
กลูโคส (D (+) Glucose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.2± 0.2	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. อาหารแข็งดีเอ็นเอส (DNase Agar)

ทริปโตส (Tryotose)	20.0	กรัม
ดีออกซี่ไรโบนิวคลีอิค แอซิด (Deoxyribonucleic acid)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	5.0	กรัม
วุ้น (Agar)	15.0	กรัม
พีเอช	7.3± 0.2	

8. อาหารเหลวเอ็มอาร์วีพี (MR-VP Broth)

เปปโตน (Peptone from meat)	7.0	กรัม
กลูโคส (D(+)Glucose)	5.0	กรัม
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.9± 0.1	

9. ทริปโตน (Tryptone 1%)

ทริปโตน (Tryptone)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.9± 0.2	

10. อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient Agar)

แล็บเลมโก (Lab-Lemco' Powder)	1.0	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรค (Yeast extract)	2.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้น (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.4 ± 0.2	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. อาหารวุ้นมาตรฐาน (Standard Methods Agar)

ทริปโตน (Tryptone)	5.0	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรค (Yeast extract)	2.5	กรัม
เด็กซ์โตส (Dextrose)	1.0	กรัม
วุ้น (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.0 ± 0.2	

12. อาหารแข็งอีเอ็มบี (EMB Agar)

เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
แลคโตส (Lactose)	5.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	5.0	กรัม
อีโอซินเยลโลอิช (Eosin yellowish)	0.4	กรัม
เมธิลลีนบลู (Methylene blue)	0.07	กรัม
วุ้น (Agar-agar)	13.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.1 ± 0.1	

13. อาหารแข็งซิมมอนซิเตรท (Simmons Citrate Agar)

อลูมิเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (AlH_2PO_4)	1.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($Na_2C_6H_6O_7$)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
โบรโมไธมอลบลู (Bromothymol blue)	0.08	กรัม
วุ้น (Agar)	13.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม
พีเอช	6.6 ± 0.1	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffered Dilution Water)

ก. สต๊อกสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Stock Phosphate Buffered solution) (Butterfield's phosphate buffer)

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.2 ด้วย 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 N NaOH) และ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าจุลินทรีย์ที่ 121°C 15 นาที และเก็บในตู้เย็น

ข. บัฟเฟอร์ (Buffered Dilution Water)

ใช้สต๊อกสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ก)	1.25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำสต็อกสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ก) ดังกล่าวมา 1.25 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าจุลินทรีย์ที่ 121°C 15 นาที

15. น้ำยาโคแวค (Kovacs' Reagent)

พาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimethylaminobenzaldehyde)	5	กรัม
เอมิลแอลกอฮอล์ (normal Amyl alcohol)	75	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentrated HCl)	25	มิลลิลิตร

ละลายพาราไดเมธิลอมิโนเบนซัลดีไฮด์ ในเอมิลแอลกอฮอล์อย่างช้าๆ ค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4°C ในการทดสอบอินโดล (indole) ให้เติมน้ำยาโคแวค 0.2-0.3 มิลลิลิตรลงใน 5 มิลลิลิตรอาหารเหลวทริปโตนซึ่งเพาะจุลินทรีย์ไว้ 24 ชั่วโมง กรณีผลการทดสอบอินโดลบวกจะปรากฏสีแดงเข้มบนผิวหน้าของหลอดทดสอบ

16. เมธิลเรด (Methyl Red Indicator)

เมธิลเรด (Methyl red)	0.10	กรัม
เอธานอล (Ethanol, 95%)	300	มิลลิลิตร

ละลายเมธิลเรด ในเอธานอล (Ethanol, 95%) 300 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17. น้ำยาทดสอบวีพี (Voges-Proskauer (VP) Reagents)

<u>สารละลาย ก</u>

แอลฟาแนพธอล ($C_{10}H_8O$)	5	กรัม
แอลกอฮอล์ (Absolute Alcohol)	100	มิลลิลิตร

<u>สารละลาย ข</u>

โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	40	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

<u>การทดสอบ VP</u>

แบ่งจุลินทรีย์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร และเติม สารละลาย ก. 0.6 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 0.2 มิลลิลิตร เขย่าแต่ละครั้งที่เติมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลการทดสอบภายใน 4 ชั่วโมง กรณีผลการทดสอบบวกจะมีสีชมพูแดง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่างในระดับความเจือจาง 1:10, 1:100, 1: 1000 ระดับการเจือจางละ 3 หลอด

Positive Tubes				Positive Tubes				Positive Tubes				Positive Tubes			
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ที่มา : FDA (1998)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 เทียบค่า MPN จากผลบวกของวิธี SimPlate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่มา : Biocontrol Inc., USA

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ Colilforms & *Escherichia coli*

Test	*E. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*E. coli*
Gram stain	-	-	-
Indole production	-	-	+
Methyl red	-	+	+
Voges-Proskauer	+	+	-
Citrate (Simmons)	+	+	-
Acid production from Lactose	+	+	+

ที่มา : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (1984)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ก

Chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	2.850	1	2.850	9.071	0.003
With Groups	29.531	94	0.314		
Total	32.381	95			

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ก

Shrimp	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	66.235	1	66.235	98.926	0.000
With Groups	60.928	91	0.670		
Total	127.163	92			

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ก

Surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	52.919	1	52.919	103.210	0.000
With Groups	44.095	86	0.513		
Total	97.015	87			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ข

Chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	1.116	1	1.116	1.938	0.167
With Groups	54.117	94	0.576		
Total	55.233	95			

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ข

Shrimp	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	3.891	1	3.891	9.981	0.002
With Groups	35.862	92	0.390		
Total	39.752	93			

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ข

Surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	1.291	1	1.291	2.350	0.129
With Groups	47.782	87	0.549		
Total	49.073	88			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ค

Chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	0.589	1	0.589	1.763	0.190
With Groups	17.383	52	0.334		
Total	17.972	53			

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 7ค

Surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	10.256	1	10.256	36.555	0.000
With Groups	7.014	25	0.281		
Total	17.269	26			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ก

Chilled chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	0.518	2	0.259	0.706	0.495
With Groups	51.664	141	0.366		
Total	52.182	143			

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log
		a
PCA	48	4.88
PAC	48	4.98
STPC-CI	48	5.02
Sig.		0.278

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ก

Frozen chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	2.642	2	1.321	4.369	0.014
With Groups	42.637	141	0.302		
Total	45.279	143			

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
PCA	48	4.5371	
STPC-CI	48		4.7725
PAC	48		4.8573
Sig.		1.000	0.450

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ก

Chilled shrimp	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	3.017	2	1.508	1.701	0.186
With Groups	126.807	143	0.887		
Total	129.824	145			

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log
		a
PCA	48	6.61
PAC	49	6.79
STPC-CI	49	6.96
Sig.		0.080

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ก

Frozen shrimp	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	0.223	2	0.111	0.162	0.851
With Groups	90.755	132	0.688		
Total	90.978	134			

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log
		a
PCA	45	4.92
PAC	45	4.96
STPC-CI	45	5.02
Sig.		0.596

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ก

Chilled surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	2.359	2	1.180	2.650	0.075
With Groups	49.410	111	0.445		
Total	51.769	113			

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
PCA	38	7.17	
PAC	38	7.33	7.33
STPC	38		7.52
Sig.		0.301	0.210

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ก

Frozen surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	5.276	1	5.276	8.174	0.005
With Groups	63.261	98	0.646		
Total	68.538	99			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ข

Chilled chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	61.873	3	20.624	26.846	0.000
With Groups	144.431	188	0.768		
Total	206.304	191			

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
MPN	48	2.63	
PEC	48	2.76	
SCEc	48		3.81
CCA	48		3.84
Sig.		0.472	0.892

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ข

Frozen chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	46.867	3	15.622	41.351	0.000
With Groups	71.027	188	0.378		
Total	117.894	191			

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
MPN	48	2.42	
PEC	48	2.54	
SCEc	48		3.34
CCA	48		3.56
Sig.		0.305	0.078

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ข

Chilled shrimp	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	21.616	3	7.205	21.871	0.000
With Groups	61.937	188	0.329		
Total	83.553	191			

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log		
		a	b	c
MPN	49	1.49		
PEC	49	1.60		
SCEc	49		2.06	
CCA	45			2.32
Sig.		0.354	1.000	1.000

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ข

Frozen shrimp	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	19.343	3	6.448	16.096	0.000
With Groups	70.500	176	0.401		
Total	89.843	179			

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
MPN	45	1.08	
PEC	45	1.12	
SCEc	45		1.74
CCA	45		1.77
Sig.		0.761	0.827

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ข

Chilled surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	15.026	3	5.009	15.605	0.000
With Groups	48.789	152	0.321		
Total	63.816	155			

ตารางที่ 29 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
MPN	39	3.46	
PEC	39	3.55	
SCEc	39	3.71	
CCA	39		4.26
Sig.		0.065	1.000

ตารางที่ 30 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในรูปที่ 8ข

Frozen surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	2.959	2	1.480	1.711	0.184
With Groups	127.123	147	0.865		
Total	130.082	149			

ตารางที่ 31 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log
		a
MPN	50	3.22
SCEc	50	3.24
CCA	50	3.53
Sig.		0.122

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในตารางที่ 9

Chilled chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	6.817	3	2.272	5.898	0.001
With Groups	36.597	95	0.385		
Total	43.414	98			

ตารางที่ 33 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log		
		a	b	c
PEC	21	2.15		
MPN	29	2.27	2.27	
SCEc	29		2.54	2.54
CCA	20			2.89
Sig.		0.519	0.141	0.053

ตารางที่ 34 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในตารางที่ 9

Frozen chicken	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	3.987	3	1.329	4.508	0.007
With Groups	15.039	51	0.295		
Total	19.026	54			

ตารางที่ 35 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log	
		a	b
MPN	25	2.06	
PEC	7	2.20	
SCEc	17	2.43	2.43
CCA	6		2.91
Sig.		0.165	0.055

ตารางที่ 36 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในตารางที่ 9

Chilled surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	3.86E-02	2	1.93E-02	0.077	0.926
With Groups	6.247	25	0.250		
Total	6.286	27			

ตารางที่ 37 การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test

Type	N	Mean log
		a
SCEc	9	3.22
MPN	14	3.30
PEC	5	3.32
Sig.		0.725

ตารางที่ 38 การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลในตารางที่ 9

Frozen surimi	SS	df	MS	F	Sig.
Mean log Between Groups	1.390	1	1.390	8.124	0.010
With Groups	3.250	19	0.171		
Total	4.640	20			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ทัศนีย์ กองแก้ว เกิดวันที่ 14 กรกฎาคม พ.ศ. 2520 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543

ผลงานทางวิชาการ

Kongkaeow, T. and Rengpipat, S. Comparison of conventional and SimPlate™ methods for total plat count and Coliforms & *Escherichia coli* in surimi. Poster presentation *in* BioThailand 2003: Technology for Life. (17-20 July 2003). p. 292

ประวัติการทำงาน

ทำงาน Part time ในตำแหน่งนักเคมี ให้แก่ บริษัท รับตรวจสินค้าโพ้นทะเล จำกัด (Overseas Merchandise Inspection Co., Ltd. : OMIC) ตั้งแต่ พ.ศ. 2545- ปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย