รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# โครงการวิจัย การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อเพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปราคาแพง

(Development of rapid microbial detection using self-developed machine vision and enhance effectiveness of culture incubation to support growth of food export and eliminate need to import expensive microbial test kits from overseas)

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802160
สัญญาเลขที่ 155/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# โครงการวิจัย การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อเพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปราคาแพง

(Development of rapid microbial detection using self-developed machine vision and enhance effectiveness of culture incubation to support growth of food export and eliminate need to import expensive microbial test kits from overseas)

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

สิงหาคม 2559

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 155/2559

# บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

## (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อเพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปราคาแพง (ภาษาอังกฤษ) Development of rapid microbial detection using self-developed machine vision and enhance effectiveness of culture incubation to support growth of food export and eliminate need to import expensive microbial test kits from overseas รหัสโครงการ 2559A10802160 สัญญาเลขที่ 155/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 891,000 บาท (แปดแสนเก้าหมื่นหนึ่งพันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2558 – วันที่ 30 กันยายน 2559) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้นำเสนอชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์เชื้อแบบปกติ (conventional method) ที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้เครื่องมืออุปกรณ์ที่มีความยุ่งยาก ราคาแพงและใช้ปริมาณอาหารจำนวนมาก อีกทั้งอาหารที่ใช้อาจจะยังไม่ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากนี้ในการทราบผลการวิเคราะห์ใช้เวลาอย่างน้อย 2 – 3 วันจากห้องปฏิบัติการที่ต้องใช้พนักงานในการตรวจนับโคโลนีที่อาจจะเกิดความผิดพลาดในการนับ เนื่องจากความเหนื่อยล้าของพนักงานที่ต้องจัดการกับตัวอย่างเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ข้อมูลคุณภาพทางจุลชีววิทยาออกมาล่าช้า เกิดความเสียหายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการผลคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่รวดเร็วเพื่อจะรู้ว่า มีเชื้อก่อโรคในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปหรือไม่ อีกทั้งนำข้อมูลไปใช้ควบคุมกระบวนการผลิตและตรวจสอบความสะอาดและสุขลักษณะ ด้วยข้อจำกัดของประสิทธิภาพของอาหารที่มีต่อการบ่มและวิธีการตรวจนับและตรวจติดตามโคโลนี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง โดยพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในอาหารจำกัดและมีขนาดเล็กร่วมกับอุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นเพื่อเร่งกระบวนการวิเคราะห์เชื้อให้เร็วขึ้น ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria* spp. เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา จากการศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเชื้อภายใต้อาหารปริมาตรจำกัดด้วยชุดอุปกรณ์

ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่น (High magnification microscopy) จากปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเช่น อุณหภูมิ ปริมาณวุ้นและปริมาณอาหารเสริม พบว่าอุณหภูมิการบ่มเชื้อ 40.5°C ความเข้มข้นของวุ้นสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมแต่ต้องมีความเข้มข้นน้อยกว่า 2.5X และการปรับปรุงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากความเข้มข้นเดิมเพิ่มเป็นที่ 2X และ2.5X ตามลำดับ เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้เวลาในการวิเคราะห์เชื้อสั้นลง ทั้งนี้เมื่อได้โคโลนีที่ฟอร์มตัวของเชื้อแล้ว ในงานวิจัยยังได้ดำเนินการพัฒนาเทคโนโลยีขั้นตอนการตรวจนับเชื้อด้วยการวิเคราะห์ image analysis ทดแทนการตรวจนับโคโลนีด้วยสายตา โดยในงานวิจัยเป็นการประยุกต์อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่น (Low magnification microscopy) ที่สามารถ capture โคโลนีได้ทั้งพื้นที่ agar ของชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอาหารปริมาตรจำกัด (MIC) โคโลนีในรูปแบบไฟล์ดิจิตอล (image picture) จะถูกเปิดโดยโปรแกรม ImageJ เพื่อแปลงข้อมูลจากภาพให้เป็น particles รูปลักษณ์ต่าง ๆที่สอดคล้องกับโคโลนีบน agar จากนั้นไฟล์ analog ที่ได้จะถูกประมวลผลเป็นตัวเลขเพื่อแสดงจำนวนของโคโลนี ซึ่งการตรวจนับโคโลนีด้วยการวิเคราะห์แบบ image analysis มีการสอบเทียบความถูกต้องของเทคนิคเปรียบเทียบกับการตรวจนับด้วยสายตา พบว่าให้ผลที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันโดยให้ค่า $R^2$ = 0.9820 และมีค่าความผิดพลาดที่เกิดจากนับ 3.15% เนื่องจากโปรแกรมประมวลผลที่เกิดจาก noise ของการสะท้อนแสงที่ปรากฏอยู่ในภาพ แต่อย่างไรก็ตามอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ นวัตกรรมดังกล่าวจะเป็นนวัตกรรมใหม่ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ สามารถใช้งานได้สะดวก รวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำสูง ลดการนำเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อและชุดตรวจสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ โรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ เช่น บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด, บริษัท ศิริมานิต จำกัด และบริษัทอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ มีงบประมาณที่สามารถนำไปจัดซื้อเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ นวัตกรรมนี้จะเอื้อให้เกิดความถี่ในการสุ่มตรวจความปลอดเชื้อในกระบวนการผลิตสินค้า และสามารถนำผลการวิเคราะห์ไปปรับปรุงกระบวนการผลิต ทำให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนส่งให้ลูกค้า เอื้อให้เกิดการศึกษาพัฒนาการผลิตอย่างต่อเนื่อง สามารถบ่งชี้ถึงจุดบกพร่องที่เกิดขึ้นจากการผลิต ซึ่งปกติมักใช้เวลามากเกินจนไม่สามารถปรับปรุงคุณภาพสินค้าหลังจากที่ได้ผลิตและส่งผลิตภัณฑ์ไปถึงลูกค้าและได้จำหน่ายสินค้าแล้ว

## บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในอาหารโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารจำกัดและมีขนาดเล็กได้มีการพัฒนาขึ้นมา เพื่อเร่งกระบวนการวิเคราะห์เชื้อให้เร็วขึ้น และเพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาการใช้ 96-well microtiter plate ที่มีการใช้ปริมาตรอาหารน้อยแทนการใช้ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน โดยทำการศึกษาด้วยการใช้เชื้อ *Listeria* แทนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จากการศึกษาพบว่าจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์เชื้อภายใต้ปริมาตรอาหารจำกัดมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน ($R^2$ = 0.97) แสดงว่าการวิเคราะห์เชื้อในอาหารปริมาตรจำกัดสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อทั้งหมดแทนการใช้วิธีมาตรฐานได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเชื้อภายใต้อาหารปริมาตรจำกัดด้วยอุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นกำลังขยายสูง โดยมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ ปริมาณวุ้นและ ปริมาณอาหารเสริม เพื่อจะได้นำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เพื่อที่จะทำให้เวลาในการวิเคราะห์เชื้อสั้นลง โดยอุณหภูมิที่นำมาใช้ในการบ่มเชื้อคือ 40.5°C และมีการปรับปรุงความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนจากความเข้มข้นเดิมเพิ่มเป็นที่ 2X และ2.5X ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของวุ้นสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมแต่ต้องมีความเข้มข้นน้อยกว่า 2.5X นอกเหนือจากนั้นในงานวิจัยนี้ยังได้มีการพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์ถาพถ่ายด้วยอุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นกำลังขยายต่ำ ต่อการนับปริมาณเชื้อโคโลนี *Escherichia coli* และ coliform บนพื้นผิวของ agar medium ในระดับ micro – environment การตรวจหา *E. coli* และปริมาณ coliform ในอาหารโดยปกติเพื่อเป็นการบ่งบอกสุขลักษณะที่ดีในการล้างมือและการผลิตอาหารตลอดรวมถึงการเก็บรักษาที่ไม่เพียงพอและมีการปนเปื้อนข้ามเกิดขึ้น ในการนับจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดประสบความสำเร็จในการประมาณการใช้เทคนิคเชิงเศรษฐศาสตร์แต่มีประสิทธิภาพในการใช้โดยเป็นการใช้กล้อง digital microscopy ร่วมกับการใช้โปรแกรม ImageJ เพื่อที่จะช่วยในเรื่องของการวิเคราะห์นับโคโลนี โปรโตคอลที่พัฒนาดังกล่าวทำให้ช่วยลดเวลาการวิเคราะห์ ลดแรงงานและเวลาในการนับโคโลนีด้วยวิธีการนับด้วยสายตา การนำเสนอการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กได้ดำเนินการโดยใช้ 96-well microtiter plate เทคนิคและความความถูกต้องของการนับปริมาณเชื้อถูกเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงวิธีการวิเคราะห์แบบ pour plate, spread plate 2 เทคนิควิธีวิเคราะห์แบบ agar ที่เป็น plate count agar และอาหาร Chromocult® Coliform Agar (CCA) ถูกนำมาใช้และนับปริมาณเซลล์บน agar ทั้งคู่ การใช้ protocol ที่ได้มีการพัฒนาให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีมาตรฐานโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการวิเคราะห์ด้วยสายตาและการใช้เทคนิค

ซอฟท์แวร์กับการยอมรับค่าเฉลี่ยที่ยอมให้ผิดพลาดที่ 3.15% รูปแบบการวิเคราะห์ขนาดเล็กที่รวดเร็วถูกนำมาทดสอบกับตัวอย่างอุตสาหกรรมที่หลากหลายชนิด โดยเป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปไปจนถึงตัวอย่างที่ swab จากสิ่งแวดล้อม ปริมาณโคโลนีที่ได้จากเทคนิคที่นำเสนอพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการวิเคราะห์แบบปกติทั่วไป แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวเป็นทางเลือกที่ดี สามารถที่จะนำไปใช้แทนที่เทคนิคที่เป็นมาตรฐานในการนับปริมาณเชื้อพวก aerobic flora ในการสนับสนุนการตรวจวิเคราะห์เพื่อการสุขลักษณะการผลิตและสุขลักษณะนิสัยที่ดี วิธีการดังกล่าวสามารถที่จะจัดการกับตัวอย่างอุตสาหกรรมปริมาณมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยพัฒนาเวลาในการวิคราะห์และค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง การใช้เทคนิค MIC ร่วมกับ digital microscopy ไม่เพียงแต่เพื่อการดำเนินการนับโคโลนีของ *Escherichia coli* และ coliform แต่ยังสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกด้วย (i.e., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp.) และสามารถเป็นประโยชน์ในการนำไประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมยา

**คำสำคัญ :** อาหารปริมาตรจำกัด, การศึกษาจลน์ศาสตร์, การนับจำนวนจุลินทรีย์, การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงด้วยวุ้นแข็ง, การวิเคราะห์ภาพถ่ายดิจิตอล, นวัตกรรมต้นทุนการผลิตต่ำ

**Abstract**

A micro-scale, viable cells cultivation strategy was developed to assist the rapid detection of *Listeria spp.* and provide the wealth of essential background to growth *Listeria* forming colonies in 96-well microtiter plate. The growth kinetics of *Listeria* colony on TSA media was studied via a high magnification microscopy to optimize the cultivation parameters, for example, temperature, nutrition and agar concentration, to fasten the detection time. The optimal temperature for micro-well growth was at 40.5$^{o}$C. Using the logistic model to evaluate the key cultivation kinetics, the study revealed that the concentration of carbon and nitrogen sources should be fortified by adding 2X of glucose and 2.5X of tryptone to enhance colony growth. Only did the concentration of agar higher than 2.5X affect the lag time of colony growth. The use of micro cultivation in micro wells was very promising to substitute the tradition of Petri dish utilization. Moreover, this research developed image analysis protocol to detect and enumerate *Escherichia coli* and coliform colonies on the surface of agar medium in a micro-environment. The detection of *E. coli* and total coliform in foods usually indicates poor hygienic practice in handling and production operations, inadequate storage and post-process contamination. The number of total viable cells was successfully estimated using an economical but effective digital microscopy together with Image J software to assist the detection of small colony formation. This developed protocol enabled the reduction of lead time and minimized the labor and analytical time to perform colony counting manually. The microscale cultivation (MIC) was achieved using 96-well microtiter plate technique and the accuracy of viable cell count was compared to common industrial routines, including pour plate and spread plate techniques. Two types of agar media (i.e., Plate Count Agar (PCA) and Chromocult® Coliform Agar (CCA)) were utilized and the cell enumeration on both agars using the developed protocol agreed well with the results obtained from the standard methods. There were no statistical differences between the visual and software-assisted techniques with acceptable mean value of absolute percentage error of 3.15%. The miniaturized rapid protocol was tested on several types of industrial samples ranging from finished goods to environmental samples. The colony count results of the proposed technique were no statistically significant differences comparable to those of routine techniques. It was suggested that the technique has promising potential and convenient alternative to the standard method for the enumeration of aerobic

flora; it supports good manufacturing practice (GMP) and good hygiene practice (GHP) as well as enables traceability and efficient management of quality control and assurance of factory data. The method was able to effectively manage a large number of industrial samples and substantially improve the analytical time and cost per sample. The use of MIC equipped with digital microscopy not only performs *E. coli* and coliform enumeration but also it is able to detect other bacterial groups (i.e., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp.) and can be useful in pharmaceutical application.

**Keywords:** a micro-scale, growth kinetic, microbial enumeration, detection of agar cultures, digital image analysis, resource-poor settings

# สารบัญเรื่อง


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | I |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร | II |
| บทคัดย่อ | IV |
| สารบัญเรื่อง | VIII |
| สารบัญตาราง | IX |
| สารบัญรูป | X |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ | 1 |
| 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา | 8 |
| 3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย | 32 |
| 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ | 40 |
| 5 สรุปผลการทดลอง | 85 |
| เอกสารอ้างอิง | 87 |
| ผลผลิต (output) | 94 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | 95 |
| ภาคผนวก-ผลงานตีพิมพ์ | 96 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.1 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการนับปริมาณแบคทีเรียจากภาพถ่ายโคโลนี 40 ภาพ | 42 |
| 4.2 | เปรียบเทียบการนับปริมาณเชื้อทั้งหมด (total plate count) ด้วยเทคนิค pour plate, spread plate และ MIC/ImageJ ที่มีต่อตัวอย่างอาหาร | 43 |
| 4.3 | ผลการนับโคโลนีเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค pour plate กับ MIC/ImageJ บนอาหาร CCA ที่ได้ มีการทดสอบกับตัวอย่างอาหารจำนวน 18 ตัวอย่าง | 44 |
| 4.4 | การนับโคโลนี *E. coli*/coliforms ของตัวอย่างที่ได้จากการ swab สิ่งแวดล้อมซึ่งถูกทดสอบโดยการใช้เทคนิค pour plate เปรียบกับเทคนิค MIC/ImageJ | 45 |
| 4.5 | เปรียบเทียบผลการนับปริมาณยีสต์/รา ที่ได้จากเทคนิคการใช้ชุดทดสอบ test kit และเทคนิค miniaturized PDA | 47 |

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1.1 | เทคนิคการวิเคราะห์แบบ pour plate | 2 |
| 1.2 | ชุด Test kit สำหรับวิเคราะห์ยีสต์ รา | 3 |
| 1.3 | ชุด Test kit สำหรับวิเคราะห์อีโคไล โคลิฟอร์ม | 3 |
| 2.1 | เชื้ออีโคไลหรือคอลิฟอร์มที่มีแหล่งมาจากสัตว์เลือดอุ่นที่อาจจะพบการปนเปื้อนในอาหาร เนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อมน้ำ | 9 |
| 2.2 | แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม | 10 |
| 2.3 | แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรืออีโคไล (นิยมใช้ชื่อย่อ *E. coli*) แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ | 12 |
| 2.4 | *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) (บริเวณลูกศรชี้) | 12 |
| 2.5 | ลักษณะโคโลนี *Listeria monocytogenes* | 15 |
| 2.6 | ลักษณะสัณฐานของยีสต์ | 16 |
| 2.7 | ลักษณะสัณฐานของรา | 17 |
| 2.8 | ลักษณะสไลด์ที่มี counting chamber | 19 |
| 2.9 | Petroff – Hausser counting chamber | 19 |
| 2.10 | Counting chamber stage micrometer | 20 |
| 2.11 | ขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยวิธี Pour plate | 21 |
| 2.12 | วิธี pour plate | 22 |
| 2.13 | วิธีการ spread plate | 22 |
| 2.14 | วิธีการ drop plate | 23 |
| 2.15 | ขั้นตอนการทำและเชื้อจุลินทรีย์หลังการทำ membrane filtration | 24 |
| 2.16 | เครื่อง Tempo | 25 |
| 2.17 | การ์ดของเครื่อง Tempo | 25 |
| 2.18 | เครื่องนับโคโลนี (Colony counting) | 25 |
| 2.19 | เครื่อง Flow Cytometry | 26 |

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.20 | เครื่อง Direct epifluorescent microscopy (DEFT) | 27 |
| 2.21 | ชุดวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์รวมและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารแบบต่างๆที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศและขายในราคาค่อนข้างสูงทำให้อุตสาหกรรมอาหารและยาของประเทศมีต้นทุนที่สูงในการวิเคราะห์การปนเปื้อนในกระบวนการผลิต | 28 |
| 2.22 | ลักษณะตัวโปรแกรม ImageJ ที่ใช้ในการประมวลผลในการประยุกต์ใช้งานแบบต่างๆ | 30 |
| 3.1 | Low magnification stereomicroscopy | 34 |
| 3.2 | High magnification stereomicroscopy | 34 |
| 4.1 | ผลของค่า ISO ต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ซึ่งถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้ high magnification stereomicroscopy | 42 |
| 4.2 | ผลของความเร็วของชัตเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงโดยการใช้ high magnification stereomicroscopy | 44 |
| 4.3 | ผลของแหล่งของแสงต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้ high magnification stereomicroscopy | 44 |
| 4.4 | ผลของปริมาตรของ inoculum ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูก inoculated ที่ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้ high magnification stereomicroscopy | 45 |
| 4.5 | ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp.ถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา จาก 7 ถึง 12 - 22 ชั่วโมง | 47 |
| 4.6 | แบบจำลองการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ซึ่งมีการเติมความเข้มข้นของคาร์บอนที่หลากหลาย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง | 50 |
| 4.7 | ผลของความเข้มข้นที่มีต่อ maximum specific growth ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง | 50 |
| 4.8 | ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนที่มีต่อเวลาที่จุดเปลี่ยน ($t_i$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง | 51 |
| 4.9 | ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง | 52 |
| 4.10 | รูปแบบการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ที่แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของไนโตรเจน โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง | 55 |

**รูปที่** **หน้า**


4.11 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อ maximum specific growth rate ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง 55

4.12 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อเวลาที่จุดเปลี่ยน ($t_i$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง 56

4.13 ผลของความเข้มข้นของ agar ที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง 57

4.14 แบบจำลองการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ที่ได้มีการเติมแหล่งของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง 60

4.15 ผลของความเข้มข้นของ agar ที่มีต่อ maximum specific growth ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง 60

4.16 ผลของความเข้มข้นของ agar ที่มีต่อจุดเปลี่ยน ($t_i$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง 61

4.17 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 ถึง 20 ชั่วโมง 62

4.18 แบบจำลองการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 65

4.19 ผลของอุณหภูมิการบ่มที่มีต่อ maximum specific growth ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 65

4.20 ผลของอุณหภูมิการบ่มที่มีต่อจุดเปลี่ยน ($t_i$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 66

4.21 กราฟเปรียบเทียบการนับโคโลนีที่ได้จากเทคนิคที่แตกต่างกัน (เทคนิค spread plate, pour plate และ MIC) ที่ปริมาณของ *E. coli* ที่ต่างๆ กัน ($10^2$ - $10^6$ CFU/ml) 70

4.22 ภาพการวิเคราะห์โคโลนีแบบดิจิตอลที่แสดงผลของการกระจายตัวของโคโลนีบนผิว agar ที่มีผลต่อความถูกต้องของการนับด้วยโปรแกรม ImageJ 73

4.23 การวิเคราะห์การนับโคโลนีด้วยโปรแกรม ImageJ โดยมีขั้นตอนของการ capture ภาพโคโลนีจากนั้นแปลงจาก analog ให้อยู่ในรูปของ digital image conversion เพื่อแสดงสัญญาณและประมาณการนับโคโลนีจาก signal 75

4.24 กราฟเปรียบเทียบการนับปริมาณเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิคการนับด้วยตา (manual counting) กับการนับด้วยการวิเคราะห์ภาพถ่าย (digital counting) 77

**รูปที่** **หน้า**

4.25 ชุดอุปกรณ์ของแต่ละเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ยีสต์และรา (a) ชุดทดสอบ Easicult® Combi test kit (b) ชุดเทคนิค miniaturized PDA 83

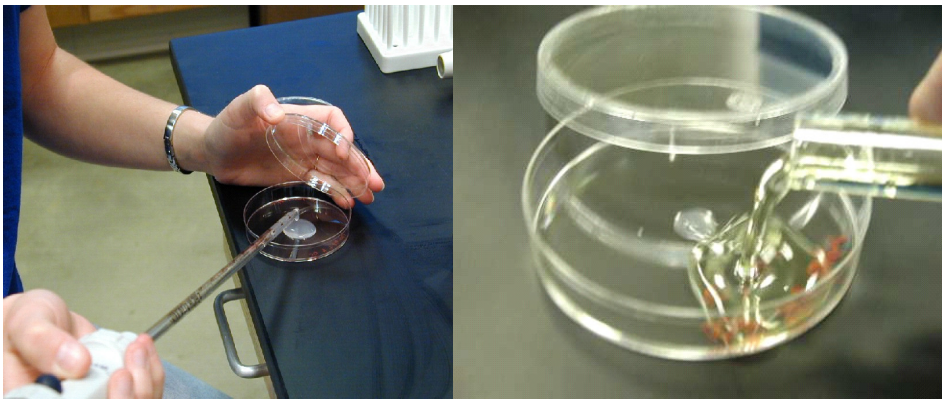
# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารและโรงงานผลิตสินค้าอุปโภค บริโภคของประเทศไทยขาดวิธีการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ที่มีราคาถูก ผลิตขึ้นเองภายในประเทศ ทำงานง่ายเหมาะกับลักษณะการผลิตในอุตสาหกรรมและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากต่อครั้ง วิธีการปัจจุบันที่ใช้อยู่ (เช่น การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็งแบบ pour plate หรืออาหารแข็งสำเร็จของ 3M petrifilm™) แม้จะเป็นที่ยอมรับและเป็นไปตามมาตรฐานการวิเคราะห์ที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป แต่หากจะพิจารณาด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการจัดการเชิงวิศวกรรมพบว่า วิธีการวิเคราะห์ที่นำเข้าจากต่างประเทศส่วนใหญ่นี้ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์เชิงอุตสาหกรรมที่มีตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก ซึ่งในการผลิตจำเป็นต้องมีความถี่ในการสุ่มตัวอย่างสูงเพื่อทำให้เกิดความมั่นใจทั้งกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ แต่โดยทั่วไป ทางโรงงานมีความถี่ในการสุ่มตัวอย่างไม่เพียงพอ เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์เหล่านี้มีค่าใช้จ่ายทางตรง (เช่น ค่าชุดวิเคราะห์ต่อตัวอย่างที่มีราคาแพง 50 –60 บาทต่อตัวอย่างสำหรับ Petrifilm™ ของ 3M) และค่าใช้จ่ายแฝงสูง (ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้เทคนิค pour plate จะต้องมีแรงงานทักษะ ล้างอุปกรณ์ และเวลาวิเคราะห์นาน) อีกทั้งยังใช้เวลานาน 1-2 วันในการวิเคราะห์ซึ่งทำให้เกิดค่าใช้จ่ายในการผลิตทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นผู้ประกอบการจึงจำกัดปริมาณตัวอย่างที่จะตรวจสอบ ก่อให้เกิดความเสี่ยงที่จะตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกินมาตรฐานในผลิตภัณฑ์ที่ปลายทาง เกิดการปฏิเสธการซื้อขาย หรือจำเป็นต้องมีการเผา ทำลายทิ้ง

ทางคณะผู้วิจัยตระหนักถึงความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นสิ่งที่ทางโรงงานไม่สามารถที่จะหลีกเลี่ยงได้ โดยเน้นกับจุลินทรีย์ที่มีความถี่และความจำเป็นในการตรวจในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ทั่วไปคือจุลินทรีย์ทั้งหมด ได้แก่ 1) Aerobic plate count, Psychrotrophic count, Thermoduric count, 2) ยีสต์และรา และ3) จุลินทรีย์ดัชนีบ่งชี้ ได้แก่ Coliform และ Faecal coliform เป็นต้น (Ray, 1996) ซึ่งปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้เริ่มทำงานวิจัยพื้นฐานเพื่อรองรับแนวคิดและสมมติฐานในการปรับปรุงระยะเวลาการวิเคราะห์จากการสังเกตุการติดเชื้อโรคจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ซึ่งในสภาวะที่เป็นกรดและด่างสูงในกระเพาะและลำไส้ แต่การแสดงอาการของโรคเกิดขึ้นภายในระยะเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลาหลายวัน ทำให้เกิดสมมุติฐานที่ว่าสารอาหารหรือสภาวะในการบ่มเชื้อไม่เหมาะสม

ทำให้เกิดการวิเคราะห์เลี้ยงเชื้อที่ไม่มีประสิทธิภาพ ต้องทำการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ในทุกมิติ ในขณะเดียวกันได้ทำการสำรวจความต้องการของวิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์จากมุมของอุตสาหกรรมและได้ทำการเก็บข้อมูลจริงจากโรงงานอุตสาหกรรมพันธมิตร เช่น บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตไอศครีมอิตาเลียนแท้ และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Frozen ready-to-eat) เช่น ขนมเค้กแช่แข็ง โมจิสอดไส้ไอศครีม ขนมไหว้พระจันทร์สอดไส้ไอศครีม ข้าวเหนียวมะม่วง ข้าวผัด ผัดไท และบริษัท ศิริมานิต จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทผลิตดินน้ำมันจากแป้งโดว์ โรงงานเหล่านี้เป็นตัวแทนโรงงานในประเทศทั่วไปที่ยังคงใช้วิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม (Conventional methods) เช่น เทคนิคการใช้ pour plate (ดังรูปที่ 1.1) ร่วมกับการใช้ชุดวิเคราะห์เชื้อสำเร็จ เพื่อบริหารค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์



**รูปที่ 1.1** เทคนิคการวิเคราะห์แบบ pour plate

ซึ่งวิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมมีความยุ่งยากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อุปกรณ์และเครื่องมือล้าสมัยไม่เหมาะกับการวิเคราะห์แบบอุตสาหกรรม ต้องการห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์เชื้อมาตรฐานที่โรงงานอุตสาหกรรมขนาดกลางและเล็กไม่สามารถจัดหาได้ ต้องการทักษะในการทำงานจากผู้ชำนาญการ และจากการศึกษาเชิงลึกของจุดด้อยในการตรวจเชื้อด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (conventional method) จะพบว่าในการเตรียมการวิเคราะห์จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเกินความจำเป็น (15-20 ml) ในขณะที่อาหารส่วนใหญ่ไม่ถูกใช้และจะถูกทิ้งหลังจากการวิเคราะห์สิ้นสุด การที่โรงงานเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์แบบสำเร็จสำหรับยีสต์และรา (รูปที่ 1.2) และอีโคไล/คลอลิฟอร์ม (รูปที่ 1.3) ซึ่งชุดตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวค่อนข้างแพง โดยค่าใช้จ่ายปกติของชุด Test kit สำหรับวิเคราะห์ยีสต์ รา อยู่ที่ประมาณ 180 บาทต่อแผ่นต่อการทดสอบ 1 ตัวอย่าง ในขณะที่ราคาชุด Test kit สำหรับวิเคราะห์อีโคไล/โคลิฟอร์ม Petrifilm™ อยู่ที่ประมาณ 52 บาท และจากการสอบถามจากผู้ประกอบการ คาดว่าอีกไม่กี่เดือนข้างหน้าราคาจะเพิ่มสูงอีก 20 % การลดค่าใช้จ่ายจากการใช้ชุดวิเคราะห์เหล่านี้เหมาะกับประเทศที่พัฒนาแล้วที่ราคาแรงงานทักษะมีราคาแพง สำหรับประเทศไทยที่ยังมีแรงงานราคาค่อนข้างถูก ชุดวิเคราะห์เหล่านี้กลับไม่มีประโยชน์ทางด้านค่าใช้จ่ายการเตรียม

**รูปที่ 1.2** ชุด Test kit สำหรับวิเคราะห์ยีสต์ รา

**รูปที่ 1.3** ชุด Test kit สำหรับวิเคราะห์อีโคไล โคลิฟอร์ม

และนอกจากนี้จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ายังมีตัวแปรที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคือ ในขั้นตอนการบ่มด้วยตู้บ่มลมร้อน (hot air incubator) ขั้นตอนดังกล่าว ตู้บ่มที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีความแปรปรวนของอุณหภูมิมากจากทางด้านในตู้ถึงประตูเปิดเข้าออก ซึ่งวิธีการให้ความร้อนของตู้บ่มที่อาศัย convective heat transfer โดยใช้อากาศเป็นสื่อตัวกลางนั้น มีประสิทธิภาพต่ำ การควบคุมอุณหภูมิการบ่มเลี้ยงมีผลอย่างมากในการเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากการได้รับอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมสม่ำเสมอจะสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศภายในตู้บ่ม (Orana et al., 2011) โดยจะต้องสามารถควบคุมไม่ให้ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำมากเกินไปเนื่องจากความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อปริมาณความชื้นอิสระ (water activity) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าภายในตู้อบมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำจะทำให้ความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar) เกิดการระเหยมาก ส่งผลให้ปริมาณความชื้นอิสระ (water activity) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ โดยปริมาณความชื้นอิสระ (water activity) เป็นระดับปริมาณน้ำต่ำสุดในอาหารที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ดีภายใต้ค่าปริมาณความชื้นอิสระที่จำกัด ดังนั้นถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นอิสระต่ำกว่า 0.9 จะส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หยุดชะงักหรือเจริญเติบโตได้ช้า (รุ่งนภา, 2547) และในการอ่านผลวิเคราะห์ วิธีการแบบดั้งเดิมต้องใช้เวลา 2 วันกว่าจะรู้ผลเนื่องจากขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการแบ่งตัวที่อุณหภูมิการบ่มประมาณ 37.5 °C (incubation) เพื่อให้เห็นลักษณะของโคโลนีที่ดูได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้วิธีการนับจำนวนและวิเคราะห์ลักษณะโคโลนีเชื้อที่โตด้วยตาเปล่ามีประสิทธิภาพต่ำ ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์ที่ส่งเข้ามาตรวจสอบคุณภาพมีจำนวนมาก อาจทำให้เกิดการเมื่อยล้าในการนับ และอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการนับ ได้ค่าที่คลาดเคลื่อน ทำให้ไม่สามารถบ่งบอกได้แน่ชัดว่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์ผ่านหรือไม่ หรือมาตรฐานจากแหล่งผลิตดีหรือไม่ ซึ่งในปัจจุบันเครื่องนับจำนวนโคโลนีแบบอัตโนมัติ มีราคาสูงเป็นอย่างมากและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการตรวจนับ เช่น ถ้าถาดหรืออุปกรณ์ที่ใส่ตัวอย่างมีรอยข่วนอาจทำให้การนับเกิดการคลาดเคลื่อนได้ และนอกจากนี้แล้วแสงที่ใช้อาจจะมีผลกระทบต่อลักษณะสีและ

ความเข้มแสงของโคโลนีบางชนิด โดยเฉพาะโคโลนีของ coliform *และ E.coli* ซึ่งเป็นโคโลนีที่สามารถขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult® Coliform Agar โดยเชื้อ coliform จะให้โคโลนีสีแดง ในขณะที่ *E.coli* จะให้โคโลนีสีม่วง ด้วยข้อจำกัดของเครื่องนับโคโลนีอัติโนมัติในปัจจุบัน ค่าที่ออกมาจะเป็นค่าจำนวนโคโลนีทั้งหมด ไม่สามารถที่จะแยกนับในแต่ละโคโลนีได้ ดังนั้นทางโรงงานหรือแหล่งผลิตจึงไม่นิยมนำมาใช้ ส่งผลให้คุณภาพทางจุลชีววิทยาออกมาล่าช้า เกิดความเสียหายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการผลคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่รวดเร็วเพื่อจะรู้ว่า มีเชื้อก่อโรคในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปหรือไม่ อีกทั้งนำข้อมูลไปใช้ควบคุมกระบวนการผลิตและตรวจสอบความสะอาดและสุขลักษณะ ด้วยข้อจำกัดของตู้บ่มและวิธีการตรวจนับและตรวจติดตามโคโลนี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งนวัตกรรมดังกล่าว ***จะเป็นนวัตกรรมใหม่ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ สามารถใช้งานได้สะดวก รวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำสูง ลดการนำเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อและชุดตรวจสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ โรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ เช่น บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด, บริษัท ศิริมานิต จำกัด และบริษัทอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ มีงบประมาณที่สามารถนำไปจัดซื้อเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ให้เสร็จสิ้นภายในเวลา 1 วันได้ (จากปกติ 5 - 7 วันต่อตัวอย่าง)*** นวัตกรรมนี้จะเอื้อให้เกิดความถี่ในการสุ่มตรวจความปลอดเชื้อในกระบวนการผลิตสินค้า และสามารถนำผลการวิเคราะห์ไปปรับปรุงกระบวนการผลิต ทำให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนส่งให้ลูกค้า เอื้อให้เกิดการศึกษาพัฒนาการผลิตอย่างต่อเนื่อง สามารถบ่งชี้ถึงจุดบกพร่องที่เกิดขึ้นจากการผลิต ซึ่งปกติมักใช้เวลามากเกินจนไม่สามารถปรับปรุงคุณภาพสินค้าหลังจากที่ได้ผลิตและส่งผลิตภัณฑ์ไปถึงลูกค้าและได้จำหน่ายสินค้าแล้ว ถึงแม้ว่าทางโรงงานจะทำการผลิตภายใต้หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิต โดยหลักเกณฑ์ดังกล่าวจะมีการควบคุมครอบคลุมตั้งแต่อาคารสถานที่ บุคลากร เครื่องมือในการผลิต แต่อย่างไรก็ตามก็อาจจะมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และเมื่อพิจารณาแนวโน้มการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารไปยังต่างประเทศที่มีจำนวนสูงมากขึ้นในแต่ละปี โดยขยายสู่ประเทศที่มีการควบคุมคุณภาพสินค้าที่เคร่งครัด เช่น ญี่ปุ่น อเมริกา สิงคโปร์ จีน ฮ่องกง และยุโรป โดยเฉพาะญี่ปุ่นเป็นประเทศที่ให้ความสำคัญเรื่องความปลอดภัย สุขอนามัยและคุณภาพของสินค้าที่นำเข้าเป็นอย่างมาก ดังนั้นกฎระเบียบการนำเข้าของผลิตภัณฑ์ในประเทศดังกล่าวจึงค่อนข้างที่จะเข้มงวด โดยผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจะต้องไม่เกินมาตรฐาน และจะต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ coliforms bacteria & *E. coli*

(สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2552) การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในเกณฑ์กำหนดของแต่ละกลุ่มประเทศคู่ค้าจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง นวัตกรรมใหม่นี้จะเป็นอีกตัวอย่างหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงที่มีผลกระทบต่อเทคโนโลยีการผลิตและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต้นทุนการผลิต เสริมสร้างศักยภาพให้กับอุตสาหกรรมการผลิตอาหารในประเทศไทย

**1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย**

1.2.1 เพื่อออกแบบและพัฒนาชุดเทคโนโลยีอุปกรณ์ต้นแบบสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มเชื้อร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแมชชีนวิชชั่นต้นทุนต่ำในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์

1.2.2 เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น

1.2.3 เพื่อพัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตรวจนับการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

1.2.4 เพื่อประเมินผลกระทบทางเศรษฐศาสตร์ของขั้นตอนการควบคุม คุณภาพการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกต่อความไวและความแม่นยำจากการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีรวดเร็ว

1.2.5 นำผลที่ได้มาเป็นแหล่งอ้างอิงและประเมินการใช้วิธีรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ

1.2.6 เพื่อให้การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์สำหรับการตรวจสอบคุณภาพอาหารเป็นมาตรฐานเดียวกัน

1.2.7 นำนวัตกรรมสิ่งประดิษฐ์คิดค้นมาประยุกต์ใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกผลิตภัณฑ์ในประเทศและส่งออกต่างประเทศ

**1.3 ขอบเขตของงานวิจัย**

1.3.1 ศึกษาออกแบบและสร้างชุดตรวจสอบการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย เช่น Aerobic plate count, Psychrotrophic count, Thermoduric count, ยีสต์และรา เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแมชชีนวิชชั่นต้นทุนต่ำ

1.3.2 ศึกษาปัจจัยที่เร่งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น พัฒนาชนิดและปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม สภาวะแวดล้อมที่มีการปรับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

1.3.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการการตรวจนับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแมชชีนวิชชั่นต้น เช่น นำเทคโนโลยีระดับจุลภาคเข้ามาประยุกต์ใช้ (Micro Inoculation) ร่วมกับชุดอุปกรณ์อิเล็คทรคนิคส์ Digital Image Acquisition ที่ประกอบไปด้วยฮาร์ดแวร์และซอฟท์แวร์

1.3.4 ปรับระดับของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ รา ที่ส่งผลให้การตรวจนับหรือตรวจวิเคราะห์รวดเร็วขึ้น

1.3.5 เปรียบเทียบผลของวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการเร่งการเจริญเติบโตและการตรวจนับและตรวจหาเชื้อด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มและการประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแมชชีนวิชชั่น

1.3.6 รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลการใช้ชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปที่ได้มีการสร้างและพัฒนาสำหรับการวิเคราะห์ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ รา

1.3.7 รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลเพื่อนำชุดเทคโนโลยีและอุปกรณ์ต้นแบบสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มเชื้อและการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแมชชีนวิชชั่นต้นทุนต่ำไปประยุกต์ใช้จริงในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1.4.1 ได้นวัตกรรมอุปกรณ์ต้นแบบสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อ Aerobic plate count, Psychrotrophic count, Thermoduric count, ยีสต์และราด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มเชื้อและการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแมชชีนวิชชั่น ที่มีประสิทธิภาพในการวัดที่ถูกต้อง แม่นยำ ต้นทุนต่ำเหมาะสำหรับอุตสาหกรรมระดับเล็ก-กลางเพื่อเสริมศักยภาพการตรวจวิเคราะห์เชื้อผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก

1.4.2 ได้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปในการวิเคราะห์เชื้อที่มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ สามารถวิเคราะห์

ตัวอย่างได้มากซ้ำ สร้างความมั่นใจในคุณภาพโดยให้ผลการวิเคราะห์เหมือนกับวิธีมาตรฐานที่ทางโรงงานใช้

1.4.3 สามารถนำนวัตกรรมไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมเล็ก – กลาง เพื่อทดแทนเทคโนโลยีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งราคาค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง

1.4.4 แก้ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก สามารถขจัดปัญหาการตีกลับสินค้าส่งออกนอกประเทศ

1.4.5 ลดการนำเข้าชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อและเครื่องนับโคโลนีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ เป็นการช่วยเพิ่มมูลค่ามวลรวมให้กับประเทศไทย

1.4.6 สามารถนำนวัตกรรมไปประยุกต์ใช้ในโรงงานยา หน่วยงานสาธารณสุข โรงพยาบาล เพื่อทดแทนเทคโนโลยีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งมีราคาค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง

1.4.7 เกิดการพัฒนานวัตกรรมด้านการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบบรวดเร็วที่มีกระบวนการตั้งแต่ต้นน้ำจนได้ผลการทดสอบทางจุลชีววิทยา และด้วยเป็นนวัตกรรมครบวงจรสามารถทำการจดสิทธิบัตรได้

# บทที่ 2
# เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณภาพอาหาร

2.2 เทคนิคการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

2.3 เครื่องนับโคโลนีที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

2.4 ชุดทดสอบ Rapid test kit ในปัจจุบัน

2.5 ระบบแมชชีนวิชัน (Machine vision)

## 2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณภาพอาหาร (สุมณฑา, 2545)

### 2.1.1 จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count)

เป็นวิธีที่ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งนิยมเรียกกันว่าวิธี Standard Plate Count หรือ Aerobic Plate Count ถ้าตัวอย่างอาหารตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดเกินมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบที่นำมาผลิต ผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก กระบวนการผลิตอาจไม่ถูกสุขาภิบาลและอาจมีการเก็บอาหารในสภาวะที่ไม่เหมาะสม แม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค แต่ถ้ามีจำนวนมากเกินมาตรฐานที่กำหนดก็สามารถก่อโรคทางเดินอาหารได้เช่นเดียวกัน (กองสุขาภิบาล, 2537)

ในการตรวจวิเคราะห์ถ้าในตัวอย่างอาหารมีจุลินทรีย์จำนวนมาก ต้องทำการเจือจางให้ลดลงทีละสิบเท่าที่เรียกว่า (Ten fold dilution) หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดเจริญได้ ที่นิยมใช้ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar หรือ Plate Count Agar ความเป็นกรด – ด่าง เป็น 7.0 – 7.4 เป็นผลให้แบคทีเรียเจริญได้ สภาวะในการบ่มต้องมีออกซิเจน ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้จะเป็นกลุ่ม Aerobe หรือ Facultative anaerobe ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ ขึ้นอยู่กับว่าตัวอย่างอาหารจะมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อกลุ่มไหน ถ้าตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน โอกาสส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียกลุ่ม Thermophile ดังนั้นจะบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 3 วัน ถ้าตัวอย่างอาหารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะพบแบคทีเรียกลุ่ม Mesophile ดังนั้นจะบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 – 37°C เป็นเวลา 24 – 28 ชั่วโมง แต่ถ้าตัวอย่างอาหารที่เก็บแช่เย็นจะพบแบคทีเรียกลุ่ม Psychrophile ดังนั้นจะบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 7°C เป็นเวลา 10 วัน หรือบ่มที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 7 วัน (APHA, 2001)

**2.1.2 จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสุขลักษณะ**

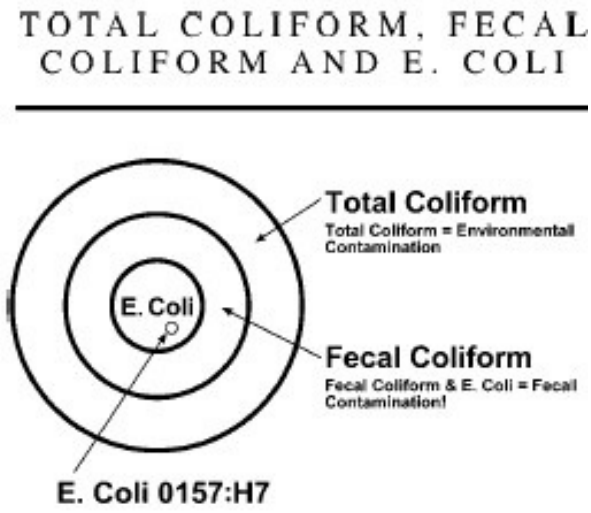
โดยทั่วไปการตรวจหาจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ตามมาตรฐานสากล คือการตรวจหา Coliforms bacteria และ *Escherichia coli* ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีแหล่งสะสมอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น การปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มนี้ในอาหารแสดงถึง สุขลักษณะของการผลิตที่ไม่ดี เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อน ดังนั้นเมื่อตรวจพบเชื้อกลุ่มนี้ในอาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนภายหลังการให้ความร้อนหรือความร้อนที่ใช้ในกระบวนการผลิตไม่เพียงพอที่ทำลายเชื้อในกลุ่มดังกล่าวได้

**2.1.2.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform**

โดยทั่วไปแบคทีเรียโคลิฟอร์มถูกใช้เป็นแบคทีเรียที่เป็นตัวบ่งชี้สุขลักษณะและความสะอาดของอาหารและน้ำ โดยรูปร่างของแบคทีเรียเป็นแท่งสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์แต่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสให้ผลพลอยได้เป็นกรดและแก๊ส ซึ่งสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิ 35 - 37°C (Anonymous, 1985; APHA, 1995) เชื้อ coliforms ถูกพบเป็นปริมาณมากในอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น แต่ก็ยังคงพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำด้วยเหมือนกัน ในดิน และพืชผัก แต่ในขณะเดียวกันตัวของเชื้อ coliforms เองโดยปกติก็ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคที่รุนแรงมากนัก เชื้อเหล่านี้สามารถที่จะเจริญเติบโตและการมีอยู่ของเชื้อดังกล่าวถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้เชื้อก่อโรคชนิดอื่นของ fecal ที่อาจจะมีอยู่ เชื้อก่อโรคในกลุ่ม fecal ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย ไวรัส หรือโปรโตซัว และพาราไซต์อื่นๆ โดยเชื้อจำเพาะที่มีอยู่เป็นเชื้อ *Citrobacter*, *Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Serratia*

**รูปที่ 2.1** เชื้ออีโคไลหรือคอลิฟอร์มที่มีแหล่งมาจากสัตว์เลือดอุ่นที่อาจจะพบการปนเปื้อนในอาหารเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อมน้ำ

มี 3 กลุ่มที่แตกต่างกันของแบคทีเรียโคลิฟอร์มดังรูปที่ 2.2 ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันในเรื่องของระดับความเสี่ยง ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ฟีคัลโคลิฟอร์มและอีโคไล กลุ่มทั้งหมดเหล่านี้ถูกใช้เป็นอินดิเคเตอร์ของอาหารและน้ำ กลุ่มปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ของชนิดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ฟีคัลโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน total coliform ซึ่งพบได้โดยส่วนใหญ่ใน feces สำหรับ *E. coli* เป็นสับกรุ๊ปของฟีคัลโคลิฟอร์ม เมื่อตัวอย่างถูกส่งไปห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกทดสอบปริมาณเชื้อทั้งหมด ถ้าผลทดสอบออกมามีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดปรากฏอยู่ ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกทดสอบฟีคัลโคลิฟอร์มและเชื้อ *E. coli* ต่อไป




**รูปที่ 2.2** แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม

จากรูปสามารถให้คำจำกัดความของแต่ละกลุ่มได้ดังนี้

- Total coliform bacteria

โดยปกติทั่วไปพบในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน หรือ ผัก และโดยทั่วไปไม่ปลอดภัยถ้ามีการปนเปื้อนในอาหาร ถ้ามีการตรวจพบปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดในอาหารและน้ำดื่ม แหล่งของการปนเปื้อนอาจเป็นสิ่งแวดล้อม การปนเปื้อนของฟีคัลไม่เป็นเช่นนี้ อย่างไรก็ตามถ้าการปนเปื้อนมาจากสิ่งแวดล้อมที่จะสามารถเข้าไปในระบบการผลิตอาหารได้ สิ่งเหล่านี้อาจเป็นเส้นทางให้เชื้อก่อโรคเข้าไปในระบบได้ดังนั้นมันจึงมีความสำคัญมากที่จะต้องหาแหล่งของการปนเปื้อนและแก้ปัญหาดังกล่าว

➢ Fecal coliform bacteria

เป็นสับกรุ๊ปของ total coliform แบคทีเรีย จุลินทรีย์เหล่านี้ปรากฏปริมาณมากในลำไส้และอุจจาระของคนและสัตว์ การปรากฏของฟีคัลโคลิฟอร์มในอาหารและเครื่องดื่มโดยปกติใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ fecal (Edberg et al., 2000) หมายถึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของ pathogen ที่จะปรากฏในตัวอย่างมากกว่าพบเฉพาะแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดที่ถูกตรวจพบ

➢ *E. coli*

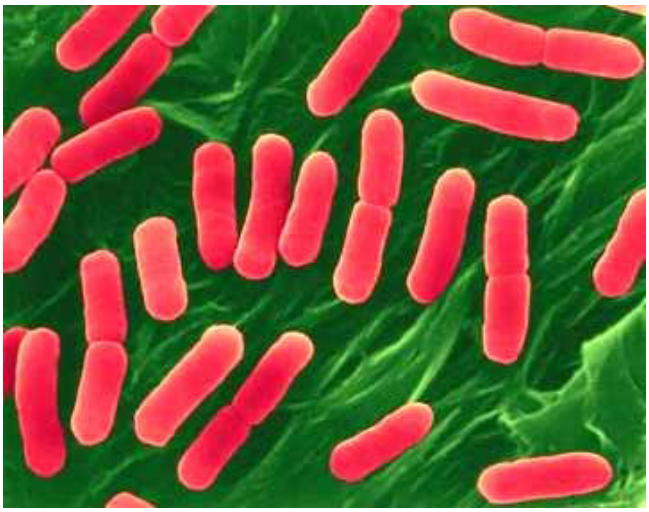
เป็นสับกรุ๊ปของฟีคัลโคลิฟอร์ม *E. coli* โดยส่วนใหญ่จะเป็นอันตรายและถูกพบในปริมาณมากในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นบางสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามสามารถเป็นสาเหตุให้เกิดการเจ็บป่วยได้ การปรากฏของ *E. coli* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยส่วนมากใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของฟีคัล การระบาดของ *E. coli* โดยส่วนใหญ่มาจากจากสายพันธุ์ที่จำเพาะของ *E. coli* ซึ่งเป็น *E. coli* O157:H7 เมื่อตัวอย่างอาหารหรือเครื่องดื่มถูกรายงานว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* มันไม่ได้หมายความว่าอันตรายจะเกิดขึ้นจาก strain ของ *E. coli* ในความเป็นจริง มันเป็นไปได้ที่จะไม่มีอยู่ของ O157:H7 อย่างไรก็ตาม ใช้บ่งชี้การปนเปื้อนของ fecal การรับประทานอาหารที่สุกหรืออาหารที่ผ่านการ treating จะสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* รวมถึง O157:H7 ได้

**2.1.2.2 แบคทีเรีย Coliform**

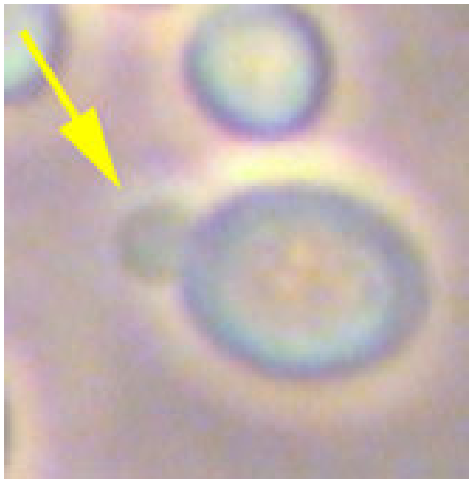
แบคทีเรีย Coliform หมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศ หรือ Facultative anaerobe สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้กรดและแก๊สได้ภายใน 48°C ที่อุณหภูมิ 35°C ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งโดยปกติมักพบอยู่ในทางเดินอาหารสัตว์เลือดอุ่น และของคน ฉะนั้นจะพบมากในอุจจาระ และ แบคทีเรียจีนัส Enterobacter ซึ่งนอกจากในอุจจาระแล้วยังสามารถพบได้ในดิน และปนเปื้อนมากับพืชผักต่างๆ หรืออยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่มีสุขลักษณะในการผลิต ดังนั้นการตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จึงถือได้ว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระ อาจนำมาซึ่งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ แต่โดยปกติคนสามารถต้านทานจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ดี ยกเว้นมีการกระตุ้นเชื้อปกติในทางเดินอาหารให้สามารถก่อโรคได้ เช่น พวกไวรัส ดังนั้น การผลิตอาหาร หรือ น้ำดื่ม จึงต้องมีการตรวจสอบจุลินทรีย์ว่ามีอยู่ในปริมาณเท่าใด มีอันตรายหรือไม่ และบางประเทศจะไม่รับซื้อสินค้าหากตรวจพบ

**2.1.2.3 แบคทีเรีย *Escherichia coli***

*Escherichia coli* หรือ *E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็ก และผู้ใหญ่มักมีภูมิต้านทานอยู่บ้างแล้ว เนื่องจาก ได้รับเชื้อนี้เข้าไปทีละน้อยอยู่เรื่อยๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือมือของผู้ประกอบอาหาร ปกติเชื้อเหล่านี้อาจพบในอุจจาระได้อยู่แล้วแม้จะไม่มีอาการอะไร



**รูปที่ 2.3** แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรืออีโคไล (นิยมใช้ชื่อย่อ *E. coli*) แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์



**รูปที่ 2.4** *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) (บริเวณลูกศรชี้)

อีโคไลที่ก่อโรคจะพบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อมและในสัตว์ แม้ว่าชื่อเดียวกันแต่เป็นคนละสายพันธุ์กัน คือ เป็นอีโคไลสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนได้ ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถก่อโรคได้หลายโรค รวมถึงโรคอุจจาระร่วง ปัจจุบันสายพันธุ์ที่ก่อโรคอุจจาระร่วงมีมากมาย แต่ที่จัดกลุ่มกันไว้จะเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ ที่มีลักษณะการดำเนินโรคและความรุนแรงที่แตกต่างกัน คือ

**- เอ็นเทอโรท็อกซิเจนิคอีโคไล หรือ อีเทค (Enterotoxigenic: ETEC)** ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่ถ่ายเหลวแบบเป็นน้ำ อาการมักไม่รุนแรงและส่วนใหญ่หายได้เอง พบก่อโรคได้บ่อยโดยเฉพาะพื้นที่เขตร้อนอย่างในบ้านเรา โดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อน

**- เอ็นเทอโรพาโธเจนิคอีโคไล หรือ อีเปค (Enteropathogenic *E. coli*: EPEC)** มักก่อโรคในเด็กเล็ก และพบได้บ่อยในประเทศกำลังพัฒนา ผู้ป่วยมักมีถ่ายเหลวเป็นมูก ถ่ายไม่มาก แต่มีอาการเรื้อรังได้นานเป็นเดือน ๆ ในเด็กที่เป็นนาน ๆ บางครั้งอาจเกิดภาวะขาดสารอาหารแทรกซ้อนได้

**- เอ็นเทอโรอินเวสีฟอีโคไล หรือ อีอิค (Enteroinvasive *E. coli*: EIEC)** เชื้อกลุ่มนี้จะก่อโรคได้รุนแรงขึ้น โดยเชื้อบุกรุกผนังลำไส้ทำให้เกิดแผล ผู้ป่วยมักปวดเกร็งท้องมาก และอาจถ่ายเป็นมูกปนเลือดออกมาได้ แต่พบก่อโรคได้ไม่บ่อย

**- เอ็นเทอโรแอ็กกรีเกทีฟอีโคไล หรือ อีเอค (Entero-aggregative *E.coli*: EAEC)** เชื้อกลุ่มนี้ก่อให้เกิดอาการที่หลากหลาย อาจถ่ายเป็นน้ำหรือเป็นมูก และอาจก่อให้เกิดท้องร่วงเรื้อรังได้ แต่ยังไม่ทราบกลไกก่อโรคที่แน่ชัดนัก

**- เอ็นเทอโรเฮโมราจิคอีโคไล หรือ อีเฮค (Enterohemorrhagic *E.coli*: EHEC)** เป็นเชื้อที่ก่อโรคได้รุนแรงมากที่สุด อาการของผู้ป่วยมีความหลากหลาย ตั้งแต่ท้องร่วงถ่ายเหลวเป็นน้ำธรรมดา บางรายอาจถ่ายเป็นมูกแต่อาจมีผู้ป่วยบางส่วนที่อาการรุนแรงมากได้ เนื่องจากเชื้อสามารถบุกรุกผนังลำไส้ ทำให้เกิดแผล รวมถึงเชื้อยังสามารถสร้างสารพิษ "ชิกา" (Shiga toxin) สารพิษนี้สามารถกระจายเข้าสู่กระแสเลือดได้ แม้ว่าตัวเชื้ออีโคไลจะไม่ได้เข้าไปในเลือดด้วย โดยเชื้อจะอยู่ในลำไส้และสร้างสารพิษเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งสารพิษจะไปออกฤทธิ์อยู่ที่ 2 ระบบใหญ่ ๆ คือ ในระบบเลือด โดยจะไปทำลายเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

เป็นผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะซีดเฉียบพลัน รวมถึงทำลายเกล็ดเลือด ทำให้เกล็ดเลือดลดต่ำลงอย่างมาก เป็นผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะเลือดออกง่าย ผู้ป่วยจึงอาจเกิดจ้ำเลือดตามผิวหนังและมีเลือดออกที่อวัยวะต่าง ๆ ภายในได้ อีกระบบหนึ่งคือสารพิษจะไปออกฤทธิ์ทำลายไต หน้าที่การทำงานของไตเสียไป จึงทำให้เกิดไตวายเฉียบพลัน ภาวะทั้งสามนี้ (ซีดจากเม็ดเลือดแดงแตก เลือดออกจากเกล็ดเลือดต่ำ และไตวาย) เรียกรวมกันว่ากลุ่มอาการ "ฮีโมไลติค ยูเรมิค ซินโดรม" หรือ"เอชยูเอส" (Hemolytic uremic syndrome : HUS) ซึ่งถือเป็นภาวะที่รุนแรงมาก ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็วมาก

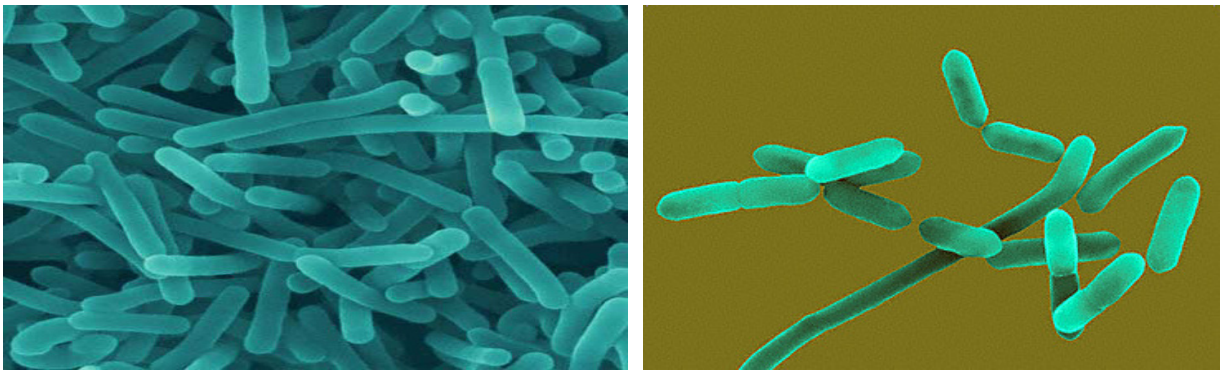
**2.1.3 จุลินทรีย์ก่อโรค *Listeria monocytogenes***

ในปี ค.ศ. 1891 พบการติดเชื้อแบบ Listeriosis type Infection ทำให้เกิดโรค Listeric-like disease ต่อมา ในปี ค.ศ. 1911 Hulphers นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ได้แยกเชื้อจาก Necrotic Foci ของตับกระต่าย เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง ประกอบกับอาการของโรคพบว่าเป็นแบคทีเรียและตั้งชื่อให้ว่า *Bacillus hepatic* (ต่อมาพบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *L. monocytogenes*) ในปี ค.ศ. 1915 และ 1919 Atkinson และ Dick ได้รายงานว่าแยกเชื้อ *L. monocytogenes* จากผู้ป่วยโรค Menigitis และต่อมาในปี ค.ศ. 1918 Dumont และ Contini แยกเชื้อ Diphtheroid จาก Cerebrospinal fluid และต่อมาได้มอบเชื้อให้กับ Pasteur Institute ในกรุงปารีส ซึ่งภายหลัง Paterson ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่าคือ *L. monocytogenes* ต่อมาในปี ค.ศ. 1924 Murray และคณะ แยกแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น ขนาดเล็ก จากโรคเลือดเป็นพิษของกระต่ายและหนูตะเพาที่ติดเชื้อ ได้ทำการตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacterium monocytogenes* (Murray et al., 1926) และปี ค.ศ. 1927 Pirie สามารถแยกเชื้อได้จากตับของตัว Gerbilles (African jumping mouse) จึงได้ชื่อว่า *Listerella hepatolytica* หลังจากที่ได้ทำการศึกษาพบว่า *Bacterium monocytogenes* และ *Listeria hepatolytica* เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันจึงตั้งชื่อใหม่ว่า *Listerella monocytogenes* และใช้ชื่อนี้มาเป็นระยะเวลา 12 ปี จนในปี ค.ศ. 1939 มีผู้ค้นพบว่า *Listerella* เป็นชื่อกลุ่มของ Slime molds ก่อนแล้ว ดังนั้นในปี ค.ศ. 1940 Pirie ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Listeria monocytogenes* และใช้ชื่อนี้จนถึงปัจจุบัน โดยเริ่มใช้อย่างเป็นทางการใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ($6^{th}$ ed., 1948) และมีการยอมรับจาก Judicial Commission on Bacteriological Nomenclature Taxonomy ในปี ค.ศ. 1954

**2.1.3.1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์และโคโลนี**

*L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีขนาดเล็ก โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.5 ไมครอน และยาวประมาณ 0.5-2.0 ไมครอน รูปแท่งสั้นหรืออาจมีรูปร่างกลม โดยมีปลาย

กลมมนดังรูปที่ 2.5 การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ รูปลูกบาศก์หรือเป็นสายสั้นๆ เรียงเป็นรูปตัว V หรือ ตัว Y หรืออาจพบเป็นกลุ่มก้อนโดยเซลล์เรียงแผ่ขนานกันอยู่ก็ได้ เซลล์ที่มีอายุน้อยอาจมีรูปร่าง Diplococci หรือ Cocci เซลล์ที่มีอายุมาก (มากกว่า 24 ชั่วโมง) อาจติดสีแกรม variable และอาจเห็นเซลล์เป็นเส้นยาว (Filamentous) ถ้าเลี้ยงเซลล์นานเกิน 3-5 วัน อาจพบเซลล์ยาวขนาด 6-20 ไมครอน (Seeliger และ Jones, 1986)



**รูปที่ 2.5** ลักษณะโคโลนี *Listeria monocytogenes*

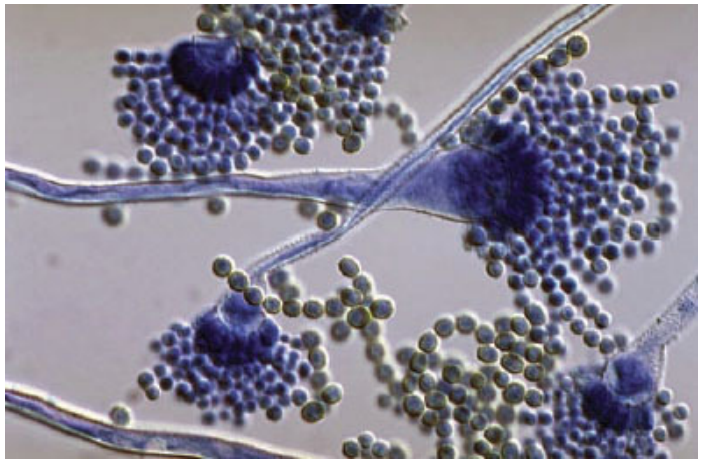
ที่มา: Bill Marler (2010) และ Dennis Kunkel Microscopy, 2004

*Listeria* spp. เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe หรือ Microaerophile เคลื่อนไหวได้โดยใช้ Peritrichous flagella ที่มีอยู่รอบเซลล์โบกพัดให้เซลล์กลิ้ง หรือเคลื่อนตัวกลับไปกลับมาได้ ที่อุณหภูมิ 20-25 °C ในอาหารเหลว เช่น Trypticase soy broth เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่โดย stab ลง Semisolid motility medium แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20-25 °C จะเห็นการเคลื่อนที่แบบร่ม (Umbrella-like) โดยเห็นเป็นรัศมีแผ่ออกรอบๆรอย stab คล้ายร่มกาง ซึ่งจะอยู่ต่ำกว่าผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แต่ที่อุณหภูมิ 37 °C การพัฒนา flagella ไม่ค่อยดี มีการเปลี่ยนจาก Peritrichous มาเป็น Single flagella หรือที่อุณหภูมิสูงไปจะทำลาย flagella ให้มีปริมาณน้อยลง ทำให้ไม่เห็นการเคลื่อนที่อย่างชัดเจน ลักษณะโคโลนีของเชื้อบน Nutrient agar เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีมีขนาดเล็กมาก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-1.5 มิลลิเมตร ลักษณะกลมใสคล้ายหยดน้ำ โคโลนีโค้งนูนเล็กน้อย มีขอบเรียบ เนื้อบนผิวโคโลนีละเอียดและไม่แห้ง มีสีฟ้าอมเทา โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้นถ้าเลี้ยงใน Trypticase soy agar ที่เติม 0.6% Yeast extract เมื่อส่องดูโคโลนีผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีของ Henry's illumination technique จะเห็นสีฟ้าอมเขียว มีผิวหน้าเรียบละเอียด Henry ได้ใช้วิธีนี้ช่วยแยกโคโลนีของ *Listeria* spp. ออกจากแบคทีเรียอื่นๆ โคโลนีของเชื้อที่มีอายุมากกว่า 3 วัน จะเหนียว ขอบไม่เรียบ และตรงกลางโคโลนีจะบุ๋มลงไป เมื่อเชื้อมีอายุ 5-10 วัน โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ 3-5 มิลลิเมตร ถ้าทำการถ่ายเชื้อหลายๆครั้ง ลักษณะโคโลนีอาจเปลี่ยนไป

เช่น ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าหยาบ และอาจสูญเสียคุณสมบัติที่ก่อให้เกิดโรคไปด้วย ใน 5% Sheep blood agar หลังจากเขี่ยเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-1.5 มิลลิเมตร และมีโซนใสแคบๆของ β-heamolysis ล้อมรอบโซนนี้อาจเกิดขึ้นน้อยมากจนต้องเขี่ยโคโลนีขึ้นก่อนจึงสังเกตเห็น ถ้ายิ่งบ่มไว้หลายวันเท่าใดก็ยิ่งเห็นโซนใสชัดขึ้นมากกว่าเท่านั้น ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เช่น Nutrient broth หรือ Tryptose broth จะเห็นอาหารขุ่นชัดเจนหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญในบริเวณที่ต่ำกว่าผิวหน้าของอาหารลงมาเล็กน้อย เป็นการแสดงให้เห็นว่า *Listeria* spp. เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำกว่าในสภาพบรรยากาศทั่วไป การเจริญจะดียิ่งขึ้นเมื่อเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในอาหารหรือนำเชื้อไปบ่มที่ Modified atmosphere อย่างไรก็ตามเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในสภาพไร้ก๊าซออกซิเจนอย่างสมบูรณ์

**2.1.4 ยีสต์ รา (Forsythe and Hayes, 1998)**

ยีสต์ คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มักจะปนลงไปในอาหาร เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้



**รูปที่ 2.6** ลักษณะสัณฐานของยีสต์

ยีสต์ (รูปที่ 2.6) เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณถึงกับมีผู้กล่าวว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ

6,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่น ในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาแจ่ว เครื่องดองของเมาหลายชนิด เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เป็นต้นว่า การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง การผลิตเซลล์ยีสต์ เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปังและเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

**รูปที่ 2.7** ลักษณะสัณฐานของรา

รา (รูปที่ 2.7) บางประเภทสามารถนำมาใช้ในการผลิตสุราได้แต่ราบางชนิดที่เพาะมาเป็นพิเศษ ก็เป็นราที่ผลิตมาเพื่อการค้าและมีลิขสิทธิ์เฉพาะ เช่น รา คาลสเบิร์กโนเจนซิส เป็นรา ลิขสิทธิ์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์คาลสเบริ์ก

การผลิตยีสต์ที่ได้คุณภาพจะต้องผ่านการรับรองจากสถาบัน Leco ถึงจะสามารถบรรจุวางขายในซูเปอร์มาร์เก็ตของยุโรป เช่น ร้าน Hermes และ Struers ได้ ยีสต์ มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ได้ โดยหลักการทำงานของยีสต์ หรือ "เบเกอร์ ยีสต์" (Baker yeast) ที่ใส่ให้ขนมปังฟูเนื่องมาจากยีสต์ที่ใส่ลงไปมีการใช้น้ำตาลในแป้งขนมปัง หรือที่เรียกกันว่า "โด" (dough) เป็นอาหาร และระหว่างที่มันกินอาหารมันก็จะหายใจเอาออกซิเจนเข้าไป และหายใจเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา และเมื่อเราเอาแป้งไปอบ ก๊าซที่มันคายออกมาก็ผุดขึ้นมาระหว่างเนื้อขนมปัง ทำให้เกิดรูพรุนจนฟูขึ้นมา

“รา” มีมากมายหลายสายพันธุ์แต่สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ราชนิดเซลล์เดียว (yeast) และ ราชนิดหลายเซลล์หรือราสาย (mold หรือ mould)

“รา” มีทั้งก่อให้เกิดโรค และไม่ก่อให้เกิดโรค การก่อโรคของ “รา” พบได้ทั้งในคน สัตว์ และพืช ดังนั้นการศึกษาเรื่องราวของราจึงเป็นเรื่องหนึ่งที่น่าสนใจ และมีการกระทำได้อย่างกว้างขวาง การก่อโรคของ “รา” ราเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ จึงต้องอาศัยอาหารจากผู้อื่น เช่น ราบางชนิดอาศัยสารอาหารจากซากสัตว์ บางชนิดอาศัยอินทรีย์สารจากซากพืช หรือบางชนิดเจริญเติบโตโดยอาศัยสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ เช่น ตามอวัยวะต่างๆของมนุษย์ ราที่ก่อโรคในมนุษย์มีทั้งสองแบบทั้งก่อให้เกิดโรคและเจริญได้โดยอาศัยอินทรีย์สารจากธรรมชาติ

เชื้อราแต่ละชนิดต้องการอาหารแตกต่างกันไป เช่น บางชนิดต้องการน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราชอบ ราบางชนิดต้องการธาตุไนโตรเจนจากกรดอะมิโนเคอราติน และจากการศึกษาพบว่าราส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามินในการเจริญเติบโต ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของราคือประมาณ 25-30°C แต่ราที่ก่อโรคในมนุษย์จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติของร่างกายมนุษย์

**2.2 เทคนิคการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์**

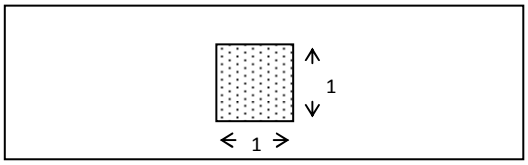
ในการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตทางอุตสาหกรรม การวิจัย การควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ การควบคุมคุณภาพน้ำและอาหาร สิ่งหนึ่งที่จะต้องศึกษาคือ การนับจำนวนจุลินทรีย์ การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ตั้งแต่จำนวนเซลล์เริ่มต้น จำนวนเซลล์ระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่เจริญได้ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี คือ

**2.2.1 การนับโดยตรง (direct count)** เป็นการนับจำนวนโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ มีหลายวิธี คือ

2.2.1.1 การนับเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตรึงและย้อมสี (stained film) วิธีนี้เป็นการนับเชื้อแบคทีเรีย โดยหยดตัวอย่างปริมาตร 0.01 ml ที่ถูกตรึงและย้อมสีอยู่บนสไลด์ภายในพื้นที่ 1 ตร.ซม. ข้อดีของวิธีดังกล่าวคือทำง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ไม่แพง แต่มีข้อเสียตรงที่เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total count) ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต นอกจากนี้ตัวอย่างที่จะตรวจนับต้องมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมาก

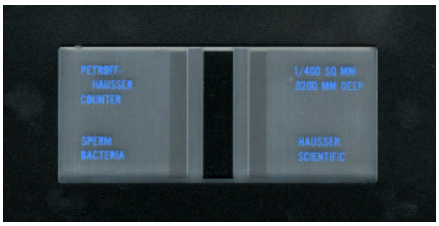
2.2.1.2 การนับเชื้อบนสไลด์ที่มี counting chamber สไลด์ที่มี counting chamber ได้แก่

- Petroff – Hausser counting chamber นิยมใช้นับจำนวนแบคทีเรีย
- Haemacytometerใช้นับ eucaryotic microbe ที่มีขนาดใหญ่



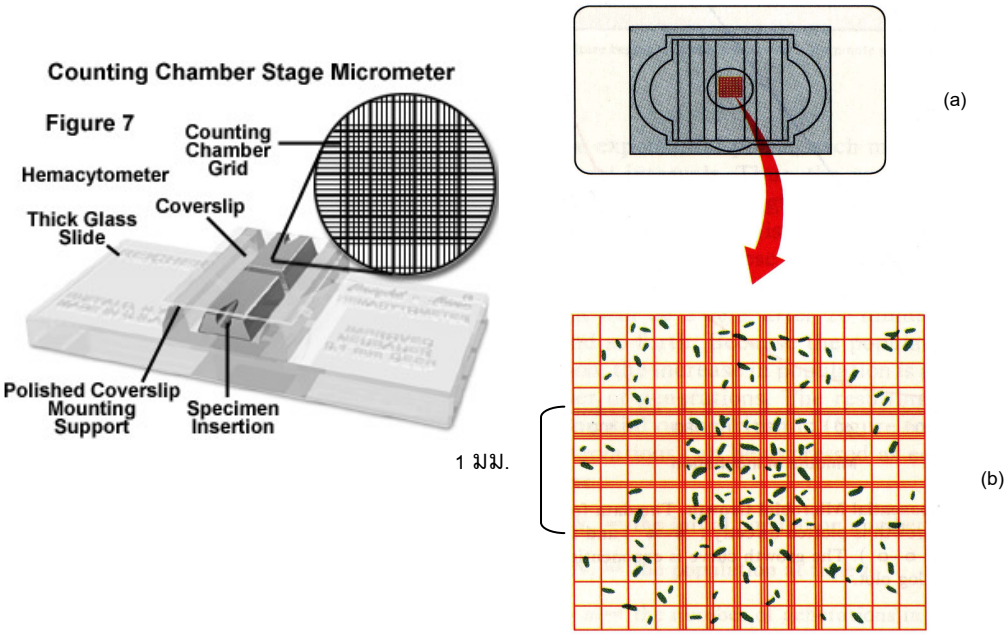

**รูปที่ 2.8** ลักษณะสไลด์ที่มี counting chamber

สไลด์พวกนี้จะมีแอ่ง (Chamber) ซึ่งรู้ความลึกของ chamber และที่พื้นของ chamber จะมีตารางสี่เหลี่ยมซึ่งทราบความกว้างความยาวของตารางสี่เหลี่ยม ดังนั้นเมื่อหยดเชื้อจุลินทรีย์ลงไปใน chamber ที่มี cover glass ปิดอยู่ ตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400X ในสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อ ml ของตัวอย่างได้ สำหรับข้อดีข้อเสียของ counting chamber จะเหมือนกับนับด้วยวิธี stained film




**รูปที่ 2.9** Petroff – Hausser counting chamber

- การนับเชื้อจุลินทรีย์ใช้กำลังขยาย Objective lens 40X
- ถ้าเป็นเชื้อแบคทีเรียให้นับช่องที่มีความยาวด้านละ 0.05 มม. และควรเจือจางให้มีแบคทีเรีย 1-10 เซลล์ในแต่ละช่องเล็ก และนับไม่ต่ำกว่า 10 ช่อง
- ถ้าเป็นยีสต์หรือจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ให้ใช้ช่องใหญ่ที่มีความยาวด้านละ 0.2 มม.
- การนับให้นับเฉพาะเซลล์ที่แตะหรือทับด้านบนหรือด้านขวาของสี่เหลี่ยมจตุรัส แต่จะไม่นับเซลล์ใดก็ตามที่แตะหรือทับด้านล่างและทางซ้ายมือของสี่เหลี่ยมจัตุรัส




**รูปที่ 2.10** Counting chamber stage micrometer

(a) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์

(b) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10X ประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 mm. ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบ โดยแต่ละด้านยาว 0.2 mm. ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง

**2.2.2 การนับจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร**

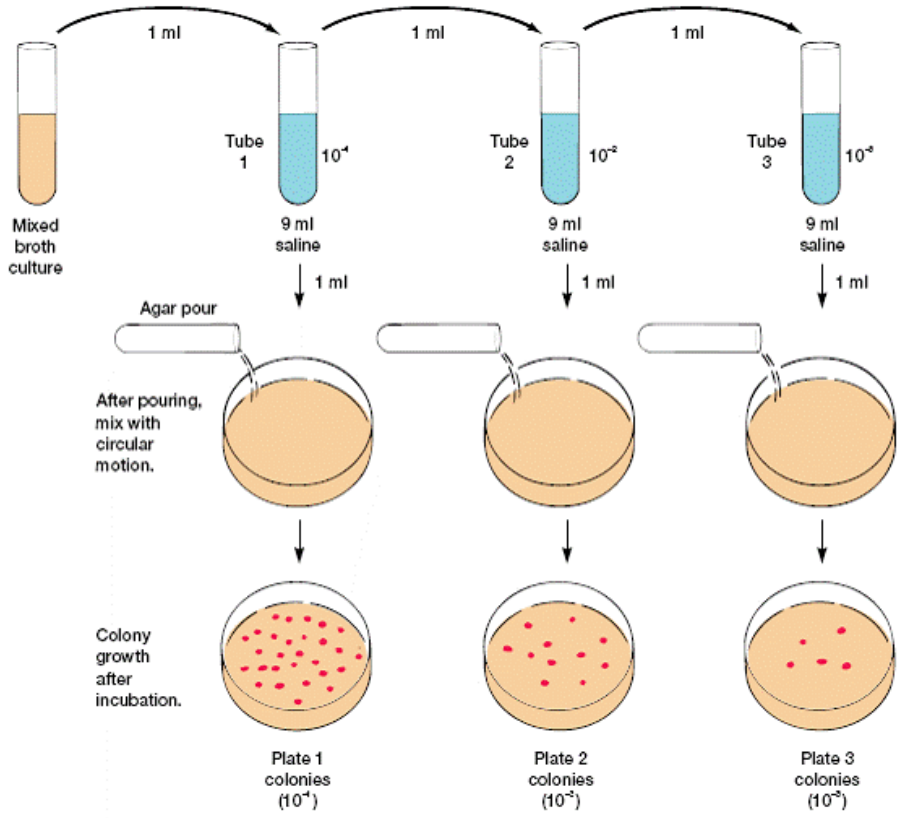
เป็นการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น (agar media) มาใช้ตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1800 ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี วิธีการดังกล่าวมีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่างคือ

(1) เซลล์จุลินทรีย์หนึ่งเซลล์เจริญและแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีเดี่ยว

(2) เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous)

(3) ไม่มีเซลล์ใดๆ ที่อยู่รวมกัน (no aggregate) วิธีนี้ทำง่าย นับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ (sensitive) และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งจากตัวอย่างอาหาร น้ำ และดิน ในการนับเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญ คือ ต้องมีจำนวนไม่มากหรือน้อยเกินไปโดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์เท่านั้นดังนั้นเพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว ควรทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นหลาย ๆ ครั้ง โดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า (serial dilution) (รูปที่ 2.11) แล้วทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้ว นับจำนวน ทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมล.ของตัวอย่าง

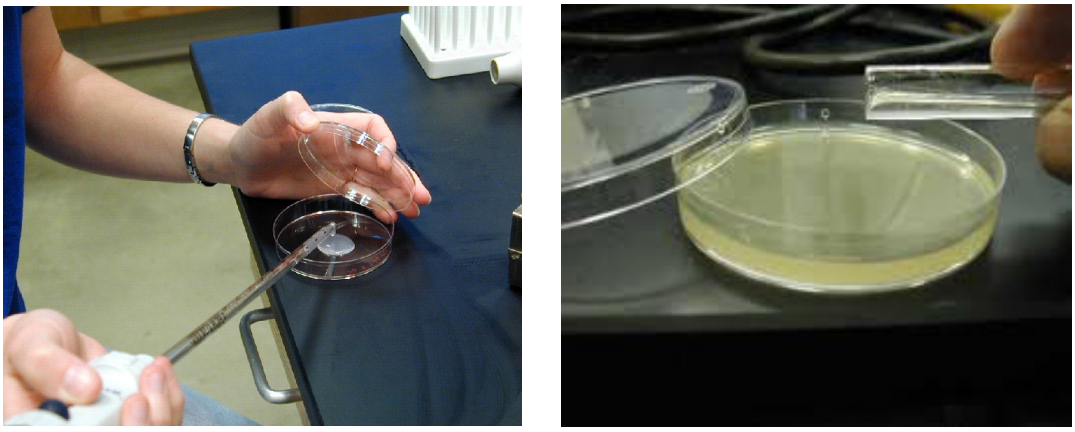
ได้ การรายงานผลมักรายงานเป็น colony forming unit (CFU) มากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน ชัดเจนว่า 1 โคโลนีมาจาก 1 เซลล์ การนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) ซึ่งมีหลายวิธี คือ




**รูปที่ 2.11** ขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยวิธี Pour plate

**2.2.2.1 Pour plate**

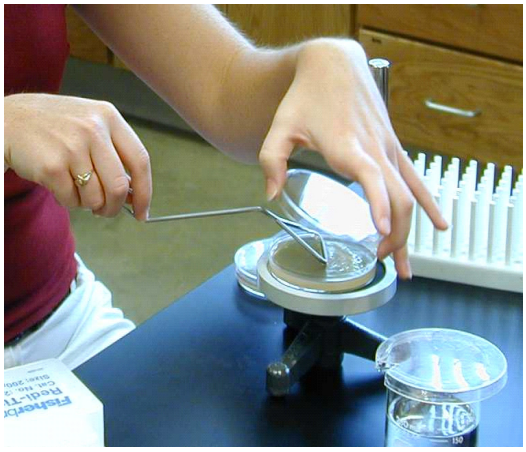
เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 ml หรือ 0.1 ml หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 – 46 °C ลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์กับให้เข้าอาหารโดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆ (รูปที่ 2.12) ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่ม ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อ ml หรือต่อกรัมตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้วุ้นที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้



**รูปที่ 2.12** วิธี pour plate

**2.2.2.2 Spread plate**

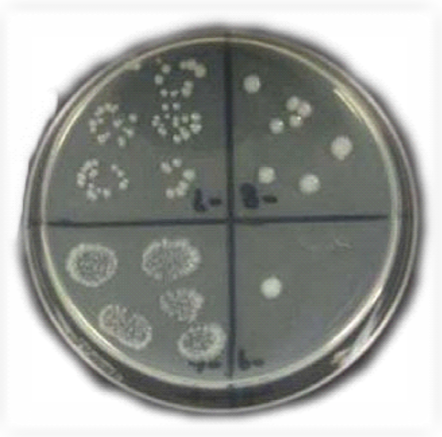
เป็นวิธีการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 ml หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) (รูปที่ 2.13) วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ในบางครั้งวิธี spread plate อาจนับปริมาณเซลล์ได้มากกว่าวิธี pour plate เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้เจอกับความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลวเหมือนวิธี pour plate ในกรณีที่ตัวอย่างมีเซลล์จุลินทรีย์อยู่น้อย การใช้วิธีนี้อาจขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างน้อยในการ plating



**รูปที่ 2.13** วิธีการ spread plate

**2.2.2.3 Drop plate**

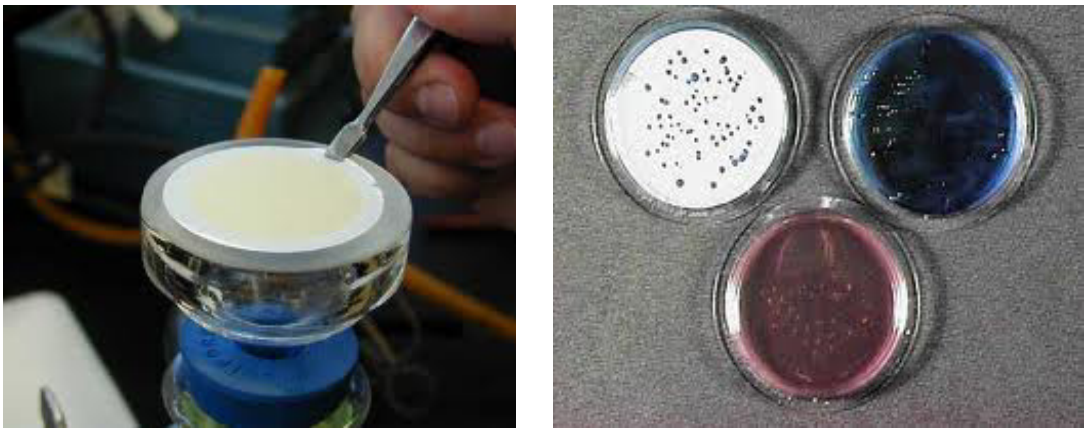
วิธีนี้มีหลักการเหมือนกันกับ spread plate โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนจานอาหารหนึ่งจานต่อ 5 จุด โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 0.02 ml ตัวอย่างจะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร (รูปที่ 2.14) ซึ่งโดยปกติจะมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1.5 ถึง 3 cm การนับและคำนวณจำนวนโคโลนีขึ้นอยู่กับจำนวนหยดต่อจานอาหาร จำนวนหยดต่อ ml และค่าการเจือจาง (dilution factor) โดยทั่วไปเมื่อบ่มจนเชื้อเจริญแล้ว ให้เลือกจานอาหารที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมคือ มีเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารแต่ละจุดไม่เกิน 10 โคโลนี เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง ก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อ ml หรือต่อกรัมตัวอย่าง



**รูปที่ 2.14** วิธีการ drop plate

**2.2.2.4 Membrane filtration method**

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยและจำเป็นต้องใช้ปริมาตรของตัวอย่างมากเพื่อความแม่นยำในการตรวจหาจุลินทรีย์แบบปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative analyses) ตัวอย่าง 100 ml หรือมากกว่าจะถูกกรองผ่าน membrane filter ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมครอน (แบคทีเรียไม่สามารถผ่านได้) ดังนั้นจุลินทรีย์จะถูกกักอยู่บนกระดาษกรอง จากนั้นนำกระดาษกรองวางในจานอาหารที่มีกระดาษซึ่งชุ่มด้วยอาหารเหลว (liquid nutrient medium) อยู่แล้ว โคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญบนกระดาษกรอง (รูปที่ 2.15) วิธีนี้มักใช้กับการตรวจวิเคราะห์ coliform bacteria ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) การปนเปื้อนจากอุจจาระในอาหาร หรือน้ำ



**รูปที่ 2.15** ขั้นตอนการทำและเชื้อจุลินทรีย์หลังการทำ membrane filtration

## 2.3 เครื่องนับโคโลนีที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

### 2.3.1 เครื่องอัตโนมัติในการนับจำนวนจุลินทรีย์ Tempo

โดยทั่วไปการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีขั้นตอนยุ่งยากเริ่มตั้งแต่การชั่ง การละลายน้ำ การฆ่าเชื้อ การเทลงจานเพาะเชื้อและการเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามด้วยการบ่มและนับจำนวนบนจานเพาะเชื้อ ขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้ใช้เวลา แรงงาน และความชำนาญ เทคโนโลยี Tempo ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว ด้วยการใช้อาหารสำเร็จรูปที่เพียงแต่ใส่น้ำกลั่นและเติมตัวอย่างอาหารที่ผ่านการตีป่นแล้วลงไป สารละลายดังกล่าวจะใส่ลงในการ์ดที่ประกอบด้วยหลอดทดลองขนาดเล็กจำนวน 48 หลอด ที่แทนระดับการเจือจางตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งใช้หลักการ MPN (Most Probable Number) ขณะที่บ่มเชื้อจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารและเกิดการเรืองแสงหรือการเรืองแสงลดลง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเชื้อที่ทดสอบและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจึงนำการ์ด Tempo เข้าเครื่องอ่าน Reader เพื่อรายงานผลเป็นค่า CFU/ml. ปัจจุบัน Tempo ได้มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ Total aerobic plate counts, Coliforms, *E. coli* และในอนาคตจะมีพารามิเตอร์สำหรับ Enterobacteriaceae , Yeast and mould count และ *Staphylococcus aureus*

**รูปที่ 2.16** เครื่อง Tempo

**รูปที่ 2.17** การ์ดของเครื่อง Tempo

### 2.3.2 เครื่องนับโคโลนี (Colony counting)

เครื่องนับโคโลนีใช้นับจำนวนจุลินทรีย์แบบอัตโนมัติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพงานและลดแรงงาน เป็นระบบการวิเคราะห์ภาพโดยรูปของจานเพาะเชื้อจะถูกบันทึกไว้ ผู้ใช้สามารถดูภาพ พิมพ์หรือส่งไปยังโปรแกรมอื่น ๆ ผู้ใช้สามารถที่จะตั้งค่าให้แสงมาจากด้านบนหรือด้านล่าง และจำกัดขนาดของโคโลนีเพื่อไม่ให้นับรวมอนุภาคอื่น ๆ เช่น เศษอาหาร

**รูปที่ 2.18** เครื่องนับโคโลนี (Colony counting)

### 2.3.3 Flow Cytometry

เป็นวิธีการวิเคราะห์เซลล์แต่ละเซลล์โดยอาศัยระบบ (Optic) จุลินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวจะผ่านลำแสงเลเซอร์และทำให้แสงกระจาย (Scattered) และแสงจะถูกดูดกลืน ลักษณะของการกระจายแสงจะเป็นลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์ การวิเคราะห์ทำได้โดยนับแสงที่กระจายโดยใช้เลนส์หลายชนิดและเซลล์

แสงอาทิตย์ ทำให้สามารถประมาณจำนวน ขนาดและรูปร่างของจุลินทรีย์ เทคนิคนี้มีความไวสูงมาก สามารถนับยีสต์ที่มีอยู่ 100 เซลล์ หรือเซลล์แบคทีเรียจำนวน 100 - 1,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทราบผลภายในเวลาเพียงไม่กี่นาที เพราะความไวที่สูงของวิธีการ Flow Cytometry วิธีการนี้จึงเหมาะสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยในของเหลวหรือน้ำล้างจากกระบวนการ (Marie และคณะ, 1999) ข้อจำกัดอย่างหนึ่งของเทคนิคนี้คือ เครื่องจะไม่สามารถแยกระหว่างเซลล์เป็นหรือเซลล์ตายหรือการรบกวนจากเมตริกของอาหาร (Griffiths, 1997)

**รูปที่ 2.19** เครื่อง Flow Cytometry

**2.3.4 Direct epifluorescent microscopy (DEFT)**

เป็นวิธีการโดยตรงที่ใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ที่จับกับสาร Fluorochrome acridine orange ด้วยวิธีการใส่สารลดแรงตึงผิว (Detergent) และเอนไซม์ย่อยโปรตีนลงไปในอาหารก่อน ตามด้วยการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน Polycarbonate และย้อมสีด้วย Acridine orange และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Fluorescence microscope) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตซึ่งมีสีส้มติดอยู่บนแผ่นเมมเบรน แต่ต้องดูภายในเวลา 10 นาที การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตในเนื้อบดโดยใช้เทคนิค DEFT นี้จะเท่ากันกับวิธีการดั้งเดิม Standard plate counts และเทคนิคนี้มีประโยชน์ในการตรวจวัดความสะอาด (Holah และคณะ, 1988)

**รูปที่ 2.20** เครื่อง Direct epifluorescent microscopy (DEFT)

### 2.3.5 Impedimetry

เป็นหลักการที่ดูการเปลี่ยนแปลงการนำไฟฟ้า (Conductance) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์เจริญและมีเมตาบอลิซึ่มเกิดขึ้น เวลาที่ตรวจพบ (Detection Time) คือเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นจนถึงค่า Threshold ซึ่งจะผกผันกันกับกล้าเชื้อที่เริ่มต้น (Initial inoculumn) คือถ้าเชื้อมีปริมาณมาก เวลาที่ตรวจพบก็จะสั้น ระบบนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้กว่าร้อยตัวอย่างในเวลาเดียวกันด้วย เครื่องที่ใช้งานแบบอัตโนมัติและควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์นี้ทำให้ตรวจวัดค่า Impedance อย่างต่อเนื่องในหลายตัวอย่างพร้อมกัน ผลที่ได้จะแสดงแบบเส้นโค้ง (Impedance Curve) ซึ่งจะนำไปเปรียบเทียบกับเส้นโค้งมาตรฐานที่ถูกสร้างไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อใช้ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ โดยทั่วไปการทดสอบตัวอย่างอาหารจะใช้เวลาไม่เกิน 24 h วิธีการนี้นิยมใช้ในการประมาณแบคทีเรียทั้งหมดและสำหรับการทดสอบเบื้องต้นที่ใช้กับจำนวนตัวอย่างมาก ๆ (van der Zee และ Huis in 't Veld, 1997) อย่างไรก็ตามเทคนิค Impedance ก็ไม่เหมาะสำหรับทดสอบตัวอย่างที่มีปริมาณจุลินทรีย์น้อย ๆ นอกจากนี้เมตริกของอาหารมีอิทธิพลต่อการทดสอบทำให้จำเป็นต้องทำเส้นโค้งมาตรฐาน สำหรับอาหารแต่ละชนิด ได้มีการนำเทคนิคนี้ไปพัฒนาเพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella, Listeria* และ *Campylobacter*

### 2.4 ชุดทดสอบ Rapid test kit ในปัจจุบัน (AOAC, 1998; สุมณฑา, 2545)

ปัจจุบันโรงงานที่เกี่ยวข้องกับสินค้าอุปโภค บริโภคตลอดจนอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้ทำการนำเข้าชุดทดสอบหลากหลายวิธีจากต่างประเทศ (รูปที่ 2.21) จุดด้อยของวิธีการเหล่านี้หนีไม่พ้นค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นกับผู้ประกอบการทำให้ต้นทุนการผลิตสูง สูญเสียความสามารถในการแข่งขัน ยิ่งไปกว่านั้นวิธีการเหล่านี้ก็ไม่เหมาะกับเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในสภาพภูมิอากาศเขตร้อนชื้น ทำให้การบ่มให้เชื้อ

เจริญเติบโตได้ช้า อีกทั้งวิธีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อส่วนใหญ่ใช้ตามนุษย์ อุปกรณ์ช่วยในการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงสำหรับแต่ละชุดวิเคราะห์มีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โรงงานส่วนใหญ่ไม่สามารถจัดหามาช่วยทำการวิเคราะห์ภายในโรงงานได้

**รูปที่ 2.21** ชุดวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์รวมและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารแบบต่างๆที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศและขายในราคาค่อนข้างสูงทำให้อุตสาหกรรมอาหารและยาของประเทศมีต้นทุนที่สูงในการวิเคราะห์การปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

**2.5 ระบบแมชชีนวิชัน (Machine vision)**

ปัจจุบันโปรแกรมคอมพิวเตอร์มีการพัฒนาไปมาก ซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกให้การปฏิบัติงานต่างๆ สามารถดำเนินไปได้อย่างคล่องตัว และรวดเร็วมากขึ้น รวมทั้งงานทางด้านการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ซึ่งสามารถนำเทคโนโลยีคอมพิวเตอร์เหล่านี้มาปรับใช้ได้อย่างสะดวกเช่นกัน

โดยในบทความนี้จะกล่าวถึงการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางด้านระบบแมชีนวิชัน มาวิเคราะห์ภาพถ่ายสำหรับใช้ในการศึกษาการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทำได้สะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำ

ในกระบวนการผลิตสินค้าทางอุตสาหกรรมเกษตรสิ่งหนึ่งที่จำเป็นต้องปฏิบัติทั้งในระหว่างและหลังจากกระบวนการผลิต คือ การตรวจสอบสินค้าว่ามีคุณภาพตรงตามที่กำหนดหรือไม่ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะใช้แรงงานคนในการตรวจสอบ เช่น การตรวจวัดขนาด รูปร่าง ตำหนิของวัตถุดิบ เนื่องจากความแตกต่างในด้านประสบการณ์การตัดสินใจของแต่ละคน ความเหนื่อยล้าในการทำงาน ทำให้การคัดคุณภาพนั้นไม่สม่ำเสมอและไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ จึงได้มีการพัฒนาระบบแมชีนวิชันที่มีความแม่นยำในการทำงานสูงกว่าโดยเลียนแบบการมองเห็นและการตัดสินใจของมนุษย์

แมชีนวิชันเป็นชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่ประกอบไปด้วยฮาร์ดแวร์ (Hardware) และซอฟแวร์ (Software) โดยซอฟท์แวร์จะทำหน้าที่แปลงสัญญาณต่างๆ ที่ได้จากฮาร์ดแวร์ให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมและทำการประมวลและรายงานผลลัพธ์ตามเงื่อนไขที่ผู้ใช้กำหนด (Jahne et al., 1999) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากการประมลผลนอกจากจะใช้ในการตรวจสอบคุณภาพแล้วยังสามารถนำไปใช้งานในด้านอื่นอีก เช่น ควบคุมการผลิต พัฒนาคุณภาพการผลิต หรือเพื่อตรวจสอบและยืนยันกระบวนการทำงาน (Davies, 2000)

**2.5.1 โปรแกรม ImageJ** (Chuenarrom, 2016)

ImageJ เป็นโปรแกรมที่ได้ถูกพัฒนาขึ้น Wayne Rasband และ The National Institute of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกา โปรแกรมนี้ถูกเขียนมาเพื่ออำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ข้อมูลจากรูปภาพ ตัวอย่างเช่น การนับจำนวนเซลล์ที่ได้จากภาพถ่าย การหาพื้นที่ของวัตถุ วิเคราะห์ขนาดของวัตถุบนภาพถ่าย เป็นต้น โดยทำการวัดขนาดของอนุภาคที่ปรากฏในรูปภาพ นอกจากนี้ ต่อยังได้มีการพัฒนามาวิเคราะห์ขนาดของเกรนและการกระจายตัวของภาคตัดขวางของวัสดุ เป็นการประยุกต์ใช้เพื่อหาคุณสมบัติของวัสดุอีกวิธีหนึ่ง เป็นโปรแกรมวิเคราะห์ภาพที่ให้มีการดาว์นโหลดได้ฟรีและยังมีการเปิด source code ให้มีการพัฒนาอีกด้วย ใช้กับเครื่องแมคอินทอชหรือพีซีธรรมดา (Personal Computer) ที่มีโปรแกรม

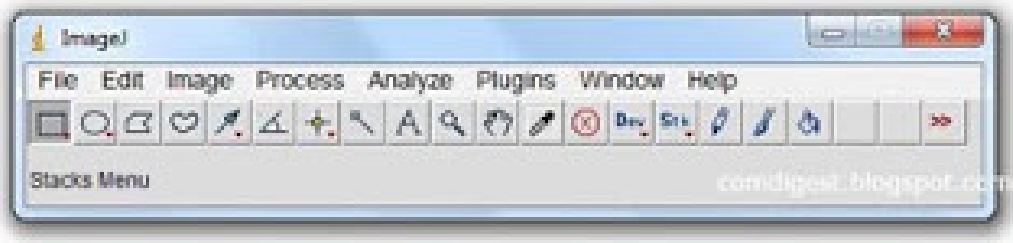
Java ตั้งแต่เวอร์ชั่น 1.4 ขึ้นไป Image J เป็นโปรแกรมที่มีประโยชน์อย่างมากในงานวิจัย ที่จำเป็นต้องวัดระยะหรือพื้นที่ของวัตถุบนภาพที่ถ่ายจากกล้อง microscope หรือ Scanning electron microscope (SEM)

ImageJ ทำงานโดยใช้คำสั่ง Analyze, Process และคำสั่งอื่นๆ บันทึกไฟล์ในรูปแบบ 8-bit,16-bit,32-bit และไฟล์ที่ตัวโปรแกรมอ่านได้ต้องบันทึกเป็นไฟล์ TIFF,GIF,JPEG,BMP,DICOM,FITS หรือ raw

ImageJ สามารถเปิดภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์พร้อมๆกันหลายภาพได้ในเวลาเดียวกัน สามารถคำนวณสัดส่วนพื้นที่ และพื้นที่ของวัตถุบนภาพได้ ในหน่วย pixel ของรูปนั้น หรือ หน่วยพื้นที่ตามมาตรฐาน เช่น ตารางมิลลิเมตร วัดระยะความยาวของวัตถุบนภาพ วัดความหนาแน่นของรูปภาพ แล้วแสดงในรูปแบบแผนภูมิแท่ง จัดทำค่าต่างๆในรูปสถิติได้

ImageJ สามารถกำหนด Scale, Rotate, Flips ภาพได้ ซูมภาพได้ และเปิดภาพพร้อมกันหลายภาพได้

ข้อดีของ ImageJ คือ การที่มันเป็นโปรแกรมแจกฟรี (freeware) และอนุญาติให้ผู้ใช้แก้ไขตัวโปรแกรมและหา Plugin อื่นๆ เพื่อมาช่วยแก้ไขปัญหาในการวิเคราะห์ภาพ โดยสามารถศึกษาได้ในเว็บไซต์ของ ImageJ ในหมวด Plugin ที่มีการพัฒนามาให้ดาวน์โหลดใช้ได้ และหากต้องการแก้ไข code เอง ก็สามารถทำได้โดยการโหลดโปรแกรม BBEdit ซึ่งเป็นตัว edit code หรือโปรแกรม ANT ซึ่งเป็น Build Tool อีกหนึ่งตัวช่วยในการแก้ไข




**รูปที่ 2.22** ลักษณะตัวโปรแกรม ImageJ ที่ใช้ในการประมวลผลในการประยุกต์ใช้งานแบบต่างๆ

ปัจจุบันได้มีการนำมาใช้มากขึ้นในการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ นักวิจัยที่สนใจเข้ามาศึกษาและพัฒนาโปรแกรมนี้ มีข้อดีโดยสังเขปดังนี้

- การนำภาพมาวิเคราะห์ สามารถเลือกภาพถ่ายที่มีขนาด 8 บิต, 16 บิต และ 32 บิต

- สกุลไฟล์ภาพที่นำมาวิเคราะห์ ได้แก่ TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS และ Raw
- สามารถคำนวณพื้นที่และปริมาณ Pixel ตามการเลือกพื้นที่ของผู้ใช้ กำหนดรูปแบบผ่านโหมด contrast manipulation, sharpening, smoothing, edge detection และ median filtering
- ดาว์นโหลด Plug in ตามลักษณะที่สนใจได้
- เปิดกว้างการพัฒนา source code สำหรับผู้สนใจและพัฒนาโปรแกรม

# บทที่ 3
# วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อเพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปราคาแพง โดยอุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์ที่ได้พัฒนามี 2 รูปแบบเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน โดยรูปแบบแรกเป็นเซ็ทอุปกรณ์กล้องกำลังขยายสูง (High magnification stereomicroscopy) เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพการบ่มผ่าน kinetic ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียภายใต้อาหารปริมาตรจำกัด ด้วยการใช้ 96-well microtiter plate แทนการใช้วิธีเลี้ยงเชื้อแบบปกติ (conventional method) แบคทีเรีย *Listeria* spp. ที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตจะเป็นตัวแทนของแบคทีเรีย Aerobic bateria, Psychrotrophic bacteria และ Thermoduric bacteria โดยปัจจัยที่ศึกษามีทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ ปริมาณวุ้นและปริมาณอาหารเสริม เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลงสำหรับเป็นพื้นฐานในการศึกษาประยุกต์ใช้กล้องกำลังขยายต่ำ (Low magnification stereomicroscopy) ในการตรวจนับโคโลนีผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมด้วยการวิเคราะห์ภาพถ่ายผ่านโปรแกรม ImageJ เพื่อการ analyze ผลออกมาเป็นจำนวนโคโลนี การตรวจนับโคโลนี *E. coli*/coliform จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการตรวจนับด้วยเทคโนโลยีภาพถ่ายดิจิตอล (image analysis) เนื่องจากเชื้อดังกล่าวจะเป็นดัชนีบ่งบอกสุขลักษณะการผลิตและการล้างมือที่ดีในโรงงาน นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้นำนวัตกรรมต้นทุนต่ำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ยีสต์ราด้วยเช่นกัน

## 3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

### 3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Listeria spp.*
- *Escherichia coli*

### 3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 0.0001 g (Metter Toledo Model AG204, Switzerland)
- เครื่องชั่ง 0.01 g (Metter Toledo Model GG4002 - S, Switzerland)
- ตู้ปลอดเชื้อ (DWYER Series 0325, USA)
- ตู้เขย่าเชื้อ (New Brunwick Scientific, Enfield, CT)
- ตู้เย็น 4°C (Hitachi 35S I, Japan)

- ตู้บ่ม (Memmert Model ULM500, Japan )
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Becthai and Hirayama Model HA300D, Japan)
- เครื่องเขย่า (NEW BRUNWICK SCIENTIFIC, USA)
- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Mechanical stepper (Biohit, Bohemia, NY, USA)

### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB, Lab M, UK)
- Trypticase soy agar (TSA, Lab M, UK)
- Plate count agar (PCA, Lab M, UK)
- Chromocult®coliform agar (Difco, USA)
- Sodium Chloride (NaCl), UNIVAR, New Zealand
- Yeast extract (USbiological, Salem, MA)
- Agar powder, Com grd., Thailand
- Dextrose ($C_6H_{12}O_6$), UNIVAR, New Zealand
- Tryptone, Lab M, United Kingdom

## 3.2 อุปกรณ์เพื่อการวิเคราะห์จุลินทรีย์ต้นทุนการผลิตต่ำ

การทดลองใช้ 2 เซ็ทอุปกรณ์เพื่อศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดยเซ็ทการทดลองแรกเป็นการใช้ High magnification stereomicroscopy (รูปที่ 3.2) เพื่อศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งจะเป็นการศึกษาจำเพาะเจาะจงที่โคโลนี ในขณะที่เซ็ทอุปกรณ์ของ Low magnification stereomicroscopy (รูปที่ 3.1) จะเป็นการศึกษาที่คลอบคลุม well ของ 96-well microtiter plate เพื่อบันทึกภาพภาพโคโลนีทั้งหมด

### 3.2.1 เซ็ทอุปกรณ์กล้อง Low magnification stereomicroscopy

**รูปที่ 3.1** Low magnification stereomicroscopy

### 3.2.2 เซ็ทอุปกรณ์กล้อง High magnification stereomicroscopy

**รูปที่ 3.2** High magnification stereomicroscopy

**3.3 การศึกษา kinetic การเจริญเติบโตของเชื้อที่สภาวะต่างๆ ด้วย** High magnification stereomicroscopy

การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ถูกศึกษาใน 96-well microtiter plate เพื่อการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้เริ่มต้นที่ประมาณ $10^3$ CFU/ml ปริมาณของเชื้อ 5 µl ของแต่ละความเข้มข้นถูก spread บน micro-well agar และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อการศึกษาผลของสารอาหาร ความเข้มข้นของ agar และปริมาณเชื้อเริ่มต้น สำหรับผลของอุณหภูมิ มีการศึกษาอุณหภูมิในการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

**3.3.1 การเตรียมเชื้อ *Listeria* เพื่อการศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโต**

สำหรับเชื้อ *Listeria* ที่ใช้เป็น strain ของ *L. ivanovii* โดยก่อนใช้งานทำการ recovery เชื้อจากเพลท Tryptic Soy Agar หรือ stock เชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 °C ในอาหารเหลว TSB (Trypticase Soy Broth) ทำการเขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้ปริมาณเชื้อที่ $10^8$ CFU/ml

**3.3.2 การติดตั้งระบบอุปกรณ์**

การทดลองนี้มี 2 ปัจจัยซึ่งมีผลต่อคุณภาพของภาพ; ค่า ISO และความเร็วของชัตเตอร์ สำหรับการตั้งค่า ISO ค่าถูกเลือกจากค่าที่มีอยู่แล้วของกล้องซึ่งเป็น 100, 200, 400, 800 และ 1,600 สำหรับความเร็วของชัตเตอร์ที่ตั้ง ค่าถูกเลือกจาก 10 ถึง 100 ซึ่งให้ค่าความสว่างสูงสุดและค่าความสว่างน้อยสุดแก่รูปภาพ และแหล่งของแสงถูกสังเกตที่สเปคตรัมที่แตกต่างกันจาก 450 ถึง 750 nm wavelength ซึ่งแปรเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นแดง

**3.3.3 ขนาดของ inoculums ที่เหมาะสม**

โดยขนาดของ inoculums ที่ศึกษาอยู่ในช่วง 5, 7, 10 และ 12 µl เพื่อหาขนาดที่เหมาะสมสำหรับประยุกต์ใช้กับการเพาะเชื้อระดับเล็กที่มีการใช้ 96-well microtiter plate

**3.3.4 ผลของสารอาหารที่มีต่อการเจริญของ *Listeria***

การเจริญเติบโตในอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ถูกใช้ในการศึกษานี้ การศึกษาผลของสารอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทริปโตนและเด็กซ์โตรสถูกเติมลงใน agar เพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจนและ

คาร์บอนของแบคทีเรีย ตามลำดับ สำหรับคาร์บอนและไนโตรเจนถูกเติมที่ความเข้มข้นของ 1X, 1.5X, 2X, 2.5X และ 3X ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง

**3.3.5 ผลของความเข้มข้นของ agar ที่ต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria***

ผง agar ถูกใช้ในการศึกษานี้ ผง agar ถูกเติมลงในอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5X, 1X, 1.5X, 1X และ 2.5X

**3.3.6 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria***

การศึกษา kinetic การเจริญเติบโตของเชื้อเป็นการศึกษาที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ กันที่ 30°C, 33.5°C, 37°C, 40.5°C และ 44°C และทำการบ่มเป็นเวลา 5 ถึง 20 ชั่วโมง

## 3.4 การศึกษาความสามารถของอุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับตรวจนับโคโลนีร่วมกับการวิเคราะห์ภาพดิจิตอลด้วย ImageJ

### 3.4.1 การทวนสอบวิธีการนับ *E. coli* โดยการใช้เทคนิค 96-well microplate (MIC) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการนับในปัจจุบัน

เทคนิควิธี MIC ถูกใช้เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานเช่น pour plate และ spread plate สำหรับการนับปริมาณเชื้อ *E. coli* โดย *E. coli* ที่ใช้ (DMST 4609) ถูกเตรียมใน Trypticase Soy Broth (TSB, Difco, NJ, USA) จากนั้นเขย่าเชื้อจนได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายที่ $10^8$ CFU/ml ทำการ dilution เชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่เริ่มต้นประมาณในช่วง $10^2$ ถึง $10^7$ CFU/ml ในแต่ละ standard ถูกทำการนับโดยการใช้อาหาร CCA โดยในแต่ละเทคนิคแสดงรายละเอียดดังต่อไปนี้

- เทคนิค Pour plate

ทำการบรรจุเซลล์ culture ที่เตรียมปริมาณ 1 ml ลงใน petri dish แก้ว จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CCA ที่อุณหภูมิประมาณ 45 – 50°C ลงใน petri dish แก้วประมาณ 15 – 20 ml ขยับ petri dish ให้เซลล์ culture กับอาหารเลี้ยงเชื้อ CCA ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปล่อยให้วุ้นอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนี *E. coli* จะขึ้นเป็นลักษณะสีม่วง ส่วนโคโลนี coliforms จะขึ้นเป็นลักษณะสีแดง

- เทคนิค Spread plate

เทอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CCA ที่อุณหภูมิประมาณ 45 – 50°C ลงใน petri dish แก้ว จากนั้นปล่อยให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง บรรจุเซลล์ culture ที่เตรียมปริมาณ 0.1 ml ลงบนวุ้นแข็ง เกลี่ยเซลล์ culture ให้กระจายด้วยลูกแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- เทคนิค MIC

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CCA ปริมาณ 0.5 ml ถูกบรรจุลงใน 96-well U-bottomed polypropylene plate ด้วย mechanical stepper จากนั้นปล่อยให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ทำการ drop ตัวอย่างเซลล์ culture ปริมาณ 0.01 ml ลงบนผิวอาหารดังกล่าว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.4.2 การประยุกต์ใช้โปรแกรม Image J ในการนับปริมาณเชื้อ

#### 3.4.2.1 ระบบการวิเคราะห์ภาพ (photomicroscope image analysis)

ระบบดังกล่าวถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อการวัดจำนวนของโคโลนีแบคทีเรียบน agar ใน microwell (Liamkaew and Thipayarat, 2009) ระบบนี้ประกอบไปด้วยกล้อง stereo microscope (XDC-10A with coaxial illumination), กล้องดิจิตอล (Olympus model E-620) เพื่อให้ได้ภาพโคโลนี และการทำให้ส่องสว่างโดยกล้องดิจิตอลจะถูกติดตั้งกับ microscope โดยการใช้ a magnification lens adapter (ScopeTronix MaxView™ Plus System) ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และ 3.2

#### 3.4.2.2 การสอบเทียบความถูกต้องในการนับโคโลนีด้วยการวิเคราะห์ภาพ (digital image analysis) เปรียบเทียบกับการตรวจนับด้วยสายตา (visual analyses)

การศึกษาประยุกต์ใช้ photomicroscopy ร่วมกับการใช้ Image J ในการประมวลผลเพื่อการนับโคโลนีได้ดำเนินการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ที่ได้ทำการ varied ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาณเชื้อ 10 μL จากของแต่ละความเข้มข้นของ *E. coli* ถูก inoculation ลงบน microwell ที่มีอาหาร CCA โดยการใช้ปิเปตแบบ multi – channel เมื่อนั้นตัวอย่างจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกล้องกำลังขยายต่ำ (low magnification power stereo microscope) ถูกใช้ในการสังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร โคโลนีที่โตด้วยการใช้ 96-microwell plate จะถูกจับภาพในรูปแบบ analog เพื่อการ

วิเคราะห์ภาพดิจิตอลสำหรับการประมวลผลจำนวนโคโลนีผ่านโปรแกรม image J 1.47 (Wayne Rasband, USA)

เมื่อผู้ใช้เปิดไฟล์รูปภาพและเปิดรูปออกมา โปรแกรมจะมีการ run เป็นแบบอัตโนมัติ รูปโคโลนีถูก uploaded ด้วยคอมพิวเตอร์ Intel i7 CPU running at a 2.67 GHz clock speed เมื่อนั้นทำการเซ็ทค่าที่เหมาะสมเพื่อที่จะดำเนินการวิเคราะห์รูปภาพ การนับโคโลนีของแบคทีเรียสามารถดำเนินการได้ภายใน 20 วินาที ผลการนับโคโลนีถูกแสดงบนหน้าจอและรูปแบบการนับโคโลนีที่มีการเน้นย้ำโดยการใช้ Image J ที่จะแสดงภาพเป็นสีแดงเป็นวงรอบโคโลนีเป้าหมาย ผลปริมาณโคโลนีที่นับได้จาก image processing ถูกนำไปเปรียบเทียบกับการนับด้วยสายตาในเทอมของ log CFU/ml

**3.4.2.3 ความแม่นยำและความไวของเทคนิค MIC/ImageJ**

เพื่อที่จะประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคการนับโคโลนีที่นำเสนอ การนับโคโลนีบน agar ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก 96-well microplate ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่ายผ่านโปรแกรม ImageJ เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่นับได้กับการนับด้วยสายตา ภาพโคโลนีจำนวน 40 รูปที่ได้จากการบ่มด้วย 96-well microplate ถูกใช้และนับโดยกระบวนการวิธีที่นำเสนอ ตัวแปรที่ศึกษาเป็นความแม่นยำถูกต้องและความไว ถูกประยุกต์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการนับโคโลนีโดยการใช้สมการ Eqs. (1) และ (2) ตามลำดับ (Chiang et al., 2015).

$$\text{Precision} = \frac{T}{T+FP} \qquad (1)$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{T}{T+FN} \qquad (2)$$

โดยสัญลักษณ์ T (true positive) แสดงจำนวนของแบคทีเรียจริง; FP (false positive) เป็นจำนวนที่ไม่มีปรากฏของแบคทีเรียจริงแต่มีโคโลนีจริง; FN (false negative) เป็นจำนวนของโคโลนีที่ปรากฏแต่ไม่มีโคโลนีจริง การวัดซึ่ง combined ความถูกต้องแม่นยำกับความไว ที่เรียกว่า F – measure (Stehman, 1997), ซึ่งถูกจำกัดความเป็น

$$\text{F} - \text{measure} = 2.\frac{\text{Precision}}{\text{Precision+sensitivity}} \qquad (3)$$

**3.4.2.4 การประยุกต์เทคนิคที่นำเสนอเพื่อการนับปริมาณโคโลนีในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร**

ผลิตภัณฑ์อาหารและตัวอย่างที่ swab จากสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการผลิตในโรงงานถูกเก็บตัวอย่างเพื่อประเมินค่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและ coliforms โดยการใช้เทคนิคการนับในแต่ละวิธีซึ่งได้มีอธิบายรายละเอียดขั้นตอนก่อนหน้านี้ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดสอบจะถูกชั่งน้ำหนักที่ 25 กรัม แล้วใส่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 225 มิลลิลิตร นำไปใส่ในเครื่องปั่นอาหารที่ปราศจากเชื้อ ปั่นให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันจะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 ถ้าอาหารเป็นของเหลวแต่ไม่ใช่เป็นเนื้อเดียวกันต้องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนเช่นกัน จากนั้นตัวอย่างอาหารปริมาณ 10 μL จะถูก spotted ลงบนอาหาร PCA และ CCA ใน 96-well microplate สำหรับการนับจำนวนโคโลนีเป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมงที่ทำการบ่ม หลังจากบ่มเสร็จแล้ว โคโลนีที่โตอยู่บน agar microwell จะถูกบันทึกภาพด้วยเซ็ทอุปกรณ์รูปที่ 3.1 เพื่อนำไปวิเคราะห์จำนวนโคโลนี

**3.4.2.5 สถิติเพื่อการวิเคราะห์**

จำนวนแบคทีเรียที่นับได้จะถูกเปลี่ยนเป็น log CFU/ml ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ โดยการใช้ ANOVA ทำการทดสอบ t-test เพื่อการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแบบคู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้ง 2 set เพื่อให้เห็นผลสอดคล้องกัน

# บทที่ 4

# ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อเพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปราคาแพง โดยแนวคิดการดำเนินงานวิจัยเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับเล็กเพื่อลดขนาดการวิเคราะห์โดยที่ยังให้ผลสอดคล้องกับวิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน ในเชิงเศรษฐศาสตร์ทำให้สามารถประหยัดต้นทุนการวิเคราะห์ สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนมากลดความผิดพลาดที่เกิดจากการจำกัดตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ชุดอุปกรณ์ดังกล่าวทำงานร่วมกับอุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นซึ่งมี 2 รูปแบบ โดยเป็นกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นกำลังขยายสูง (high magnification microscopy) สำหรับการศึกษาจลน์ศาสตร์การเจริญเติบโตของเชื้อที่มีผลต่อประสิทธิภาพการบ่มที่ปริมาณสารอาหาร ปริมาณ agar ที่ใช้และอุณหภูมิในการบ่มต่างกัน สำหรับในการตรวจนับโคโลนีมีการพัฒนานวัตกรรมการตรวจนับแบบอัตโนมัติด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นกำลังขยายต่ำ (high magnification microscopy) เพื่อการ capture ภาพโคโลนีไปประมวลผลด้วยโปรแกรม ImageJ สำหรับการคำนวณนับออกมาเป็นตัวเลขที่แสดงถึงจำนวนโคโลนีที่นับได้ ผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยมีการสังเกตและถูกวิเคราะห์โดยรูปภาพ โดยรายละเอียดผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

## 4.1 ขั้นตอนการ optimization ของการใช้กล้องกำลังขยายสูง

สำหรับการใช้เลนส์กำลังขยายสูงของกล้อง high magnification stereo microscopy ขนาดของรูปภาพคลอบคลุมพื้นที่ 1/3 ของ well ใน 96 micro-wells เพราะว่ากล้องมีกำลังขยายที่มีประสิทธิภาพในการเข้าถึงโคโลนีที่ต้องการสังเกตโดยที่ยังไม่จำเป็นต้องเกิดเป็นโคโลนีที่ผิวของ agar ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมที่จะวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้ออย่างรวดเร็วหรือศึกษา kinetic ของการโตของเชื้อ สำหรับการใช้ set ของอุปกรณ์ มี 2 พารามิเตอร์หลักที่ต้องศึกษา เพื่อที่จะให้ได้ภาพที่ชัดเจน อย่างแรกเป็น ISO ซึ่งเป็นการวัดของความไวในการถ่ายภาพที่มีต่อแสง และความเร็วของชัตเตอร์ซึ่งเป็นเทอมที่ใช้ในการอภิปรายผลของเวลา

### 4.1.1 ผลของการ ISO

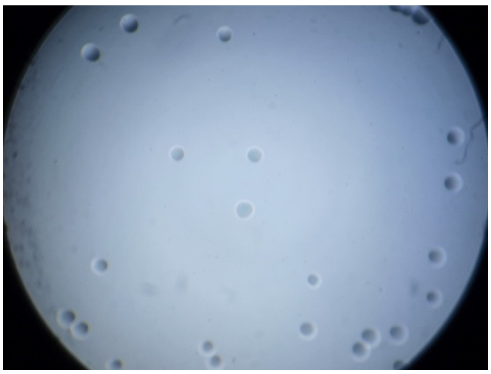
ผลของการเปลี่ยนค่า ISO ในช่วง 100 – 1600 ถูกแสดงในรูปที่ 4.1 หลังจากทำการบ่มบนอาหาร TSA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของค่า ISO ส่งผลให้เพิ่มความสว่างของภาพ และสำหรับความชัดเจนที่เหมาะสม การเซ็ตค่า ISO ถูกเลือกเป็นที่ 200

**4.1.2 ผลของความเร็วของชัตเตอร์**

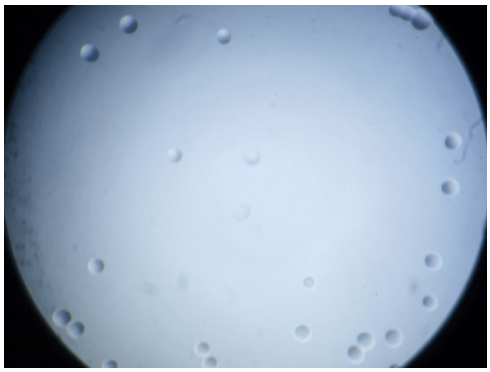
การทดลองนี้ถูกแปรเปลี่ยนความเร็วของชัตเตอร์จาก 10 เป็น 100 ผลการทดลองถูกแสดงในรูปที่ 4.2 การเพิ่มขึ้นของชัตเตอร์ ส่งผลต่อการลดความสว่างของภาพและความเร็วของชัตเตอร์ที่เหมาะสมถูกเลือกเป็น 40

**4.1.3 ผลของแหล่งของแสง**

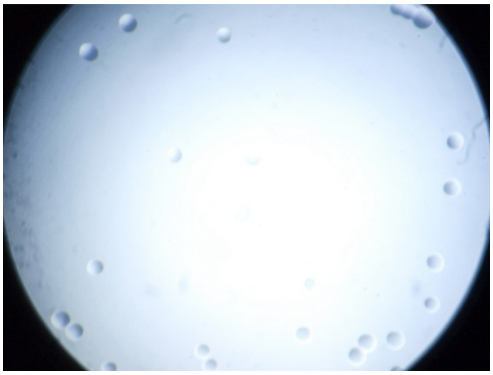
ผลการทดลองถูกแสดงให้เห็นในรูปที่ 4.3 ผลการทดลองเหล่านี้ถูกแปรเปลี่ยนแหล่งของแสงที่ spectrum จาก 450 ถึง 750 nm ซึ่งสีจะแปรเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีแดง เราพบว่าอาหาร TSA ชอบแหล่งของแสงที่สว่างมากกว่าเป็นสีขาวซึ่งให้ช่วง spectrum ที่กว้างที่สุด



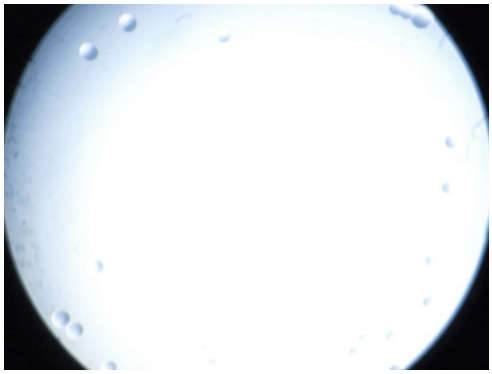
(a) ISO = 100



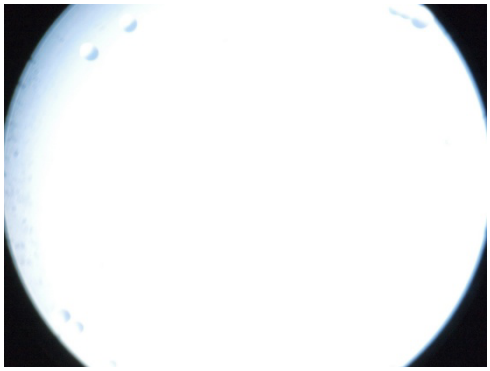
(b) ISO = 200



(c) ISO = 400

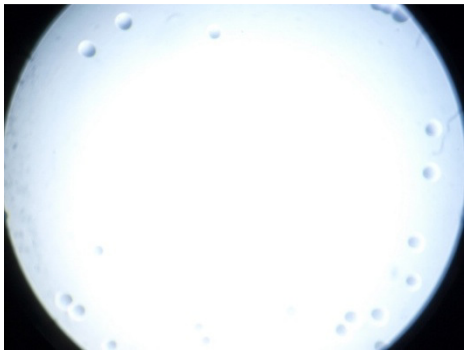


(d) ISO = 800

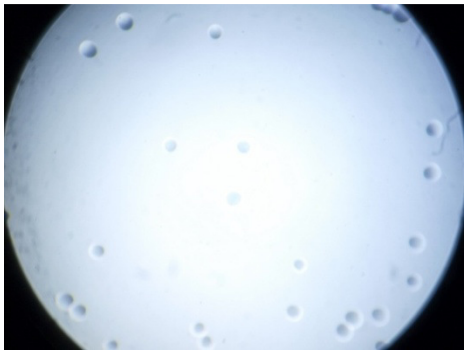


(e) ISO = 1600

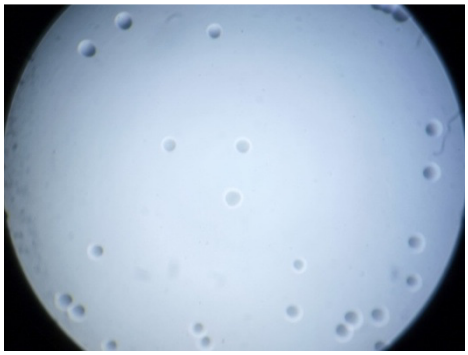
**รูปที่ 4.1** ผลของค่า ISO ต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ซึ่งถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้ high magnification stereomicroscopy



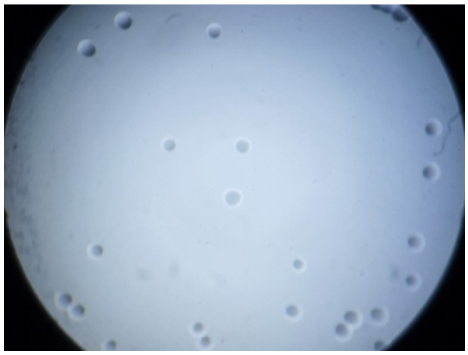
(a) f = 10



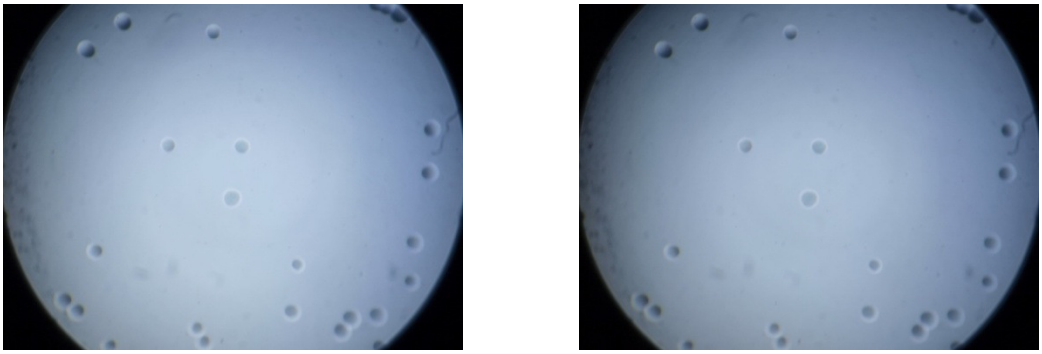
(b) f = 20



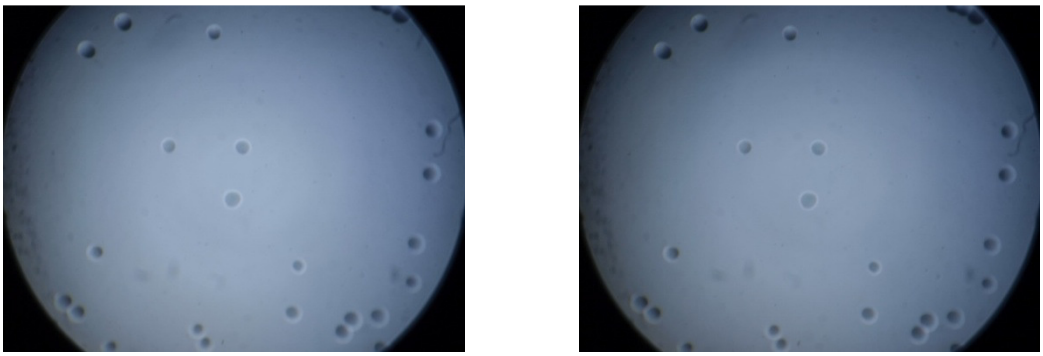
(c) f = 30



(d) f = 40

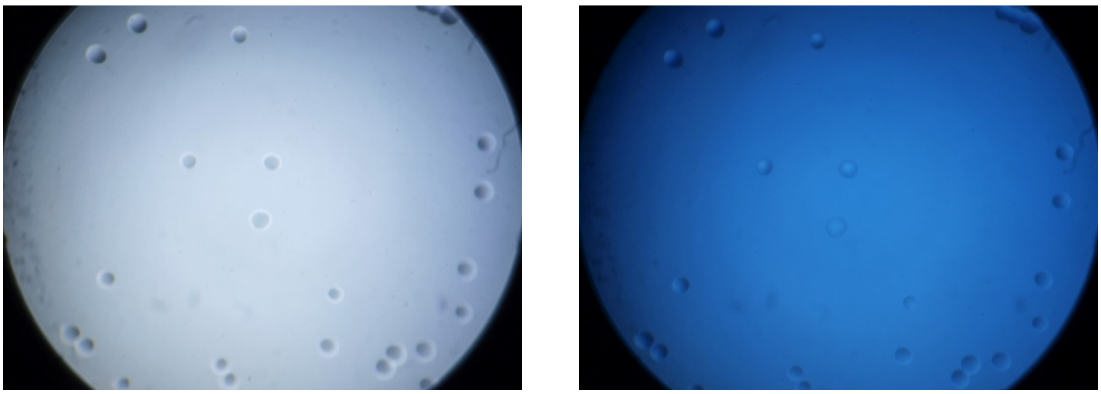


(e) f = 50 (f) f = 60

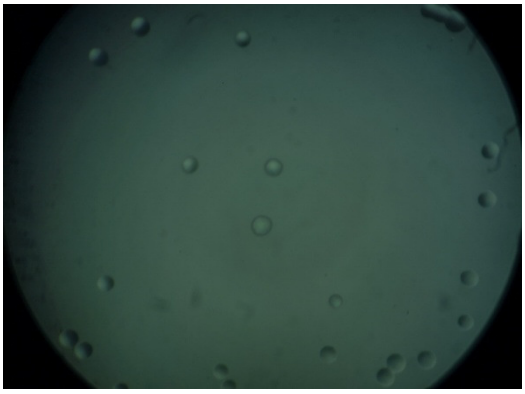


(g) f = 80 (h) f = 100

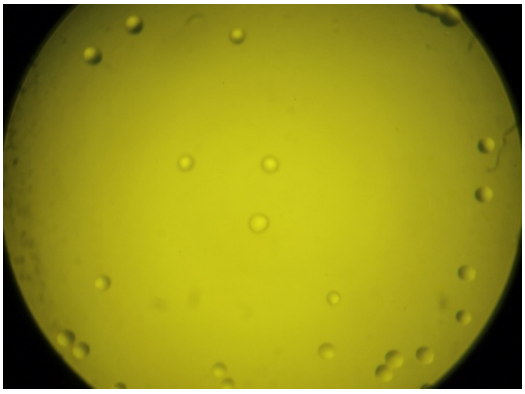
**รูปที่ 4.2** ผลของความเร็วของชัตเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงโดยการใช้ high magnification stereomicroscopy



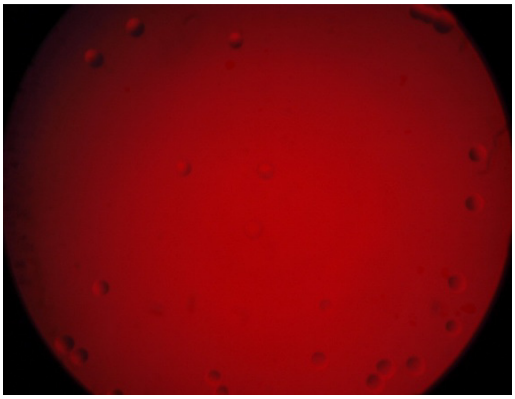
(a) Broad spectrum (b) Wave length 450–495 nm (blue)



(c) Wave length 495–570 nm (green)



(d) Wave length 570–590 nm (yellow)

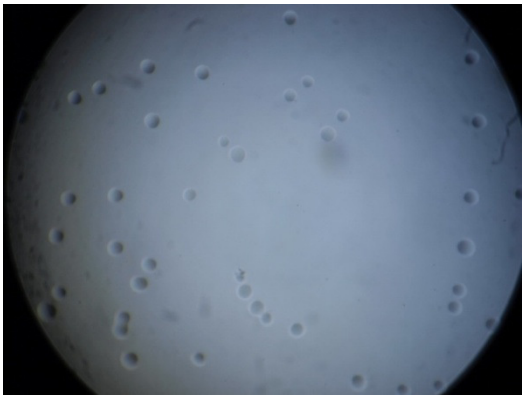


(e) Wave length 620–750 nm (red)

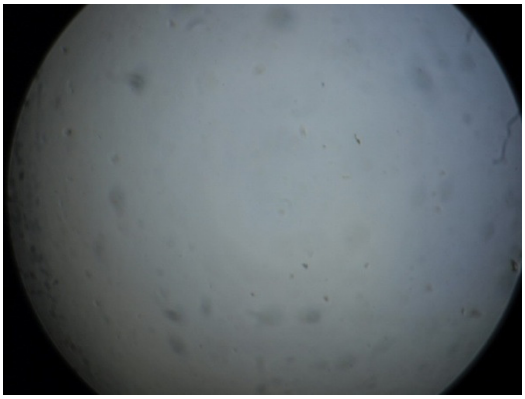
**รูปที่ 4.3** ผลของแหล่งของแสงต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้ high magnification stereomicroscopy

#### 4.1.4 ผลของปริมาตรของ inoculums

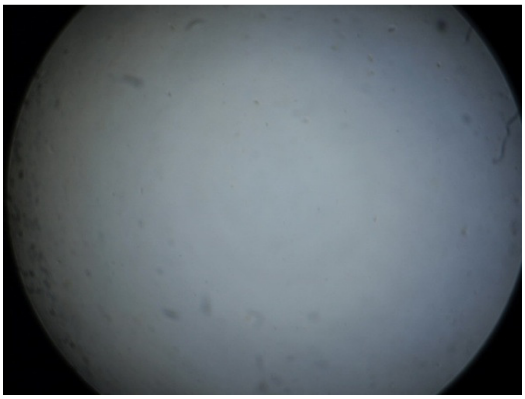
สำหรับการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้แบ่งปริมาตรออกเป็น 4 ปริมาตร จาก 5 ถึง 12 µl และพบว่าการฟอร์มตัวของโคโลนีสามารถถูกสังเกตได้บนผิว agar หลังจากการบ่ม 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C แต่ที่การทดลองปริมาตร 7, 10 และ 12 µl ไม่มีโคโลนีฟอร์มตัวปรากฏบนผิว agar ซึ่งเป็นไปได้ใน 5 µl ตัวอย่างของเหลวมีการระเหยอย่างสมบูรณ์ และ *Listeria* spp. เซลล์ที่แยกเดี่ยวบนผิวของอาหารแสดงโคโลนีที่แยกจากกันชัดเจนบนผิว agar สำหรับการทดลองอื่น เซลล์ยังคงแขวนลอยอยู่เพราะของเหลวมีปริมาตรมากเกินไปใน well เป็นผลให้ไม่มีการฟอร์มตัวของโคโลนีบนผิว agar



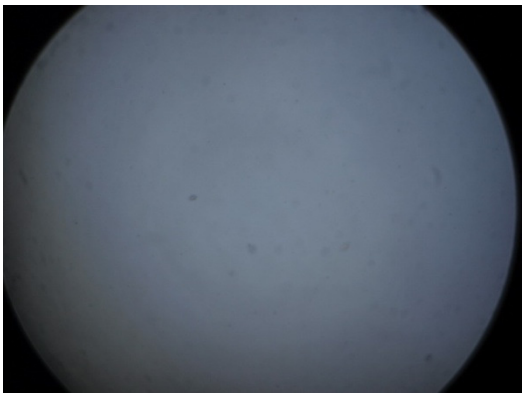
(a) Inoculum volume = 5 µl



(b) Inoculum volume = 7 µl



(c) Inoculum volume = 10 µl



(d) Inoculum volume = 12 µl

**รูปที่ 4.4** ผลของปริมาตรของ inoculum ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูก inoculated ที่ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้ high magnification stereomicroscopy

### 4.2 Kinetic การเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

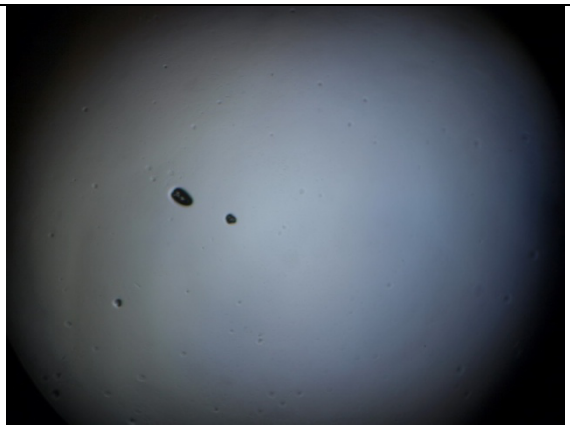
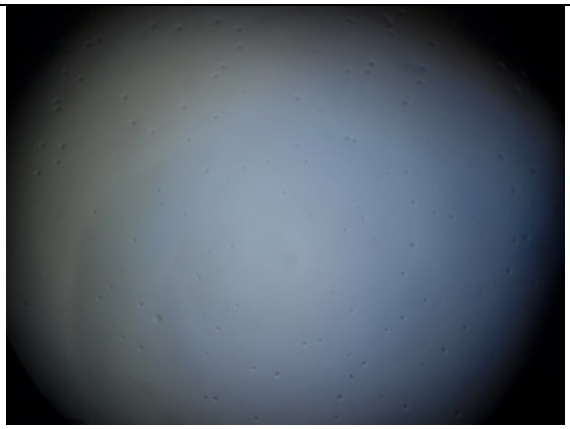
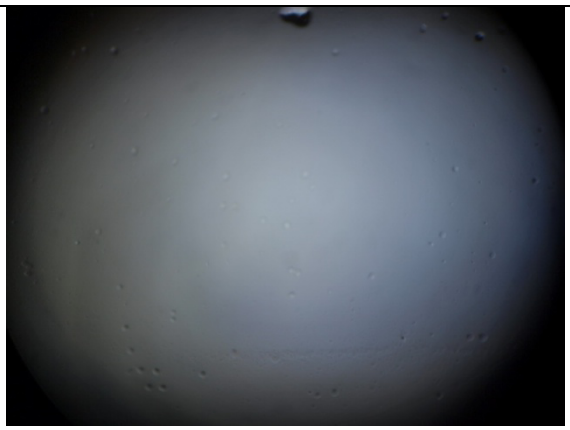
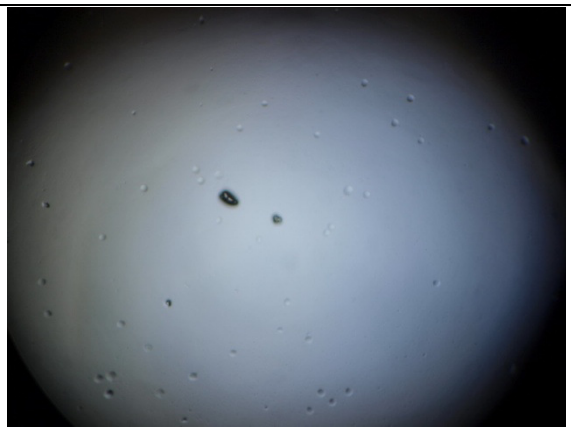
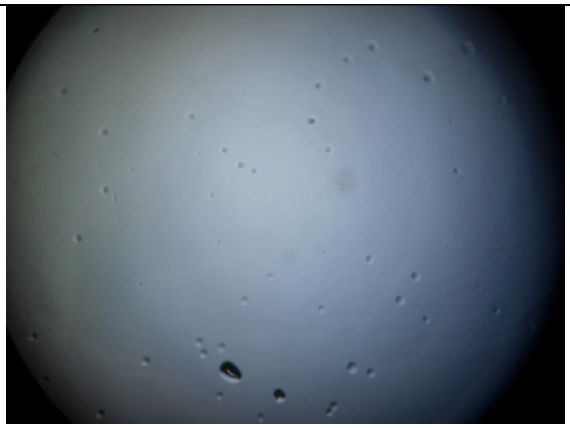
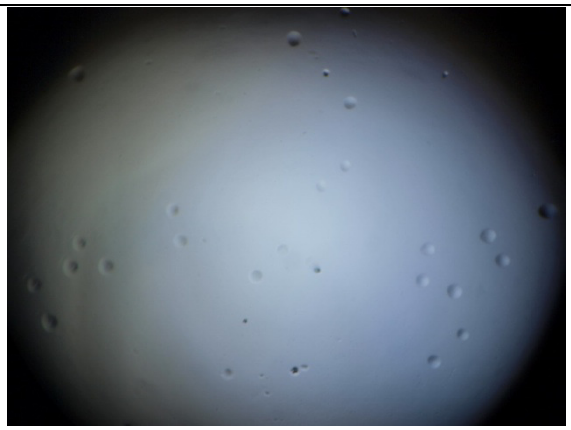
เป้าหมายของการทดลองนี้เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ที่มีการผสมทริปโตน เด็กซ์โตส และ agar ลงใน medium มาตรฐาน (TSA) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ เพื่อสังเกตอัตราการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

**4.2.1 ผลของการเติมสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.**

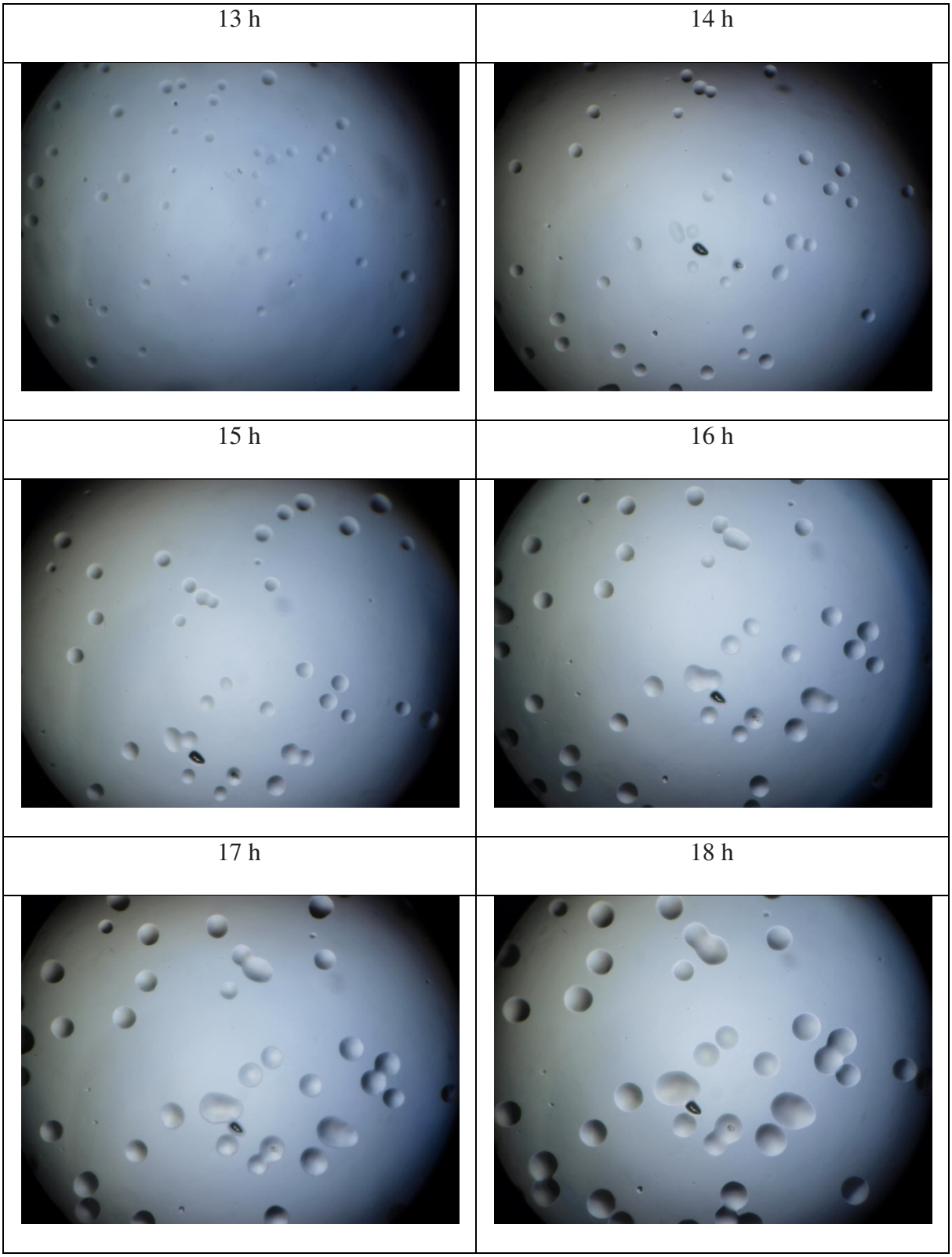
เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดยทริปโตน เด็กซ์โตสถูกเติมลงใน standard media agar ที่เป็นอาหาร TSA ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจน (N) และคาร์บอน (C) ตามลำดับ เพราะว่าการสังเกตในเชิงลึกของ profile การเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ที่เวลาต่างๆ ไม่เข้าใกล้ช่วง stationary stage โดย Wimpenny et al. (1995) และ Walker et al. (1997) ได้กล่าวว่าที่อัตราการเจริญเติบโตช้าของโคโลนีถือเป็นผลมาจากสารยาที่อยู่ในสภาพแวดล้อม (i.e., pH ลดลง) ซึ่งเป็นผลให้ลดกิจกรรมของ metabolic ในบางส่วนของโคโลนี มีงานวิจัยที่ได้กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการบ่ม พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ pH มีปริมาณมากในระหว่างการบ่มและค่า specific growth rate ต่ำเมื่อเปรียบเทียบสับเสตรทที่เป็นกลาง (soy beans) (Nagel et al., 1999) อย่างไรก็ตาม แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของ pH เนื่องจากกิจกรรมของ metabolic ของเซลล์ควรที่จะมีผลกระทบน้อยและแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของ pH เนื่องจากผลกระทบทางกายภาพและเคมีระหว่างการบ่มและก่อนการเริ่มต้นหรือการริเริ่มของการเจริญเติบโตถูกสมมติเป็น minor ดังนั้น maximum surface area ถูก fixed เพื่อให้ได้ค่าการสังเกตที่สูงที่สุด

**4.2.1.1 ผลของการเติมคาร์บอนที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.**

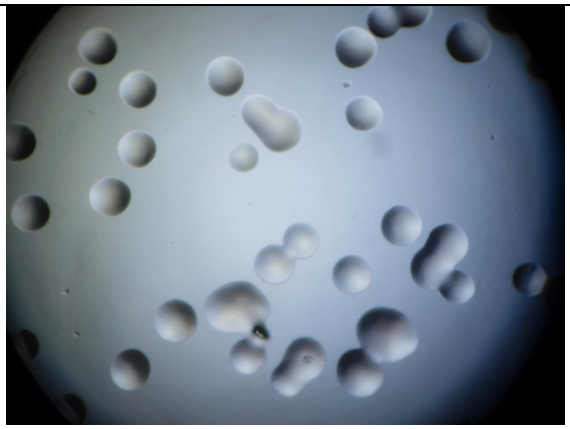
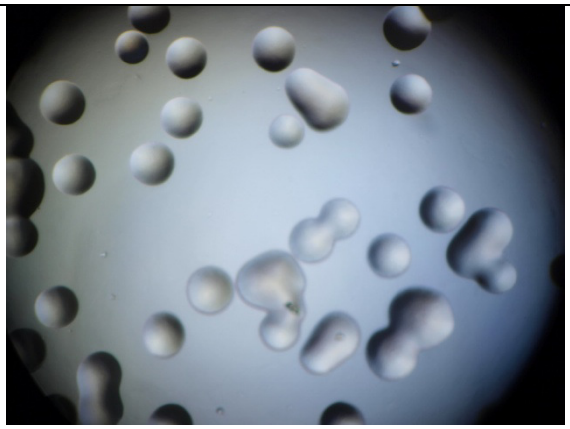
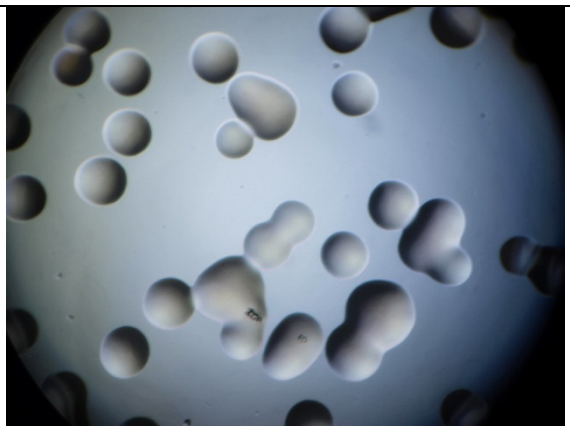
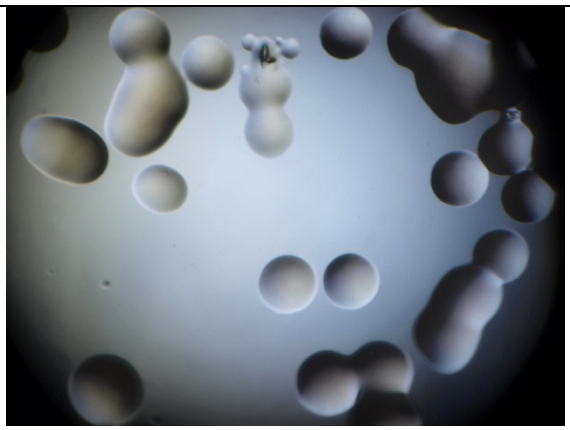
เพื่อศึกษาผลของการเติมแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ถูกสังเกตที่ความเข้มข้นของคาร์บอนที่แตกต่างกัน จากรูปที่ 4.7 กราฟการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.ที่ความเข้มข้น 1X, 1.5X, 2X, 2.5X พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในระดับช่วงแรก โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ 3X ของคาร์บอนแสดงให้เห็นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่อาหาร agar ปกติ (standard media agar) หรือที่ความเข้มข้น 1X ของแหล่งคาร์บอน Ziad et al. (2002) สังเกตอาหารที่มีคุณค่าของสารอาหารที่ดี (nutrient-rich) และความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงจะกดการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ซึ่งมีความเป็นไปได้เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของ pH ใน media ระหว่างการเจริญเติบโตจากเนื่องจากมีการสะสมของ by product จากกระบวนการ fermentation รูปที่ 4.8 แสดง maximum growth rate ของ *Listeria* spp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ $t_i$ –จากที่ 1X เป็น 2X หลังจากที่ $t_i$ ของ *Listeria* spp. เพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอน ไม่ได้เพิ่มการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. แต่การเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนจาก 2X ไปเป็น 3X การเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ลดลง

| 7 h | 8 h |
| --- | --- |
|  |  |
| 9 h | 10 h |
|  |  |
| 11 h | 12 h |
|  |  |

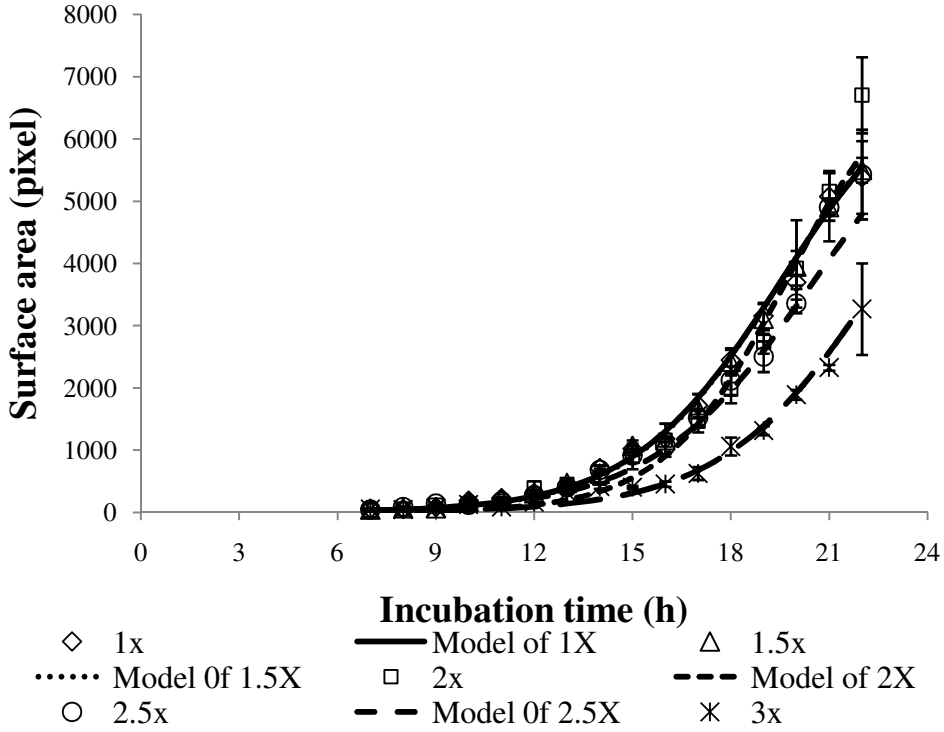
**รูปที่ 4.5** ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp.ถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา จาก 7 ถึง 12 - 22 ชั่วโมง



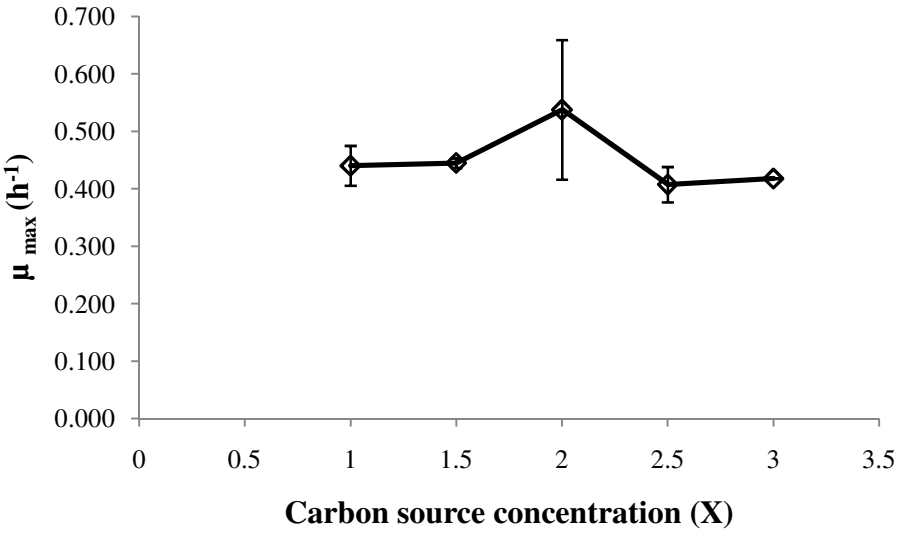

**รูปที่ 4.5** ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp.ถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา จาก 13 ถึง 18 - 22 ชั่วโมง

| 19 h | 20 h |
| --- | --- |
|  |  |
| 21 h | 22 h |
|  |  |

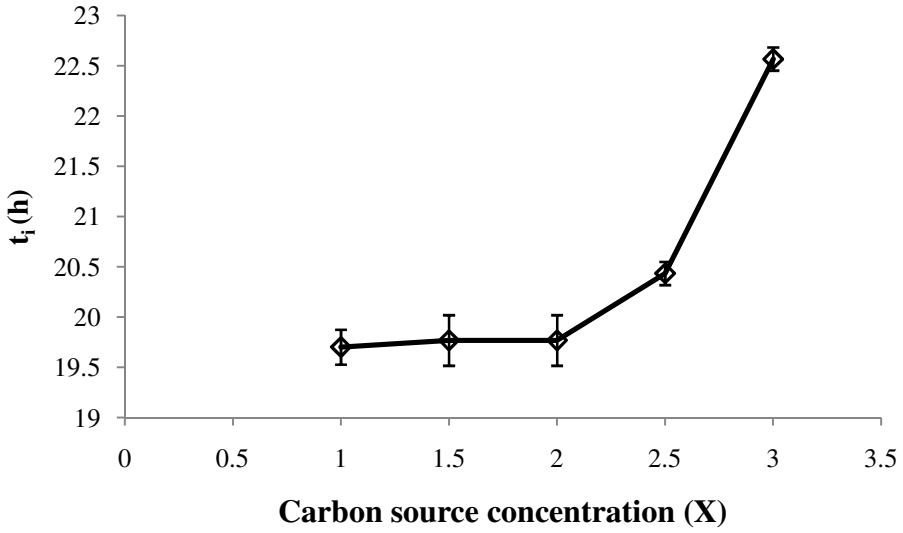
**รูปที่ 4.5** ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp.ถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา จาก 19 ถึง 22 ชั่วโมง




**รูปที่ 4.6** แบบจำลองการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ซึ่งมีการเติมความเข้มข้นของคาร์บอนที่หลากหลาย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง



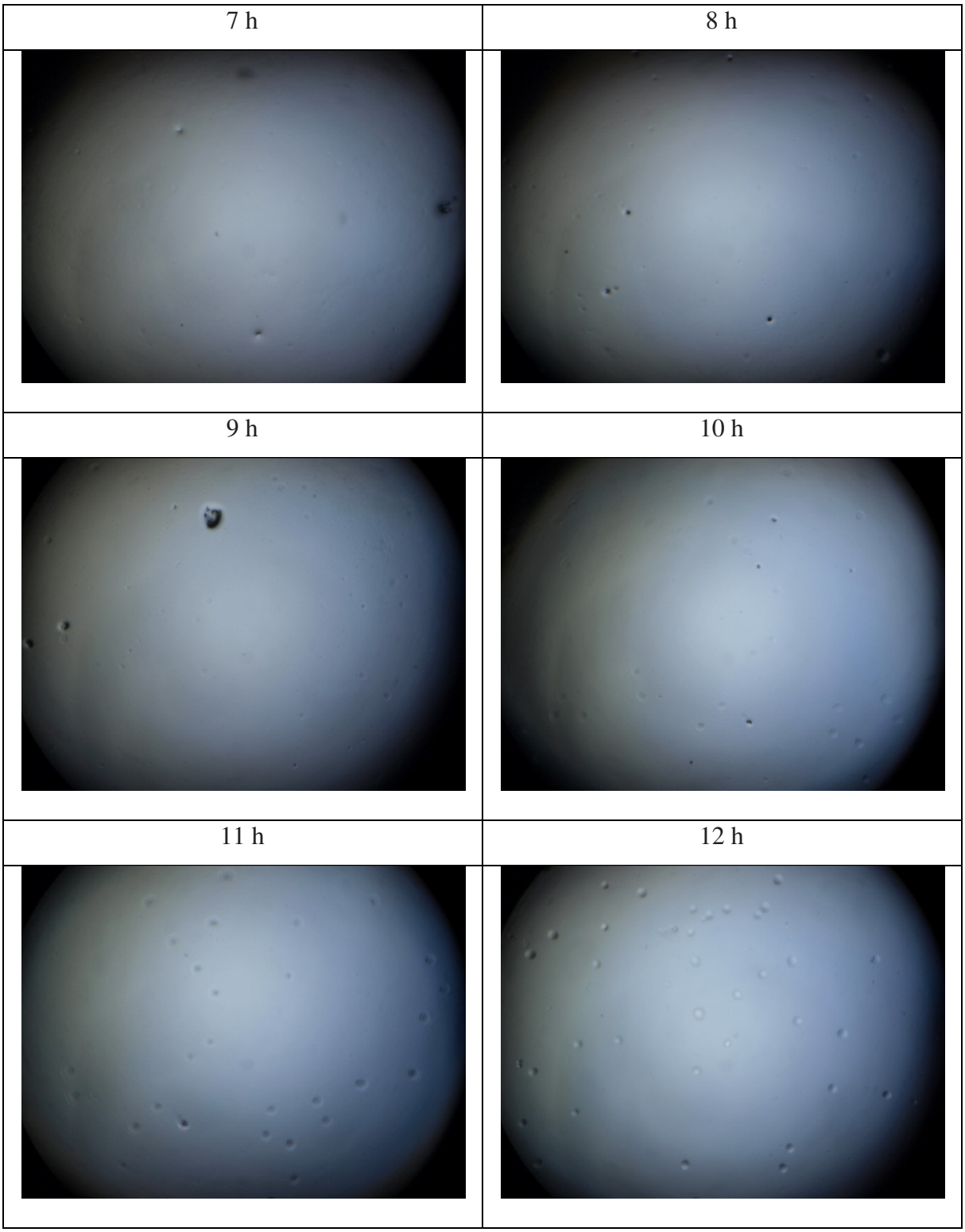

**รูปที่ 4.7** ผลของความเข้มข้นที่มีต่อ maximum specific growth ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง



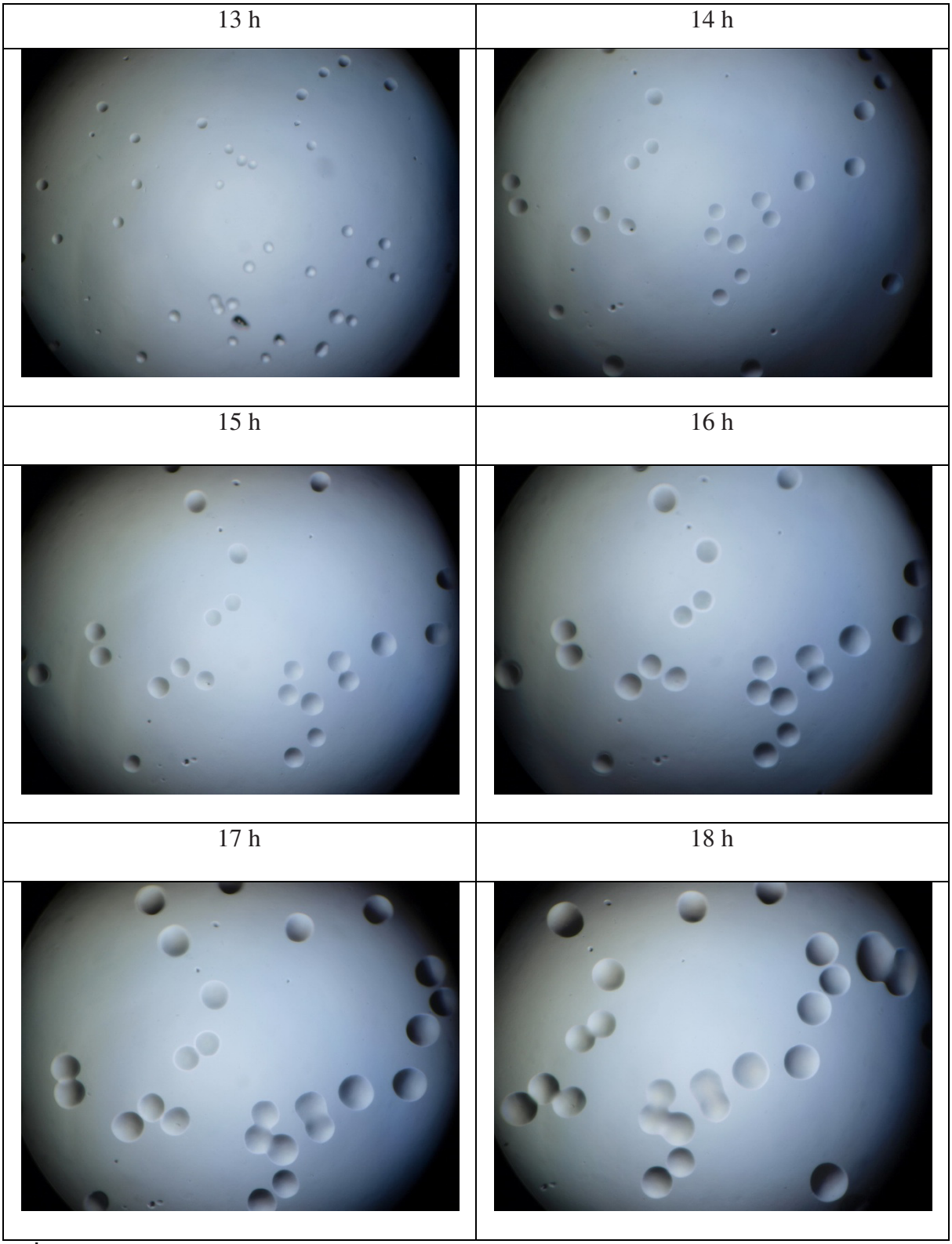

**รูปที่ 4.8** ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนที่มีต่อเวลาที่จุดเปลี่ยน ($t_l$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

**4.2.1.2 ผลของการเติมไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.**

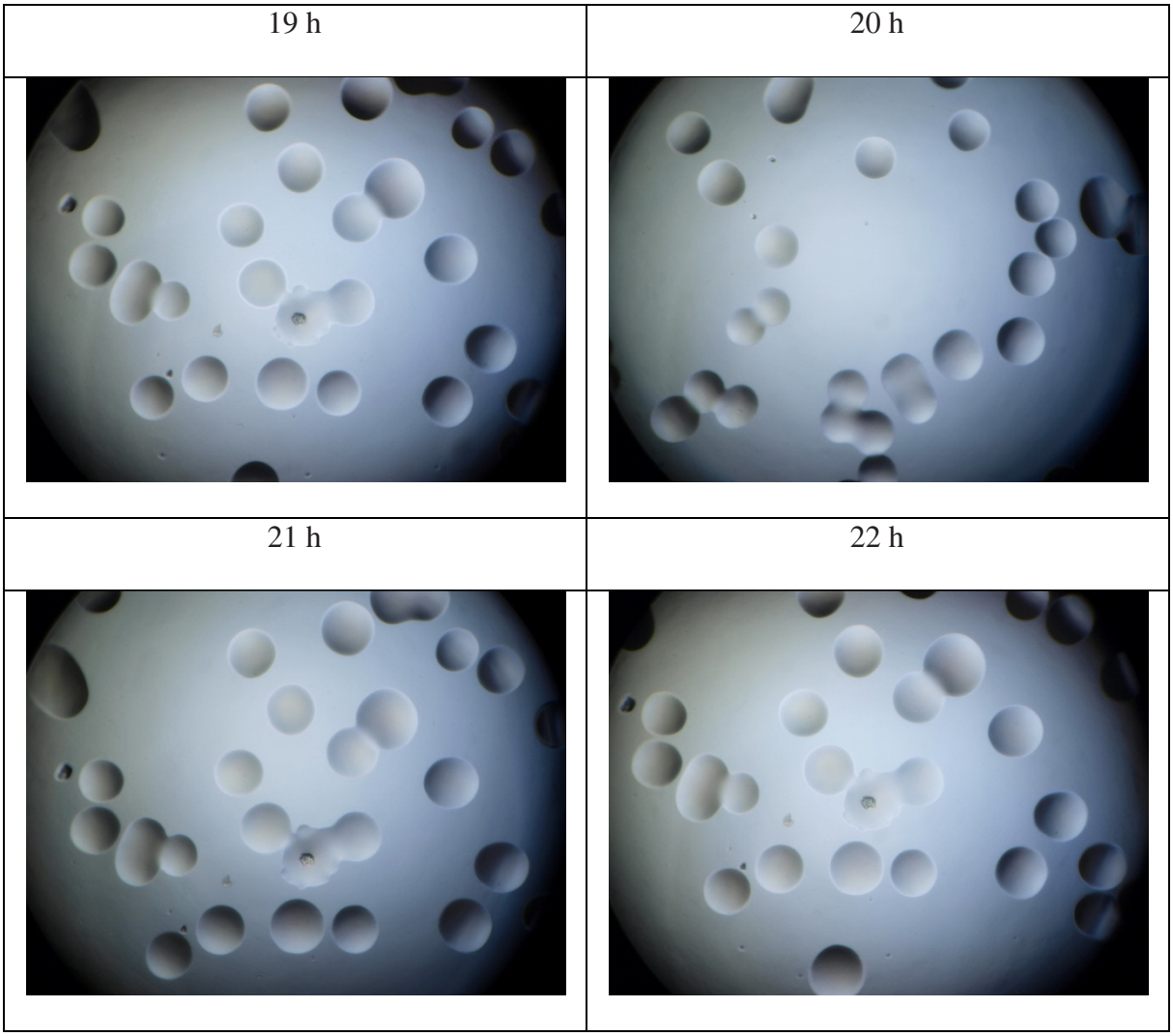
จากรูปที่ 4.10 การเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจาก 1X เป็น 2.5X ได้ส่งผลให้เพิ่มการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ซึ่งให้ผลสอดคล้องโดยตรงกับการทดลองก่อนหน้านี้ Naget et al. (1999) สังเกตการเติมของแหล่งไนโตรเจนมีผลให้ช่วง lag phase ของ *R. oligosporus* ลดลง ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและอัตราการผลิต $CO_2$ สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกับการเติม 5 g/l ของ tryptone (N source) เพื่อที่จะเป็น standard mineral medium รูปที่ 4.11 แสดงการเพิ่มความเข้มข้นจาก 1X เป็น 2X ได้เพิ่มค่า maximum growth rate และลดความเข้มข้นของ 3X และรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่า $t_l$ ของความเข้มข้นอาหาร 2.5X ให้การเจริญเติบโตที่เร็ว



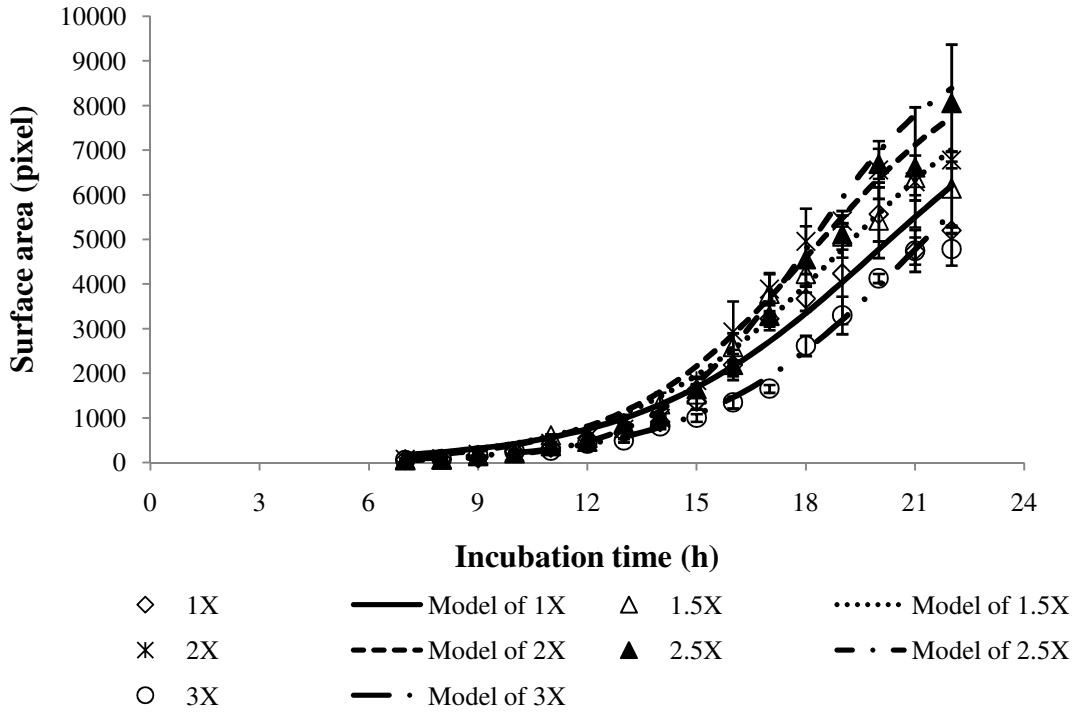

**รูปที่ 4.9** ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง



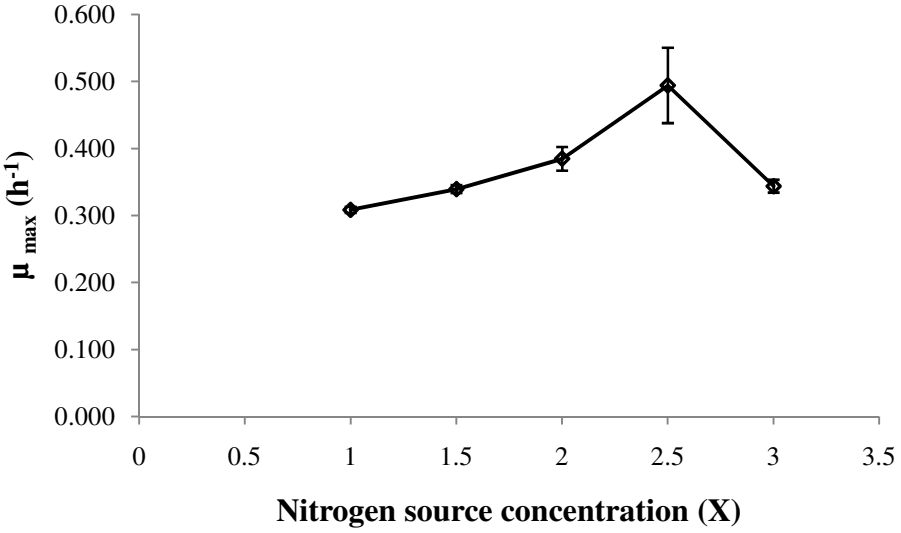

**รูปที่ 4.9** ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง (ต่อ)



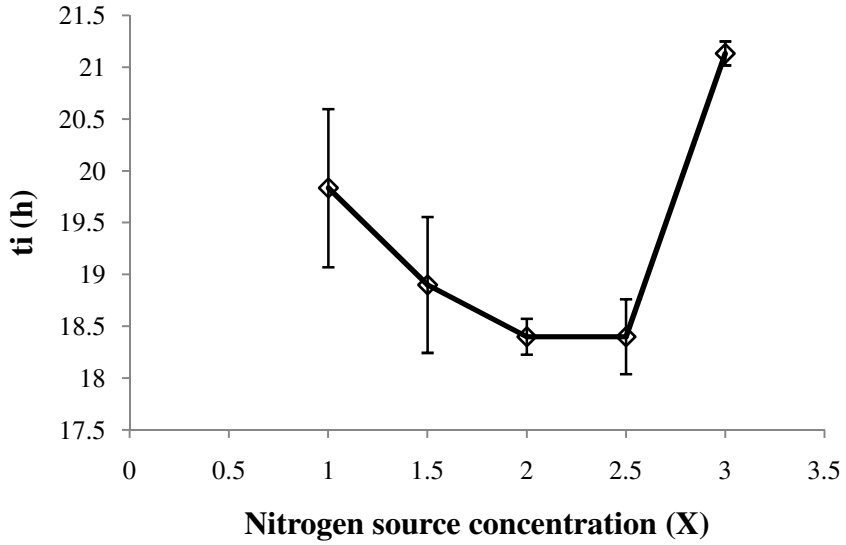

**รูปที่ 4.9** ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง (ต่อ)




**รูปที่ 4.10** รูปแบบการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ที่แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของไนโตรเจน โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง




**รูปที่ 4.11** ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อ maximum specific growth rate ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง



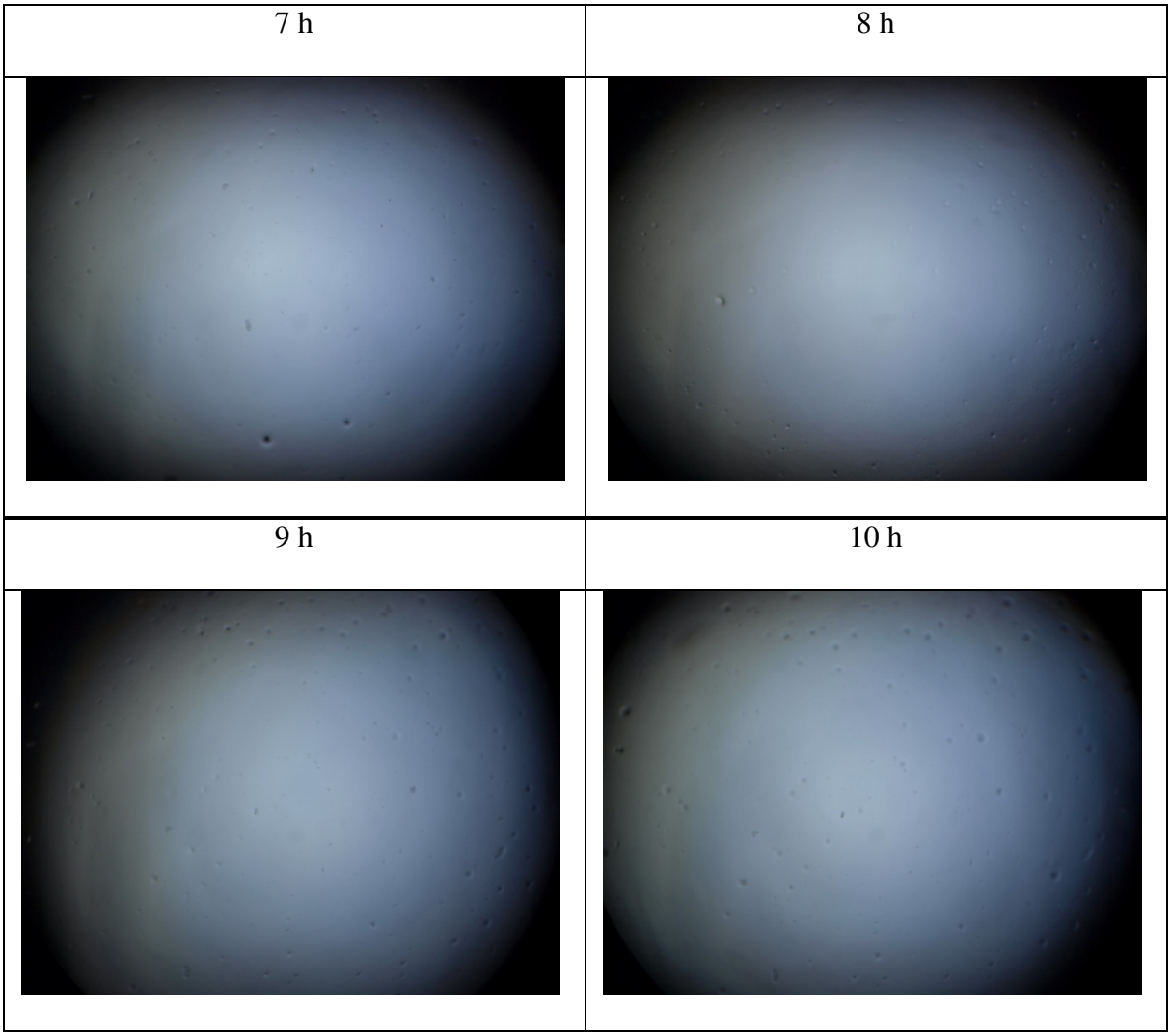

**รูปที่ 4.12** ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อเวลาที่จุดเปลี่ยน ($t_i$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

ผลกระทบของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโต ตามที่ McCarty, 1975 และ Faust et al., 1971 รายงานไว้พลังงานที่แบคทีเรียได้รับจากการ oxidation ของ substrate ผ่านการหายใจต้อง balance ต่อความจำเป็นในการสังเคราะห์ของเซลล์ใหม่ คาร์บอนและไนโตรเจนเป็น 2 องค์ประกอบหลักต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมถูกต้องการสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่อไนโตรเจนถูกจำกัดและคาร์บอนมีปริมาณมากเกินไป การสังเคราะห์ของเซลล์ถูกจำกัดโดยปริมาณของไนโตรเจนที่มีอยู่จำกัด ในขณะที่คาร์บอนมีอยู่จำกัดและไนโตรเจนที่มีอยู่มีปริมาณมากเกินไป การสังเคราะห์ของเซลล์ถูกจำกัดโดยพลังงานที่ produced จากกลูโคส (Gang, 2003)

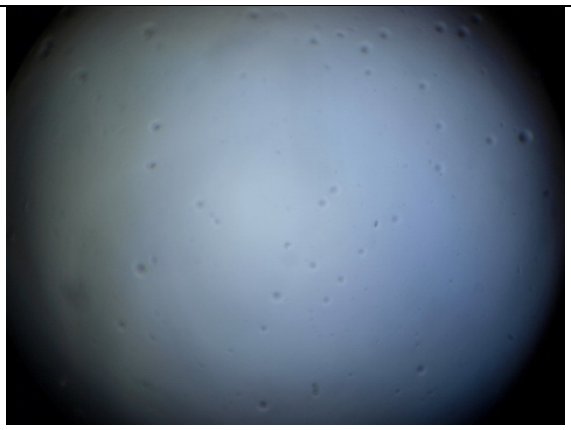
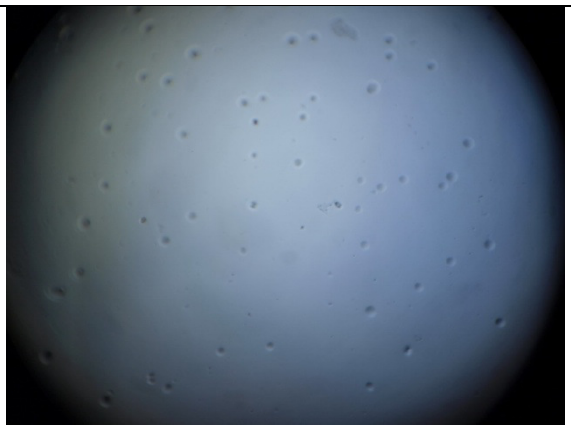
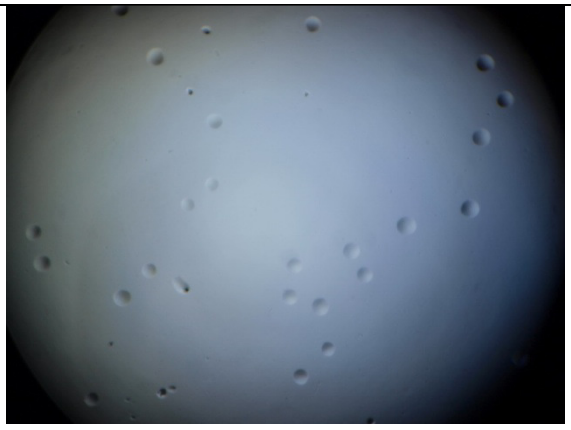
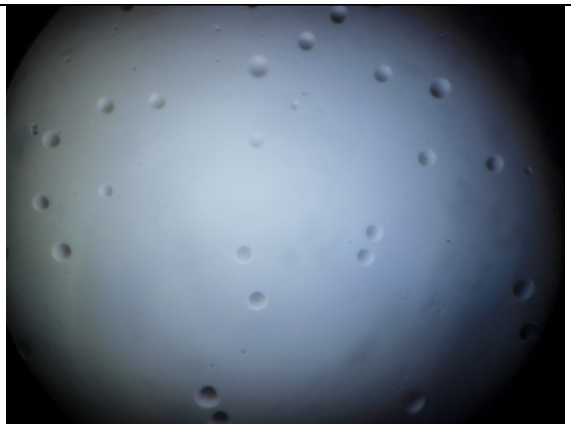
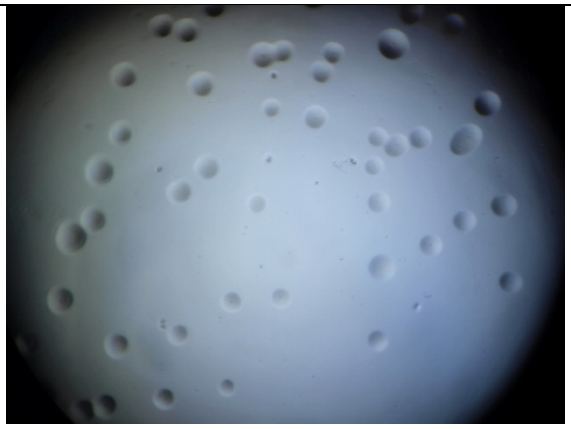
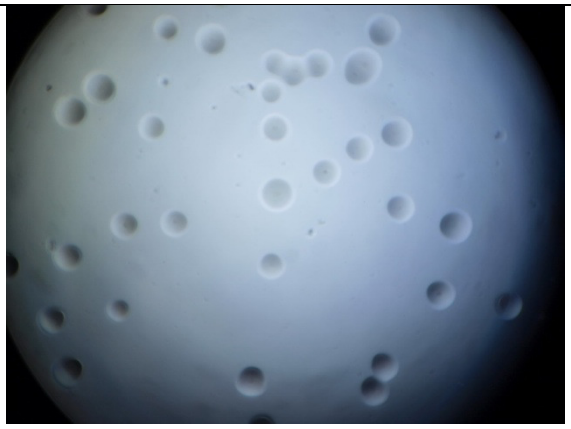
### 4.2.2 ผลของความเข้มข้นของ agar ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* spp. บนอาหาร agar เป็นการ modified โดยศึกษาปริมาณ agar ที่ต่างๆ กัน จากรูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยการเติมความเข้มข้นของ agar ที่ปริมาณต่างๆ งานวิจัยก่อนหน้านี้นำเสนอที่ความเข้มข้นของ agar ต่างๆ ในอาหารที่มี $A_w$ สูง (~ 0.99) เป็นผลให้โคโลนีของ *Bacillus cereus* มีขนาดต่างๆ กัน และจำนวน cell ต่อโคโลนีต่างกัน ซึ่งโคโลนีโตในความเข้มข้นของ agar ที่มากที่สุดให้จำนวนและโคโลนีขนาดที่เล็กที่สุด ผลการทดลองเหล่านี้ถูกอธิบายว่าปัจจัยอื่นๆ นอกจากปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ ระบบ agar สามารถมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เช่นกัน (Stecchini et al., 1998, 2000) โดยพบว่าที่ความ

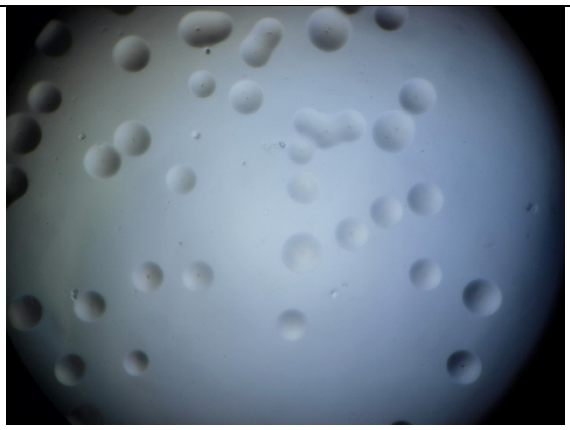
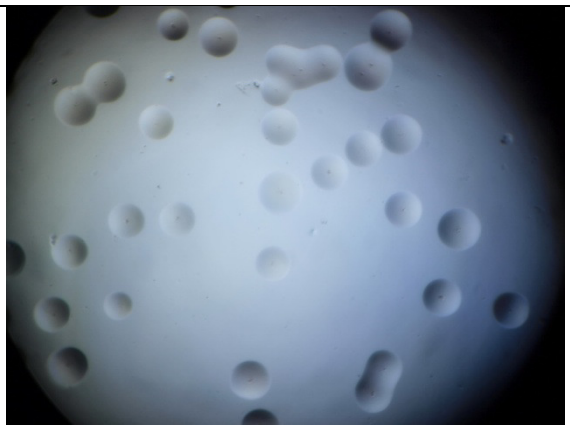
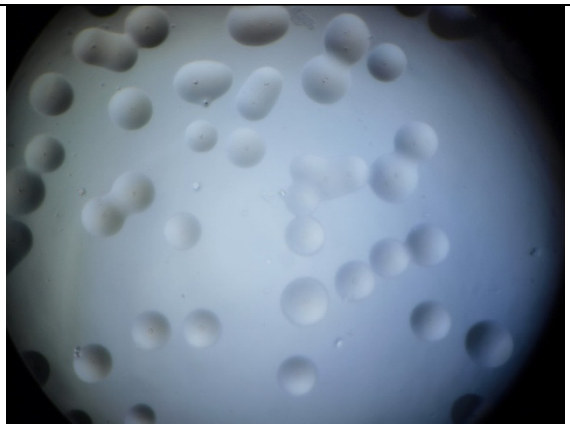
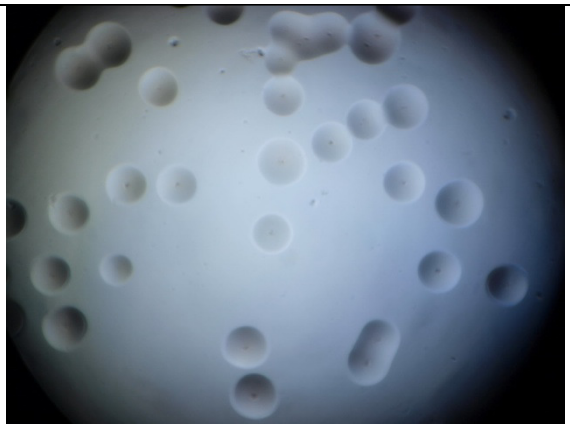
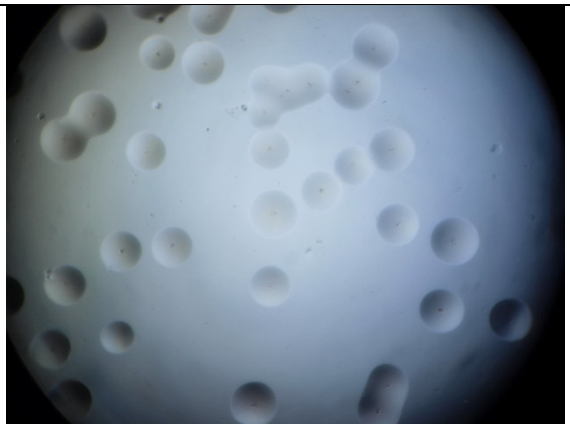
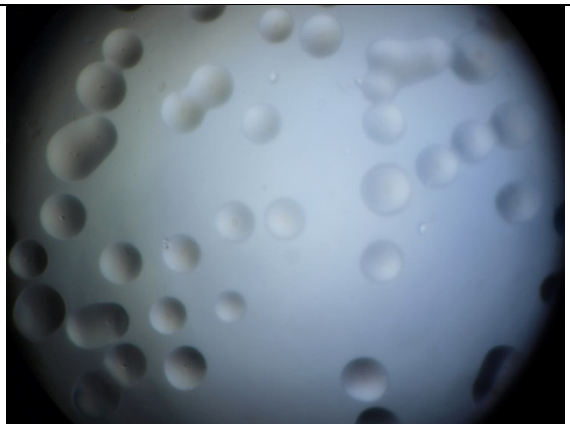
เข้มข้นของ agar ต่ำเซลล์ *B. cereus* สามารถที่จะสร้างโคโลนีที่ลื่นกว่าซึ่งพบได้ทีปริมาณ agar สูง เพราะว่าขนาดของเซลล์ไม่ได้มีผลกระทบกับปริมาณของ agar (Stecchini et al., 2001) นอกเหนือจากนั้น การโตของโคโลนีในเพลทที่มีปริมาณ agar มาก แสดงให้เห็นผิวที่ไม่เรียบมากกว่าโคโลนีที่มีปริมาณ agar น้อย ดังนั้นปริมาณ agar ที่เหมาะสมถูกเลือกขึ้นมาใช้



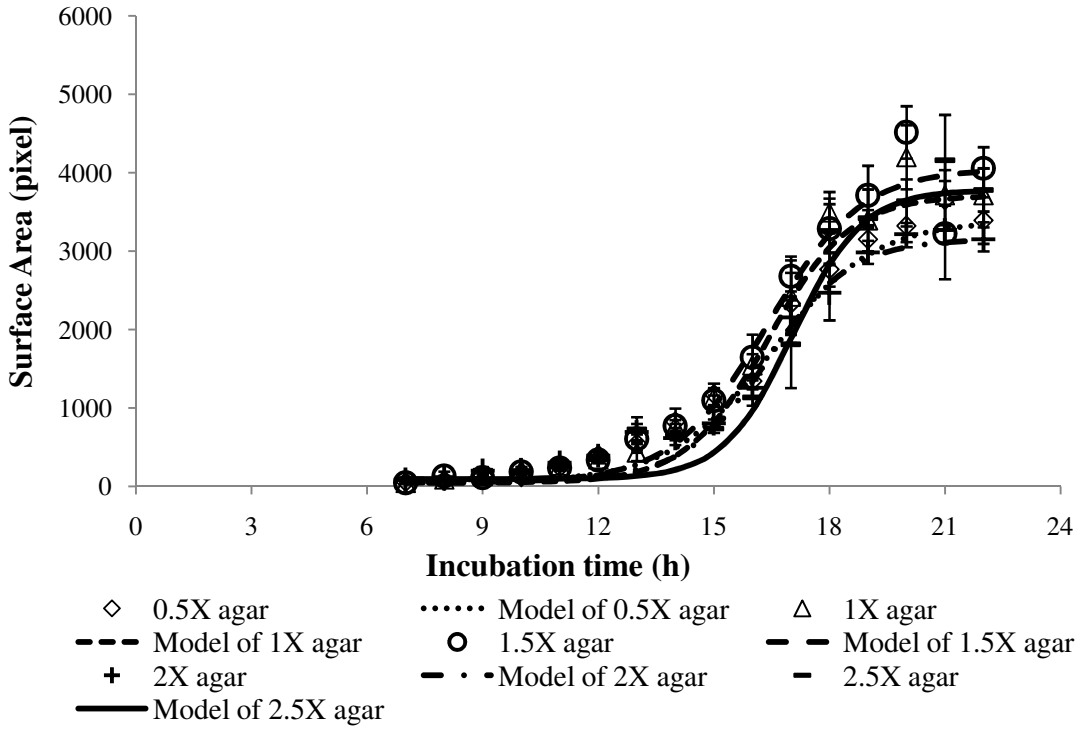

**รูปที่ 4.13** ผลของความเข้มข้นของ agar ที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง

| 11 h | 12 h |
| --- | --- |
|  |  |
| 13 h | 14 h |
|  |  |
| 15 h | 16 h |
|  |  |

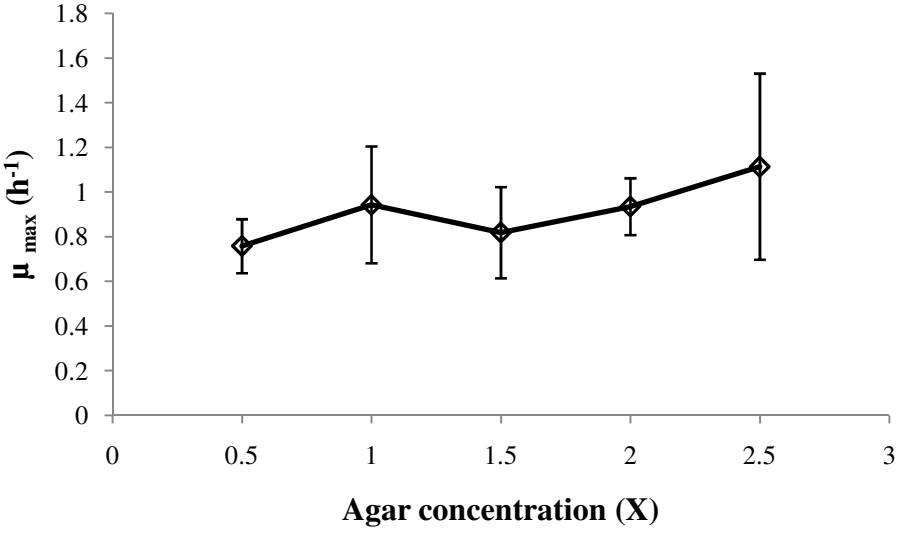
**รูปที่ 4.13** ผลของความเข้มข้นของ agar ที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง (ต่อ)

| 17 h | 18 h |
| --- | --- |
|  |  |
| 19 h | 20 h |
|  |  |
| 21 h | 22 h |
|  |  |

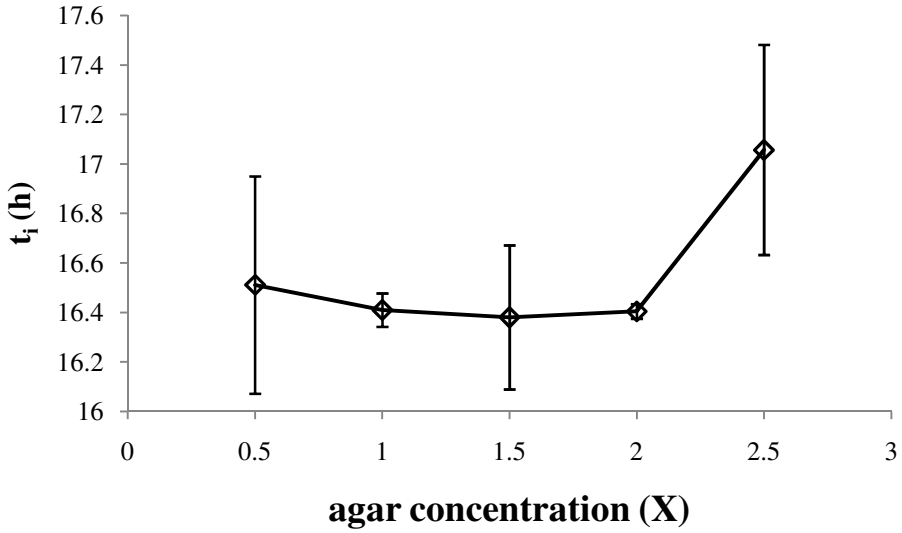
**รูปที่ 4.13** ผลของความเข้มข้นของ agar ที่ 1X ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 ถึง 22 ชั่วโมง (ต่อ)




**รูปที่ 4.14** แบบจำลองการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ที่ได้มีการเติมแหล่งของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง



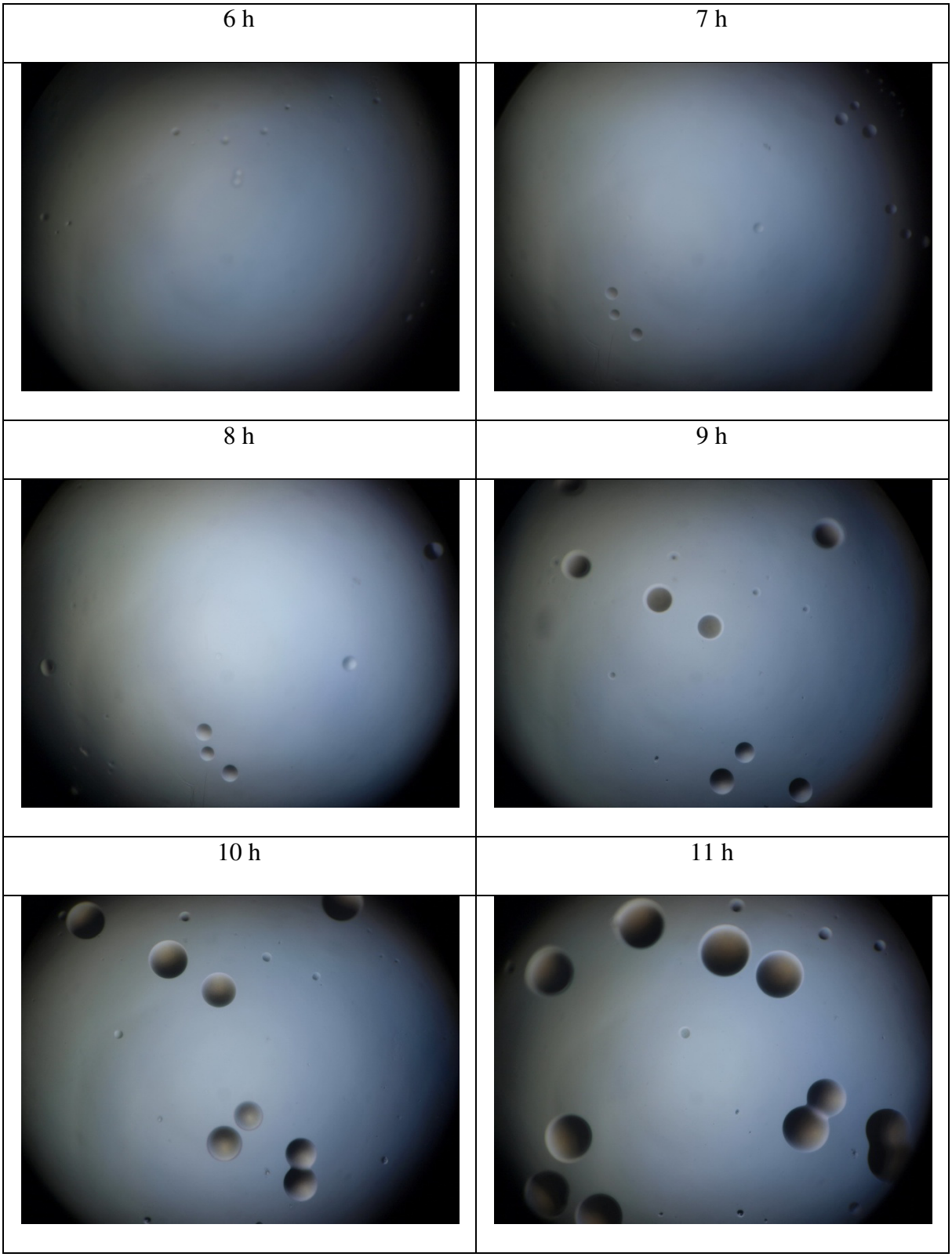

**รูปที่ 4.15** ผลของความเข้มข้นของ agar ที่มีต่อ maximum specific growth ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง



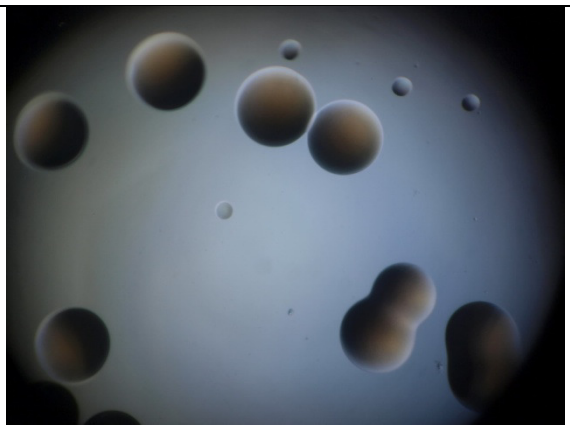
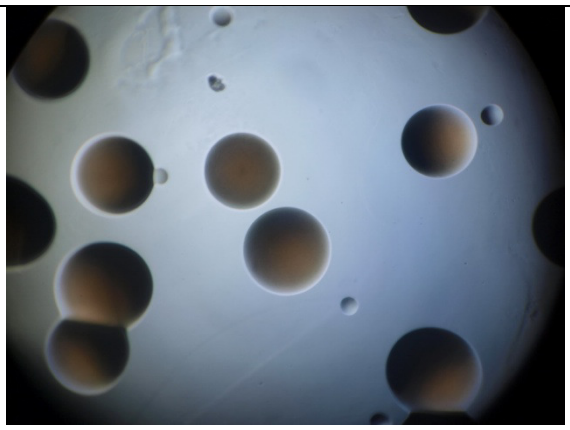
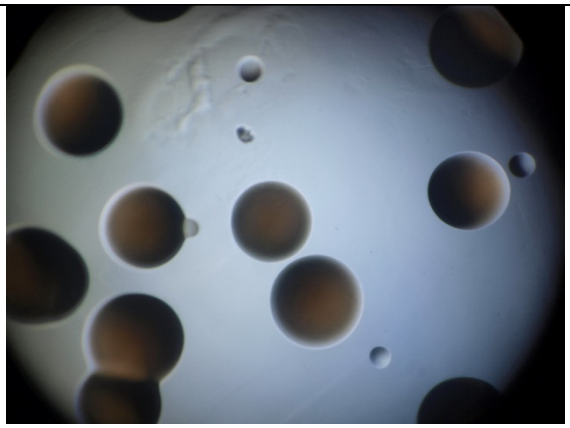
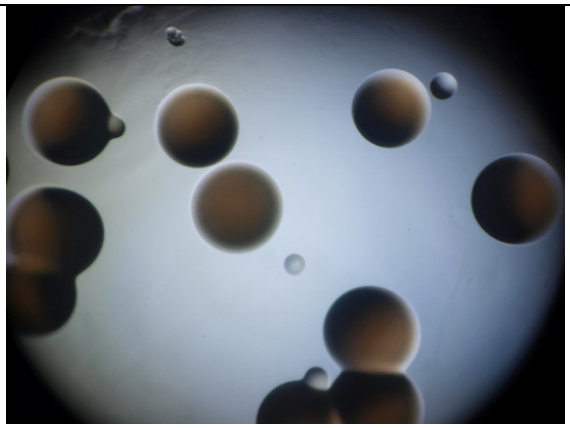
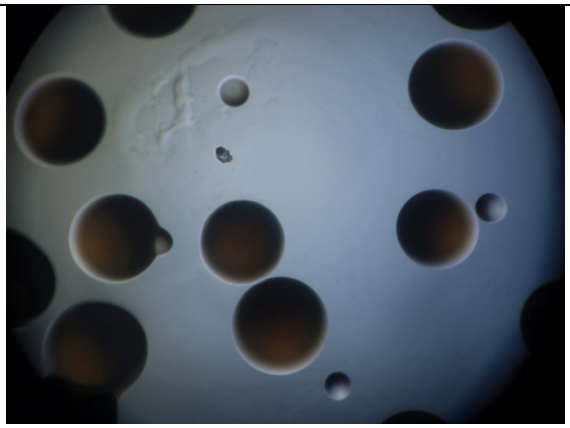
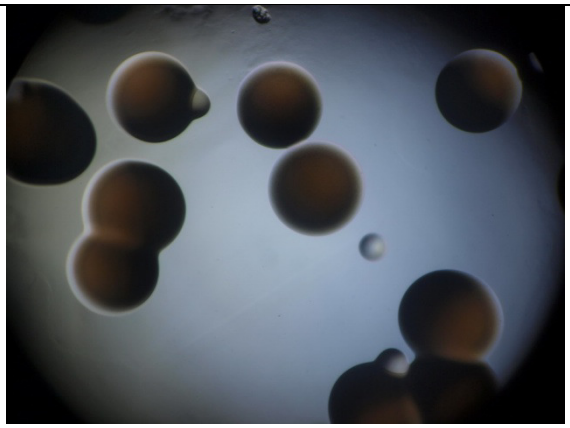

**รูปที่ 4.16** ผลของความเข้มข้นของ agar ที่มีต่อจุดเปลี่ยน ($t_l$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

### 4.3.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

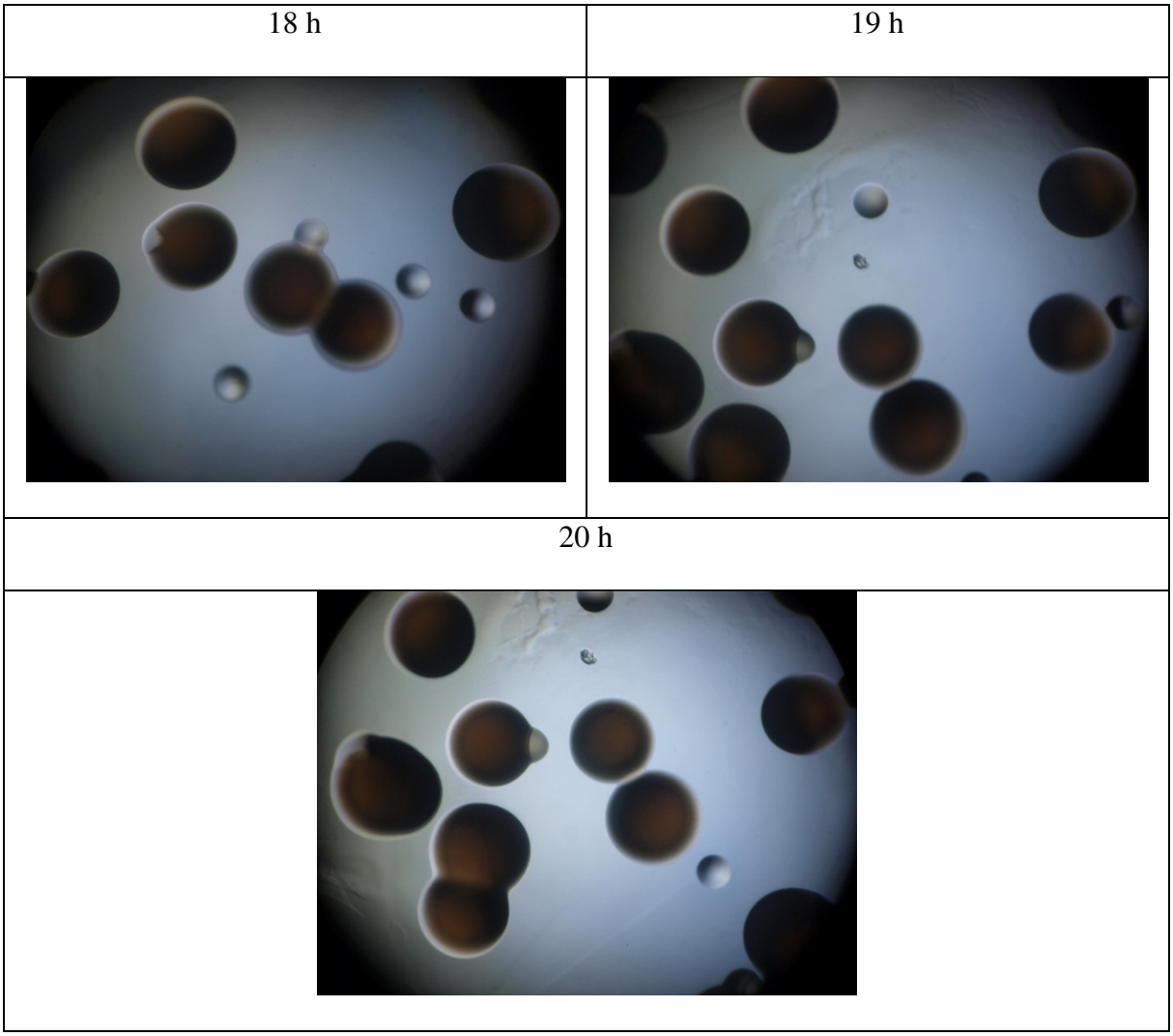
จุลินทรีย์เจริญที่อุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมจะแสดงให้เห็นในช่วงของ lag phase ที่สั้นมีช่วงเวลา generation ที่สั้นระหว่าง exponential growth phase และให้ปริมาณเซลล์ที่มากหรือความหนาแน่นที่ stationary phase (Elliot, 2007) การศึกษาก่อนหน้านี้ถูกสังเกตผลของอุณหภูมิที่มีต่อ lag phase ของ *Listeria* spp. พบว่าช่วง lag phase เพิ่ม เมื่ออุณหภูมิลดลงจาก 37°C ไป 25°C เมื่อนั้นลดลงอีกครั้งไปเป็นที่อุณหภูมิต่ำที่ 15°C ดังนั้นมีการเพิ่มที่ค่อนข้างพุ่งแหลมใน lag phase เป็นผลให้อุณหภูมิลดลงเป็น 5°C (Robinson et al., 1998) จากรูปที่ 4.18 การทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ สำหรับการทดลองนี้ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจาก 30 ถึง 40.5°C ลด lag phase ในขณะที่อุณหภูมิ 44°C เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมในการบ่ม รูปที่ 4.19 แสดงให้เห็นอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ 37°C ถึงแม้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ถูกแสดงให้เห็นว่าให้อัตราการเจริญสูงที่สุด เนื่องจาก $t_l$ สั้นอุณหภูมิ 40.5 ถูกพิจารณาให้เป็นอุณหภูมิในการบ่มของ *Listeria* spp.



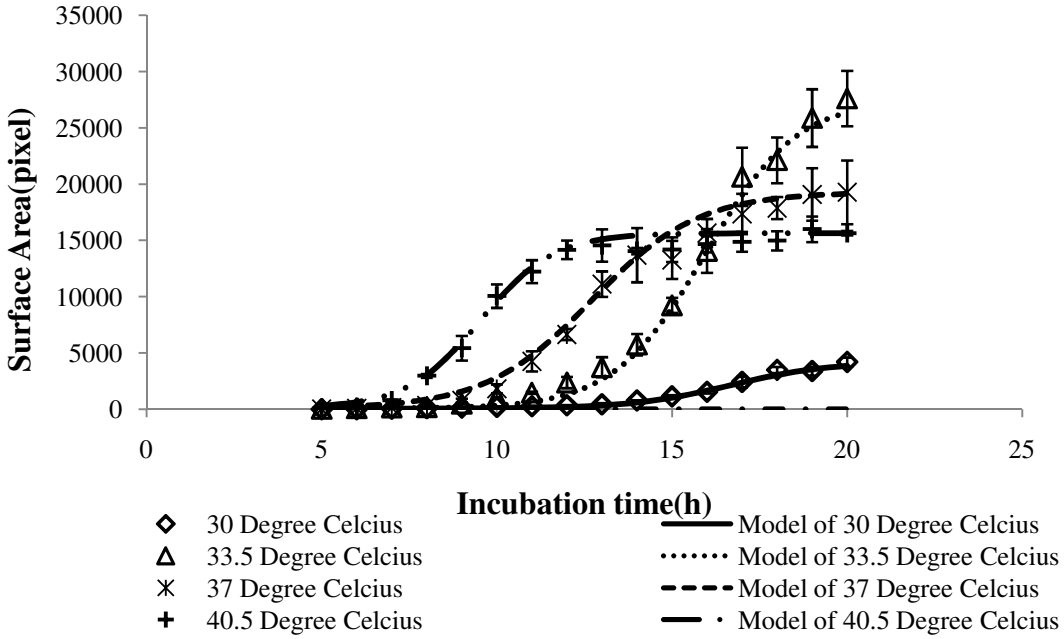

**รูปที่ 4.17** ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 ถึง 20 ชั่วโมง

| 12 h | 13 h |
| --- | --- |
|  |  |
| 14 h | 15 h |
|  |  |
| 16 h | 17 h |
|  |  |

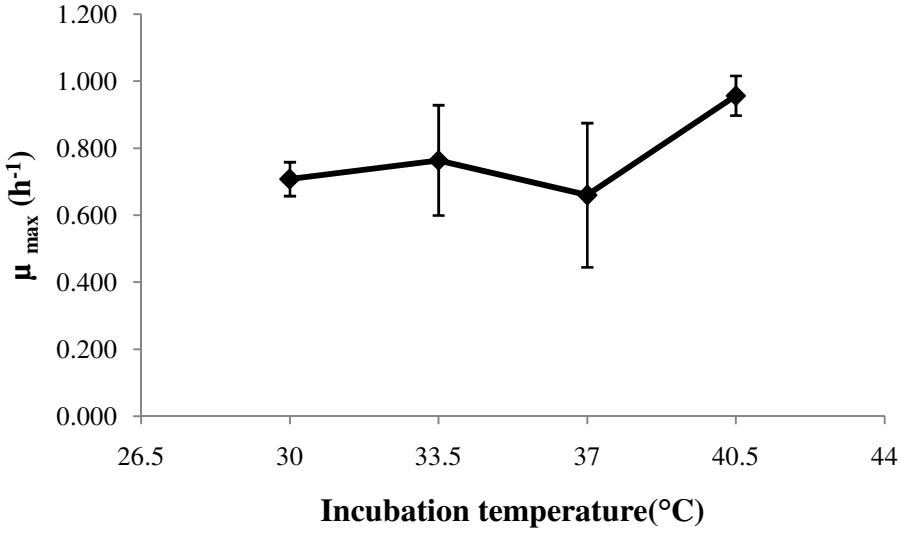
**รูปที่ 4.17** ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 ถึง 20 ชั่วโมง (ต่อ)



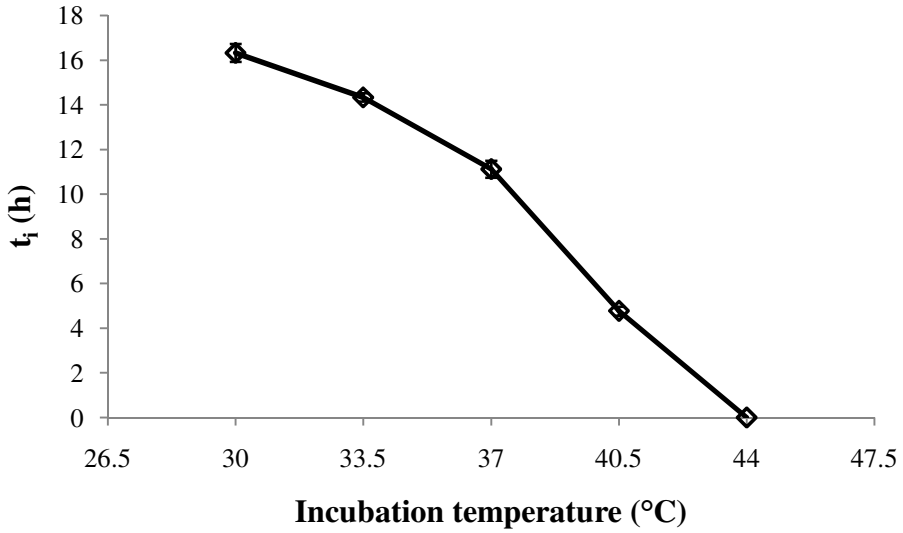

**รูปที่ 4.17** ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 ถึง 20 ชั่วโมง (ต่อ)




**รูปที่ 4.18** แบบจำลองการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง




**รูปที่ 4.19**ผลของอุณหภูมิการบ่มที่มีต่อ maximum specific growth ($\mu_{max}$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA เป็นเวลา 20 ชั่วโมง




**รูปที่ 4.20** ผลของอุณหภูมิการบ่มที่มีต่อจุดเปลี่ยน ($t_i$) ของ *Listeria* spp. โดย *Listeria* spp. ถูกบ่มบน TSA เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

### 4.3 การใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่น (Low magnification microscopy) ต่อการนับจำนวนโคโลนี

ทั้งนี้โรงงานอุตสาหกรรมอาหารส่งออกของประเทศไทยมีหลายโรงงานพยายามที่จะใช้วิธีที่ง่าย เป็นที่ไว้ใจ เชื่อถือได้ และ protocol มีประสิทธิภาพราคาไม่แพงสำหรับการดำเนินการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นกิจวัตรประจำวัน (Suwansonthichai and Rengpipat, 2003) การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่รวดเร็ว มีความสำคัญมากสำหรับสุขลักษณะการผลิตอาหารที่ดีและสุขอนามัยของพนักงาน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเพื่อให้เกิดความมั่นใจกับคุณภาพที่ดีที่สุดสำหรับกฎข้อระเบียบการส่งออกทั้งภายในและนอกประเทศ ที่เป็นไปตามความต้องการของลูกค้า ปริมาณแบคทีเรียและคอลิฟอร์มที่มากสะท้อนในเรื่องของสุขลักษณะการผลิตที่ไม่ดีในการล้างมือและขั้นตอนกระบวนการผลิต การเก็บรักษาที่ไม่เพียงพอและเกิดการปนเปื้อนข้าม (Castro-Rosas et al., 2012; Paruch and Maehlum, 2012; McMeekin et al., 2006; Bredie and de Boer, 1992; Feng and Hartman, 1982) ดังนั้นทางโรงงานจึงนำเสนอจุดควบคุมเพื่อที่จะตัดสินใจกระบวนการทำความสะอาดและความปลอดภัยทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหาร (Turner et al., 2000; Venkateswaran et al., 1996) การเน้นความปลอดภัยของอาหารทางด้านจุลชีววิทยาชี้ให้เห็นความจำเป็นสำหรับวิธีที่เพียงพอในการนำเสนอวิธีการนับเชื้อที่ง่ายและเร็วเพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้น

วิธีการวิเคราะห์แบบปกติในปัจจุบัน ยังคงเป็นวิธิที่มีการใช้กันอยู่ในหลายๆ lab และเป็นที่รู้จักดีว่าเป็นมาตรฐานที่ดี สำหรับการวิเคราะห์ที่เป็น routine ของการตัดสินใจการนับปริมาณเชื้อในอุตสาหกรรมอาหาร โรงงานดังกล่าวสามารถที่จะประเมินโดยการใช้เทคนิคการนับเชื้อที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเช่น pour plate, spread plate, drop plate (Mahony, 2009) โปรโตคอลที่เป็น conventional method อยู่บนพื้นฐานที่เป็นสมมติฐานที่ว่าในแต่ละเซลล์จะมีการฟอร์มของโคโลนีเมื่อผสมกับวุ้นที่ได้มีการเติมสารอาหารที่เหมาะสม หลังจากนั้นโคโลนีจะถูกประมาณเพื่อตัดสินใจการนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์หลังจากที่ทำการบ่มเพลทไปแล้วที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าการนับปริมาณเชื้อจะสามารถดำเนินการโดยการใช้วิธีที่หลากหลายของวิธีของ agar เช่นการใช้ flow cytometry, spectrophotometry, membrane filtering และวิธีการเพาะด้วย agar (Chiang et al., 2015 ) วิธีการใช้ agar เป็นเทคนิควิธีที่เป็นวิธีการโดยทั่วไปในการใช้นับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สำหรับอุตสาหกรรมโรงงานอาหาร

ในปีที่ผ่านมา งานวิจัยที่หลากหลายมีการพัฒนาในความจำเป็นเพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและเป็นระบบอัตโนมัติของวิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา สำหรับการ detection ของ *E. coli* และcoliforms โรงงานอุตสาหกรรมอาหารใช้ 1 ในวิธีการทดสอบในเชิงการค้าที่เป็นที่รู้จักในรูปแบบของ Chromocult® Coliform Agar (CCA), Fluorocult® LMX broth และ Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count plates (Anonymous, 1987; Firstenberg-Eden, 1985; Feng and Hartman, 1982; Anderson and Baird-Parker, 1975) วิธีการทดสอบเหล่านี้เป็นวิธีที่ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นเพื่อดำเนินการการสอบเทียบอย่างกว้างขวางที่เป็นบันทึกข้อมูลมาหลาย 10 ปี อย่างไรก็ตามถึงกระนั้นวิธีการดังกล่าวใช้เวลาวิเคราะห์นาน 48 – 72 ชั่วโมง เพื่อที่จะได้ผลการวิเคราะห์ วิธีการวิเคราะห์เหล่านี้ใช้เพลท Petri dish ซึ่งเป็นแก้วที่ต้องการพื้นที่ในการเติมที่ใช้ขั้นตอน lab ที่ค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลาการบ่มนาน หลังจากนั้นจึงทำการนับโคโลนีซึ่งเป็นเรื่องที่น่าเบื่อหน่ายและมีแนวโน้มที่จะเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากความสามารถคนจากการดำเนินงานที่อาจเกิดความเหนื่อยล้า (Monis and Hallas, 2015; Wang et al., 2007) เพื่อที่จะแทนที่วิธีการวิเคราะห์ที่ใช้เวลานานและความไม่แน่ชัดของวิธีการนับด้วยวิธีปกติที่ใช้สายตานับโคโลนีด้วยการใช้โปรแกรม image processing software ตัวอย่างเช่น Image J ที่ได้มีการถูกพัฒนาขึ้นมา (Chiang et al., 2015; Grishagin, 2015)

ในงานวิจัยได้ประยุกต์นำเทคโนโลยีการวิเคราะห์ขนาดเล็กซึ่งเป็นนวัตกรรมแบบใหม่ (Chenu et al., 2013; Fung, 1992) การประเมินวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วย miniaturization เป็นการลดการใช้ปริมาตรของ media มีงานวิจัยจำนวนมากที่ประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้ microwell ที่เป็นรูปแบบ 24 และ 96 เทคนิคสำหรับการนับปริมาณแบคทีเรีย (Khueankhancharoen and Thipayarat, 2011; Supanivatin et al., 2010) ใน

งานวิจัยนี้วิธีการที่เป็น miniaturization ถูกนำมาใช้อีกครั้งแต่เป็นการใช้ขนาดของปริมาณตัวอย่างมากขึ้น (inoculums size) และมีการ applied เพื่อไปใช้ในตัวอย่างอุตสาหกรรมสำหรับแบคทีเรียทั้งคู่ของการนับ *E. coli* และ *coliform* การใช้เทคนิควิเคราะห์ภาพถ่ายจากดิจิตอลร่วมกับการใช้โปรแกรม ImageJ ถูกประยุกต์ใช้ในการทำให้สะดวกในการนับปริมาณเชื้อ

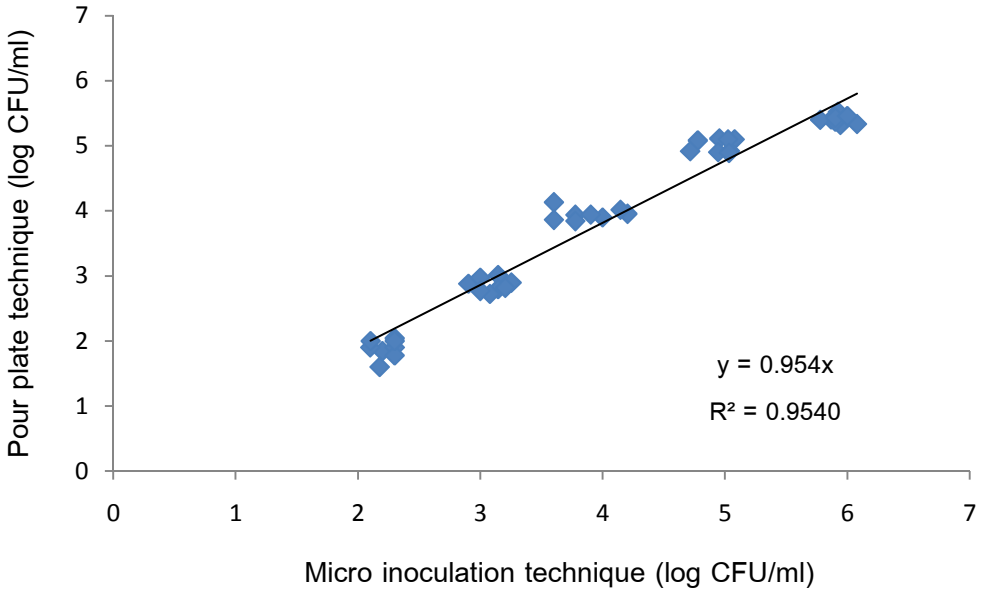
การศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้มีการใช้ MIC โดยเป็นการใช้ปริมาณตัวอย่าง 5 μL เทคนิควิธีการนับปริมาณเชื้อที่รวดเร็วเป็นงานที่เป็นที่รู้จักดีในทั้งคู่ของโรงงานอุตสาหกรรมและ lab การวิเคราะห์ต่างๆ (Khueankhancharoen and Thipayarat, 2011; Supanivatin et al., 2010; Saeaung et al., 2010) อย่างไรก็ตามปริมาณตัวอย่างที่เล็กน้อยอาจนำไปสู่ความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นได้ โดยเฉพาะในกรณีเป็นพิเศษที่ปริมาณเซลล์น้อย เมื่อความเข้มข้นของเซลล์เข้าใกล้ที่ปริมาณต่ำกว่า limit ที่จะสามารถตรวจนับได้ โดยทั่วๆ ไป ที่ปริมาณของตัวอย่างมาก (higher inoculums size) ควรที่จะสามารถ provide ความไวได้ดีกว่าเพราะตัวอย่างถูกรวมอยู่ในการทดสอบของ protocol (APHA, 2001) ดังนั้น ปริมาณตัวอย่าง 10 μL ถูกประยุกต์เพื่อเพิ่มความสามารถในการ detection limit และพัฒนาความไวของการวิเคราะห์ MIC เทคนิคปริมาณของตัวอย่างที่มากกว่าถูกดำเนินการทดสอบด้วยเหมือนกันแต่ใช้ปริมาณที่มากขึ้น สาเหตุเพราะการนับโคโลนีที่ปริมาณตัวอย่างน้อย อาจทำให้การนับโคโลนีที่ผิดพลาดได้

การพัฒนาเทคนิค MIC และ การตรวจนับด้วยเทคนิคดิจิตอลถูกดำเนินการเพื่อให้สามารถได้ปริมาณเชื้อในการนับของตัวอย่างในระดับอุตสาหกรรม การนับโคโลนีถูกเปรียบเทียบกับวิธีที่ได้จาก TPC และ การนับ coliforms ด้วยการใช้ PCA และ CCA โดย CCA ถูกใช้เป็นอาหาร agar ที่เป็น chromogenic ส่งผลทำให้เกิดโคโลนีที่เป็นสีม่วงของ *Escherichia coli* และสีชมพูจาก coliforms อาหาร medium ที่ได้มีส่วนผสมของ Tergitol®7 เป็นอินดิเคเตอร์ในการยับยั้ง Gram-positiveซึ่งไม่มีผลกระทบกับกับเชื้อเป้าหมาย *E. coli*/coliforms ที่ทดสอบ CCA เป็นอาหารที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/coliforms ในตัวอย่างน้ำดื่มและผลิตภัณฑ์อาหาร

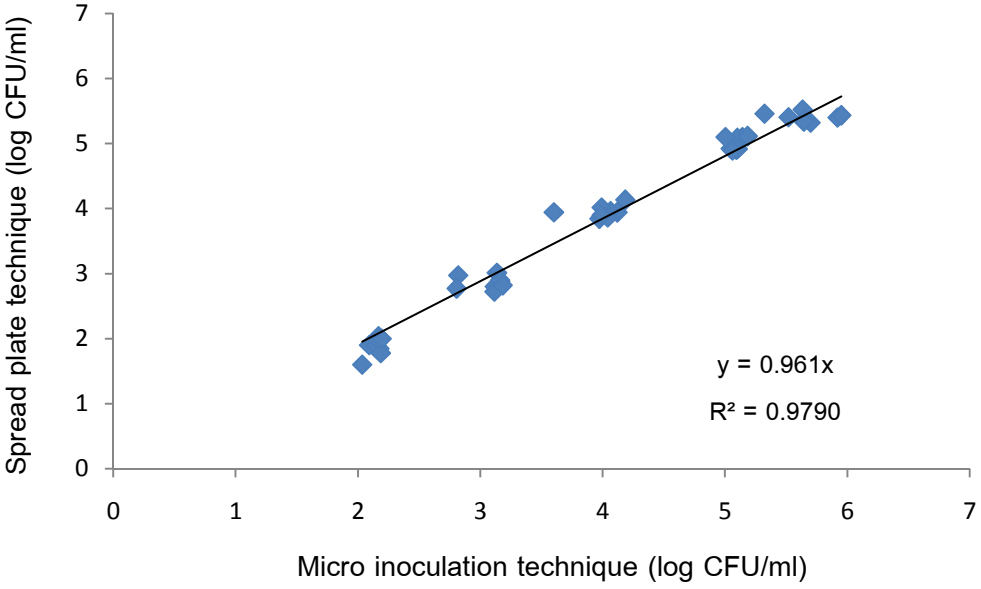
### 4.3.1 ผลการนับปริมาณด้วยการใช้เทคนิค 96-well microplate เปรียบเทียบกับเทคนิคที่เป็น standard protocol

เทคนิคการเพาะเชื้อขนาดเล็กใน microwell ทำให้สะดวกขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องมีการ dilition และตัวอย่างที่ swab จากสิ่งแวดล้อมเพื่อที่จะดำเนินการนำไปสู่การเตรียม dilution ที่เพียงพอที่ครอบคลุมความหนาแน่นของเซลล์ที่มีโอกาสที่จะมีซึ่งเราไม่ทราบจำนวนในตัวอย่าง ในสถานการณ์ระดับ

อุตสาหกรรมกรณีที่พบบ่อยๆ ที่พบว่าการทำ dilution ของตัวอย่างไม่เพียงพอเพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนมากค่อนข้างที่จะประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะตัวอย่างที่ต้องใช้อาหาร chromogenic agar เช่น CCA ซึ่งค่อนข้างมีราคาแพงเมื่อถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์แบบปกติที่มีการใช้กันอยู่ เพื่อเป็นการประหยัดอาหารดังกล่าว ทางโรงงานจึงทำการ dilution ตัวอย่างที่น้อย ทำให้บางครั้งไม่ทราบจำนวนจุลินทรีย์ที่แท้จริงเนื่องจากการทำ dilution ไม่คลอบคลุม ในการค้นหาวิธีการที่รวดเร็ว ง่าย และเป็นวิธีการที่มีความถูกต้องสูงเพื่อประเมินการนับปริมาณเชื้อในระดับอุตสาหกรรม และแทนที่วิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบัน การใช้ 96 – well microplate (ขนาด กว้าง 5 mm, ยาว 10 mm และหนา 1.5 mm) ถูกนำเสนอขึ้นมาเพื่อที่จะทำให้สะดวกขึ้น การวิเคราะห์ตัวอย่าง 96 ตัวอย่างถูกใช้เพื่อดำเนินการวิเคราะห์นับเชื้อ ที่ให้ผลสอดคล้องกับการใช้ 96 – Petri dish ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค conventional method (Supanivatin et al., 2010; SOUSA, 2005) การใช้รูปแบบ 96 – well ยอมให้ใช้ได้กับปิเปตแบบ multi-channel auto pipettes เพื่อที่จะลดเวลาในการดำเนินงานที่จะต้องมีการเติมซ้ำๆๆ กันและพัฒนาประสิทธิภาพการวิเคราะห์ทั้งหมด เพื่อที่จะ apply วิธีการของ MIC ที่ได้มีการ modified โดยการใช้ 10 μL ในการแทนที่กับวิธีการในปัจจุบันที่ยุ่งยาก ผลการนับโคโลนีด้วยเทคนิค MIC ที่ปริมาณเชื้อที่แตกต่างกันไปถูกนำมาเปรียบเทียบระหว่าง 2 เทคนิค ดังแสดงรูปที่ 4.21 สำหรับ MIC protocol ให้ผลทางสถิติที่สอดคล้องกับผลการนับปริมาณเชื้อในทิศทางเดียวกันเหมือนกับวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นวิธีมาตรฐาน ($p<0.05$) การประยุกต์ใช้ 10 μL ของปริมาณตัวอย่างที่ใช้สามารถถูกใช้เพื่อตัดสินใจความหนาแน่นของเซลล์ของตัวอย่างอาหารโดยปราศจากการประนีนอมการสอบเทียบกับวิธีการที่ได้มีการรายงานไปก่อนหน้านี้ (Rattanabumrung et al., 2011; Liamkaew and Thipayarat, 2009)




(a) MIC เปรียบเทียบกับ pour plate




(b) MIC เปรียบเทียบกับ spread plate

**รูปที่ 4.21** กราฟเปรียบเทียบการนับโคโลนีที่ได้จากเทคนิคที่แตกต่างกัน (เทคนิค spread plate, pour plate และ MIC) ที่ปริมาณของ *E. coli* ที่ต่างๆ กัน ($10^2$ - $10^6$ CFU/ml)

ในรูปที่ 4.21(b) แสดงความสัมพันธ์ของเทคนิคการนับปริมาณแบคทีเรียระหว่าง spread plate และ MIC ดูเหมือนว่าการนับโคโลนีจะมีความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกว่าระหว่างเทคนิค pour plate และ MIC โดยให้ค่า $R^2$ ที่มาก ผลการนับปริมาณเชื้อที่แต่ละความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้ทำการ validated ให้ค่า variation ที่น้อยด้วยเหมือนกัน ผลการทดลองที่สอดคล้องกันระหว่าง spread plate และ MIC เทคนิค อาจจะถูกเป็นอนุพันธ์จากความจริงที่ว่าทั้งคู่โคโลนีโตบนพื้นฐานที่ surface เดียวกันที่ซึ่งแต่ละโคโลนีมีการฟอร์มตัวโตขึ้นมาจากเซลล์เดี่ยวบนผิวของ agar เงื่อนไขการเจริญเติบโตถูกเหมือนกับในเทอมของความสามารถในการละลายของออกซิเจนและความสามารถในการเข้าถึงได้ของสารอาหาร ด้วยเหมือนกันคุณสมบัติทางกายภาพอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่ยอมให้เซลล์มีการใช้ oxidative การผสมกลมกลืนของสับเสตรทเท่าที่จะเป็นไปได้ ในทางตรงกันข้าม ตัวอย่าง inoculums ในวิธีการ pour plate ถูกเป็นวิธีการแรกในการมีผลต่อตัวอย่างที่ใส่ลงไปซึ่งจะมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากอุณหภูมิในขั้นตอนการผสมกับ agar ที่อุ่นเพื่อทำการ pour plate บางทีเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนร้อนได้อาจจะได้รับบาดเจ็บหรือถูกกำจัดจากกลุ่มของแบคทีเรียที่จะทำการนับ โดยส่วนมากการกระจายตัวของเซลล์บนผิว agar เพลท ถูก submerged อยู่ข้างล่าง agar และมีการครอบคลุมที่ดีไปด้วยกับ agar ซึ่งความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายลงไปและการขยายตัวของโคโลนีเป็นลักษณะจมทำให้การพัฒนาของโคโลนีเป็นไปได้ช้า (APHA, 2001; Hoben and Somasegaran, 1982) การฟอร์มของโคโลนีโดยทั่วไปด้วยเทคนิค pour plate ได้เป็นโคโลนีเล็กที่ได้จากที่เวลาการบ่มเดียวกัน ดังนั้นการ variation ของ pour plate ค่อนข้างมากและผลของการนับ deviated จากเทคนิค MIC

ในกลุ่มของบุคลากร QC&QA ของโรงงานอุตสาหกรรมเป็นบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับความสะดวกในการใช้และประสิทธิภาพของโปรโตคอลถูกดำเนินการโดยการใช้ MIC protocol เปรียบเทียบกับ 2 วิธีการที่เป็นมาตรฐาน กลุ่มผู้ร่วมเข้าอภิปรายหลักมีการให้ผล positive สะท้อนกลับเพราะการใช้ MIC ในตอนแรกโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพิเศษถ้าโรงงานเหล่านั้น นักวิเคราะห์จุลชีววิทยามีการดำเนินงานที่มีการใช้ pour plate เป็นวิธีการที่เป็น routine อยู่ก่อนหน้านั้นแล้ว (following ด้วยวิธีการ ISO โดยส่วนมาก) ที่ปริมาณของเซลล์น้อยมากๆ การประมาณของโคโลนีจากเทคนิค MIC สามารถมีปัญหาเป็นเรื่องของจำนวนของโคโลนีที่นับได้ในตัวอย่าง เป็นผลให้มีระดับปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ที่ (i.e., 2 log CFU/ml) ในสถานการณ์นี้ เทคนิควิธีการวิเคราะห์อื่นๆ ยอมให้ตัวอย่างที่มาก (e.g., เทคนิค pour plate ใช้ตัวอย่าง 1 ml) ข้อเสียของเทคนิค MIC ที่ปรากฏเป็นปริมาณของ inoculums ที่ใช้น้อย และมีความ sensitivity ที่น้อยที่ความเข้มข้นของเชื้อน้อย พื้นที่ของ agar ที่ 50.28 $mm^2$ ของ microwell สามารถที่จะยอมรับปริมาณของตัวอย่างที่

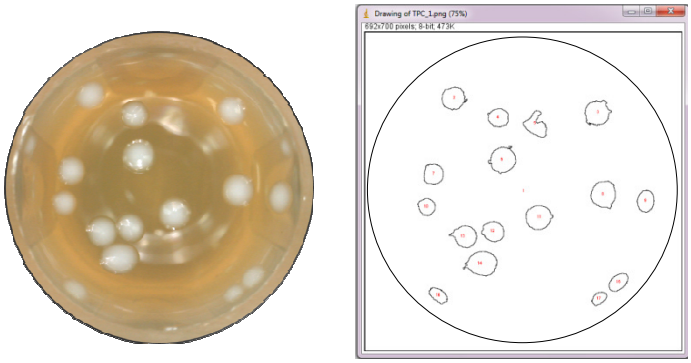
เหมาะสมประมาณ 10 μl ได้รูปแบบการวิเคราะห์ MIC มี limit detection อยู่ที่ 2 log CFU/ml โดยเป็นปริมาณเริ่มต้นที่จะสามารถตรวจนับได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับที่ 1 log CFU/ml ในวิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน จำนวน order ของ magnitude ให้ lower sensitivity ทำให้ protocol นี้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีระดับการปนเปื้อนน้อยซึ่งเป็น signification ที่สำคัญ

สำหรับการทดสอบจุลชีววิทยาหลักรวมถึงการวิเคราะห์ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม โปรโตคอล MIC นี้อย่างไรก็ตามเพียงพอสำหรับการ application และสามารถอ่านผลในโรงงานอุตสาหรรมอีกมาก เทคนิคดังกล่าวได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีโดยคนทำงาน เนื่องจากสะดวกในการประเมินค่าการอ่านในการตรวจสุขลักษณะและเป็นการวัดผลปริมาณเพื่อยืนยันความสะอาดจากการล้าง ประโยชน์หลักของเทคนิค MIC เหนือการใช้เทคนิคในระดับเชิงการค้าและวิธีมาตรฐานที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เป็นการลดพื้นที่ในการดำเนินงานและการบ่มได้อย่างดี และเป็นการประหยัด agar และการใช้เพลท การเตรียม การทำความสะอาดเครื่องแก้วและการใช้อุปกรณ์ที่มีปริมาณมากถูกลดลง ใช้หลอดแก้วเพื่อการทำเจือจางน้อยลง ปริมาณ agar ที่ใช้น้อยและมีประสิทธิภาพในการขนถ่ายของเหลวที่สูงด้วยระบบการใช้ autopipette

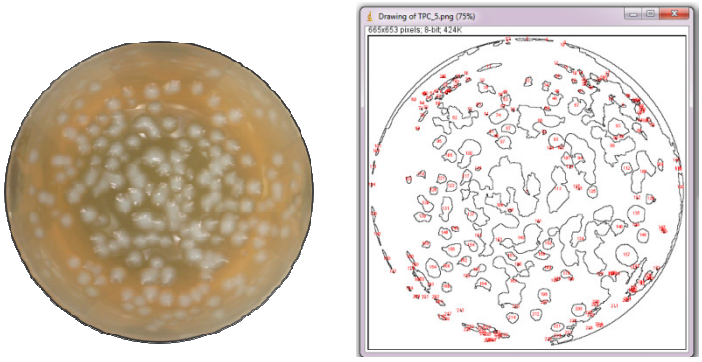
### 4.3.2 การวิเคราะห์ภาพถ่ายด้วยโปรแกรม ImageJ (digital imagery analysis) สำหรับการนับปริมาณแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว

#### 4.3.2.1 การประยุกต์ใช้ระบบการนับด้วย automated ของการนับโคโลนีแบคทีเรียบนผิว PCA agar

การวิเคราะห์ในระดับ microscale ของโคโลนี *E. coli* บนอาหาร PCA ที่ใช้ 96-well microtiter plate ถูกแสดงดังรูปที่ 4.22 การใช้รูปแบบการวิเคราะห์ขนาดเล็กยอมให้สามารถทำซ้ำได้มากและสามารถทำ dilution ได้อย่างกว้างขวางมากกว่าการใช้เทคนิค petri dish การให้ผลที่มีประสิทธิภาพสูงและสะดวกในการขนย้ายของเหลวด้วยการใช้ปิเปตแบบ multichannel และอุปกรณ์ plasticware ที่เกี่ยวข้องเพื่อให้สะดวกในการนำ application ของการวิเคราะห์ด้วยภาพถ่ายมาใช้การนับจำนวนแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้การนับโคโลนีที่มีความถูกต้องของโคโลนีที่มีการฟอร์มตัว จะต้องไม่เกินกว่าความสามารถของการใช้โปรแกรม image analysis ในการวิเคราะห์ รูปที่ 4.20b แสดงให้เห็นข้อจำกัดของของการใช้โปรแกรม image analysis ที่ใช้ ImageJ สำหรับการนับปริมาณโคโลนี เมื่อโคโลนีมีการกระจายเกะกะยุ่งเหยิงและไม่มีการกระจายตัวที่ดี การใช้ดิจิตอลในการเปลี่ยนแปลงรูปภาพของโคโลนีเป็นจำนวน ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการ defined เป็นพื้นที่ของโคโลนี และให้ผลการนับที่ผิดพลาด



(a) โคโลนีที่มีการกระจายตัวดี



(b) โคโลนีที่มีการกระจายตัวไม่ดี

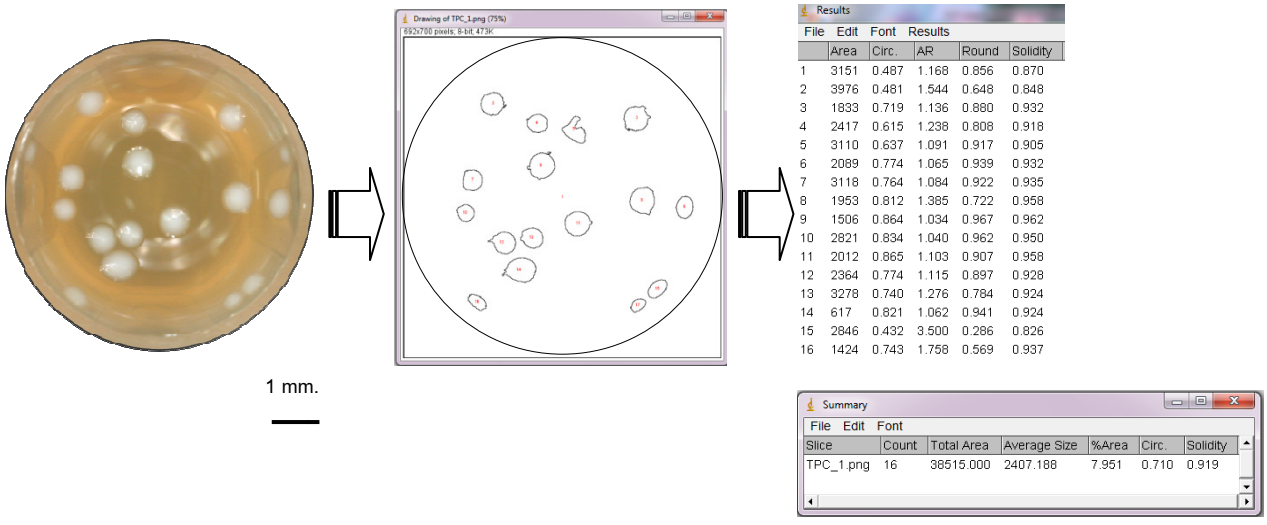
**รูปที่ 4.22** ภาพการวิเคราะห์โคโลนีแบบดิจิตอลที่แสดงผลของการกระจายตัวของโคโลนีบนผิว agar ที่มีผลต่อความถูกต้องของการนับด้วยโปรแกรม ImageJ

*E. coli* เป็นรูปแบบ model ของการติดเชื้อที่ถูกนำมาประเมินการทดสอบความเร็วของการนับโคโลนีบนอาหาร PCA ดังแสดงในรูปที่ 4.22 โดยรูปแรก 4.22(a) แสดงให้เห็นการกระจายตัวของโคโลนีที่ dilution ที่เหมาะสมของการใช้เทคนิค MIC ที่ได้มีการถูกเลือกมา การใช้เทคนิค MIC เหมาะสมกับตัวอย่างที่ให้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ไม่ทราบช่วงของ dilution และเลือกภาพที่มีการกระจายตัวของโคโลนีที่เป็น uniformly เมื่อนั้นรูปภาพจะถูกวิเคราะห์โดยการใช้โปรแกรม ImageJ โดยขั้นตอนแรกจะเป็นการปรับสีของรูปโดยการเปลี่ยนเป็น grayscale ด้วยคำสั่ง “Conversion…” ก่อนที่จะเลือก “scale when converting.” เมื่อนั้นรูปภาพในสภาวะ grayscale ถูก digitized เป็น 16-bit format อย่างทางเลือกของคำสั่ง ‘‘Threshold . . .’’

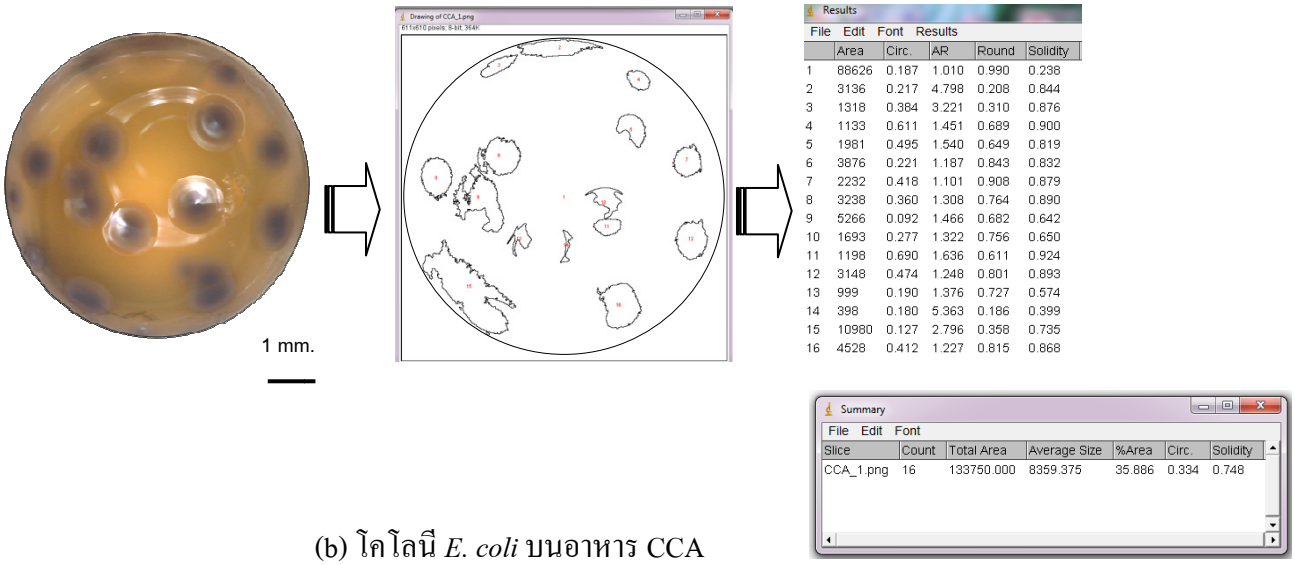
สามารถถูกใช้เพื่อปรับและแยก background พื้นจากโคโลนีซึ่งเป็นที่น่าสนใจ จากนั้นใช้คำสั่ง ‘‘Analyze Particles . . .’’ การวิเคราะห์ด้วย Image J analysis ตามลำดับขั้นตอนของการดำเนินงานสามารถ fine tuned โดยการปรับความกลมและขนาดของ pixel ในการวัดเพื่อการนับที่แตกต่างชัดเจนจากพื้นกับขนาดที่มีความจำเพาะของรูปร่างและขนาดของพื้นที่ สำหรับการนับ paticles ถูก set ที่น้อยกว่า 100 pixels (ขนาด area pixel ที่เล็กกว่าเป็นเรื่องของ noise ที่ปรากฏ)

#### 4.3.2.2 การประมวลผลการนับโคโลนีแบบอัตโนมัติของ *E. coli* และcoliforms ด้วยโปรแกรม ImageJ

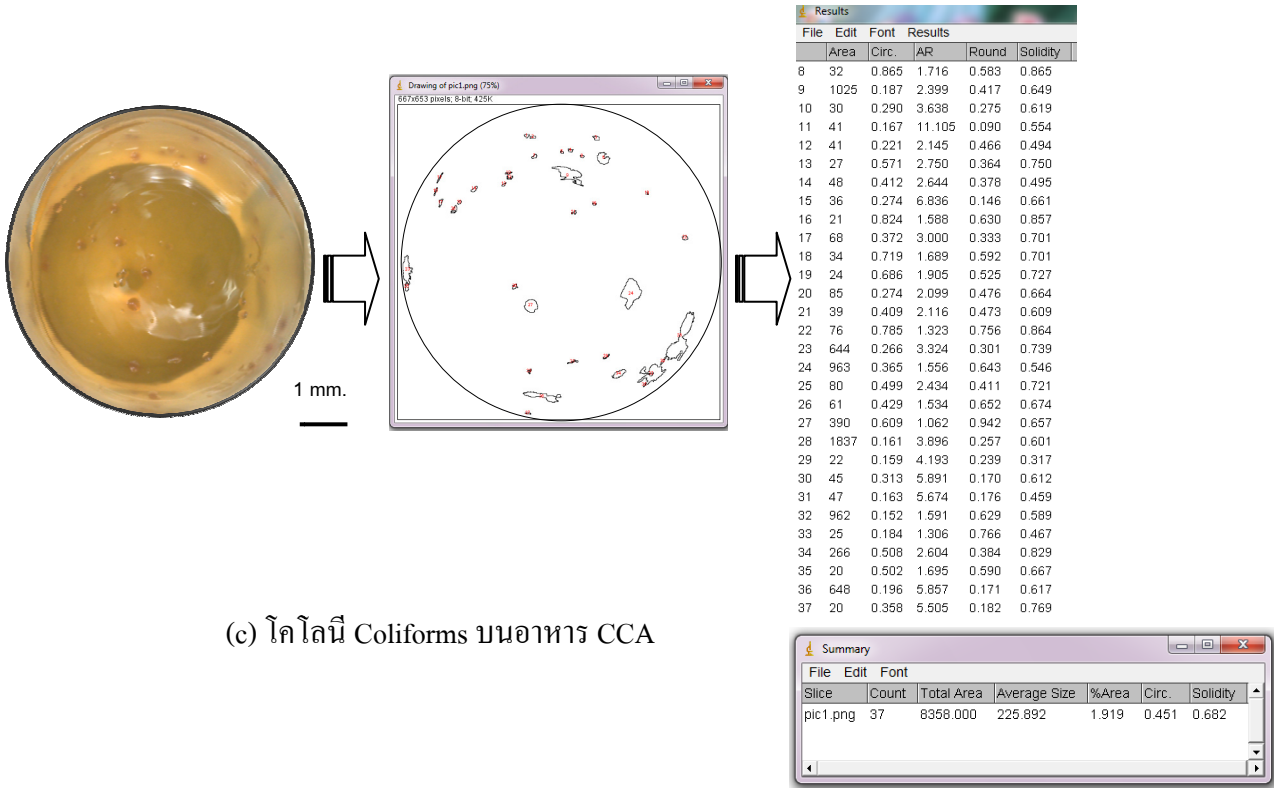
การพัฒนารูปแบบการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทำให้เป็นไปได้ในการที่จะประมาณการนับโคโลนี *E. coli* ที่เป็นรูปภาพบนอาหาร PCA และ CCA agar รูปที่ 4.23 โคโลนีสีขาวบนอาหารที่มีพื้นน้ำตาลสว่างของ PCA ถูกง่ายในการดำเนินการมากกว่าในการการใช้ background ของ CCA ที่เป็นโคโลนีสีดำ purple โดย CCA นี้เป็นที่รู้จักกันดีของอาหาร chromogenic สับเสตรทที่มีการเติม X-glucuronide (จากสี dark blue ไปเป็นสีม่วงของ *E. coli* ) และ salmon-GAL (จากสีแดงสำหรับ coliform) (Corry et al., 2003; Curiale et al., 1991) คุณสมบัติที่จำเพาะของสีโคโลนี *E. coli* สามารถที่จะrefined ต่อได้และทำการแยกจาก strains อื่นๆ อย่างเช่น coliforms บนอาหาร CCA โดยการใช้ 96-well format รูปแบบการนับโคโลนีโดยใช้โปรแกรม Image J code ดำเนินการได้อย่างประสบผลสำเร็จบนอาหาร media ทั้งคู่กับการยอมรับในความถูกต้อง




(a) โคโลนี *E. coli* บนอาหาร PCA




(b) โคโลนี *E. coli* บนอาหาร CCA



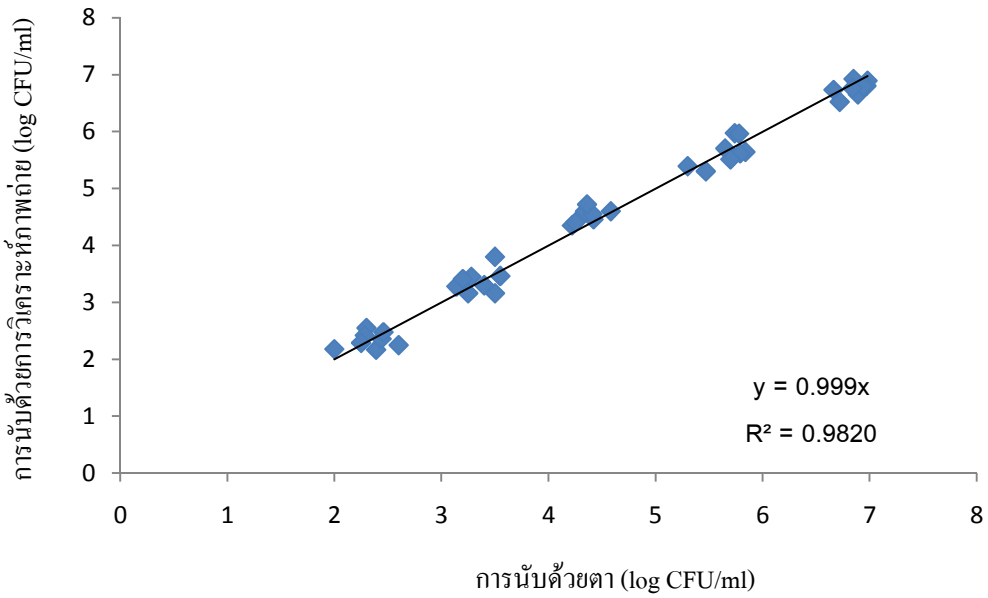

(c) โคโลนี Coliforms บนอาหาร CCA

**รูปที่ 4.23** การวิเคราะห์การนับโคโลนีด้วยโปรแกรม ImageJ โดยมีขั้นตอนของการ capture ภาพโคโลนี จากนั้นแปลงจาก analog ให้อยู่ในรูปของ digital image conversion เพื่อแสดงสัญญาณและประมาณการนับโคโลนีจาก signal

ถึงแม้ว่าการนับโคโลนีแบบการใช้สายตา (manual) จะให้ค่าความถูกต้องมากกว่า แต่การดำเนินการดังกล่าวใช้เวลานานและไม่เป็นที่พึงต้องการของพนักงาน ในปัจจุบันมีเครื่องนับโคโลนีเชิงการค้าแต่ราคาของอุปกรณ์เหล่านั้นแพงและมีความสิ้นเปลืองสูง (Monis and Hallas, 2015; Grishagin, 2015; Putman et al., 2005) คุณภาพของภาพโคโลนีและการกระจายตัวของโคโลนีที่ฟอร์มมีผลอย่างสำคัญต่อการนับของโคโลนีด้วยเหมือนกัน การพัฒนา image analysis protocol ร่วมกับการใช้เทคนิค MIC เป็นอะไรที่ more practical ในการใช้ในระดับอุตสาหกรรมมาก ด้วยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องของงบประมาณและการติดตั้ง ระบบมีต้นทุนต่ำเหมาะกับตัวอย่างเมื่อมีปริมาณของเซลล์ต่อรูปภาพมากหรือมีรูปภาพจำนวนมากเพื่อที่จะต้องดำเนินการวิเคราะห์ มีการพัฒนางานจำนวนมากในการที่จะนับโคโลนีแบบอัตโนมัติโดยการใช้โปรแกรม Image J software (Brugger et al., 2012; Clarke et al., 2010; Chen and Zhang, 2009) ตัวอย่างที่มีการเก็บสะสมเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะประยุกต์เป็นตัวบ่งชี้ indicator ที่แข็งแรงของเทคโนโลยี เป็นงานวิจัยหรือเครื่องมือทางอุตสาหกรรมเพื่อการโปรโมทวิธีการวิเคราะห์ที่เร็วและรูปแบบ protocol ที่ง่ายในการนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการดำเนินงานดังกล่าวจะต้องถูกดำเนินการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างเพียงพอ เป็นผลให้เป็นที่พึงพอใจในการยกระดับมาตรฐานนานาชาติสำหรับการสอบเทียบ (Monis and Hallas, 2015)

**4.3.2.3 การเปรียบเทียบระหว่างการนับโคโลนีโดยการใช้โปรแกรม ImageJ และการใช้สายตามนุษย์**

เพื่อที่จะประเมินประสิทธิภาพของวิธีการที่นำเสนอ รูปจำนวน 40 ภาพของโคโลนี *E .coli* ในแต่ละ well ถูกนำมาประเมินประสิทธิภาพ ด้วยการนำมาประมวลผล digitized และนับโคโลนีแบบอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการนับด้วยสายตาโดยเจ้าหน้าที่ชำนาญการ รูปที่ 4.24 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีระหว่างการนับด้วยการใช้สายตาและการใช้ digital counting เทคนิค ที่ให้ค่า $R^2 = 0.9820$ ค่าทั้งหมดเป็น 95% การทำนายภายใน การวิเคราะห์ทดสอบทางสถิติของค่าเฉลี่ยและ variance ของการนับโคโลนีจาก 2 เทคนิค การวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 วิธีการที่นำเสนอ (Student's *t*-test: $P = 0.241$, *F* test: $P = 0.466$) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ 1 ชี้ให้เห็นว่าการนับด้วย digital counting จากเทคนิค image analysis มีประสิทธิภาพที่ดีใกล้เคียงกับการใช้สายตาในการนับโคโลนี *E. coli*




**รูปที่ 4.24** กราฟเปรียบเทียบการนับปริมาณเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิคการนับด้วยตา (manual counting) กับการนับด้วยการวิเคราะห์ภาพถ่าย (digital counting)

**ตารางที่ 4.1** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการนับปริมาณแบคทีเรียจากภาพถ่ายโคโลนี 40 ภาพ

| | | **Min** | **Max** | **Std.** | **Avg.** |
|---|---|---|---|---|---|
| เทคนิคการนับ | precision | 0.89 | 0.99 | 0.025 | 0.97 |
| ด้วยการ | sensitivity | 0.88 | 1 | 0.028 | 0.96 |
| วิเคราะห์ | F-measure | 0.90 | 0.99 | 0.024 | 0.96 |
| ภาพถ่าย | APE* | 0.22% | 13.28% | 3.58% | 3.15% |

APE = absolute percentage error

ความถูกต้อง, ความไว, F-measure และ เปอร์เซ็นต์ absolute error ของวิธีการที่นำเสนอถูกนำมาตัดสินใจในวัสดุและวิธีการ ในตารางที่ 4.1 ค่าเปอร์เซ็นต์ absolute error เป็น 3.15% ชี้ให้เห็นว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน และผลสอดคล้องดีกับนักวิจัยก่อนหน้านี้

**4.3.2.3 ผลของการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อทั้งหมดและการนับปริมาณ *E. coli*/coliforms ด้วยเทคนิค digital image analysis กับตัวอย่างอุตสาหกรรมอาหาร**

**4.3.2.3.1 การนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด**

3 เทคนิคการวิเคราะห์นับปริมาณเชื้อถูกประยุกต์ใช้ทดสอบกับตัวอย่างอุตสาหกรรมอาหาร (pour plate, spread plate, และ MIC/Image) โดยดำเนินการทดสอบกับตัวอย่างของโรงงานอุตสาหกรรม (ตารางที่ 4.2) วิธีการทดสอบที่ได้ถือเป็นการยอมรับ (ISO-approved) ของเทคนิค pour plate และ spread plate เทคนิคถูกเปรียบเทียบกับ MIC/Image J เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องของการนับโคโลนี ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองสอบเทียบวิธีการวิเคราะห์ ก่อนหน้านี้ (หัวข้อ 3.4) เทคนิคการวิเคราะห์ของ pour plate, spread plate และ MIC/ImageJ เทคนิคทั้ง 3 สามารถที่จะ produce ให้ผลปริมาณโคโลนีที่เหมือนกัน จำนวนของโคโลนีใน spread plate และ MIC treatment ซึ่ง favored กับ oxidative pathways แสดงให้เห็นปริมาณของแบคทีเรียที่มากขึ้นโดยมีปริมาณโคโลนีที่นับได้มากกว่าวิธีการ pour plate (APHA, 2001; Hoben and Somasegaran, 1982)

**ตารางที่ 4.2**เปรียบเทียบการนับปริมาณเชื้อทั้งหมด (total plate count) ด้วยเทคนิค pour plate, spread plate และ MIC/ImageJ ที่มีต่อตัวอย่างอาหาร

| ตัวอย่าง | No. | ปริมาณเชื้อทั้งหมด (log CFU/ml) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Pour plate | Spread plate | MIC/ImageJ |
| ผัดไท | 1-5 | ND[a] | ND[a] | ND[a] |
| | 6 | TNTC[a] | TNTC[a] | 4.84±0.15 |
| | 7 | 2.39[a]±0.12 | 2.42[a]±0.14 | 2.53[a]±0.11 |
| | 8 | 2.75[a]±0.07 | 2.85[a]±0.15 | 2.82[a]±0.09 |
| | 9 | 3.06[a]±0.12 | 3.15[a]±0.07 | 3.19[a]±0.12 |
| | 10 | 2.79[a]±0.23 | 2.85[a]±0.14 | 2.84[a]±0.13 |
| | 11 | 2.47[a]±0.15 | 2.55[a]±0.14 | 2.57[a]±0.11 |
| | 12 | 2.83[a]±0.08 | 2.89[a]±0.12 | 2.93[a]±0.12 |
| ข้าวผัดหมู | 1-11 | ND[a] | ND[a] | ND[a] |
| | 12 | 2.83[a]±0.09 | 2.88[a]±0.14 | 2.94[a]±0.13 |
| | 13 | 2.62[a]±0.06 | 2.69[a]±0.09 | 2.73[a]±0.11 |
| | 14 | 2.55[a]±0.14 | 2.59[a]±0.10 | 2.57[a]±0.12 |
| | 15 | 2.65[a]±0.13 | 2.63[a]±0.09 | 2.69[a]±0.12 |
| วัตถุดิบแต่งหน้าเค้ก | 1-11 | ND[a] | ND[a] | ND[a] |
| | 12 | 2.83[a]±0.08 | 2.88[a]±0.12 | 2.89[a]±0.05 |
| | 13 | 3.12[a]±0.09 | 3.08[a]±0.08 | 3.03[a]±0.16 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 14 | 3.26[a]±0.16 | 3.24[a]±0.15 | 3.29[a]±0.13 |
| | 15 | 2.92[a]±0.04 | 3.11[a]±0.08 | 3.16[a]±0.10 |
| | 16 | 3.11[a]±0.13 | 3.23[a]±0.11 | 3.28[a]±0.21 |

[a] สัญลักษณ์ที่ปรากฏในแถวต่างกันแสดงว่าค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ND = ไม่พบการปนเปื้อน; TNTC = ปริมาณเชื้อมากเกินไป

ในตัวอย่างส่วนมาก ปริมาณเซลล์ที่นับได้ด้วยเทคนิค MIC/ImageJ, pour plate และ spread plate ให้ผลที่สอดคล้องไปในแนวทางเดียวกัน นอกจากนี้ไม่พบ (Not detected) ปริมาณเชื้อในตัวอย่างผัดไท ตัวอย่างที่ 1 – 5 ผัดซีอิ๊วหมู ตัวอย่างที่ 1 – 11 และวัตถุดิบแต่งหน้าเค้กตัวอย่างที่ 1 – 11 ถูกได้รับโดยไม่คำนึงถึงความแตกต่างในปริมาตรของ inoculums (1 ml ของเทคนิค pour plate, 0.1 ml ของเทคนิค spread plate และ 0.01 ml ของเทคนิค MIC/ImageJ) โดยทั่วไปที่ปริมาณของตัวอย่างมาก ควรที่จะสามารถ provide ความไวได้ดีกว่าเพราะปริมาณตัวอย่างมากกว่าถูกรวมอยู่ใน protocol การทดสอบ (APHA, 2001) สำหรับตัวอย่างผัดไท ตัวอย่างที่ 6 จำนวนของโคโลนีที่ได้รับจากวิธีการวิเคราะห์แบบ standard เทคนิค แสดงให้เห็นปริมาณเชื้อที่มากเกินไป Too Numerous To Count (TNTC) เพราะการทำ dilution ของตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม เทคนิค MIC/ImageJ ได้แก้ปัญหาข้อเสียดังกล่าวโดยสามารถทำ dilution ได้กว้างเพียงพอและทำให้เป็นไปได้ในการเป็นรูปธรรมในการนับโคโลนี

**4.3.2.3.2 การนับเชื้อ *E. coli* และ *coliforms* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร**

เนื่องจากการปนเปื้อนของ *E. coli* และ coliforms ในตัวอย่างโรงงานอุตสาหกรรมพบค่อนข้างน้อย การนับโคโลนีถูกดำเนินการกับตัวอย่างอาหารแช่แข็งสำเร็จรูปที่ได้มีการ screen ก่อนหน้านี้แล้วและมีการ rejected โดยการใช้ Petrifilm™ kits (ตารางที่ 4.3) การใช้เทคนิค pour plate ถูกตรวจสอบความถูกต้องของผลที่เป็น positive ด้วยเทคนิค Petrifilm™ kits และ เปิดทางให้มีการสอบเทียบความถูกต้องของเทคนิคผลของ MIC/ImageJ ในการ detecting ตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วย coliforms การปนเปื้อนของ *E. coli* ไม่พบในระหว่างการดำเนินการวิจัย ผลวิเคราะห์จุลินทรีย์เป็น “Not detected” คือตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่าง และมีเพียงตัวอย่างส้มตำที่มีการปนเปื้อนของ coliforms การนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิค MIC/ImageJ ให้ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน

**ตารางที่ 4.3**ผลการนับโคโลนีเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค pour plate กับ MIC/ImageJ บนอาหาร CCA ที่ได้มีการทดสอบกับตัวอย่างอาหารจำนวน 18 ตัวอย่าง

| ตัวอย่าง | No. | โคลิฟอร์ม (log CFU/ml) | |
|---|---|---|---|
| | | **Pour plate** | **MIC/Image J** |
| ผัดไท | 1-5 | ND[a] | ND[a] |
| ข้าวผัด | 6-12 | ND[a] | ND[a] |
| ส้มตำ | 13 | 2.56[a]±0.12 | 2.68[a]±0.09 |
| | 14 | 2.79[a]±0.18 | 2.85[a]±0.23 |
| | 15 | 2.94[a]±0.09 | 3.15[a]±0.17 |
| | 16 | 2.53[a]±0.15 | 2.62[a]±0.10 |
| | 17 | 3.29[a]±0.17 | 3.54[a]±0.18 |
| | 18 | 2.92[a]±0.20 | 3.16[a]±0.11 |

[a] สัญลักษณ์ที่ปรากฏในแถวต่างกันแสดงว่าค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$

**4.3.2.3.3 การนับเชื้อ *E. coli* และ *coliforms* ในตัวอย่าง swab จากอุปกรณ์ต่างๆ**

การนำเสนอเทคนิค MIC/ImageJ สามารถที่จะทำให้สะดวกและง่ายขึ้นในการดำเนินการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีวิทยาที่เป็นกิจวัตรของกระบวนการผลิตและการตรวจสอบความสะอาดจัดให้เหมาะเป็นประจำกับปริมาณตัวอย่างที่ได้จากการ swab แสดงในตารางที่ 4.4 ผลของจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละตัวอย่างโดยใช้ 2 วิธีเปรียบเทียบกันด้วยการใช้ t-tests พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเทคนิควิธีการ pour plate และ MIC/Image J สำหรับตัวอย่างโดยส่วนมาก ปริมาณเซลล์ที่นับได้ของ pour plate และ MIC/ImageJ ให้ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน โคโลนีที่พบทั้งหมดเป็นสีชมพูแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างโดยส่วนมากแล้วมีการปนเปื้อนโดยเชื้อ coliforms หรืออาจเป็นไปได้ที่จะเป็น *E. coli* strains (Manafi, 2000) ตาม manual ของ CCA ได้ระบุว่า โคโลนีที่ฟอร์มตัวเป็นสีชมพูเหมือนกันสามารถที่จะเป็นเชื้อ pathogen ที่เป็น *E. coli* O157:H7 ได้เช่นกัน อย่างโดยทั่วไป MIC/Image J technique จะให้ปริมาณเชื้อ CFU ที่มากกว่าเทคนิค pour plate

**ตารางที่ 4.4** การนับโคโลนี *E. coli*/coliforms ของตัวอย่างที่ได้จากการ swab สิ่งแวดล้อมซึ่งถูกทดสอบโดยการใช้เทคนิค pour plate เปรียบกับเทคนิค MIC/ImageJ

| ตัวอย่าง | Coliforms (log CFU/ml) | |
|---|---|---|
| | Pour plate | MIC/ImageJ |
| โต๊ะสแตนเลส | 3.62[a]±0.15 | 3.79[a]±0.22 |
| เครื่องปั่น | 3.54[a]±0.16 | 3.68[a]±0.13 |
| เขียง | 3.55[a]±0.15 | 3.69[a]±0.18 |
| กะละมังสแตนเลส | 3.46[a]±0.18 | 3.54[a]±0.25 |
| เครื่องชั่ง | 3.65[a]±0.20 | 3.74[a]±0.16 |
| ตะแกรงแยก | 3.68[a]±0.13 | 3.78[a]±0.24 |

[a] สัญลักษณ์ที่ปรากฏในแถวต่างกันแสดงว่าค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$

ข้อมูลที่ได้รับจากเทคนิค MIC/image J ปรากฏค่าที่สูงกว่าเทคนิคการตรวจนับด้วยสายตา แต่อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย โดยค่าที่แตกต่างกันอาจเป็นความผิดพลาดเล็กน้อยเนื่องจากการ combination ของ analog เป็น digital image processing และขั้นตอนวิธีในการวิเคราะห์ particle ด้วย image J software การประมาณค่าที่ต่ำไปหรือมากเกินไปของการนับโคโลนีสามารถที่จะชดเชยระหว่างการแปลงเป็นตัวเลขของโคโลนี (การเปลี่ยนสีไปเป็น grayscale image, การแก้ปัญหาหรือลงมติของ digitization และการปรับคุณภาพของ digitized colony image) แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างปริมาณเล็กน้อยระหว่าง การใช้ software-assisted และการใช้สายตาในการนับและการเรียนรู้ประสบการณ์การใช้ software และ image processing protocol ถูกเป็นการแลกเปลี่ยนโดยความเร็วของการนับโคโลนีและความสามารถในการจัดการกับตัวอย่างปริมาณมากในตัวอย่างที่มาจากสิ่งแวดล้อม ความจริงของความถูกต้องของการนับโคโลนีถูกให้ความสำคัญน้อยจากในมุมมองของโรงงานอุตสาหกรรมกว่าความถูกต้องในการตัดสินใจในระดับ order ของการนับโคโลนี (log CFU) ของความเข้มข้นของเซลล์และความสามารถหลายด้านของเทคนิค MIC/imageJ ที่ครอบคลุมกับปริมาณ dilution ที่มาก

### 4.4 การตรวจนับยีสต์และราในระดับอุตสาหกรรมด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อขนาดเล็ก

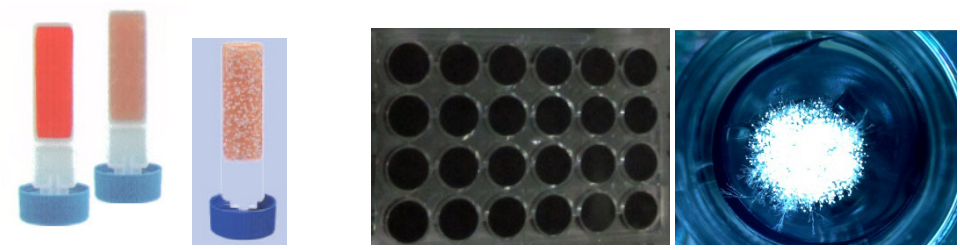
จุลินทรีย์ยีสต์และรา เป็นกลุ่มจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่โรงงานให้ความความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ การการตรวจสอบนับปริมาณยีสต์และราในอาหารไม่ว่าจะเป็นเครื่องปรุงต่างๆ ที่ใช้ประกอบอาหาร (food ingredients) อาหารที่ผ่านกรรมวิธีการผลิต (processed food) หรือเครื่องดื่ม นับเป็นส่วนสำคัญและเป็นสิ่งจำเป็นในการประเมินและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ทั้งที่นำมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นจุลินทรีย์เริ่มต้น (starter culture) หรือหาปริมาณยีสต์และ

ราอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมัก ก็เป็นสิ่งจำเป็นในการควบคุมผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพที่ดีอย่างสม่ำเสมอ ยีสต์และราที่พบว่าปนเปื้อนในอาหารมีอยู่หลายสายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ตามปกติจะพบอยู่ในดิน ในอากาศ แล้วบังเอิญเข้ามาปนเปื้อนในอาหาร โดยผ่านเข้ามาทางวัตถุดิบ สารปรุงแต่ง เครื่องมือเครื่องใช้ ผู้ประกอบการ หรือสภาพบรรยากาศภายในบริเวณห้องที่ประกอบอาหารนั้นๆ ประกอบกับสมบัติที่ราและยีสต์สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้หลายอย่าง และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้เมื่อเข้ามาปนเปื้อนในอาหารแม้แต่ปริมาณน้อย ก็สามารถเจริญได้ดีและทำให้อาหารเสียได้ง่าย

การวิเคราะห์นับเชื้อยีสต์และราในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) ซึ่งกรรมวิธีดังกล่าวค่อนข้างที่จะยุ่งยาก ใช้อาหารจำนวนมาก สิ้นเปลืองวัสดุอุปกรณ์ นอกจากจะมีการใช้อาหารที่เป็น conventional method ดังกล่าวแล้ว บางครั้งทางโรงงานมีการใช้ commercial test kit ที่เป็นชุดทดสอบยีสต์และราสำเร็จรูป แต่อย่างไรก็ตามชุดทดสอบดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพง การจัดหาหรือจัดซื้อจึงไม่ได้มีการใช้บ่อยในโรงงานอุตสหกรรม ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวทางโรงงานจึงดำเนินสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์มาทดสอบในปริมาณน้อยทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะไม่ได้ผลวิเคราะห์ที่แท้จริง เนื่องจากตัวแทนของตัวอย่างที่วิเคราะห์มีจำนวนน้อย เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และลดค่าใช้จ่าย ทางคณะผู้วิจัยจึงนำเสนอระบบวิเคราะห์ miniaturized PDA ที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้

**4.4.1 รายละเอียดการทดลอง**

เทคนิคการวิเคราะห์เชื้อขนาดเล็ก (รูปที่ 4.25b) ถูกใช้เพื่อดำเนินการวิเคราะห์นับเชื้อยีสต์และราเปรียบเทียบกับเทคนิควิธีที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งเป็นการใช้ test kit (รูปที่ 4.24a) 2 เทคนิคการวิเคราะห์ดังกล่าวได้ถูกนำมาทดสอบกับตัวอย่างจริง ปริมาณของตัวอย่าง 10 $\mu$l ของในแต่ละ dilution ถูก spread ลงบน micro-well ของ agar สำหรับการเพาะเชื้อขนาดเล็ก (MIC) และส่วนการทดสอบด้วย test kit ดำเนินการจุ่ม test kit ลงในตัวอย่างเป็นเวลา 5 – 10 วินาที (การทดสอบเปียกหรือ spray ตัวอย่างลงบน test kit) และทำการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 30$^{\circ}$C เป็นเวลา 3 วัน และ 24 h โคโลนีจะมีการฟอร์มตัวและเปรียบเทียบผลการทดลอง



(a) (b)

**รูปที่ 4.25** ชุดอุปกรณ์ของแต่ละเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ยีสต์และรา (a) ชุดทดสอบ Easicult® Combi test kit (b) ชุดเทคนิค miniaturized PDA

### 4.4.2 ผลการทดลองและสรุปผล

เทคนิค miniaturized PDA เป็นรูปแบบการลดขนาดวิเคราะห์ลงโดยเป็นการใช้ 24-well microplate สำหรับประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมทั้งขนาดเล็กและกลางในประเทศไทย ผลค่า log CFU/ml จากเทคนิค miniaturized PDA ถูกประเมินดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** เปรียบเทียบผลการนับปริมาณยีสต์/รา ที่ได้จากเทคนิคการใช้ชุดทดสอบ test kit และเทคนิค miniaturized PDA

| ตัวอย่าง | จำนวนของยีสต์/รา (CFU/ml) | |
|---|---|---|
| | Test kit | MIC |
| 1-5 | $<10^2$ | $<10^2$ |
| 6 | $10^3$ | $3.91\pm0.03\times10^3$ |
| 7 | $10^3$ | $3.69\pm0.04\times10^3$ |
| 8 | $10^3$ | $3.48\pm0.04\times10^3$ |
| 9 | $10^3$ | $3.78\pm0.03\times10^3$ |
| 10 | $10^3$ | $4.93\pm0.06\times10^3$ |

สำหรับการนับโคโลนีด้วยเทคนิคที่นำเสนอเปรียบเทียบกับวิธีการที่เป็น commercial test kit จากการทดลองจะเห็นได้ว่าจำนวนโคโลนีของยีสต์/ราในตัวอย่างให้ค่าตัวเลขที่สูงกว่าวิธีการใช้ test kit ในการทดสอบ การเจริญเติบโตของโคโลนีซึ่งต้องการออกซิเจน (favored oxidative pathways) ให้ค่าการอ่านที่สูงกว่าของ test

kit (APHA, 2001; Buck and Cleverdon, 1960; Hoben and Somasegaran, 1982) แต่ถึงกระนั้นก็ตามค่าตัวเลขที่ได้เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติในระดับความเชื่อมั่นพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันของยีสต์และรา นำเสนอให้เห็นว่าโปรโตคอลเหล่านี้สามารถที่จะแทนที่วิธีการวิเคราะห์ที่โรงงานอุตสาหกรรมมีการใช้กันอยู่

# บทที่ 5

## สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่มร่วมกับการใช้อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นสำหรับเร่งการตรวจหาเชื้อ โดยชุดอุปกรณ์อุปกรณ์ต้นแบบกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นที่ใช้ศึกษาสามารถดำเนินการวิเคราะห์ในระดับ microscale ที่สามารถเร่งการตรวจหาเชื้อได้อย่างรวดเร็วและศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของกล้องด้วยการศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโตของเชื้อต้นแบบ *Listeria* spp. เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการบ่ม นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาความสามารถในการตรวจนับโคโลนีด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่นในการ capture ภาพรวมโคโลนีของชุดอุปกรณ์วิเคราะห์เชื้อ MIC เพื่อประมวลผลการนับด้วยโปรแกรม ImageJ (MIC/ImageJ) ที่ให้ค่าจำนวนโคโลนีสอดคล้องกับการนับด้วยสายตา นอกจากนี้รูปแบบการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียขนาดเล็กยังได้มีการประยุกต์ใช้กับการตรวจนับเชื้อยีสต์หรือราด้วยเช่นกัน โดยภาพรวมของผลงานวิจัยสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

ในการศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ด้วยกล้อง High magnification microscopy มี 3 ปัจจัยที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของ agar, สารอาหาร, และอุณหภูมิในการบ่ม สำหรับความเข้มข้นของ agar พบว่าการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ agar ที่ปริมาณต่างๆ ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ในขณะที่การศึกษาไนโตรเจนที่ปริมาณต่างๆ พบว่ามีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งถ้าความเข้มข้นของสารอาหารมากเกินไป อัตราการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. จะลดลง สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของคาร์บอนพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในการบ่มจาก 30°C ไปเป็น 40.5°C ได้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ในขณะที่อุณหภูมิการบ่ม 44°C ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว ดังนั้นโดยสรุปอุณหภูมิและสารอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. ในระดับการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก โดยสภาวะที่เหมาะสมที่เพิ่มประสิทธิภาพการบ่มที่ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อดีเป็นที่สภาวะความเข้มข้น agar ที่ใช้เป็น 1X, ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 2X, ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 2.5X, และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40.5°C ถูกเลือกมาเป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมในการที่จะตรวจพบการเจริญเติบโตของเชื้อได้เร็วเนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง

สำหรับในส่วนของการตรวจนับโคโลนี set กล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชชั่น Low magnification microscopy ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์นับโคโลนีที่บ่มเพาะด้วยเทคโนโลนีขนาดเล็ก 96-microtiter plate ที่ได้มีการสอบเทียบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์กับ standard method (pour plate และ spread plate) โคโลนีที่ได้จะถูกบันทึกเป็นภาพดิจิตอลด้วยอุปกรณ์ Low magnification microscopy จากนั้นแปลงภาพโคโลนีดังกล่าวเป็นข้อมูลตัวเลขด้วยโปรแกรม ImageJ การใช้เทคนิคการเพาะเชื้อขนาดเล็กร่วมกับภาพดิจิตอลโคโลนี (digital image analysis) เป็นเทคโนโลยีที่คุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์และเพียงพอในการแทนที่วิธีการตรวจนับด้วยสายตา (manual counting) ที่เป็น conventional method เทคนิคสำหรับการนับโคโลนี ด้วยระบบดิจิตอลสามารถแทนที่การใช้แรงงานจากคนในการนับออกไป การตรวจนับโคโลนี *E. coli*/coliform ถูกใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของระบบต้นแบบ เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวโรงงานอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่มี routine ของการตรวจสอบเชื้อที่บ่งบอกสุขลักษณะการผลิตและสุขอนามัยของพนักงาน ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนเพื่อให้ได้ผลคุณภาพที่เป็นความต้องการของมาตรฐานการผลิตอาหารที่มักระบุให้มีการวิเคราะห์เชื้อดังกล่าว โดยจากการทดสอบการนับโคโลนีในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารและตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อม (swab sampling) พบว่า เทคนิค MIC/ImageJ สามารถทำการอ่านปริมาณของ *E. coli*/coliform ที่เร็วและให้ผลการอ่านถูกต้องเมื่อเทียบกับวิธีที่เป็นมาตรฐานการยอมรับ การใช้เทคนิค MIC ร่วมกับการใช้ digital microscopy ไม่เพียงแต่ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์และลดค่าใช้จ่ายของอาหาร CCA ที่แพง แต่มันยังสามารถลดเวลาในการนับจำนวนโคโลนีจาก 48 – 72 ชั่วโมง เหลือเพียง 12 – 14 ชั่วโมง นอกจากนี้ด้วยแนวคิดการเพาะเชื้อขนาดเล็กที่ประสบความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *E. coli*/coliform นวัตกรรมดังกล่าวยังให้ผลสำเร็จในการประยุกต์ใช้นับปริมาณยีสต์/รา โดยสามารถให้ผลการนับโคโลนีสอดคล้องกับวิธีการที่ทางโรงงานใช้กันอยู่

ด้วยความสามารถรอบด้านของเทคนิคการนับโคโลนีด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยในการใช้การ image analysis software รวมถึงโปรแกรม Image J การทำงานร่วมกันระหว่าง MIC และ Image analysis software สามารถเพิ่มความท้าท้ายด้วยการประยุกต์ใช้กับสับเสตรทโครโมเจนิกอื่นๆ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ให้รูปร่างลักษณะของสีและโคโลนีที่แตกต่างกันไป การประยุกต์ใช้ในวงการยาเป็นอีกหนึ่งของอุตสาหกรรมที่สามารถนำนวัตกรรม digital image processing ที่พัฒนาไปประยุกต์ใช้เพื่อที่จะตัดสินใจการยอมรับความสามารถของแอนติไบโอติคจากการทดสอบในตัวอย่างคนไข้ โดยเป็นการศึกษาเคลียร์โซนบน agar เพื่อตัดสินใจเลือกเงื่อนไขสภาวะที่เหมาะสม ถูกต้อง เที่ยงตรงกว่าการใช้สายตาในการตัดสินใจ

# เอกสารอ้างอิง

กองสุขาภิบาล กระทรวงสาธารณสุข, คู่มือวิชาการอนามัยอาหาร, กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์องค์การ สงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2537

รศ.ดร.รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และ ดร.ไพศาล วุฒิจำนงค์, 2545, การประเมินอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร, เอกสารประกอบการสัมมนา-อบรมวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร

สุมณฑา วัฒนสินธ์, "การวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา", วารสารจาร์พา, 64 (มกราคม – กุมภาพันธ์ 2545)

American Public Health Association, 1995, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19th ed.), APHA, Washington, DC.

American Public Health Association, 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (4th ed.), APHA, Washington, D.C.

Anderson, J.M. and Baird-Parker, A.C., 1975, "A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype 1 in food", Journal of Applied Bacteriology, Vol. 39, pp. 111 – 117.

Anonymous, 1985, Standard methods for the examination of water and waste water (16th ed.), APHA, Washington, DC, pp. 886 - 899.

Anonymous, 1987, Australian Standard 1095, Microbiological Methods for the Dairy Industry, Standard Association of Australia, Sydney, Australia.

AOAC, Bacteriological Analytical Manual, 8th ed, Gaithersburg, MD.,: Association of Official Analytical Chemists, 1998

Bredie, W.L.P. and de Boer, E., 1992, "Evaluation of the MPN, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin", Journal of Food Microbiology, Vol. 161, pp. 197– 208.

Brugger, S.D., Aumberger, C.B., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U. and Mu¨ hlemann, K., 2012, "Automated counting on bacterial colony forming unit on agar plates", PLoS ONE, Vol. 7(3), pp. pe33695.

Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. and Estrada-Garcia, T., 2012, "Presence of faecal coliforms*, Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water", International Journal of Food Microbiology, Vol. 156, pp. 176–180.

Chen, W.B. and Zhang, C.C., 2009, "An automated bacterial colony counting and classification system", Information Systems Frontiers, Vol. 11(4), pp. 349 – 368.

Chenu, J.W., Pavic, A. and Cox, J.M., 2013, "A novel miniaturized most probable number method for the enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry-associated matrices", Journal of Microbiological Methods, Vol. 93, pp. 12-19.

Chiang, P., Tseng, M., He, Z. and Li, C., 2015, Automated counting of bacterial colonies by image analysis, Journal of Microbiological Methods, Vol. 108, pp. 74–82.

Chuenarrom; http://comdigest.blogspot.com/2015/10/imagej.html

Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. and Baird, R.M., 2003, "Handbook of culture media for food microbiology", Sara Burgerhartstraat, Amsterdam, The Netherlands.

Clarke, M.L., Burton, R.L., Hill, A.N., Litorja, M., Nahm, M.H. and Hwang, J., 2010, "Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies", Cytometry A77A(8), pp. 790–797.

Curiale, M.S., Sons, T. and McIver, D., 1991, "Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: collaborative study", Journal of AOAC International, Vol. 74, pp. 635–648.

Davies, E.R., 2000, "Image Processing for the Food Industry", World Scientific Publishing, Singapore, 289 p.

Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J. and Allen, M.J., 2000, "*Escherichia coli* : the best biological drinking water indicator for public health protection", Applied and Environmental Microbiology**,** Vol. 88**,** pp. 106 - 116.

Elliot, T. R. and Elmer, H. M., 2007, Listeria, listeriosis, and food safety, 3rd ed., CRC Press, USA, pp. 159-161.

Faust, S.D. and Hunter, J.V., 1971, "Organic Compounds in Aquetic Environment", Marcel Dekker, New York.

Feng, P.C.S. and Hartman, P.A., 1982, "Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 43, pp. 1320– 1329.

Firstenberg-Eden, R. 1985, "Electrical impedance method for determining microbial quality of foods", In: Hobermehl. K.O. (Ed.), Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology, Springer-Verlag, Berlin, pp. 679–687.

Fung, D. Y. C., 1992, "Historical development of rapid methods and automation in microbiology", Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, Vol. 1, pp. 1-14.

Gang, C., Strevett, K.A., 2003, "Impact of carbon and nitrogen conditions on *E. coli* surface thermodynamics, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 28, pp. 135-146.

Griffiths, M.W., 1997, "Rapid microbiological methods with Hazard Analysis Critical Control Point", Journal of AOAC International, Vol. 80, pp. 1143 – 1150.

Grishagin, I., 2015, "Automatic cell counting with Image", Analytical Biochemistry, pp. 473: 63–65.

Hoben, H.J. and Somasegaran, P., 1982, "Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 44(5), pp. 1246 – 1247.

Holah, J.T., Betts, R.P. and Thorpe, R.H., 1988, "The use of direct epifluorescent microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces", Journal of Applied Bacteriology, Vol. 65, pp. 215 – 221.

Jahne, B., HauBecler, H. and GeiBler, P., 1999, Handbook of Computer Vision and Application, Academic press, New York, 942 p.

Khueankhancharoen, J. and Thipayarat, A., 2011, "Application of modified drop plate technique (MDPT) and logistic model to optimize non-selective substrates for *Salmonella typhi* resuscitation", Asian Journal of Food and Agro-Industry, Vol. 4(06), pp. 349 - 358.

Liamkaew, R. and Thipayarat, A., 2009, "Effect of temperature and glucose concentration on colony surface growth of *Escherichia coli* using image analysis technique", The 10th Annual Conference of Thai Society of Agricultural Engineering, "International Conference on Innovations in Agricultural, Food and Renewable Energy Productions for Mankind", School of Agricultural Engineering, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand; 1-3 April 2009.

Mahony, F., Green, R., Baylis, C., Fernandes, R. and Papkovsky, D., 2009, "Analysis of total aerobic viable counts in samples of raw meat using fluorescence-based probe and oxygen consumption assay", Food Control, Vol. 20, pp. 129-135.

McCarty, P.L., 1975, "Stoichiometry of biological reactions", Progress in Water Technology, Vol. 157, pp. 172.

McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S. and Zwietering, M.H., 2006, "Information systems in food safety management", International Journal of Food Microbiology, Vol. 112, pp. 181-194.

Monis, P. and Hallas, G., 2015, "Evaluation of heterotrophic plate and chromogenic agar colony counting in water quality laboratories", Methods, Vol. 10, pp. 1-8.

Nagel, F.J., Oostra, J., Tramper, J. and Rinzema, A., 1999, "Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate", Process Biochemistry, Vol. 35, pp. 69–75.

Paruch, A. and Maehlum, T., 2012, "Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment", Ecological Indicators, Vol. 23, pp. 140–142.

Putman, M., Burton, R. and Nahm, M.H., 2005, "Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit", Jounal of Immunological methods, Vol. 302(1–2), pp. 99–102.

Rattanabumrung, O., Sangadkit, W., Supanivatin, P. and Thipayarat, A., 2011, "Kinetics of *E.coli* colony area expansion and color development in Chromocult® Coliform Agar (CCA) under different incubation conditions", I-SEEC 2011 3rd International Science, Social Science, Engineering and Energy Conference 2011, Organized by Nakhon Pathom Rajabhat University (NPRU)", December 15 – 18, Bangkok, Thailand.

Ray Marsili, 1993, Water Activity, Food Product Design, December, www.foodproductdesign.com/archive/1933/1293QA.html

Robinson, T.P., Ocio, M. J., Kaloti, A. and Mackey, B. M., 1998, "The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*, International Journal of Food Microbiology, Vol. 44, pp. 83–92.

Saeaung, W., Boonyaprapasorn, A. and Thipayarat, A., 2010, "Digital image detection of *E. coli* micro image to accelerate aerobic plate count analysis", Food Innovation Asia Conference 2010 / ProPak Asia 2010 "Indigenous Food Research and Development to Global Market", June 17-18, 2010, BITEC, Bangkok, Thailand.

Sousa, G.B.D., Tamagnini, L.M., Gonzalez, R.D. and Budde, C.E., 2005, "Evaluation of Petrifilm™ method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat's cheese", Revista Argentina de Microbiologia, Vol. 37, pp. 214-216.

Stecchini, M.L., Del Torre, M., Sarais, I., Saro, O., Messina, M. and Maltini, E., 1998, "Influence of structural properties and kinetic constraints on *Bacillus cereus* growth", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, pp. 1075–1078.

Stecchini, M.L., Del Torre, M., Donda, S., Maltini, E., 2000, "Growth of *Bacillus cereus* on solid media as affected by agar, sodium chloride, and potassium sorbate", Journal of Food Protection, Vol. 63, pp. 926–929.

Stecchini, M.L., Del Torre, M., Donda, S. and Maltini, E., 2001, "Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus Cereus*", International Journal of Food Microbiology, Vol. 64, pp. 81–88.

Supanivatin, P., Khueankhancharoen, J., Saeaung, W., Boonyaprapasorn, A. andThipayarat, A., 2010, "Industrial implementation of fast total plate count analysis applying micro inoculation culture on frozen ready-to-eat food products", In Proceedings of International Conference for a Sustainable Greater Mekong Subregion, 26 - 27 August, Bangkok, Thailand (CD-ROM).

Suwansonthichai, S. and Rengpipat, S., 2003, "Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods", International Journal of Food Microbiology, Vol. 81, pp. 113– 121.

Turner, K.M., Restaino, L. and Frampton, E.W., 2000, "Efficacy of Chromocult coliform agar for coliform and *Escherichia coli* detection in foods", Journal of Food Protection, Vol. 63, pp. 539–541.

Venkateswaran, K., Murakoshi, A. and Satake, M., 1996, "Comparision of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods", Applied and Environment Microbiology, Vol. 62(7), pp. 2236–2243.

Walker, S.L., Brocklehurst, T.F. and Wimpenny, J.W.T., 1998, "Adenylates and adenylate-energy charge in submerged and planktonic cultures of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium", International Journal of Food Microbiology, Vol, 44, pp. 107–113.

Wang, X., Yamaguchi, N., Someya, T. and Nasu, M., 2007, “Rapid and automated enumeration of viable bacteria in compost using a micro-colony auto counting system”, Journal of Microbiological Methods, Vol. 71, pp. 1–6.

Wimpenny, J.W.T., Leistner, L., Thomas, L.V., Mitchell, A.J., Katsaras, K. and Peetz, P., 1995, “ Submerged bacterial colonies within food and model systems; their growth, distribution and interaction”, Int. J. Food Microbiol, Vol. 28, pp. 299–315.