รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ อีโคไล/คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้น สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของประเทศ

(Development of high throughput and rapid detection kits for *E. coli*/coliform and *E. coli* O157:H7 to assure pathogen-free in Thailand export food products)

ดร.อาณัติ ดีพัฒนา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802387
สัญญาเลขที่ 114/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ อีโคไล/คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้น สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของประเทศ

(Development of high throughput and rapid detection kits for *E. coli*/coliform and *E. coli* O157:H7 to assure pathogen-free in Thailand export food products)

ดร.อาณัติ ดีพัฒนา

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

กรกฎาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 114/2558

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.อาณัติ ดีพัฒนา ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ อีโคไล/คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้นสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของประเทศ (ภาษาอังกฤษ) Development of high throughput and rapid detection kits for *E. coli*/coliform and *E. coli* O157:H7 to assure pathogen – free in Thailand export food products รหัสโครงการ 2558A10802387 สัญญาเลขที่ 114/2558 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,100,000 บาท (หนึ่งล้านหนึ่งแสนบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 9 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2557 – วันที่ 30 มิถุนายน 2559) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อีโคไล/คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 เพื่อนำเสนอแนวทางวิธีการใหม่ๆ ที่สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงกับการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ของโรงงาน เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของบริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด เป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ของโรงงานให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สามารถจำหน่ายได้ทั้งภายในและส่งออกต่างประเทศ เพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและยกระดับให้กับผลิตภัณฑ์ของประเทศไทย โดยวิธีการที่คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาขึ้นนั้น คือ การพัฒนาเทคโนโลยีขั้นตอนการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาค Micro Inoculation Culture (MIC) ร่วมกับการประยุกต์ใช้ระบบการวิเคราะห์โดยใช้ภาพถ่าย (Image analysis) ที่กำลังขยายสูงสุด ทำให้สามารถเห็นโคโลนีภายในเวลาที่รวดเร็วทดแทนการใช้สายตามนุษย์ในการตรวจสอบซึ่งช้ากว่า เทคโนโลยีดังกล่าวจะช่วยเพิ่มความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์ในแง่ของราคาต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากต่อครั้ง ต้นทุนต่อตัวอย่างลดลงได้ถึงร้อยละ 83 เมื่อเทียบกับวิธีการดั้งเดิมที่ทางโรงงานใช้ในการวิเคราะห์คือ การใช้เทคนิค Pour plate โดยวิธีการที่ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาขึ้นนี้ สามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารเหลือเพียง 1 วัน จากเดิม 2 - 3 วัน อีกทั้งคณะผู้วิจัยได้ทำการคิดค้นวิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคในสายการผลิต (swab) ด้วยเทคนิค easy swab ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนโดยทำการสุ่มตัวอย่างจากคนงาน ภาชนะ เครื่องจักรและวิธีการทำความสะอาดในสายการผลิต เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดสุขอนามัยในการ

กระบวนการผลิตและความสะอาดทำให้ทราบถึงระดับการปนเปื้อน ด้วยเทคโนโลยีดังกล่าวจะเป็นประโยชน์กับโรงงานอุตสาหกรรมอาหารส่งออกทั้งระดับเล็ก-กลางในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ อีโคไล/คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 การเพิ่มความถี่ในการตรวจสอบเชื้อเหล่านี้ด้วยเทคโนโลยี MIC ที่นำเสนอจะเป็นยุทธศาสตร์ที่ดีในการประกันคุณภาพการผลิตและดำเนินตามนโยบายอาหารปลอดภัยของอุตสาหกรรมอาหารและเกษตรแปรรูปส่งออก ทางคณะผู้วิจัยหวังว่าแนวทางวิธีการวิเคราะห์ที่นำเสนอจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาพัฒนาและสร้างองค์ความรู้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารและยังสามารถใช้เป็นหนังสืออ้างอิงในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ รวมถึงการนำไปใช้งานของผู้ที่เกี่ยวข้อง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอต้นแบบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม โดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาค (micro inoculation culture) ซึ่งมีกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง (digital microscope) สำหรับเร่งการตรวจพบโคโลนี เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาคเป็นการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ได้ถูกพัฒนาจากเทคนิคการ spread plate โดยเป็นการปรับเปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์ของผิวหน้าเทคนิค spread plate อาหาร Chromocult®Coliform agar (CCA) ถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ โดยอาหารดังกล่าวมีส่วนผสมของโครมาเจนิกซับเสตรททำให้เกิดการฟอร์มตัวของโคโลนีสีม่วงซึ่งเป็นโคโลนีของ *E. coli* และโคโลนีสีชมพูหรือแดงที่อาจจะเป็นโคโลนีจาก *E. coli* O157:H7 ทั้งนี้ข้อด้อยของวิธีการที่นำเสนอเป็นการลดขนาดการวิเคราะห์โดยจำกัดปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ประมาณ 10 – 20 μl และให้ระดับปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ที่ปริมาณ 10^2 CFU/ml อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารโดยทั่วไปใช้ปิเปตแก้วซึ่งสามารถที่จะตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำสุดที่ประมาณ 10 CFU/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการนับปริมาณเชื้อจากทั้ง 2 วิธี พบว่าให้ผลที่สอดคล้องไปในแนวทางเดียวกัน โดยประสิทธิภาพของเทคนิคการลดขนาดการวิเคราะห์ สามารถที่จะจัดการกับปริมาณตัวอย่างจำนวนมากด้วยการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate ร่วมกับการใช้อุปกรณ์ลำเลียงตัวอย่างผ่าน multichannel pipette และติดตามการตรวจหาโคโลนีด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงร่วมกับการใช้อุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมที่ 37 °C สามารถให้ผลการวิเคราะห์ภายในเวลา 12 - 16 h อีกทั้งเมื่อทำการสอบเทียบวิธีการวิเคราะห์ที่ได้นำเสนอ (MIC) กับวิธีการที่ยังคงมีใช้ในปัจจุบันได้แก่ MPN method, Petrifilm™ by 3M และ pour plate ปริมาณโคโลนีที่นับได้จากผลิตภัณฑ์อาหารให้ผลที่เหมือนกันเป็นที่ยอมรับเมื่อเทียบกับวิธีการทางมาตรฐาน อีกทั้งผลการประเมินจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ QC ในการใช้เทคโนโลยีดังกล่าว ให้คะแนนเฉลี่ยความพึงพอใจในการใช้งานอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี pour plate ที่ทางโรงงานใช้ เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาคเพื่อการนับโคโลนีเหล่านี้สามารถใช้แทนที่วิธีการที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งมีความล่าช้าและยุ่งยาก อีกทั้งช่วยเพิ่มความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์ในแง่ของราคาต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง

คำสำคัญ : Chromocult®Coliform agar, โคลิฟอร์ม, ตัวอย่างจากวัสดุที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อม, *Escherichia coli*, เทคนิคการลดขนาดการวิเคราะห์, การนับโคโลนีอย่างรวดเร็ว

Abstract

This research aimed to propose efficient protocols to accelerate the colony count as well as *E. coli*/coliform and *E. coli* O157:H7 detection for industrial samples. Micro Inoculation Culture (MIC), together with digital microscopy, was utilized to expedite colony detection and economically improve the analytical cost per sample. Unlike medical samples from clinics, samples associated with food products and the environment they come into contact with during their processing are characterized by low initial cell counts and large sample volumes. This calls for different strategies of handling, especially in low-resource settings and in less advanced food industrial laboratories. This paper compares three popular industrial methodologies; MPN method, Petrifilm™ by 3M, and the standard pour plate technique, relative to a modified surface spread technique using 96-well U-bottomed polypropylene plate. The colony enumeration results obtained from each technique showed good agreement. The miniaturized rapid protocol efficiently managed a large number of samples using multichannel autopipettes and a high-throughput design utilizing 96-well microtiter plates. Useful colony counts were obtained within 12-16 h. The analytical efficacy of the miniaturized protocol surpassed those of the three conventional methods. The colony counts from ready-to-eat product samples showed comparable results to the pour plate technique, displaying good agreement with the universally-accepted standard. The feedback by QC staff from a local Thai food factory revealed good overall acceptance of the MIC method with respect to usability, protocol design and method efficiency. The proposed miniaturized technique gave highly consistent results of colony count numbers and good colony separation. This colony enumeration consistency suggests that the miniaturized rapid protocol can economically replace the slower more complex standard protocols as an in-house protocol for food processing environment swabs.

Keywords: Chromocult® Coliform agar, coliforms, environmental sample, *Escherichia coli*, practical miniaturized technique, rapid colony enumeration.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	IV
สารบัญเรื่อง	VI
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	IX
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	7
3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย	39
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	60
5 สรุปผลการทดลอง	109
เอกสารอ้างอิง	112
ภาคผนวก	118
ผลผลิต (output)	122
ประวัติคณะผู้วิจัย	123

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ *E.coli* ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน	64
4.2	แสดงปัจจัยของเทคนิค Spread plate, Petrifilm™EC plate, Pour plate และ MIC ที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการขยายตัวโคโลนีในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli*)	70
4.3	เปรียบเทียบปริมาณเชื้อของ *E. coli* ที่อุณหภูมิการบ่มต่างกันโดยใช้อาหาร CCA	72
4.4	จลนพลศาสตร์ต่อขนาดของโคโลนี *E. coli* บนอาหาร CCA ที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ	74
4.5	ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ Spread plate ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดใน ผลิตภัณฑ์อาหาร	79
4.6	ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหาร	80
4.7	ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ Petrifilm ต่อการวิเคราะห์ *E. coli* และ coliforms ในผลิตภัณฑ์อาหาร	83
4.8	ผลของการใช้เทคนิค Petrifilm และ Spread plate ต่อการวิเคราะห์ *E. coli* และ coliforms ในผลิตภัณฑ์อาหาร	84
4.9	ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์ *E. coli* และ coliforms ในผลิตภัณฑ์อาหาร	85
4.10	ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน *E.coli* ในห้องน้ำสำหรับพนักงานสายการผลิต	89
4.11	ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน coliforms ในห้องน้ำสำหรับพนักงานสายการผลิต	90
4.12	ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน *E.coli* ในสายการผลิตส้มตำ	92
4.13	ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน coliforms ในสายการผลิตส้มตำ	93
4.14	แสดงการเปรียบเทียบต้นทุนของการใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด	97
4.15	แสดงการเปรียบเทียบต้นทุนของการใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm™EC plate, Spread plate และ MIC ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรค	100
4.16	แสดงคะแนนการยอมรับเฉลี่ยของเทคนิคการวิเคราะห์ MIC เทียบกับวิธี Pour plate	101

ตารางที่ **หน้า**

ก.1 แสดงหัวข้อประเมินความพึงพอใจในการใช้งานระหว่างเทคนิคการวิเคราะห์ Pour plate เปรียบเทียบกับ MIC 119

ก.2 ตารางดัชนี MPN ซึ่งจะบอกจำนวน *E. coli*/coliforms ที่มีอยู่ในอาหาร 100 กรัม โดยค่าในตารางดัชนีเป็นค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งเป็นการประมาณทางสถิติถึงปริมาณโคลิฟอร์มที่น่าจะตรวจพบได้ในอาหาร (Most Probable Number per 100 g of sample) 120

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	เชื้ออีโคไลหรือคอลิฟอร์มที่มีแหล่งมาจากสัตว์เลือดอุ่นที่อาจจะพบการปนเปื้อนในอาหารเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อมน้ำ	10
2.2	แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม	11
2.3	แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรืออีโคไล (นิยมใช้ชื่อย่อ *E. coli*) แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มเป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์	13
2.4	*Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding)	13
2.5	ลักษณะสไลด์ที่มี counting chamber	16
2.6	Petroff – Hausser counting chamber	16
2.7	Counting chamber stage micrometer	17
2.8	ขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยวิธี Pour plate	18
2.9	วิธี pour plate	19
2.10	วิธีการ spread plate	19
2.11	วิธีการ drop plate	20
2.12	ขั้นตอนการทำและเชื้อจุลินทรีย์หลังการทำ membrane filtration	21
2.13	อาหาร Chromocult®coliform agar	31
2.14	Petrifilm^{TM} plates	32
2.15	แสดงกลไกการเกิดปฏิกริยาของสับสเตรทโครโมเจนิก	34
2.16	แสดงกลไกการเกิดปฏิกริยาของสับสเตรทฟลูโอโรเจนิก	35
3.1	กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงเพื่อการตรวจ detect การปนเปื้อนของ *E. coli*/coliform	43
3.2	ประเภทจานเพาะเชื้อ (ก) จานเพาะเชื้อแบบแก้ว, (ข) จานเพาะเชื้อแบบ 96-well U-bottomed polypropylene plate	46
3.3	อุปกรณ์สำหรับ swab แบบโรงงาน (ก) cotton swab, (ข) rack สแตนเลสใส่หลอดแก้วบรรจุสารละลายน้ำยาบัฟเฟอร์, (ค) ไฟแช็ค, (ง) ตะเกียงแอลกอฮอล์	48
3.4	อุปกรณ์สำหรับ swab แบบ easy swab	49

รูปที่		หน้า
3.5	วิธีการใช้อีซี่ swab โดยเปิดปากถุงแล้วใช้มือดันวัสดุสำหรับกวาดผิวหน้าตัวอย่างจากด้านล่างถุงดันขึ้นไปที่ด้านบน	50
3.6	การใช้อีซี่ swab : โดยการใช้วัสดุกวาดผิวหน้าของภาชนะขนาด 900 ตารางเซนติเมตร	51
3.7	96-well U-bottomed polypropylene plate ที่มี agar แข็งตัวแล้ว	55
3.8	การหยดตัวอย่างบน 96-well U-bottomed polypropylene plate ด้วยการใช้ Multichannel pipette	56
3.9	อาหารจำเพาะ biochemical broths ชนิดต่างใน 96 – well flat bottom microplate	58
4.1	96-well U-bottomed polypropylene plate สำหรับวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคโนโลยีการลดขนาดการวิเคราะห์	62
4.2	กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง (Digital microscope) สำหรับวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคโนโลยีการลดขนาดการวิเคราะห์	63
4.3	กราฟความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์นับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค (a) pour plate เปรียบเทียบกับ MPN, (b) Pour plate เปรียบเทียบกับ Petrifilm™ EC plate และ (c) Pour plate เปรียบเทียบกับ MIC	66
4.4	แสดงจลนพลศาสตร์ของการขยายตัวโคโลนีในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli*) โดยใช้ เทคนิค Pour plate (●), Spread plate (●, Petrifilm™ EC plate (▼)และ MIC (▼)	70
4.5	แสดงการขยายตัวของโคโลนีในระหว่างการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิการบ่ม 30, 35, 37, 40 และ 45 °C	73
4.6	เปรียบเทียบขั้นตอนการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคนิควิธีการในปัจจุบัน (conventional method) กับวิธีการที่นำเสนอ (proposed method)	76
4.7	ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ผัดไท (ก) เค้ก (ข) Topping (ค)	78
4.8	ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค ผัดไท (ก), ข้าวเหนียวมะม่วง (ข)	82
4.9	การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Pour plate (ก) เทียบกับการใช้ Petrifilm (ข)	83
4.10	การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Petrifilm (ก) เทียบกับการใช้ Spread plate (ข)	84
4.11	การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Petri film (ก) เทียบกับการใช้ MIC (ข)	85
4.12	อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการ Swab แบบวิธีดั้งเดิมของโรงงานบูโอโน่ (ก) Rack), (ข) ไม้ Cotton swab, (ค) ตะเกียงแอลกอฮอร์, (ง) ไฟแช็ค	88
4.13	อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการ Swab แบบอีซี่ Swab	88

รูปที่		หน้า
4.14	อุปกรณ์ในห้องน้ำชายและหญิงที่ได้ทำการ Swab (ก) บานประตูห้องน้ำ, (ข) ที่กดสบู่, (ค) ที่ล๊อกประตูห้องน้ำ, (ง) ที่จับสายชำระ, (จ) ฝารองนั่งชักโครก, (ฉ) ลูกบิดประตูห้องน้ำ, (ช) ที่กดน้ำโถปัสสาวะ	91
4.15	อุปกรณ์ในสายการผลิตส้มตำที่ทำการ Swab (ก) ม่านพลาสติก, (ข) ถุงมือพนักงานแพ็ค, (ค) ถุงมือพนักงาน, (ง) ด้ามตักเส้นมะละกอ, (จ) เครื่องชั่ง, (ฉ) หม้อปั่นแคลเซียม, (ช) กะละมังใส่เส้นมะละกอ, (ซ) ตะแกรงวางแพ็คส้มตำ, (ฌ)โต๊ะสแตนเลส	94
4.16	แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC	97
4.17	แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm™EC plate, Spread plate และ MIC	99
4.18	ลักษณะโคโลนีของ *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 ที่ปรากฏบนอาหาร CCA	102
4.19	ชุด miniaturized biochemical broths ที่ประกอบไปด้วยอาหารชนิดต่างๆ ซึ่ง *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 จะมีความสามารถในการใช้อาหารที่แตกต่างกัน	103
4.20	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตร ของเชื้อ *E. coli* ในอาหาร amino decarboxylation	104
4.21	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตร ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร amino decarboxylation	105
4.22	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* ในอาหาร sugar fermentable	106
4.23	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร sugar fermentable	107

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารขนาดใหญ่และโรงงานส่งออกอาหารและผลิตสินค้าแปรรูปเกษตรขนาดกลาง-เล็กในประเทศไทยล้วน**ประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร (Foodborne pathogen contamination) ในกระบวนการผลิตหรือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วยกันทั้งสิ้น เนื่องจากโรงงานผลิตอาหารในประเทศส่วนใหญ่ยังขาดการออกแบบระบบการผลิตที่เป็นไปตามสุขอนามัยการผลิตที่ดี (Good Hygenic Practice) ในขั้นตอนการออกแบบเริ่มสร้างโรงงาน และในแต่ละโรงงานมีความสามารถในการควบคุมระดับความปนเปื้อนมากน้อยขึ้นอยู่กับองค์ความรู้และเทคโนโลยีในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของแต่ละโรงงาน สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ในปัจจุบันส่วนใหญ่อาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อหรือชุดการตรวจวิเคราะห์สำเร็จนำเข้าที่มีราคาแพง ทำให้โรงงานอาหารส่งออกระดับเล็ก-กลางที่มีทุนน้อยไม่สามารถเพิ่มความถี่ในการตรวจวิเคราะห์ทั้งในผลิตภัณฑ์สุดท้ายและสุขอนามัยของกระบวนการผลิตได้ทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร** ดังที่มีตัวอย่างการระบาดทั้งในประเทศและต่างประเทศอย่างรุนแรงในหลายๆครั้งแม้ในประเทศที่พัฒนาแล้วอย่างเช่น สหรัฐอเมริกา ในช่วงฤดูหนาวปี 2007 โรงงานอเมริกัน ฟูดส์ กรุ๊ป ในเมืองกรีนเบย์ มลรัฐวิสคอนซิน ได้เรียกคืนเนื้อวัวบดจากตลาดจำนวนกว่า 43,000 กิโลกรัมจาสาเหตุการที่ผู้บริโภคทานเนื้อวัวบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อเชื้ออีโคไล (รูปที่ 1.1)

ก. เชื้ออีโคไล ข.เนื้อวัวบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้ออีโคไล

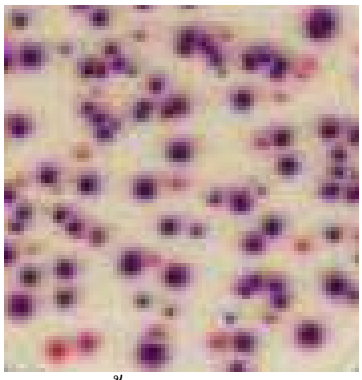
รูปที่ 1.1 เชื้ออีโคไลที่การปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมในการผลิตและตัวอย่างเนื้อวัวบดที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้ออีโคไล

แม้ในประเทศกลุ่มยุโรปเองก็มีการแพร่ระบาดของอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้ออีโคไลอย่างรุนแรงเช่นในเยอรมันนี เดือนพฤษาคม 2011 พบว่าพืชผักในตลาดมีการปนเปื้อนด้วยเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงผิดปกติทำให้มีคนตายอย่างน้อย 16 คนและพบผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงกว่า 1,150 คน แพร่กระจายใน 8 ประเทศของยุโรป ซึ่งจะเห็นถึงความร้ายแรงถึงชีวิตของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ทำให้ประเทศคู่ค้าหลายประเทศที่รับสินค้าอาหารหรือผลิตภัณฑ์เกษตรจากประเทศไทย กำหนดมาตรฐานให้ปลอดการปนเปื้อนของเชื้ออีโคไลในผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้เกิดการเผาทำลายหรือเรียกคืนสินค้าเหล่านั้น ถ้าการตรวจวิเคราะห์เชื้อในขั้นตอนการผลิตขาดประสิทธิภาพ

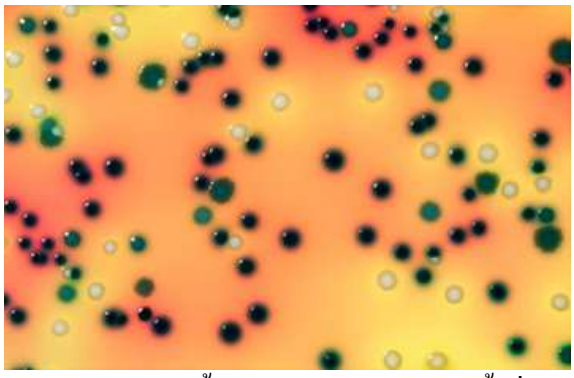
รูปที่ 1.2 ในปี 2011 พบการแพร่ระบาดของเชื้ออีโคไลอย่างรุนแรงเป็นประวัติการณ์ในสินค้าเกษตรที่จำหน่ายในยุโรปทำให้ผู้บริโภคเสียชีวิตและล้มป่วยเป็นจำนวนมาก

ในโครงงานวิจัยนี้จะนำเสนอแนวทางในการพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล 0157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารที่มีจำนวนมากในอุตสาหกรรมอาหารส่งออกซึ่งสามารถวิเคราะห์ตรวจหาเชื้อด้วยเวลาอันสั้น (รูปที่ 1.3) เทคโนโลยีนี้จะช่วยเพิ่มศักยภาพและความสามารถในการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าแปรรูปทางการเกษตรของประเทศ ลดการทำลายสินค้าที่ส่งออกเนื่องจากลูกค้าตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล0157:H7 ในสินค้าที่ลูกค้าปลายทาง**ทำให้สามารถสุ่มตรวจตัวอย่างสินค้าได้ปริมาณมากและทราบถึงผลการวิเคราะห์ด้วยเวลาที่เหมาะสมทำให้ทราบถึงปัญหาการปนเปื้อนของสินค้าก่อนส่งออกจากคลังสินค้า สามารถบ่งชี้ความสะอาดของกระบวนการผลิตและสุขอนามัยของพนักงานผลิต** ซึ่งเทคโนโลยีนี้จะทำให้อุตสาหกรรมอาหารของประเทศไทยลดความสุ่มเสี่ยงต่อการทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารซึ่งจะทำให้ประเทศคู่ค้าไม่มีความเชื่อมั่นในนโยบายอาหารที่ปลอดภัยในการบริโภค (Food Safety) ของประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อยุทธศาสตร์ในการเป็นครัวโลก (Kitchen of the World)

ของประเทศไทย และในที่สุดจะทำลายเศรษฐกิจพื้นฐานของประเทศซึ่งประชาชนส่วนใหญ่ที่ยังยากจน ประเทศขาดรายได้ ไม่สามารถประกอบอาชีพเกษตรให้เกิดผลกำไร และเกิดปัญหาทางสังคม เกิดการขยายช่องว่างระหว่างคนรวย-คนจนมากขึ้น ทำให้ประเทศขาดสเถียรภาพในที่สุด



ก) โคโลนีของเชื้ออีโคไลและคอลิฟอร์ม



ข) โคโลนีของเชื้ออีโคไล 0157:H7 และเชื้ออื่นๆ

รูปที่ 1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อโครโมเจนนิคในปัจจุบันสามารถแยกเชื้ออีโคไล คอลิฟอร์ม และอีโคไล0157:H7 ได้ซึ่งสามารถใช้ประกอบกับเทคโนโลยีชีวโมเลกุลสมัยใหม่เพื่อลดค่าใช้จ่ายและเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์

เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านราคาของอาหารและชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล 0157:H7ที่มีราคาสูง เช่น ชุดตรวจเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มสำเร็จของ 3M มีราคา 50-60 บาท อาหารเลี้ยงเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์ม Chromocult Coliform Agar (CCA) ราคา 10,000-15,000 บาทต่อ 500 กรัม อาหารเลี้ยงเชื้ออีโคไล O157:H7 ของ Bio-rad ราคา 26,000 บาทต่อ 500 กรัม ทำให้ต้นทุนการวิเคราะห์มีราคาสูงเนื่องจากตามหลักวิชาการในแต่ละตัวอย่างจะมีการทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง มีทั้งต้องมีการเจือจางให้เห็นความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการทดสอบและมีจำนวนพอเหมาะต่อการตรวจนับ ทำให้ในแต่ละตัวอย่างจำเป็นต้องใช้ชุดตรวจนับเชื้ออย่างน้อย 6 ชุด ดังนั้นค่าใช้จ่ายเบื้องต้นที่กล่าวมาข้างต้นจะเพิ่มเป็น 6 เท่าต่อตัวอย่างทันที นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายแฝงอีกจากค่าแรงที่เพิ่มขึ้นจากนโยบายเพิ่มค่าแรงของทางรัฐบาล และค่าใช้จ่ายอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องกับการทำงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เช่น ค่าไฟฟ้าจากตู้อบ ตู้เขี่ยเชื้อ ค่าน้ำล้างอุปกรณ์ ค่าเสื่อมจากอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่มีราคาสูงต่างๆ จากค่าใช้จ่ายที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ตรวจสอบเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล O157:H7 จึงทำให้โรงงานอาหารส่งออกระดับเล็ก-กลางลดการตรวจสอบการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต ทำให้ไม่ทราบถึงระดับการปนเปื้อนและความ

สกปรกในกระบวนการผลิต เป็นที่มาของปัญหาการปนเปื้อนของทั้งระบบทำให้เกิดความสูญเสียกับห่วงโซ่อุปทานของทั้งวงจรการผลิตอาหารของประเทศ

แนวทางการแก้ไขปัญหาคือการลดการสูญเสียอาหารเลี้ยงเชื้อราคาแพงอย่างเปล่าประโยชน์ ลดขนาดของชุดทดสอบเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และประยุกต์ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือชีวโมเลกุลสมัยใหม่ที่ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากต่อครั้งและสร้างอุปกรณ์ตรวจนับโคโลนีด้วยการวิเคราะห์ภาพเชิงดิจิตอลเพื่อให้ตรวจสอบได้เร็วกว่าสายตามนุษย์ ใช้เวลาน้อยและลดการใช้น้ำในการทำความสะอาดเป็นการอนุรักษ์ ลดการปล่อยเชื้อโรคและสารพิษลงสู่ท่อน้ำสาธารณะ และการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ทันสมัยเหล่านี้จะเป็นการลดการใช้แรงงานทักษะและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ภาพรวมได้ในที่สุด แบคทีเรียเป้าหมายในโครงงานวิจัยนี้เน้นกลุ่มที่เป็นดัชนีชี้วัดสุขอนามัยในการกระบวนการผลิตและความสะอาดของกระบวนการผลิต การปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอีโคไล/คอลิฟอร์มแสดงให้เห็นถึงการขาดการให้ความรู้กับพนักงานผลิตและขาดการดูแลความสะอาดสุขอนามัยของคนงาน ของเสียในลำไส้ของมนุษย์เป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อนทั้งเชื้ออีโคไล คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 การเพิ่มความถี่ในการตรวจสอบเชื้อเหล่านี้จะเป็นยุทธศาสตร์ที่ดีในการประกันคุณภาพการผลิตและดำเนินนโยบายอาหารปลอดภัยของอุตสาหกรรมอาหารและเกษตรแปรรูปส่งออก

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.2.1 ปรับปรุงวิธีการและเพิ่มประสิทธิภาพกรรมวิธีการตรวจสอบเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์ม และ อีโคไล O157:H7 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่มีจำนวนมากและรวดเร็วภายใน 1 วัน โดยให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำเทียบเท่าวิธีการมาตรฐาน

1.2.2 ปรับชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการตรวจนับการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารให้เหมาะกับการทำงานในโรงงานอาหาร เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล O157:H7 ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น

1.2.3 พัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตรวจนับการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาข้อจำกัดและความต้องการของโรงงานอุตสาหกรรม ข้อกำหนดต่างๆของลูกค้าในประเทศต่างๆ และความสามารถในการตรวจสอบความพร้อมของเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติมาตรฐานในอุตสาหกรรมอาหาร

1.3.2 ศึกษารูปแบบการวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและเชื้ออีโคไล O157:H7 เช่น Bacteriological Analytical Manual (BAM) และชุดตรวจวิเคราะห์ที่มีขายตามท้องตลาด นำมาใช้เป็นวิธีการมาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบในการศึกษาปัจจัยที่ใช้ในการเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่กล่าวมาข้างต้น โดยจะมีการพัฒนา

1.3.2.1 การประยุกต์ใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate แทนจานเพาะเชื้อแบบแก้ว ทำให้สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ถึง 96 ตัวอย่างทำให้สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากครั้งขึ้นและมีความถี่มากขึ้น สามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์อย่างมาก ในการประยุกต์ใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate จะมีการศึกษาเปรียบเทียบผลกับการใช้วิธีปกติที่เป็นจานเพาะเชื้อแบบแก้ว เพื่อสอบเทียบความถูกต้อง

1.3.3 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล O157:H7 ที่ใช้สูตรอาหารที่ได้มีการพัฒนากับวิธีการวิเคราะห์แบบปกติ (conventional method) เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (calibration) และความน่าเชื่อถือในการประยุกต์นำไปใช้งาน

1.3.4 ประยุกต์นำเทคโนโลยีวิธีการตรวจ detect การปนเปื้อนของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงทดแทนการตรวจนับด้วยสายตาหรือทดแทนการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์นำเข้าราคาแพง การใช้เทคโนโลยีดังกล่าวจะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วขึ้น

1.3.5 ศึกษาสภาวะแวดล้อมในการบ่มเลี้ยงเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มที่เหมาะสม โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

1.3.6 นำชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มและอีโคไล O157:H7 อย่างรวดเร็ว ไปทดลองใช้จริงที่ บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด เพื่อยืนยันผลความถูกต้อง โดยนำไปทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริงและตัวอย่าง swab จาก line การผลิต

1.3.7 ประเมินผลความพึงพอใจในการใช้รูปแบบวิธีการวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนาโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ QC&QA

1.3.8 ประเมินต้นทุนในการออกแบบและสร้างชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปอย่างรวดเร็ว และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารเพื่อการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยาของกระบวนการผลิตอาหาร

1.3.9 รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลการใช้ชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปที่ได้มีการสร้างและพัฒนาสำหรับการวิเคราะห์ตรวจนับจำนวนเชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์ม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์มที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากและรวดเร็ว โดยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์จากปกติ 2 - 3 วันให้เหลือภายในหลักชั่วโมง

1.4.2 ชุดตรวจสอบพร้อมอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำเหมาะกับการทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร สามารถลดปริมาณการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายลดลงถึง 10 เท่าของวิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม

1.4.3 สามารถอ้างอิงสอบเทียบกับวิธีการปัจจุบันซึ่งเป็นวิธีที่ลูกค้าของทางโรงงานให้การยอมรับ

1.4.4 ได้สิ่งประดิษฐ์ เครื่องจักร และผลงานวิชาการตีพิมพ์จากชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิเคราะห์เชื้ออีโคไล/คอลิฟอร์ม

1.4.5 มูลค่าเชิงเศรษฐศาสตร์จากการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพสู่ตลาดการค้าโลก

1.4.6 ลดการนำเข้าชุดตรวจสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

1.4.7 สามารถทดแทนแรงงานชำนาญงานที่ขาดแคลน

1.4.8 องค์ความรู้ใหม่เพื่อพัฒนาแนวความคิดในการสร้างชุดตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำและรวดเร็วกว่าวิธีการที่ใช้ในปัจจุบันโดยมีต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำและมีประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ ถูกต้อง แม่นยำสูง

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

2.1 อันตรายของความปลอดภัยในอาหาร (Food safety hazard)

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

2.3 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform

2.4 เทคนิคการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

2.5 กรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/coliform

2.6 การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157 :H7

2.1 อันตรายของความปลอดภัยในอาหาร (Food safety hazard)

ในการผลิตอาหารให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ผู้ผลิตจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจในเรื่องของอันตรายต่างๆที่มีโอกาสเกิดขึ้นกับผู้บริโภค เพื่อที่จะหาแนวทางหรือมาตรการควบคุมอันตรายที่เกิดขึ้นได้ คำว่า “อันตราย” หรือ “Hazard” หมายถึง สิ่งที่มีคุณลักษณะทางชีวภาพ เคมี หรือฟิสิกส์ที่มีอยู่ในอาหารหรือสภาวะของอาการที่มีศักยภาพในการก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพ อันตรายที่มีผลต่อความปลอดภัยของอาหารแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.1.1 อันตรายทางชีวภาพ (Biological hazard)

อันตรายทางชีวภาพหมายถึง อันตรายที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรคหรือผลที่ไม่ดีต่อสุขภาพ ได้แก่ จุลินทรีย์ ไวรัส และพาราไซต์ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ อันตรายเหล่านี้อาจมาจากวัตถุดิบ หรือปนเปื้อนจากขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิต ผู้ผลิตอาหารจึงควรมีความรู้ ความเข้าใจในเรื่องของอันตรายชีวภาพเหล่านี้และหาแนวทางการควบคุมให้เหมาะสม เพื่อป้องกันไม่ให้อันตรายเหล่านี้ปนเปื้อนไปสู่ผู้บริโภค

2.1.2 อันตรายทางเคมี (Chemical hazard)

การปนเปื้อนจากสารเคมีอาจเกิดขึ้นในทุกขั้นตอนของกระบวนการแปรรูปอาหาร สารเคมีบางอย่างเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องใช้ เช่น สารฆ่าแมลงที่ใช้กับผักผลไม้ แต่สารเคมีเหล่านี้จะไม่มีอันตรายถ้ามีการใช้และ

การควบคุมอย่างถูกต้อง ถ้าใช้สารเคมีโดยที่ไม่มีการควบคุมหรือไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำในการใช้จะเป็นการเสี่ยงต่อผู้บริโภค อันตรายที่เกิดจากสารเคมีนั้นจะมีลักษณะที่แตกต่างจากอันตรายชีวภาพ กล่าวคือ อันตรายชีวภาพเมื่อเกิดขึ้นก็มักจะมีการแพร่กระจายไปกับอาหารอย่างสม่ำเสมอและรวดเร็ว แต่อันตรายเคมีนั้นจะไม่มีการแพร่กระจายมากนัก ทำให้การสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจเช็คอันตรายเคมีไม่ได้ผล ดังนั้น มาตรการควบคุมอันตรายเคมีจึงเน้นการป้องกันในขั้นต้น และความถี่ในการตรวจเช็คเพื่อป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนต้องเพียงพอที่จะสามารถประกันความปลอดภัยของอาหารได้

ในการใช้สารเคมีนั้น ควรจะปรึกษาหารือกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมวิชาการเกษตร กรมปศุสัตว์ หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ว่าสารเคมีนั้นๆ ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้หรือไม่และหากได้รับอนุญาตก็ต้องดูว่าระดับหรือปริมาณที่อนุญาตให้ใช้เป็นเท่าไร

2.1.3 อันตรายทางกายภาพ (Physical hazard)

อันตรายทางกายภาพจะหมายถึงสิ่งปลอมปนหรือสิ่งแปลกปลอมในอาหารซึ่งตามปกติไม่ควรจะมีในอาหารประเภทนั้นๆ เช่น เศษโลหะ เศษไม้ เมื่อผู้บริโภครับประทานสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้เข้าไปจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บหรือเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ในการควบคุมอันตรายชนิดต่าง ๆ นั้น ต้องควบคุมตั้งแต่วัตถุดิบ องค์ประกอบต่าง ๆ วัตถุดิบจะต้องมี Specifications จดหมายรับรองคุณภาพและทางโรงงานต้องมีวิธีการตรวจรับที่ถูกต้องในกระบวนการผลิตก็ต้องจัดการในเรื่องหลักและวิธีการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices) สรรหาวิธีการและเครื่องมือที่เหมาะสมในการผลิตและในการกำจัดอันตรายต่าง ๆ ตัวอย่างของเครื่องมือที่ใช้ช่วยกำจัดอันตรายกายภาพแสดงไว้ในตารางตัวอย่างของอันตรายกายภาพและแหล่งของอันตราย

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

อาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนก่อนการแช่เยือกแข็ง ความร้อนที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิด และประเภทของอาหารที่ต้องการผลิต ซึ่งความร้อนที่ใช้อาจไม่พอทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบให้หมดไปได้ จึงต้องกำหนดคุณภาพของวัตถุดิบ การควบคุมการผลิต และสุขลักษณะที่ดีของการผลิต ซึ่งเป็นปัจจัยที่กำหนดการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์หรือการปนเปื้อนกลับ (Cross - contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการให้ความร้อน โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องในอาหารสำเร็จรูปแบ่งได้ดังต่อไปนี้

2.2.1 จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชอบเย็น (Psychrophiles) ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เมื่อเจริญในอาหารเกิดสารในกระบวนการสร้างและสลาย (metabolite) กรดอะมิโนในอาหาร แล้วให้สารประกอบพวกมาโลโดรัส (Malodorus) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดีในอาหาร โดยปกติถ้าควบคุมอุณหภูมิในการแช่เยือกแข็งอย่างมีประสิทธิภาพแล้วเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าอุณหภูมิการเก็บผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน จุลินทรีย์ดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมเสียได้

2.2.2 จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

การตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้แสดงให้เห็นว่า วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต มีคุณภาพไม่ดี หรือสุขลักษณะของแหล่งผลิตไม่ดี เชื้อในกลุ่มนี้ถ้าเจริญในผลิตภัณฑ์เป็นปริมาณมาก และผู้บริโภคใช้ความร้อนในการอุ่นไม่เพียงพอ อาจก่อให้เกิดอันตรายได้ เชื้อที่สำคัญได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonellae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*

2.2.3 จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสุขลักษณะ

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

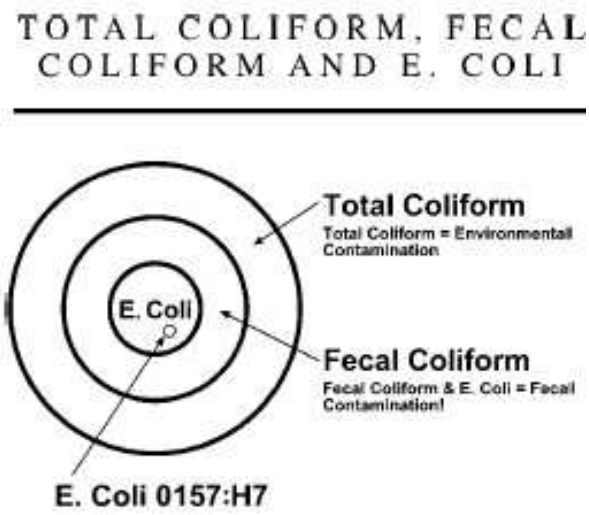
2.3 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform

โดยทั่วไปแบคทีเรียโคลิฟอร์มถูกใช้เป็นแบคทีเรียที่เป็นตัวบ่งชี้สุขลักษณะและความสะอาดของอาหารและน้ำ โดยรูปร่างของแบคทีเรียเป็นแท่งสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์แต่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสให้ผลพลอยได้เป็นกรดและแก๊ส ซึ่งสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิ 35 - 37°C (Anonymous, 1985; APHA, 1995) เชื้อ coliforms ถูกพบเป็นปริมาณมากในอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น แต่ก็ยังคงพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำด้วยเหมือนกัน ในดิน และพืชผัก แต่ในขณะเดียวกันตัวของเชื้อ coliforms เองโดยปกติก็ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคที่รุนแรงมากนัก เชื้อเหล่านี้สามารถที่จะเจริญเติบโตและการมีอยู่ของเชื้อดังกล่าวถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้เชื้อ

ก่อโรคชนิดอื่นของ fecal ที่อาจจะมีอยู่ เชื้อก่อโรคในกลุ่ม fecal ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย ไวรัส หรือโปรโตซัว และพาราไซต์อื่นๆ โดยเชื้อจำเพาะที่มีอยู่เป็นเชื้อ *Citrobacter*, *Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Serratia*

รูปที่ 2.1 เชื้ออีโคไลหรือคอลิฟอร์มที่มีแหล่งมาจากสัตว์เลือดอุ่นที่อาจจะพบการปนเปื้อนในอาหาร เนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อมน้ำ

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.*

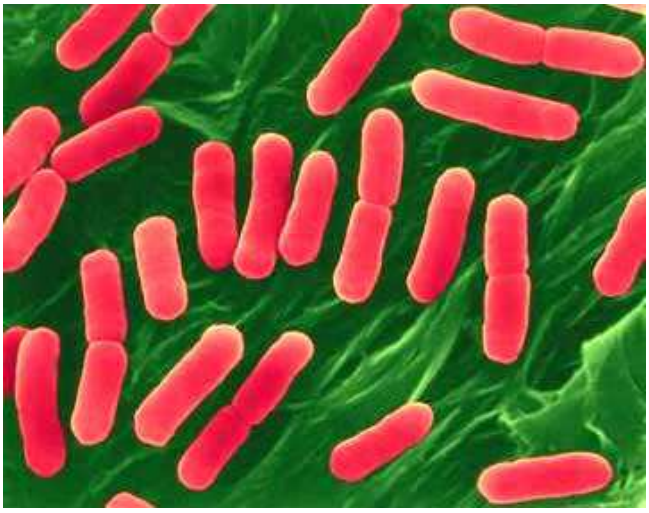
coli โดยส่วนใหญ่มาจากจากสายพันธุ์ที่จำเพาะของ *E. coli* ซึ่งเป็น *E. coli* O157:H7 เมื่อตัวอย่างอาหารหรือเครื่องดื่มถูกรายงานว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* มันไม่ได้หมายความว่าอันตรายจะเกิดขึ้นจาก strain ของ *E. coli* ในความเป็นจริง มันเป็นไปได้ที่จะไม่มีอยู่ของ O157:H7 อย่างไรก็ตาม ใช้บ่งชี้การปนเปื้อนของ fecal การรับประทานอาหารที่สุกหรืออาหารที่ผ่านการ treating จะสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* รวมถึง O157:H7 ได้

2.3.1 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

2.3.2 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

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

2.3.2.2 เอ็นเทอโรพาโธเจนิคอีโคไล หรือ อีเปค (Enteropathogenic *E. coli*: EPEC) มักก่อโรคในเด็กเล็กและพบได้บ่อยในประเทศกำลังพัฒนา ผู้ป่วยมักมีถ่ายเหลวเป็นมูก ถ่ายไม่มาก แต่มีอาการเรื้อรังได้นานเป็นเดือน ๆในเด็กที่เป็นนาน ๆ บางครั้งอาจเกิดภาวะขาดสารอาหารแทรกซ้อนได้

2.3.2.3 เอ็นเทอโรอินเวสีฟอีโคไล หรือ อีอิค (Enteroinvasive *E. coli*: EIEC) เชื้อกลุ่มนี้จะก่อโรคได้รุนแรงขึ้นโดยเชื้อบุกรุกผนังลำไส้ทำให้เกิดแผล ผู้ป่วยมักปวดเกร็งท้องมาก และอาจถ่ายเป็นมูกปนเลือดออกมาได้ แต่พบก่อโรคได้ไม่บ่อย

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

2.3.2.5 เอ็นเทอโรเฮโมราจิคอีโคไล หรือ อีเฮค (Enterohemorrhagic *E.coli*: EHEC) เป็นเชื้อที่ก่อโรคได้รุนแรงมากที่สุด อาการของผู้ป่วยมีความหลากหลาย ตั้งแต่ท้องร่วงถ่ายเหลวเป็นน้ำธรรมดา บางรายอาจถ่ายเป็นมูก แต่อาจมีผู้ป่วยบางส่วนที่อาการรุนแรงมากได้ 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) เรียก

รวมกันว่า กลุ่มอาการ "ฮีโมไลติค ยูเรมิค ซินโดรม" หรือ"เอชยูเอส" (Hemolytic uremic syndrome : HUS) ซึ่งถือเป็นภาวะที่รุนแรงมาก ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็วมาก

2.3.3 เชื้ออีโคไล O157:H7

เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ก่อโรคระบบทางเดินอาหารที่รุนแรง การระบาดของเชื้อนี้แต่ละปีมีผู้ติดเชื้อนับแสนคน อัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 1 อาการสำคัญคือ ท้องเสียชนิดอุจจาระมีเลือดปน บางรายมีอาการอุจจาระเป็นมูกเลือด และที่สำคัญคือ โรคนี้ทำให้เกิดภาวะไตวายร่วมด้วยได้บ่อยมาก โดยทั่วไปคนติดเชื้อโรคนี้จากการรับประทานอาหารที่ไม่สุก ส่วนใหญ่เป็นอาหารประเภทเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อวัว พบมีรายงานการระบาดของเชื้อ เชื้ออีโคไล O157:H7 จากการดื่มนมวัวที่ดิบ การเล่นน้ำหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อโรคชนิดนี้ และพบว่าเชื้ออีโคไล O157:H7 สามารถติดต่อจากคนสู่คนได้ รวมทั้งการระบาดในครอบครัวและสถานเลี้ยงเด็กอ่อน

2.4 เทคนิคการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

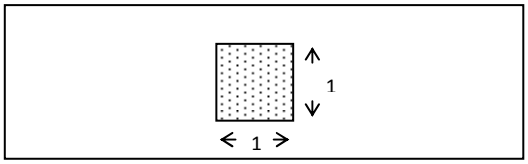
ในการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตทางอุตสาหกรรม การวิจัย การควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ การควบคุมคุณภาพน้ำและอาหาร สิ่งหนึ่งที่จะต้องศึกษาคือ การนับจำนวนจุลินทรีย์ การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ตั้งแต่จำนวนเซลล์เริ่มต้น จำนวนเซลล์ระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่เจริญได้ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี คือ

2.4.1 การนับโดยตรง (direct count) เป็นการนับจำนวนโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ มีหลายวิธี คือ

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

2.4.1.2 การนับเชื้อบนสไลด์ที่มี counting chamber สไลด์ที่มี counting chamber ได้แก่

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

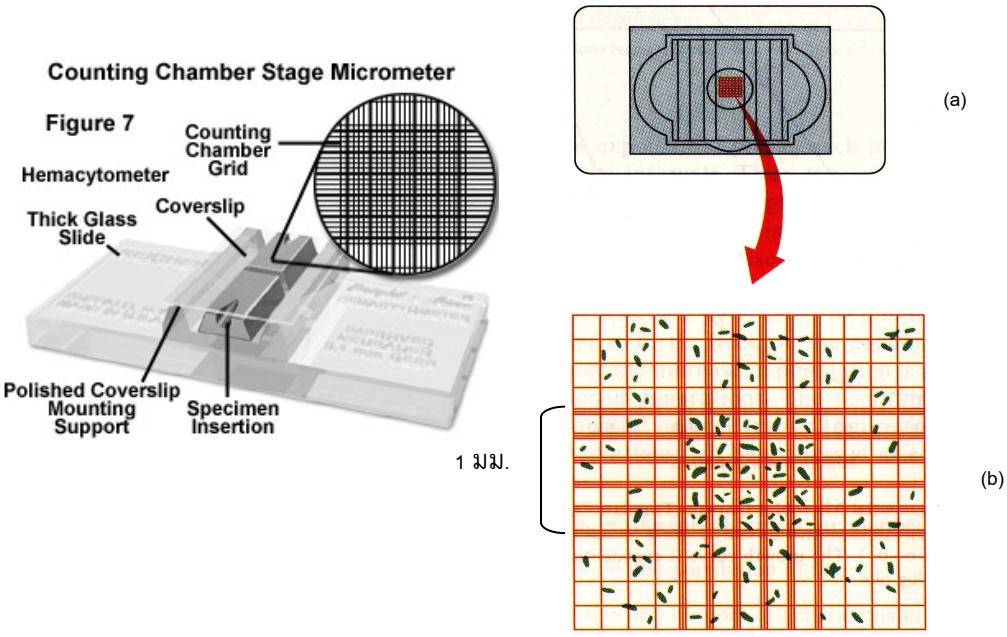


รูปที่ 2.5 ลักษณะสไลด์ที่มี counting chamber

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 2.6 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 2.7 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

2.4.2 การนับจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร

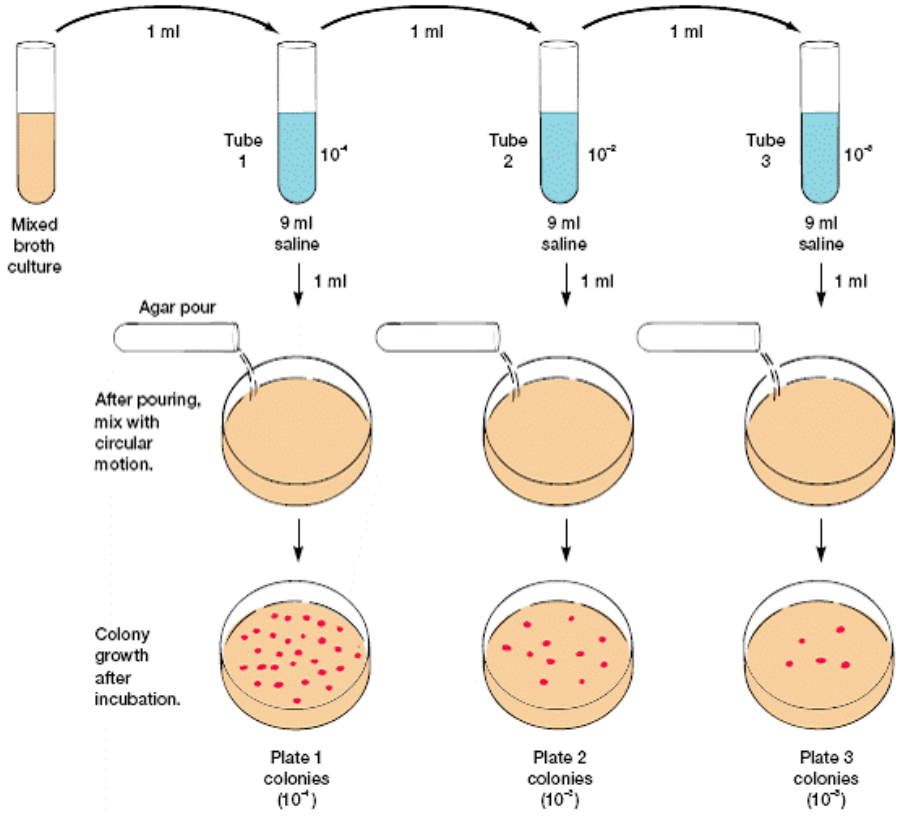
เป็นการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น (agar media) มาใช้ตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1800 ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี วิธีการดังกล่าวมีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่างคือ

(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 2.8) แล้วทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้ว นับจำนวน ทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมล.ของตัวอย่าง

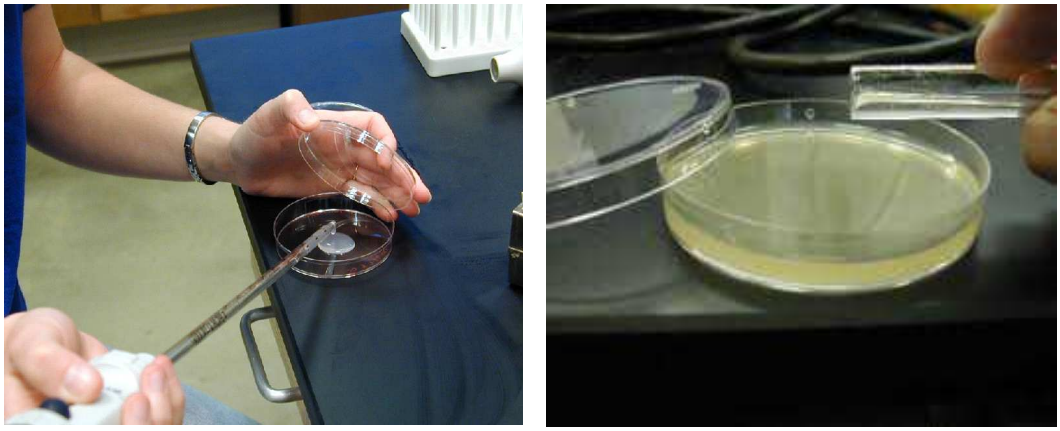
ได้ การรายงานผลมักรายงานเป็น colony forming unit (CFU) มากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน ชัดเจนว่า 1 โคโลนีมาจาก 1 เซลล์ การนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) ซึ่งมีหลายวิธี คือ



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยวิธี Pour plate

2.4.2.1 Pour plate

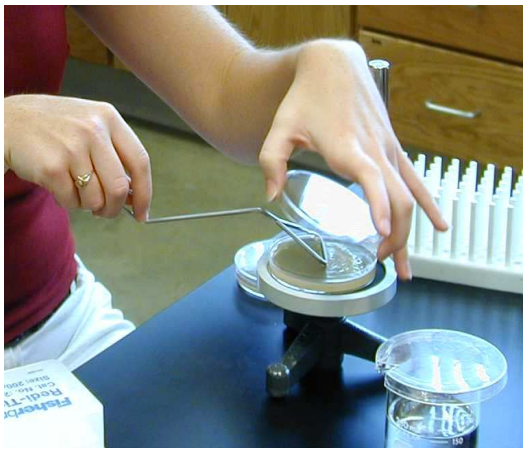
เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 ml หรือ 0.1 ml หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 – 46 °C ลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์กับให้เข้าอาหาร โดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆ (รูปที่ 2.9) ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่ม ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อ ml หรือต่อกรัมตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้วุ้นที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้



รูปที่ 2.9 วิธี pour plate

2.4.2.2 Spread plate

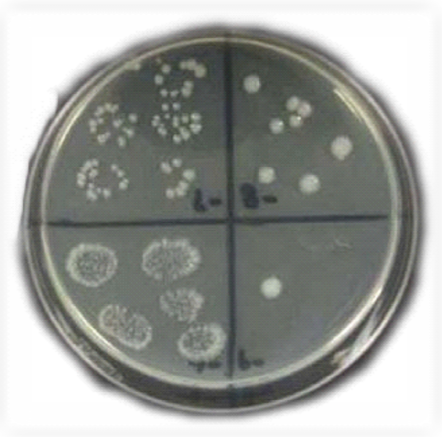
เป็นวิธีการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 ml หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) (รูปที่ 2.10) วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ในบางครั้งวิธี spread plate อาจนับปริมาณเซลล์ได้มากกว่าวิธี pour plate เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้เจอกับความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลวเหมือนวิธี pour plate ในกรณีที่ตัวอย่างมีเซลล์จุลินทรีย์อยู่น้อย การใช้วิธีนี้อาจขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างน้อยในการ plating



รูปที่ 2.10 วิธีการ spread plate

2.4.2.3 Drop plate

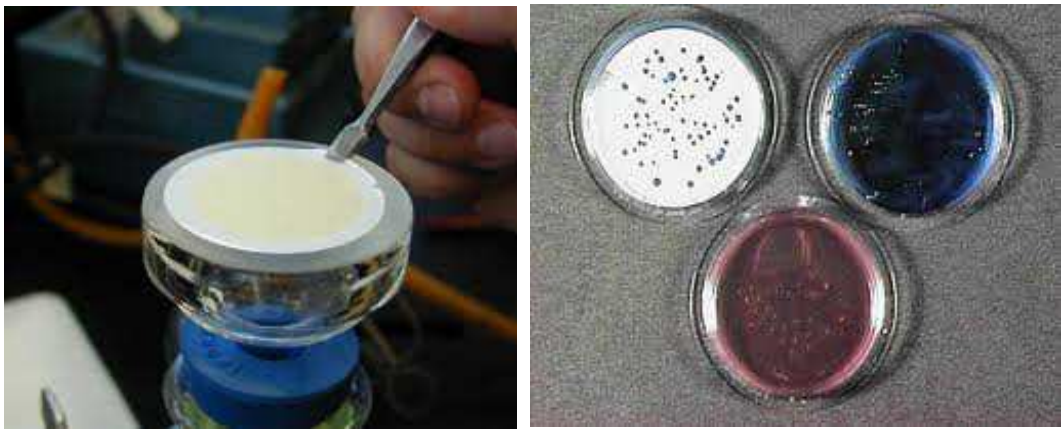
วิธีนี้มีหลักการเหมือนกันกับ spread plate โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนจานอาหารหนึ่งจานต่อ 5 จุด โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 0.02 ml ตัวอย่างจะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร (รูปที่ 2.11) ซึ่งโดยปกติจะมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1.5 ถึง 3 cm การนับและคำนวณจำนวนโคโลนีขึ้นอยู่กับจำนวนหยดต่อจานอาหาร จำนวนหยดต่อ ml และค่าการเจือจาง (dilution factor) โดยทั่วไปเมื่อบ่มจนเชื้อเจริญแล้ว ให้เลือกจานอาหารที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมคือ มีเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารแต่ละจุดไม่เกิน 10 โคโลนี เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง ก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อ ml หรือต่อกรัมตัวอย่าง



รูปที่ 2.11 วิธีการ drop plate

2.4.2.4 Membrane filtration method

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยและจำเป็นต้องใช้ปริมาตรของตัวอย่างมากเพื่อความแม่นยำในการตรจหาจุลินทรีย์แบบปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative analyses) ตัวอย่าง 100 ml หรือมากกว่าจะถูกกรองผ่าน membrane filter ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมครอน (แบคทีเรียไม่สามารถผ่านได้) ดังนั้นจุลินทรีย์จะถูกกักอยู่บนกระดาษกรอง จากนั้นนำกระดาษกรองวางในจานอาหารที่มีกระดาษซึ่งชุ่มด้วยอาหารเหลว (liquid nutrient medium) อยู่แล้ว โคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญบนกระดาษกรอง (รูปที่ 2.12) วิธีนี้มักใช้กับการตรวจวิเคราะห์ coliform bacteria ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) การปนเปื้อนจากอุจจาระในอาหาร หรือน้ำ



รูปที่ 2.12 ขั้นตอนการทำและเชื้อจุลินทรีย์หลังการทำ membrane filtration

2.5 กรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/coliform

Coliform bacteria นิยมใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขาภิบาลของอาหารและน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำดื่ม เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้คือ *E. coli* มีแหล่งอาศัยในลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นการตรวจพบ *E. coli* ในอาหารและน้ำดื่มจึงแสดงว่ามีการปนเปื้อนอุจจาระซึ่งบอกถึงลักษณะสุขาภิบาลการผลิตของอาหารและน้ำนั้นไม่สะอาดพอ และมีแนวโน้มที่จะมีแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* และ *Shigella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกัน ปนเปื้อนอยู่ในอาหารและน้ำ แบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียรูปแท่งสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งสภาพ aerobe และ facultative anaerobe คุณสมบัติที่แตกต่างและนิยมใช้แยกแบคทีเรียกลุ่มนี้จากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ คือความสามารถรีดิวซ์น้ำตาลแลคโทสให้กรดและก๊าซใน 24-48 h ที่อุณหภูมิ 35 °C และสามารถแยก *E. coli* ออกจากกลุ่ม Coliform bacteria โดยอาศัยความสามารถในการผลิตกรดและแก๊สภายใน 24 h ที่ 44.5 °C และการทดสอบ IMViC เป็น ++-- หรือ -+--

วิธีการตรวจวิเคราะห์คอลิฟอร์มหรือ *E. coli* เป็นสิ่งที่โรงงานอุตสาหกรรมอาหารโดยส่วนใหญ่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารเพราะการปรากฏเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของฟีคัล (Cox et al., 1983) *E. coli* ถูกใช้พิจารณาเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เพราะเมื่อเร็วๆ นี้มีการระบาดของการติดเชื้อก่อโรคของ *E. coli* (Kornacki et al., 1982; Doyle et al., 1984) Wehr (1982) รายงานว่า 7% ของการสำรวจพบมีการปนเปื้อนของหรือไม่ปรากฏของ *E. coli* ถูกบ่งชี้เป็นความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์

วิธีการวิเคราะห์โดยส่วนใหญ่ของ *E. coli*/coliform สามารถจำแนกออกเป็น 3 วิธีด้วยกันคือ

2.5.1 วิธี Conventional method

โปรโตคอลที่รู้จักกันดีเป็นการวิเคราะห์ที่ชื่อว่า Most Probable Number หรือ Duram test

2.5.2 วิธี Non – conventional method

2.5.2.1 วิธี Modern Molecular Biology หรือ Rapid Method

2.5.2.2 วิธี Enzyme Based Method ซึ่งเป็นวิธีปกติที่รู้โดยทั่วไปว่าเป็น chromogenic และ fluorogenic detection

2.5.3 Modified non – conventional method

2.5.3.1 วิธี Micro Inoculation Technique

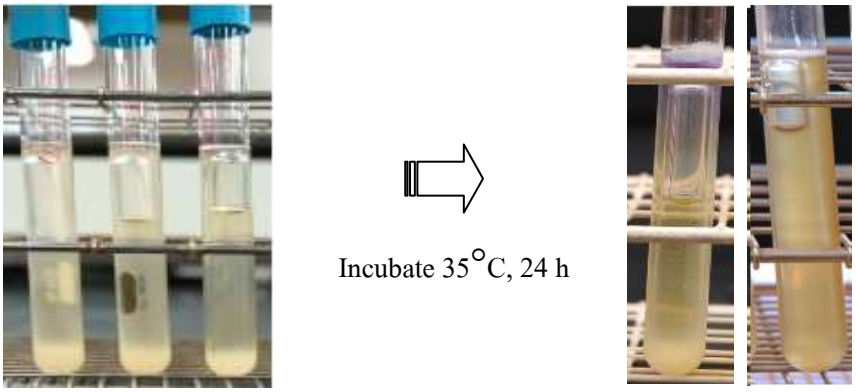
2.5.1 วิธี Conventional method

สำหรับวิธีการวิเคราะห์แบบ conventional method หรือที่เรียกว่า Most Probable Number Method (MPN) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Durham test โดยหลักการแล้ว เป็นการอาศัยคุณสมบัติของการใช้น้ำตาลแลคโตส (APHA, 2001; BAM 2015) วิธีการวิเคราะห์ MPN เป็นวิธีการทางสถิติ หลายขั้นตอนซึ่งประกอบไปด้วย presumptive, confirmed และ completed test ในการวิเคราะห์ serial dilutions ของตัวอย่างถูก inoculated ลงใน broth media การวิเคราะห์จำนวนคะแนนของตัวอย่างที่เกิด positive ในหลอดทดลอง (การ ferment ของ lactose) จากอีก 2 เฟสของการวิเคราะห์ถูกทดลองและเมื่อนั้นใช้ร่วมกับผลการทดลองที่เป็นบวกเพื่อให้ผลที่เป็นตารางสถิติ สำหรับประเมินจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรากฏ ความจำเพาะของการวิเคราะห์โดยเฉพาะ 2 เฟสถูกดำเนินการในการวิเคราะห์คอลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม ขณะที่ทั้ง 3 เฟสถูกดำเนินการสำหรับ *E. coli* ทั้งนี้ 3 หลอด MPN test ถูกใช้สำหรับการทดสอบอาหารโดยส่วนใหญ่ สำหรับ 5 หลอด MPN test ถูกใช้สำหรับทดสอบตัวอย่างน้ำ, shellfish และ shellfish harvest water testing และ 10 หลอด MPN test นั้นถูกใช้ทดสอบน้ำหรือตัวอย่างที่ไม่ได้คาดว่าจะมีการปนเปื้อนสูง (APHA, 1995)

2.5.1.1 MPN – Presumptive test for coliforms, fecal coliforms and *E. coli*

ทำการชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัมลงในถุง sterilize bag จากนั้นทำการปั่นด้วยเครื่องตีปั่นความเร็วสูง สำหรับตัวอย่างอาหารแช่แข็งสามารถทำการละลายน้ำแข็งโดยเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 5°C เป็นเวลาไม่เกิน 18 h ห้ามทำการ thaw ตัวอย่าง จากนั้นเติม PBS จำนวน 450 ml และตีปั่นเป็นเวลา 2 นาที ถ้าตัวอย่างอาหารมีปริมาณน้อยกว่า 50 กรัม ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารและเติม sterile diluents เพื่อทำความเข้มข้นเป็น 1:10 ปริมาณ

ทั้งหมดในถ้วยปั่นควรสูงกว่าใบมีด เตรียม decimal dilutions กับ sterilized Butterfield's phosphate diluent จำนวนของสารละลายที่เตรียมขึ้นกับหลอดที่เกิดฟอง เขย่า all suspensions 25 ครั้ง หรือใช้ vortex เป็นเวลา 7 s ห้ามใช้ปิเปตในกรณีที่ปริมาตรตัวอย่างน้อยกว่า 10% นำ 1 ml portions ไปที่ 3 LST tubes สำหรับแต่ละความเจือจางอย่างน้อย 3 consecutive dilution ทำการ hold pipette ที่มุมเพื่อไม่ให้มีตัวอย่างตกค้างที่ปลายหลอดแล้วปล่อยให้ไหลลงมา 2 – 3 วินาที ไม่มากกว่า 15 นาที



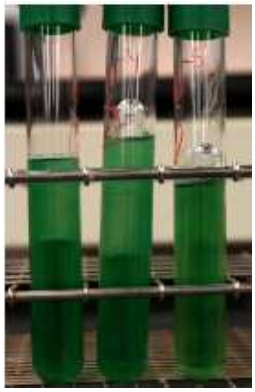
LST (Lauryl Sulfate Tryptose Broth)

(-) Gas (+) Gas

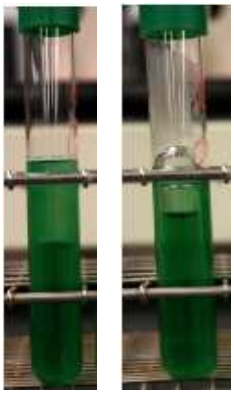
ทำการบ่มหลอด LST ที่ 35°C ทดสอบหลอดและบันทึกปฏิกริยาที่ 24 h สำหรับหลอดที่เกิดแก๊ส ทำการแทนที่ medium ในหลอดที่เกิดการหมักและทำการบ่มหลอดที่เกิดแก๊สอีกครั้งเป็นเวลา 24 h และทดสอบและบันทึกปฏิกริยาอีกครั้งที่ 48 h ทำการ confirm อีกครั้งสำหรับหลอดที่เป็น presumptive positive (gas) tubes

2.5.1.2 MPN – Confirmed test for coliform

จากหลอดที่เกิด gas ของ LST นำ loop แตะ suspension ลงใน tube ของ BGLB broth พยายามหลีกเลี่ยงตะกอนที่ปรากฏ ทำการบ่มหลอด BGLB ที่อุณหภูมิ 35°C เพราะโดยส่วนใหญ่แล้วโคลิฟอร์มสามารถโตที่อุณหภูมิ 35°C และทดสอบการเกิด gas ที่เวลา 48 ± 2 h คำนวณ most probable number (MPN) ของโคลิฟอร์มบนพื้นฐานสัดส่วนของการ confirm gassing ในหลอด LST สำหรับ 3 consecutive dilution



Incubate 35°C, 24 h



BGLB (Brilliant Green Lactose Broth)

Gas (-)

Gas (+)

2.5.1.3 MPN – Confirmed test for fecal coliform and *E. coli*

จากหลอดที่เกิด gas จาก LST ที่แสดงผล presumptive test นำ loop ไปจุ่มลงใน suspension ของหลอดที่เกิด gas เพื่อที่จะย้ายไปยังหลอด EC broth เหตุผลที่ใช้ EC medium เพราะ medium บรรจุไปด้วย bile salts ซึ่งเป็นตัวยับยั้งสปอร์เป็นส่วนใหญ่และ positive bacteria ที่สามารถ fermenting lactose ได้ (Warren et al., 1978) ทำการบ่ม EC Tube เป็นเวลา 24 ± 2 h ที่อุณหภูมิ 45.5 °C และทดสอบการเกิด gas ถ้าผลให้ negative ทำการ reincubate และทดสอบอีกครั้งที่ 48 ± 2 h ใช้ผลนี้สำหรับการคำนวณฟีคัล coliform MPN เพื่อที่จะไปวิเคราะห์ *E. coli*

2.5.1.4 MPN – Completed test for *E. coli*

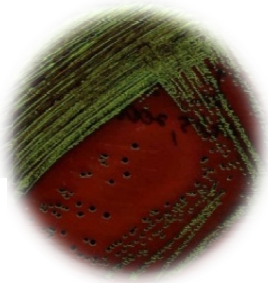
เพื่อที่จะทดสอบ *E. coli* อย่างสมบูรณ์ หลอดที่เกิด gas จาก EC broth นำ suspension ไป streak เพื่อแยก โดย loobful ของ L-EMB agar plate และทำการบ่มเป็นเวลา 18 – 24 h at 35°C ทดสอบเพลทสำหรับ suspicious *E. coli* โคโลนี โคโลนีมีสีดำตรงกลางและ flat นำไปทำ PCA slants และทำการบ่มเป็นเวลา 18 – 24 h ที่ 35 °C และนำไปใช้เพื่อทดสอบต่อไป

(+)
Gassing EC tube
from the confirm

streak

L - EMB

Incubate 35°C, 24 h



Transfer suspicious colonies

PCA slants

use for
biochemical test

Incubate 35°C, 24 h

หมายเหตุ : ทำการ identification ของ 1 ใน 5 โคโลนีของ *E. coli* เพื่อที่จะทดสอบหลอดที่เป็น EC tube ที่เป็น positive ดังนั้น ไม่ทั้งหมดที่ 5 isolates อาจจะจำเป็นต้องทดสอบ

2.5.1.5 MPN – Confirmation

ทำการทดสอบ gram strain โคโลนีที่ปรากฏทั้งหมดเป็นแกรมลบ แท่งสั้นควรที่จะทดสอบสำหรับ IMViC reaction (Andrews, 1992) ซึ่งเป็นปฏิกริยาข้างล่างนี้ และทำการ re – inoculated กลับไปที่ LST เพื่อ confirm การเกิดแก๊สอีกครั้ง

2.5.1.5.1 การทดสอบ Indole production

ทำการ inoculation เชื้อลงใน tryptone broth และบ่มเป็นเวลา 24 ± 2 h ที่ 35 °C ทดสอบสำหรับ Indole โดยการเติม 0.2 – 0.3 ml ของ Kovacs's reagent ถ้าปรากฏ distinct สีแดงบนบนผิวเป็น layer แสดงว่าผลเป็น positive

2.5.1.5.2 Voges – Proskauer (VP) – reactive compounds

ทำการ inoculate tube ของ MR – VP broth และทำการบ่มเป็นเวลา 48 ± 2 h ที่ 35°C นำ 1 ml ของตัวอย่างที่ทดสอบลงในหลอดขนาด 13 × 100 mm tube เติม 0.6 ml ของสารละลาย α - naphthol และ 0.2 ml ของ 40% KOH เขย่า เติมผลึกของครีเอทีนปริมาณเล็กน้อย เขย่าและปล่อยตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผล positive ถ้าปรากฏเป็นสีชมพู

2.5.1.5.3 Methyl red – reactive compounds

หลังจากทำ VP test ทำการบ่ม MR – VP broth หลอด ที่ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 h แล้วเติมสารละลาย methyl red 5 หยด ลงในแต่ละหลอด สีแดงจะปรากฏเป็น positive สีเหลืองบ่งบอกเป็น negative

2.5.1.5.4 Citrate

Inoculate เชื้อในสารละลาย Koser's citrste broth พยายามหลีกเลี่ยงการ detectable ความขุ่น บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 96 h พัฒนาความขุ่นแสดงผลเป็น positive

Gas from lactose ทำการ inoculate เชื้อลงในหลอด LST และบ่มที่ 48 ± 2 h at 35 °C ผลพลอยได้ที่เป็น gas (displacement ของ medium สำหรับ inner vial) หรือ effervescence หลังจาก gentle agitation เป็น positive

ข้อดีและข้อเสียของวิธี Conventional method (Bredie and de Boer, 1992; Suwansonthichai and Rengpipat, 2003)

ข้อดี

1. เป็นวิธีที่แสดงคุณภาพทางกายภาพที่ดี เพื่อตรวจสอบการเกิด gas ใน durham tube
2. โดยส่วนใหญ่เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและใช้กันอยู่ในปัจจุบันและให้ผลวิเคราะห์ที่ดี

ข้อเสีย

1. ใช้เวลานานประมาณ 3 – 7 วัน ไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับวิธีการที่เป็นมาตรฐานสำหรับที่จะนำไปใช้ในโรงงาน (Anonymous, 1987)
2. เป็นวิธีที่ต้องใช้แรงงานจำนวนมากและความชำนาญสูง
3. ใช้ปริมาณอาหารมาก

2.5.2 วิธี Non – conventional methods

2.5.2.1 The Modern Molecular Biology Method

วิธี Modern Molecular Biology Method ถูกพิจารณาเป็นวิธีที่รวดเร็ว วิธี rapid detection ของการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ ในอาหารเป็นจุดวิกฤติที่ต้องมีการประกันคุณภาพของความปลอดภัยของอาหาร วิธี conventional method เพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคโดยปกติ rely on เวลาในการเจริญเติบโตในอาหารตามด้วยการแยก isolation และ biochemical identification และบางครั้งอาจมีความจำเป็นต้องตรวจ detect ใน serology เมื่อเร็วๆ นี้เทคโนโลยีการการตรวจ detection และ identification มีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วขึ้น มากกว่าวิธีการวิเคราะห์แบบปกติในปัจจุบัน มีความ sensitive มากกว่า และความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นกว่าวิธี conventional method วิธี rapid โดยปกติใช้เป็นเทคนิค screening กับผล negative ที่ยอมรับ แต่ทั้งนี้ผลของ positive ต้องการการ confirmation โดยวิธีการที่เหมาะสมซึ่งต้องใช้ปริมาณสารจำนวนมากเป็น cultures วิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วถูกหาได้ซึ่งอยู่ในกลุ่มของชุดวิเคราะห์ที่มีการจำหน่ายในเชิงการค้ารวมถึง miniaturized biochemical kits, antibody และ DNA – based tests (BAM, 2015)

The miniaturized biochemical kits ถูกใช้เพื่อ identification ตัว pure culture แบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร โดยส่วนใหญ่ อาหารที่ใช้ในการทดสอบประกอบไปด้วย media อาหาร 15 – 30 medias หรือสารที่มีความจำเพาะถูกออกแบบมาเพื่อวิเคราะห์เชื้อเป้าหมาย หรือ species กับชุด test kit ที่สามารถทราบผลภายใน 4 h โดยส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้เวลาการบ่ม 18 – 24 h โดยปกติ miniaturized biochemical tests เหมือนกับรูปแบบและประสิทธิภาพ ให้ผลความถูกต้อง 90 – 99% ในการเปรียบเทียบกับวิธี conventional method (BAM, 2015) มีวิธีการวิเคราะห์แบบ DNA based assay ไม่เพียงแต่ probes PCR และ Bacteriophage ถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นวิธีทางการค้าสำหรับวิเคราะห์เชื้อก่อโรค Probe assay โดยทั่วไปเป็นเป้าหมาย ribosomal RNA (rRNA) ให้ข้อดีในความจริงที่สูงจำนวน copy ของ bacterial rRNA ให้เป้าหมาย amplitude โดยธรรมชาติที่เป็นเป้าหมายค่อนข้างสูงและเป็นวิธีที่มีความ sensitivity สูง กับ PCR ตัวอย่างไม่ต้องการวิธีปกติที่ต้องใช้เวลา 24 – 48 h ในการตรวจ detect แบคทีเรีย

ข้อจำกัดที่สำคัญของวิธีการวิเคราะห์แบบ Conventional method เป็นการวิเคราะห์ที่ใช้เวลานาน เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ เมื่อเร็วๆ นี้มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากและนักวิจัยได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบรวดเร็วโดยอาศัยพื้นฐานเป็น Modern molecular biology โดยเทคนิคนี้สามารถกำจัดขั้นตอนของการ presumptive

test, confirm test และ complete test ในวิธีการ conventional method โดยการใช้ concept ของ Immunological method หรือ PCR โดยวิธีการเหล่านี้ใช้เวลาน้อยประมาณ 4 – 6 h

- Immunological Method

โดยหลักการพื้นฐานวิธีของ antibody – based detection เป็นการรวมตัวของ antibodies กับ target antigen ตามด้วยการ detection ของ antigen – antibody complex เพราะแต่ละเชื้อ pathogen หรือ microorganism บรรจุโปรตีนที่จำเพาะหรือแอนติเจนซึ่งสามารถตอบสนองกับ specific antibodies เหมือนกับทฤษฎีของ Lock และ Key

- PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR เป็น nucleic acid amplification เป็นเทคโนโลยีที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจ detection แบคทีเรีย ประกอบไปด้วย cycle ที่แตกต่างกันของ DNA ที่เกิดการสูญเสียสภาพโดยความร้อน ตามด้วยการ extension phase กับการใช้ primers ที่มีประสิทธิภาพและเอนไซม์ เมื่อนั้น 2 new identical DNA sequences ทำปฏิกริยากับ new target สำหรับ cycle ถัดไป โดย new double standard DNA ที่เป็น new cycle ทำการทดสอบ step นี้ซ้ำอย่างน้อย 20 – 30 cycles จะได้จำนวนที่เพียงพอของ amplified DNA S sequences สำหรับการ detection ของ agarose gel electrophoresis

ข้อดีและข้อเสียของวิธี Modern Molecular Biology

ข้อดี

1. เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์น้อย
2. การดำเนินการใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย และใช้ rest supply

ข้อเสีย

1. เครื่องมืออุปกรณ์ค่อนข้างแพงและต้องการ reagent ที่มีราคาแพง
2. ไม่เหมาะสมกับการใช้กับโรงงาน โดยเฉพาะกับประเทศที่พัฒนาแล้ว

2.5.2.2 The Enzyme – based method

เทคนิคใหม่นี้ได้มีการพัฒนาขึ้นมาเมื่อเร็วๆ นี้สำหรับการตรวจวิเคราะห์และแยกแยะเชื้อแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์พื้นฐานจากการใช้สาร chromogenic และ fluorogenic สำหรับการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของ

เอนไซม์ ที่ specific ต่อสารจำเพาะ วิธีที่ sensitive ต่อไปนี้ได้มีการนำมาพัฒนาให้มีความถูกต้องและสามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว และอาจจะดำเนินการโดยใช้การเจริญเติบโตใน media ซึ่งบรรจุสารเอนไซม์ที่จะสามารถ linked กับ chromogen (colour reaction), fluorogen (fluorescent reaction) หรือการ combination ทั้งคู่ ซึ่งเป็นคุณสมบัติโดยระบบของเอนไซม์ที่จะ metabolized สารสับเสตรท เช่น น้ำตาลและกรดอะมิโน เพื่อปล่อยโครโมเจนหรือฟลูโอโลเจน ผลการทดลองนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงของสีใน medium และหรือ fluorescence ภายใต้แสง UV การรวมกันของสารฟลูโอโรเจนิกและโครโมเจนิกในอาหารจำเพาะสามารถลดขั้นตอนในการนำเชื้อไปไปทดสอบ biochemical test ต่อไป เพื่อ identify เชื้อที่แน่ชัด (Manafi, 1996, 2000; Greenwood et al., 2005; Perry and Freydiere, 2007; Schonenbrucher et al., 2008)

สาร chromogenic enzyme substrate ถูกประกอบไปด้วยสารที่สามารถทำปฏิกริยากับความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อเชื้อ และเปลี่ยนสีเนื่องจากการทำปฏิกริยาของเอนไซม์ โดยทั่วไปพื้นฐานของปฏิกริยาทางเคมี 4 กลุ่มของสารโครโมเจนิกสามารถแยกออกจากกันได้ และเมื่อเร็วๆ นี้มีการบรรยายโดย Manafi (1998) สารอนุพันธ์ Indolyl เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้และมีความทนต่อความร้อน โดยส่วนใหญ่สารอนุพันธ์ที่ใช้เช่น 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (X), 5-bromo-6-chloro-3-indolyl (magenta) or 6-chloro-3- indolyl (salmon) แสดงให้เห็นไม่มีการแพร่บนเพลท agar

Fluorogenic enzyme substrate โดยทั่วไป ประกอบไปด้วยสารที่จำเพาะสำหรับสารเอนไซม์ที่จำเพาะ ตัวอย่างเช่น น้ำตาลหรือกรดอะมิโนและฟลูโอโรเจน เช่น 4-methylumbelliferone สามารถที่จะเปลี่ยนแสง UV เป็น visible แสง Methylumbelliferyl-substrates เป็น water soluble มีความ sensitive สูงและมีความจำเพาะค่อนข้างสูง เพราะว่า pH – dependence มีความแรงในการแพร่สูงในอาหารแข็งและจำเป็นของ UV – light (Feng and Hartman, 1982)

การประยุกต์ใช้ความจำเพาะของเอนไซม์ substrate ในอาหาร media เชิงการค้าสำหรับการวิเคราะห์ coliform และ *E. coli* ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา วิธีเอนไซม์ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจจับและนับจำนวนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *E. coli* โดยโคลิฟอร์มแบคทีเรียผลิต β - D – galactosidase (GAD) and *E. coli* ผลิต β - D - glucuronidase (GUD) โดยอาหาร media รุ่นใหม่ใช้ β - D - glucuronidase (GUD) เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับ *E. coli* GUD ถูกแสดงอยู่ใน 94 – 96% ของ *E. coli* แต่ซัลโมเนลลาบางตัว, *Shigella* และ *Yersinia* spp. นักวิจัยบางท่านพบว่า GUD – positive strain ของ *Citrobacter freundii* หรือบาง strain ของ

Klebsiella oxytoca, *Serratia fonticola* และ*Yersinia intermedia* (Alonso et al., 1996) ทั้งนี้ GUD test ถูกใช้เพิ่มการ detection ของ *E. coli* ในน้ำและอาหาร เนื่องจาก *E. coli* เป็น indicator ที่สำคัญสำหรับการปนเปื้อนของ fecal contamination ในตัวอย่างอาหารจากกระบวนการผลิตและกระบวนการผลิตน้ำบริสุทธิ์ โดยทั้งนี้เชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่ *E. coli* จะไม่ produce เอนไซม์นี้ซึ่งได้ถูกบรรยายโดย Rice et al., 1991

กิจกรรมของ GUD ถูกวัดโดยการใช้สาร chromogenic และ fluorogenic ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *p*-nitrophenol-β-D-glucuronide (PNPG), or 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) และ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) MUG ถูก hydrolyzed โดย GUD yielding 4 – MU ซึ่งแสดงสีน้ำเงินภายใต้แสง fluorescence เมื่อแผ่รังสีส่องแสงด้วย UV ที่ความยาวคลื่นแสงที่ 366 nm MUG ถูกใช้รวมกับของเหลว media ทั้งคู่รวมถึง lauryl sulfate broth, m-Endo broth, EC broth, Brila – broth, DEV – lactose-peptone-broth และ LMX broth อาหารแข็งซึ่งเป็น MUG ถูกเติมลงไป รวมถึง violet red bile agar, ECD-agar, MacConkey-agar และ m-FC agar และถูกบรรยายโดยหน้านี้แล้ว (Manafi, 1996) โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่เพียงพอในการแยกหรือบ่งชี้เชื้อเป็น 50 μg/ml อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่จำเป็นและเป็นที่ยอมรับสำหรับการตรวจ detection ของ *E. coli* ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบอื่นๆ ของอาหาร

การตัดสินใจของ β-D-galactosidase (GUD) เป็นการแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม แบคทีเรียโคลิฟอร์มถูก accomplished โดยการใช้ *o*-nitrophenyl-β- D -galactopyranoside (ONPG), *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (PNPG), 6-bromo-3-indolyl-β-galactopyranoside (Salmon-Gal), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (XGAL) หรือ 6-bromo-2-naphthyl-β-D-galactopyranoside (BNGAL), 8-hydroxychinoline-β-D-galactoside, cyclohexenoesculetin-β-D-galactoside และ fluorogenic 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside (MUGAL) โดยพยายามที่จะตรวจหา coliform โดยการเติม 1 – isopropyl - β - D – thiogalactopyronaside (IPTG) เพื่อที่จะเป็น media (Manafi, 1996) หรือ sodium dodecyl sulfate (SDS) (Berg and Fiksdal, 1988) การเพิ่ม activity ของ β-D-galactosidase โดยการพัฒนาการใช้ซับสเตรทและหรือเอนไซม์

อาหารเลี้ยงเชื้อในเชิงการค้าที่มีการพัฒนาอยู่ในปัจจุบันถูกอนุญาติให้มีการตรวจพบ coliforms และ *E. coli* ในน้ำและอาหาร (Anderson and Baird – Parker, 1975; Feng and Hartman, 1982; Firstenberg-Eden, 1985; Anonymous, 1987) อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้บรรจุเอนไซม์ที่หลากหลายสำหรับการตรวจวิเคราะห์ β-D-

galactosidase (ซึ่งบ่งบอกการปนเปื้อนของ coliforms) และ β-D- glucuronidase (ซึ่งบ่งบอกการปนเปื้อนของ *E. coli*) ตัวอย่างของอาหาร media ในเชิงการค้าในปัจจุบัน (Suwansonthichai and Rengpipat, 2003) ที่ได้รับการยอมรับในการตรวจการปนเปื้อนของ coliforms และ *E. coli* เช่น

2.5.2.2.1 media ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *E. coli/* coliform โดยอาศัยหลักการความจำเพาะของเอนไซม์

2.5.2.2.1.1 Chromocult®coliform agar

อาหาร Chromocult®coliform agar ถูกพัฒนาขึ้นมาสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *E. coli* เนื่องจากการผนวกเข้าด้วยกันของสาร chromogenic เช่น Salmon – GAL (สีแดงของ coliform) สำหรับการตรวจ detection ของปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดโดยการผลิต β-galactosidase และ X-glucuronide (สีน้ำเงินคล้ำไปเป็นโคโลนีม่วงสำหรับ *E. coli*) สำหรับการตรวจ detection ของ *E. coli* โดยการผลิต production ของ β-glucuronidase สำหรับจุลินทรีย์ที่เป็น gram บวกและ non – enteric bacteria บางตัวถูกยับยั้งโดย Tergitol-7 โดยเพิ่มเติมการ confirmation ของการแยก *E. coli* สามารถทำได้โดยการ detection ของ indole จากการ inclusion ของ tryptophan ใน medium สามารถใช้เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* (Finney et al., 2003) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า Chromocult®coloform agar เป็นทางเลือกเพื่อแทนที่ MacConkey Agar สำหรับในการ identification และนับจำนวนของ human fecal Enterobacteriaceae

รูปที่ 2.13 อาหาร Chromocult®coliform agar

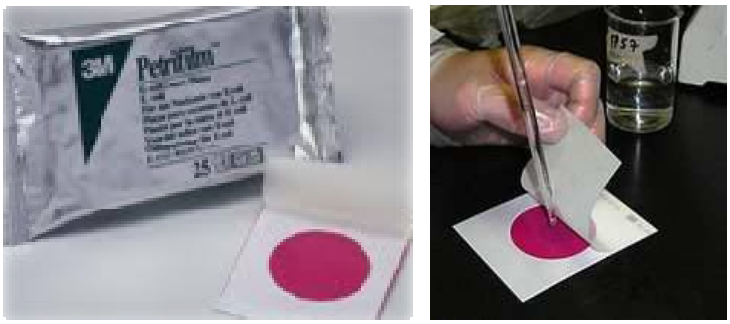
➢ ขั้นตอนการวิเคราะห์ของอาหาร Chromocult®coliform agar

ปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสม 1 ml ถูกปิเปตลงในเพลทแก้ว แล้วเติม agar ที่ผ่านการละลาย หมุน plate ให้วนซ้ายขวาเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 h ทั้งนี้ในแต่ละ

dilution ถูกทดสอบกับ CCA จำนวน 2 เพลท เพลทที่มีจำนวนโคโลนี 15 – 150 โคโลนีจะถูกนำมานับจำนวน โดยโคลิฟอร์มจะปรากฏเป็นสีแดงและ *E. coli* จะปรากฏเป็นสีน้ำเงิน

2.5.2.2.1.2 Petrifilm™ plates (Schraft and Watterworth, 2005)

เป็น media ที่พร้อมใช้ที่ช่วยลดเวลาและแรงงานในการวิเคราะห์เมื่อจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพิเศษในการทดสอบหาเชื้อในตัวอย่างน้ำและอาหาร (Matner et al., 1990) Petrifilm™ plates ถูกใช้เพื่อเป็น media ที่พร้อมใช้งานซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปและได้มีการพิสูจน์แล้วว่าสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและน้ำผลไม้



รูปที่ 2.14 Petrifilm™ plates

ทั้งนี้ Petrifilm™ plates ในรูปที่ 2.14 ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อการตรวจนับโคลิฟอร์มโดยตรงและ *E. coli* ในอาหาร เพลทมีการเติม violet red bile nutrient, gelling agent และ indicator ของ β-glucuronidase (เป็นผลจากการตกตะกอนของสีน้ำเงินกับโคโลนี) และประมาณ 95% ของ *E. coli* จะผลิต gas โคโลนีคอลิฟอร์มที่ปรากฏบน Petrifilm™ plates เป็นโคโลนีสีแดงกับ gas กรดและ gas ที่ผลิตขึ้นมาจากการหมัก lactose ระหว่างกระบวนการบ่มเป็นสาเหตุ pH indicator เปลี่ยนสีของเจลเป็นสีแดงเข้ม และ gas ที่เกิดขึ้นโดยรอบโคโลนีสีแดงของโคลิฟอร์ม บ่งบอกถึงการปนเปื้อนของเชื้อ coliform

- ขั้นตอนการวิเคราะห์ของ Petrifilm™ plates

ตัวอย่าง suspension ที่เหมาะสม ปริมาณ 1 ml ถูกปิเปตลงบนผิวของ Petrifilm™ plates ปิดแผ่นฟิล์มและทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 h สีแดงรอบๆ ที่มี gas เป็น coliform ในขณะที่โคโลนีสีน้ำเงินที่มี gas

โดยรอบเป็น *E. coli* ทำการทดสอบซ้ำด้วย dilution ที่มีอยู่ โดยเพลทที่มีโคโลนีขึ้น 15 – 150 โคโลนีถูกแนะนำให้มีการนับ

2.5.2.2.1.3 SimPlate Method

วิธี SimPlate Coliform และ *E. coli* เป็นวิธีทาง Enzymatic method สำหรับการ detection และนับเชื้อของ coliform แบคทีเรียและ *E. coli* ในอาหาร เป็นการใช้ binary detection เทคโนโลยีและการ defined ซับสเตรท เพิ่มเติมเป็นการ to buffer และเกลือ โดยอาหารบรรจุเพียง 2 สารอาหาร เฉพาะ coliform แบคทีเรีย split lactose – analogue และเปลี่ยนสีของอาหารและเฉพาะ *E. coli* split สารตัวอื่น glucuronic acid analogue และปฏิกริยาที่สามารถมองเห็นได้โดยการใช้แสงฟลูออเรสเซนส์ภายใต้ UV – light (Adams et al., 1990; AOAC, 1995) เทคนิค SimPlate เป็นวิธีทาง Most Probably Number (MPN) และจำนวนของ *E. coli* และโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อตัวอย่างถูกคำนวณโดยการใช้การนับจาก counting range conversion table ทั้งนี้ SimPlate ไม่จำเป็นต้องการ confirmation และสามารถให้ผลภายใน 24 – 28 h ใช้อุปกรณ์น้อยและ media น้อย ในการเตรียมกว่าการใช้วิธี conventional method นอกจากนี้วิธี SimPlate method ง่ายในการพกพา (Beuchat et al., 1998; Pangloli et al., 2006)

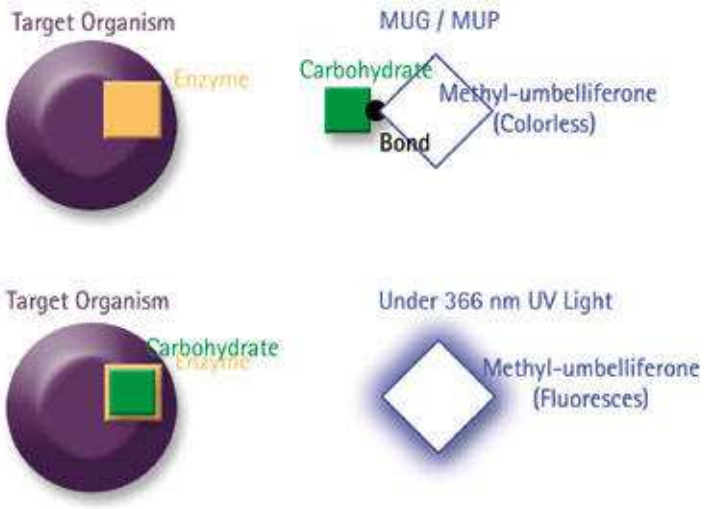
➢ รูปแบบการวิเคราะห์ SimPlate Method

ปริมาณตัวอย่าง 1 ml ถูกบรรจุลงตรงกลางของอุปกรณ์ SimPlate และ 9 ml ของ agar mixed nutrient agar ที่มีสีน้ำเงินถูกเติมลงใน port เดียวกัน SimPlate ถูกหมุนเพื่อให้ตัวอย่างกระจายและทำการไล่อากาศที่ตกค้างตัว SimPlate ถูกวางเป็น stack และบ่มเก็บที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 – 28 h ตัว well จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง เมื่อ coliform แบคทีเรียสปริท galactoside และสาร chromophore กับเอนไซม์ β-D-galactosidase ถูกนับโดย *E. coli* ซึ่ง *E. coli* จะสปริทสาร glucuronide และสาร chromophore กับเอนไซม์ β-D-glucuronidase ด้วยเหมือนกัน เพื่อที่จะให้ well นั้นเรืองแสงเมื่อ exposed กับความยาวคลื่นที่ 366 nm UV – light จำนวนของ well ที่เป็น positive ของ *E. coli* ถูกนับและใช้การนับช่วงระหว่าง conversion table จากนั้นจำนวนถูกเปลี่ยนเป็นค่า MPN ของ *E. coli* ต่อการ swab

2.5.2.2.2 ปฏิกริยาการเกิดสีในอาหารที่มีซับเสตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์

2.5.2.2.2.1 กลไกการเกิดสีของสับสเตรทโครโมเจนิก

อาหารที่มีการบรรจุสารโครโมเจนิกซึ่งทำปฏิกริยากับเอนไซม์ของเชื้อเป้าหมายเพื่อที่จะให้สีของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยบรรจุเอนไซม์ที่สามารถ metabolized สีของ chromogenic substrate ในทิศทางของการแตกพันธะระหว่างคาร์โบไฮเดรตและ indolyl เมื่อดูดซึมคาร์โบไฮเดรตและปล่อย indolyl ซึ่งการ oxidation เป็นสาเหตุของสีขึ้นกับสับเสตรทและการทดสอบ สีที่หลากหลายและการรวมตัวกันของสีสามารถที่จะได้รับและถูกใช้เพื่อ identify ความแตกต่างของเชื้อเป้าหมาย

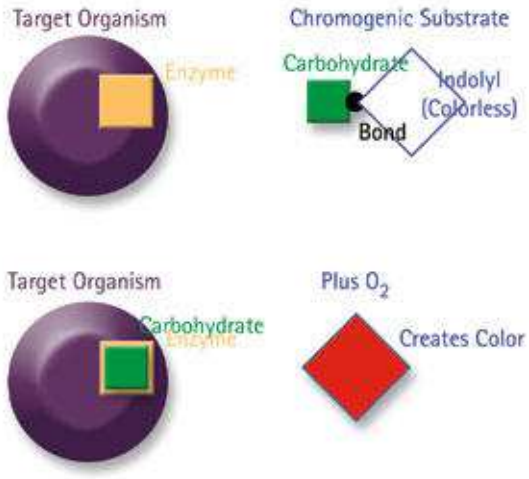


รูปที่ 2.15 แสดงกลไกการเกิดปฏิกริยาของสับสเตรทโครโมเจนิก

แหล่งที่มา : http://www.obiecorp.com/products_technologies/fluorogenic_chromogenic_analysis

2.5.2.2.2.2 กลไกของระบบฟลูโอโรเจนิกสับสเตรท

Media ที่บรรจุ MUG (4-methylumbelliferyl-ß-D-glucuronide) หรือ MUP (4-methylumbelliferyl-phosphate) ซึ่งทำปฏิกริยากับเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเพื่อการสร้างฟลูออเรสเซ้นส์ การตรวจสอบความจำเพาะของเอนไซม์มีประโยชน์ในเรื่องของความง่ายในการดำเนินการและสามารถที่จะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและข้อมูลของกิจกรรมโปรตีน codes สำหรับระบุยีนส์ จุลินทรีย์เป้าหมายบรรจุเอนไซม์ซึ่ง metabolize ได้ทั้ง MUG หรือ MUP ในเส้นทางซึ่งแตกพันธะระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับ Methyl – umbelliferon และดูดซับคาร์โบไฮเดรต ปล่อย Methyl – umbelliferon ข้างหลัง Methyl – umbelliferon เป็น visible ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm



รูปที่ 2.16 แสดงกลไกการเกิดปฏิกริยาของสับสเตรทฟลูโอโรเจนิก

ข้อดีและข้อเสียของวิธีเอนไซม์เบส (Manafi, 2000)

ข้อดี

1. โดยส่วนใหญ่สาร chromogenic และ fluorogenic ใช้ผสมลงในอาหารซึ่งพร้อมที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ปฏิกริยาโครโมเจนิกและฟลูโอโรเจนิก
2. เป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานโดยที่ไม่จำเป็นต้องมีการ confirmation ด้วย biochemical tests เพราะเทคนิคดังกล่าวมีจำเพาะ
3. เป็นวิธีที่ถูกพิจารณาว่ารวดเร็ว ให้ผลภายใน 24 h

ข้อเสีย

1. สาร fluorogenic ต้องการแสง UV ในการ generate ดังนั้นจึงต้องการอุปกรณ์เพื่อรองรับการเกิดการเรืองแสง ซึ่งมีราคาแพง
2. ราคาของอาหารที่มีสารโครโมเจนิก ค่อนข้างแพงและยังคงต้องการพนักงานที่มีพื้นฐานการวิเคราะห์ที่สูงเพื่อที่จะสามารถดำเนินงานขั้นตอนที่ยุ่งยาก

2.6 การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157 :H7 มีหลายวิธีดังนี้

2.6.1 การเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง เชื้อ *E. coli* O157:H7 ไม่หมักย่อยน้ำตาล sorbitol ภายใน 18-24 ชั่วโมง แต่มากกว่าร้อยละ 80 ของ *E. coli* non-O157:H7 หมักย่อยน้ำตาล sorbitol จึงนิยมใช้ Sorbitol Mac-conkey agar (SMAC) ซึ่งใช้ 1% น้ำตาล sorbitol แทน 1%น้ำตาล lactose ใน Mac-conkey agar base เป็น differential

medium สำหรับแยกเชื้อ *E. coli* O157:H7 หรืออาจใช้ SMAC ที่ผสม potassium tellurite และ cefixime (CT-SMAC) ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ย่อยสลายน้ำตาล sorbitol ช่วยเพิ่มอัตราการพบเชื้อ *E. coli* O157:H7 แต่จากการศึกษาของนักวิจัย บางท่านพบว่าอัตราการแยกเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากตัวอย่างอุจจาระบนอาหาร SMAC และ CT-SMAC ให้ผลไม่แตกต่างกัน ปัจจุบันมีการนำเทคนิค immunomagnetic bead separation มาช่วยเพิ่มอัตราการพบเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากตัวอย่าง โดยการ enrich ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี polystyrene bead ซึ่งเคลือบผิวด้วย monoclonal antibody จำเพาะต่อ *E. coli* O157 เชื้อ *E. coli* O157:H7 จะจับกับ antibody ที่เคลือบบน bead จากนั้นแยก bead มาเพาะเชื้อบน SMAC หรือ CT-SMAC มีรายงานว่า วิธีนี้ช่วยเพิ่มอัตราการพบเชื้อ *E. coli* มากถึงร้อยละ 65 และเหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณน้อย เช่น ตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างที่เก็บหลังจากผู้ป่วยมีอาการแล้วหลายวัน หรือ ตัวอย่างจากพาหะที่ไม่แสดงอาการของโรค ส่วนเชื้อ STEC non-O157:H7 ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีนี้ เชื้อที่แยกได้ต้องนำมาทดสอบชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli* และทดสอบกับ *E. coli* O157 และ H 7 antisera ตามลำดับ

2.6.2 การตรวจหา Shiga toxin โดยการทดสอบ cytotoxic activity กับ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero หรือ HeLa cells เป็นการตรวจหา Shiga toxin ที่เชื้อสร้างและปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง แต่วิธีนี้ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์และต้องทำโดยผู้ชำนาญการ

2.6.3 การตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157:H7 หรือ Shiga toxin จากตัวอย่างโดยตรง โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ปัจจุบันมีชุดน้ำยาที่ใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาจำหน่ายมากมายในท้องตลาด เช่น Enzyme immunoassay (EIA), Latex agglutination, Reversed passive latex agglutination เป็นต้น ข้อดีคือ ตรวจง่าย รวดเร็ว ข้อเสียคือ ชุดน้ำยามีราคาแพงและไม่สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อไว้ศึกษาต่อได้

2.6.4 การตรวจหายีนส์ที่ควบคุมการสร้าง O157 และ Shiga toxin จากตัวอย่างโดยตรง ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น วิธี colony hybridization โดยการ blot ตัวอย่างให้ติดบนแผ่นเมมเบรม และให้ทำปฏิกริยา hybridization กับ DNA probe ที่จำเพาะ แต่ Shiga toxin แบ่งเป็นกลุ่มย่อยจึงต้องทำการทดลองกับ DNA probe หลายตัว วิธีที่นิยมในปัจจุบันคือ การเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลอง หรือ Polymerase chain reaction (PCR) วิธีนี้รวดเร็วและมีความไวสูง และสามารถประยุกต์โดยการเติม DNA primers ที่จำเพาะกับยีนส์หลายชนิดในการทดลองคราวเดียว แต่ข้อเสียคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

จากการรวบรวมวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 โดยทั่วไปในปัจจุบันยังคงใช้วิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional methods) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการจำแนก (isolation) และขั้นตอนการยืนยันผล (confirmation) สำหรับขั้นตอนการจำแนกเพื่อที่จะบ่งชี้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายและในส่วนของขั้นตอนการยืนยันผล มีการประยุกต์ใช้เทคนิคหลายด้านเช่น ทางด้านชีวเคมี, ทางด้านพันธุศาสตร์ การทดสอบทางด้านชีวเคมี (biochemical tests) และ CAMP (CAMP factor tests) เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่อาศัยคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีโดยจะตรวจจับกับเอนไซน์ที่ความจำเพาะเจาะจง ในขณะที่การทดสอบทางด้านพันธุศาสตร์ (genetics identification tests) เป็นวิธีการที่อยู่บนพื้นฐานของคุณลักษณะของไรโบโซม (ribosomal characteristic) เช่นเดียวกับการประยุกต์ใช้การทดสอบแบบ RNA-based และ pulsed-field gel electrophoresis โดยวิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 ดังที่กล่าวมา เป็นวิธีการที่ต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีราคาสูง รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องใช้ในปริมาณมากและต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งยังต้องใช้เวลาในการรอผลตรวจนานถึง 2 – 3 วัน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีกลุ่มนักวิจัยทั้งในและต่างประเทศคิดค้นและพัฒนาการตรวจหาจุลินทรีย์ด้วยวิธีรวดเร็ว (Rapid detection methods microbes) เช่น

1. วิธีโดยตรง (direct methods) ใช้วิธีการตรวจเซลล์โดยตรงซึ่งอาจจะมีการบ่มหรือไม่มีก็ได้ ตัวอย่างของวิธีนี้ ได้แก่ Direct epifluorescent filter technique, DEFT และ flow cytometry
2. วิธีอ้อม (indirect methods) ใช้วิธีวัดเมทาโบไลท์ หรือการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์ ตัวอย่างเช่น ATP bioluminescence, Impedimetry และ Turbidometry เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น ส่วนใหญ่มีค่าใช้จ่ายสูง และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถและเทคนิคเฉพาะทางสูง และอีกหลายๆ วิธียังต้องการการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางและลึกซึ้งจึงจะสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ และจากแนวโน้มการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารไปยังต่างประเทศที่เพิ่มขึ้นที่จะครอบคลุมทั้งในญี่ปุ่น อเมริกา สิงคโปร์ ฮ่องกง จีน และยุโรป การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในเกณฑ์กำหนดของแต่ละกลุ่มประเทศคู่ค้าจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งถ้าโรงงานอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยยังคงใช้วิธีการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาแบบเดิมอยู่นั้น อาจทำให้ไม่สามารถจัดส่งสินค้าได้ทันต่อความต้องการของลูกค้า เนื่องจากการไหลของกระบวนการผลิตที่ช้าจากการที่ต้องรอผลการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์จากแผนกควบคุมคุณภาพ และเมื่อประเมินผลทางด้านเศรษฐศาสตร์พบว่า ค่าใช้จ่ายที่ต้องสูญเสียเป็นจำนวนมากจากการตรวจสอบเชื้อในผลิตภัณฑ์สำหรับการประเมินสินค้าที่ผลิตเพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ รวมถึงการ

ตรวจสอบเชื้อตลอดกระบวนการผลิตที่ต้องใช้เวลานาน มีผลกระทบต่อต้นทุนการผลิต ทำให้ผลกำไรที่ควรจะได้น่าจะสูงกว่านั้น แต่ต้องสูญเสียไปส่วนหนึ่งเนื่องจากค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงและพัฒนาวิธีการตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 ร่วมกับวิธีใหม่ ๆ ที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ (Feng and Hartman; 1982; Firstenberg – Eden, 1985; Anonymous, 1987) จากเหตุผลและความจำเป็นดังที่กล่าวจึงเป็นที่มาของงานวิจัย “การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ อีโคไล/คอลิฟอร์ม และอีโคไล O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้นสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของประเทศ” ซึ่งนวัตกรรมดังกล่าวจะเปลี่ยนวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ให้เสร็จสิ้นภายในเวลา 1 วัน (จากปกติ 2 - 3 วันต่อตัวอย่าง) นวัตกรรมนี้นอกจากจะลดระยะเวลาการวิเคราะห์ลง 2 - 3 เท่า แล้วยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์อย่างมากทำให้สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากครั้งขึ้นและมีความถี่มากขึ้น ทำให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนส่งให้ลูกค้า นอกจากนี้องค์ความรู้ที่จะเกิดขึ้นยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นได้อีกด้วย

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E.coli*/coliform และ *E.coli* O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้นเหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกที่จำเป็นต้องมีการตรวจสอบเป็นปริมาณมาก โดยในการทดลองช่วงแรกได้นำเสนอรูปแบบอุปกรณ์ในการวิเคราะห์โดยเป็นการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้ปริมาณมาก สามารถลดการใช้ media แทนการใช้อุปกรณ์แบบ petri dish ซึ่งเป็นแก้ว ที่มีการใช้ในการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน เช่น pour plate, spread plate, และ Most Probable Number (MPN) และมีการตรวจติดตามการโตของโคโลนีด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง (digital microscope) โดยในการทดลองมีการตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์วิเคราะห์เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (calibration) และความน่าเชื่อถือในการนำไปประยุกต์ใช้งาน จากนั้นทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม โดยเป็นการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและ kinetic ของการโตของโคโลนี *E. coli* เพื่อพิจารณาอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสม จากนั้นในงานวิจัยยังได้มีการนำ protocol ไปทดลองใช้จริงที่ บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด โดยตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารสำเร็จรูปแช่แข็งและตัวอย่าง swab จาก line การผลิตของโรงงาน พร้อมทั้งประเมินต้นทุนการวิเคราะห์เพื่อประเมินผลทางเศรษฐศาสตร์ความคุ้มค่าในการลงทุน นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ทำการประเมินความพึงพอใจในการใช้รูปแบบวิธีการวิเคราะห์ที่ได้มีการนำเสนอโดยเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการ QC&QA เพื่อรับทราบความเห็นจากพนักงานในการใช้อุปกรณ์ดังกล่าว เพื่อให้เกิดการใช้อุปกรณ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้นำเสนอเทคนิคการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลวิเคราะห์เชื้อเมื่อสามารถตรวจพบเชื้อในขั้นตอน presumptive test แล้วด้วยระบบ miniaturized biochemical broths ทดแทนวิธีการแบบ conventional method ที่ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ โดยรายละเอียดวัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Escherichia coli*
- *Escherichia coli* O157:H7

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)
- Microplate reader (M965, Metertech, Taiwan)
- พีเอชมิเตอร์ (S220 SevenCompact™, Mettler Toledo)
- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)
- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Nylon syringe filter membrane (13 mm diameter, 0.45 μm pore size, Filtrex, Thailand)
- 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)
- Soytone (USbiological, Salem, MA)
- Yeast extract (USbiological, Salem, MA)

3.1.4 น้ำตาลชนิดต่างๆ (Merck, Germany)

- น้ำตาลซูโครส
- น้ำตาลเมลิไบโอส
- น้ำตาลแมนโนส
- น้ำตาลฟรุคโตส
- น้ำตาลซอร์บิทอล
- น้ำตาลแลคโตส

- น้ำตาลเด็กซ์โตส
- น้ำตาลอินโนซิทอล
- น้ำตาลแรมโนส
- น้ำตาลกาแลคโตส
- น้ำตาลเซลโลไบโอส
- น้ำตาลดูซิทอล
- น้ำตาลซาลิซิน
- น้ำตาลอะโดนิทอล
- น้ำตาลอะราบิโนส
- น้ำตาลทรีฮาโลส
- น้ำตาลไซโลส
- น้ำตาลแมนนิทอล

3.1.5 กรดอะมิโนชนิดต่างๆ (USbiological, Salem, MA)

- ไลซีน
- ออร์นิทีน
- อาร์จินีน

3.1.6 พีเอชอินดิเคเตอร์ต่างๆ

- Bromocresol purple (BP; Fisher Scientific, Fair Lawn, Nj)
- Phenol red (PR; Acros organics, Fair Lawn, Nj)

3.2 การตรวจสอบความแม่นยำและถูกต้องของการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate เทียบกับวิธีมาตรฐานในปัจจุบันโดยการใช้เชื้อ *E. coli*

3.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*

เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* (DMST 4609) ถูกนำมาใช้ในการทดลอง โดยก่อนใช้งานทำการ recovery เชื้อจากเพลท Tryptic Soy Agar หรือ stock เชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 °C ในอาหารเหลว TSB (Trypticase Soy Broth) ทำการเขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h จนได้ปริมาณเชื้อที่ 10^8 CFU/ml ปริมาณเชื้อที่ได้จะถูกเจือจางเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่ระดับต่าง ๆ ในช่วง $10^2 – 10^7$ CFU/ml ปริมาณเชื้อที่เตรียมได้จะถูก inoculation .

ในอาหาร Chromocult®Coliform Agar (CCA) ด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน เช่น pour plate, spread plate, Most Probable Number (MPN) และ MIC

3.2.2 เทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่ใช้

การสอบเทียบความถูกต้องในการวิเคราะห์ของวิธีการที่นำเสนอกับวิธีการที่มีการใช้ในปัจจุบัน (conventional method) เช่น pour plate, spread plate, MPN และ MIC แต่ละวิธีการแสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.2.2.1 วิธี pour plate

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

3.2.2.2 วิธี Spread plate

เทอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CCA ที่อุณหภูมิประมาณ 45 – 50°C ลงใน petri dish แก้ว จากนั้นปล่อยให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง บรรจุ cell culture ที่เตรียมปริมาณ 0.1 ml ลงบนวุ้นแข็ง เกลี่ย cell culture ให้กระจายด้วยลูกแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 35°C เป็นเวลา 24 h

3.2.2.3 วิธี MPN method

(A) MPN-Presumptive test for coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli*

ปิเปต cell culture 1 ml ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เลือกหลอดที่เกิดแก๊ส แล้วบันทึกผล

(B) MPN-Confirmed test for coliforms

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สลงใน BGLB หลอดละ 1 loop นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 h เลือกหลอดที่เกิดแก๊สนำไปอ่านค่าจากตาราง MPN (ภาคผนวก) มีหน่วยเป็น MPN/g

(C) MPN-Confirmed test for fecal coliforms and *Escherichia coli*

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ลงใน EC broth ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่หลอดละ 1 loop โดยถ่ายเชื้อหลอดต่อหลอด นำ EC broth ไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 45.5°C เป็นเวลา 48 h เริ่มคัดหลอดที่เกิดแก๊สที่เวลา 24 h ถ้าให้ผล negative (ไม่เกิดแก๊ส) ให้บ่มต่อไปอีกจนครบ 48 h คัดเลือกหลอด EC

broth ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN ค่าที่อ่านได้เป็นค่าของ Fecal coliforms มีหน่วยเป็น MPN/g ตัวอย่าง

(D) MPN-Confirmed test for *Escherichia coli*

นำ loop ถ่ายเชื้อจาก EC broth ที่เกิดแก๊สมา streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 – 24 h ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E.coli* บน L-EMB agar จะมีลักษณะสีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallicsheen) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา streak บน PCA Slant จำนวน 5 โคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 – 24 h เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

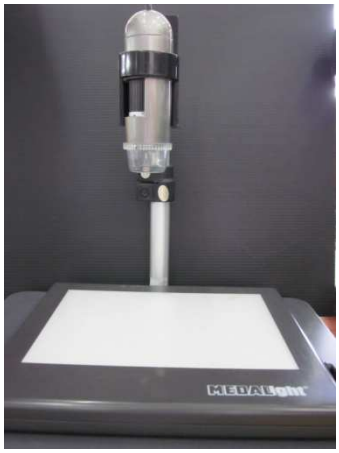
3.2.2.4 วิธี MIC method

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

การวัดและวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้เทคนิค pour plate, spread plate, MPN และ MIC จำนวนโคโลนีที่นับได้จะถูกคำนวณให้อยู่ในรูปของ CFU/ml

3.3 นวัตกรรมการใช้กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงเพื่อเพิ่มความสามารในการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

เทคโนโลยีดังกล่าวจะทำให้สามารถลดระยะเวลาและต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากเทคนิค MIC เป็นเทคนิคใหม่ที่มีการประยุกต์ใช้ระบบการวิเคราะห์โดยใช้ภาพถ่าย (Image analysis) ที่กำลังขยายสูงสุด ทำให้สามารถเห็นโคโลนีภายในเวลาที่รวดเร็ว



รูปที่ 3.1 กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงเพื่อการตรวจ detect การปนเปื้อนของ *E. coli*/coliform

3.4 ศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเทคนิค Pour plate, Petrifilm™ EC plate, Spread plate และ MIC

ทำการ inoculation เชื้อ *E. coli* ที่ทราบปริมาณด้วยเทคนิค Pour plate, Petrifilm™ EC plate, Spread plate และ MIC (ดังรายละเอียดวิธีการทดลองก่อนหน้านั้น) จากนั้นในแต่ละเทคนิคทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 h ทั้งนี้ในระหว่างการบ่ม สุ่มตัวอย่างเพื่อบันทึกภาพโคโลนีทุก 4 ชั่วโมง นำภาพที่ได้ (.jpg) ไปประมวลผลหาขนาดของโคโลนีด้วยโปรแกรม ImageJ เมื่อได้ผลของขนาดโคโลนีที่ต้องการแล้ว นำมาพอร์ตกราฟด้วยโปรแกรม Sigma plot version 11 เพื่อหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของในแต่ละวิธี

3.5 ศึกษา kinetic ของการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเทคนิค MIC ที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ

ในการทดลองจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 10^2 CFU/ml (ขั้นตอนการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์แสดงดังรายละเอียดข้อ 3.1.1) ทำการ drop ตัวอย่าง cell culture ที่ความเข้มข้นดังกล่าวลงบน 96-well U-bottomed polypropylene plate จำนวน 5 plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 40 และ 45°C ตามลำดับ ทั้งนี้ในระหว่างการบ่ม จะสุ่มตัวอย่างออกมาเพื่อบันทึกภาพโคโลนีทุกๆ 4 ชั่วโมง นำภาพที่ได้ (.jpg) ไปประมวลผลหาขนาดของโคโลนีด้วยโปรแกรม ImageJ เมื่อได้ผลของขนาดโคโลนีที่ต้องการแล้ว นำมาพล็อตกราฟด้วยโปรแกรม Sigma plot version 11 เพื่อหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของในแต่ละวิธี

3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิควิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform เพื่อยืนยันผลความถูกต้อง โดยทำการทดสอบในผลิตภัณฑ์อาหารและตัวอย่าง swab จาก line การผลิต

3.6.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร (food samples)

ตัวอย่างอาหารที่จะใช้ทดสอบเป็นตัวอย่างจริง จากบริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด เช่น ผัดไท ข้าวเหนียวมะม่วง ส้มตำ เป็นต้น

3.6.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจเป็นตัวแทนของอาหารทั้งหมด การเก็บตัวอย่างจะต้องเก็บโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อและสารเคมีมาปนเปื้อน จะต้องระมัดระวังการเปลี่ยนแปลงที่อาจจะเกิดขึ้นในระยะเวลาที่ใช้

ขนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่างจะต้องปราศจากเชื้อและสารเคมีที่จะสามารถเป็นพิษกับจุลินทรีย์ที่ยังหลงเหลืออยู่ ภาชนะเก็บตัวอย่างจะต้องปิดสนิทเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ เพิ่มเติมจากภายนอก การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจะถูกเก็บมาจากสายการผลิตโดยทำการสุ่มตัวอย่างแล้วบรรจุลงในถุงลามิเนต (Laminated plastic bag) ตัวอย่างที่ถูกเก็บจะนำมาพักไว้ในห้องเตรียมตัวอย่าง โดยจะควบคุมเวลาให้มีการวิเคราะห์ภายในครึ่งวัน

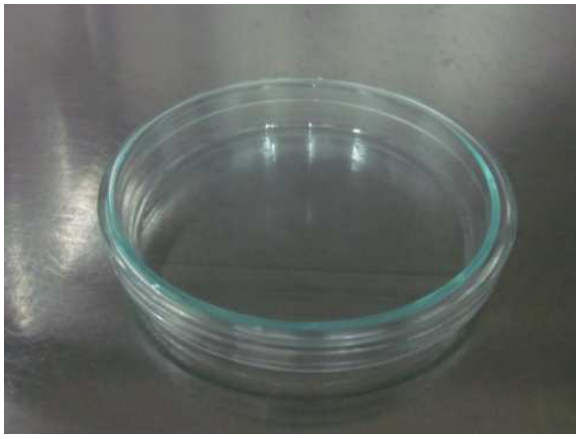
3.6.1.2 การเจือจาง

ตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจ ถ้าเป็นอาหารแข็งจะต้องทำให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยก่อนโดยการชั่งอาหาร 25 กรัม แล้วใส่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 225 มิลลิลิตร นำไปใส่ในเครื่องปั่นอาหารที่ปราศจากเชื้อ ปั่นให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันจะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 ถ้าอาหารเป็นของเหลวแต่ไม่ใช่เป็นเนื้อเดียวกันต้องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนเช่นกัน

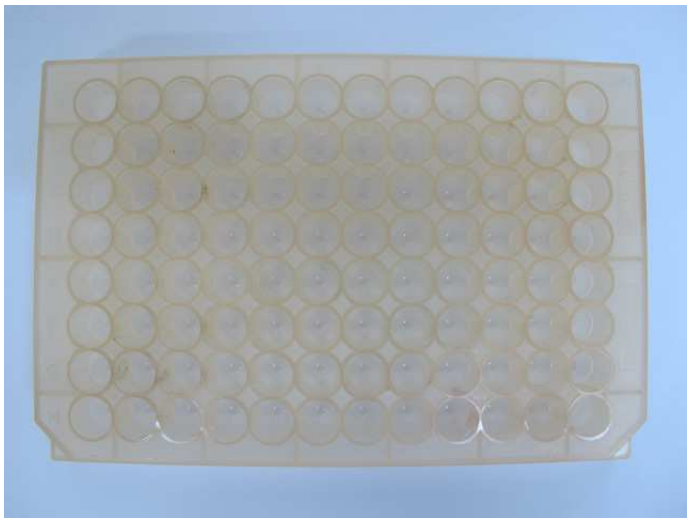
3.6.1.3 การเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่จานเพาะเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด คือ Plate Count Agar (PCA) สำหรับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ Chromocult®coloform agar สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ก่อโรค

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้จะต้องอยู่ในสภาพที่ปราศจากเชื้อ การเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเพลทก่อนหรือหลังขึ้นอยู่กับวิธีของการวิเคราะห์ เช่น การใช้เทคนิค Pour plate จะเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างเจือจางอยู่แล้ว ในขณะที่วิธีการ Spread plate จะทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อก่อน รอจนอาหารแข็งแล้วจึงหยดตัวอย่างลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ขั้นตอนการเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อต้องเป็นเทคนิคที่ปราศจากเชื้อ ในขณะที่วิธีการ MIC จะทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ 96-well U-bottomed polypropylene plate ก่อน รอจนอาหารแข็งแล้วจึงหยดตัวอย่างลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับเพลทที่จะใช้ในการเทอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริงจะมี 2 แบบ Petri dish แบบแก้วและ 96-well U-bottomed polypropylene plate



(ก) จานเพาะเชื้อแบบแก้ว



(ข) จานเพาะเชื้อ 96-well U-bottomed polypropylene plate

รูปที่ 3.2 ประเภทจานเพาะเชื้อ (ก) จานเพาะเชื้อแบบแก้ว, (ข) จานเพาะเชื้อแบบ 96-well U-bottomed polypropylene plate

3.6.1.4 สภาพการบ่มเชื้อที่เหมาะสม

จานเพาะเชื้อทุกจานที่เตรียมเสร็จแล้วจะต้องกลับจานในระหว่างการบ่มเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดหยดน้ำซึ่งอาจเกิดขึ้นที่ฝาของจานเพาะเชื้อลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำให้โคโลนีของแบคทีเรียแพร่กระจายได้ อุณหภูมิในตู้บ่มควรจะแน่นอน ในการทดลองใช้อุณหภูมิในการบ่มคือ 35±2 °C

3.6.1.5 การนับจำนวนโคโลนี

1) จานเพาะเชื้อที่เกิดโคโลนีของแบคทีเรียแพร่กระจายอย่างสม่ำเสมอและมีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนีเท่านั้นที่เหมาะสมจะนำมานับจำนวน

2) ถ้าทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง จานแรกมีแบคทีเรีย 30 - 300 โคโลนี จานที่ 2 มีไม่ถึง ให้นำจำนวนโคโลนีทั้ง 2 จานมารวมกันแล้วหาค่าเฉลี่ย

3) เฉลี่ยจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากจานที่นับได้ในความเข้มข้นติดกัน ถ้าจำนวนที่สูงกว่ามีจำนวนที่ต่ำกว่าสองเท่าหรือน้อยกว่า แต่ถ้าจำนวนที่สูงกว่ามีจำนวนมากกว่าจำนวนที่ต่ำกว่าเกินกว่าสองเท่าตัวไม่ต้องหาค่าเฉลี่ย ให้ใช้จำนวนที่ต่ำกว่าเท่านั้น

4) ถ้าจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อทุกความเจือจางมีน้อยกว่า 30 โคโลนี ให้บันทึกจำนวนโคโลนีลงในจานเพาะเชื้อที่มีความเจือจางต่ำสุด แล้วรายงานเป็น Estimated SPC (ESPC) ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม

5) ถ้าไม่เกิดโคโลนีของจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อทุกจานให้รายงานค่า SPC ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมเป็นน้อยกว่า 1 เท่าของความเจือจางต่ำสุด

6) ถ้าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อทุกจานมีมากกว่า 300 โคโลนี ให้คัดเลือกจานที่มีโคโลนีใกล้เคียงกับ 300 มากที่สุด (หรือจานเพาะเชื้อที่มีการเจือจางสูงสุด) แล้วรายงานเป็นค่า ESPC ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม

จำนวนโคโลนีที่นับได้ในจานเพาะเชื้อ จะต้องนำมาคูณด้วยส่วนกลับของอัตราส่วนการเจือจางของจานตัวอย่าง จะได้จำนวนของแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมในตัวอย่างอาหาร รายงานผลเป็น SPC ต่อมิลลิลิตร หรือ SPC ต่อกรัม

หมายเหตุ การคัดเลือกและการนับโคโลนีอาจขึ้นอยู่กับมาตรฐานของวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.6.1.6 การคำนวณจำนวนและรายงานผล

การคำนวณจำนวนจุลินทรีย์และการรายงานผลจะขึ้นอยู่กับมาตรฐานของวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น Colony Forming Unit (CFU), log CFU

3.6.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนใน line การผลิต (Swab test)

การทำ SWAB test ตัวอย่างที่จะสุ่มจะเป็นอุปกรณ์ในไลน์การผลิตและในห้องน้ำ เพื่อดูว่าภาชนะนั้นสะอาดเพียงใด เพราะถ้าภาชนะสกปรกจะทำให้อาหารที่บรรจุในภาชนะนั้นสกปรกไปด้วย และถ้าในภาชนะนั้นมีแบคทีเรียมาก ๆ ก็อาจจะมีพวกที่มีโทษหรือเชื้อโรคปะปนอยู่ด้วยก็ได้ จึงจำเป็นต้องตรวจสอบความสะอาดของภาชนะ เพื่อจะได้ทราบว่าภาชนะนั้นมีมาตรฐานทางแบคทีเรียอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้หรือไม่ สำหรับการตรวจสอบความสะอาดในห้องน้ำเพื่อเป็นการเช็คระดับของความสะอาด ถ้าในห้องน้ำมีระดับของการ

ปนเปื้อนเชื้อสูง โอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนเชื้อติดมากับพนักงานเป็นไปได้มากถ้าพนักงานมีสุขลักษณะไม่สะอาด ก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามไปยังไลน์การผลิตได้

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสำหรับในโครงการวิจัยนี้ จะใช้ 2 วิธี คือ

1. เทคนิคการ swab ของทางโรงงาน
2. เทคนิคการ swab แบบ Easy swab

3.6.2.1 หลักการเบื้องต้นสำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการ swab ของทางโรงงาน

3.6.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้

อุปกรณ์สำหรับ swab ตัวอย่าง ที่พนักงานนำเข้าไปใน line การผลิต ประกอบไปด้วย ไม้ cotton swab ที่ฆ่าเชื้อแล้ว, rack สแตนเลสที่ใส่แท่งแก้วบรรจุสารละลายน้ำยาบัฟเฟอร์, ไฟแช็ค, ตะเกียงแอลกอฮอล์

(ก) (ข) (ค) (ง)

รูปที่ 3.3 อุปกรณ์สำหรับ swab แบบโรงงาน (ก) cotton swab, (ข) rack สแตนเลสใส่หลอดแก้วบรรจุสารละลายน้ำยาบัฟเฟอร์, (ค) ไฟแช็ค, (ง) ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.6.2.1.2 การเก็บตัวอย่าง

ในสถานที่หนึ่งๆ จะมีการเก็บตัวอย่างหลาย ๆ ชนิด เช่น จาน ช้อน แก้ว ภาชนะ เขียง กะละมัง หม้อผสม ถาดแสตนเลส โดยจะต้องระวังอย่าให้เกิดความสกปรกโดยการจับต้อง

3.6.2.1.3 การ swab จุดที่ต้องการตรวจ

1) ใช้ไม้ SWAB 1 อันต่อภาชนะที่ตรวจ 1 ชิ้น

2) เปิดจุกน้ำยาบัฟเฟอร์แล้วเผาปลายหลอดด้วยไฟแอลกอฮอล์ เสร็จแล้วใช้ไม้ SWAB จุ่มลงไป บิดให้น้ำยาแห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอด

3) เอาไม้ SWAB ทำการกวาดผิวหน้าของภาชนะ พื้นที่ในการกวาดเท่ากับ 25 ตารางเซนติเมตร

4) เมื่อกวาดภาชนะอันหนึ่งเสร็จแล้วให้เอาไม้ SWAB จุ่มลงไปในน้ำยาบัฟเฟอร์เดิม แล้วบีบเอาสิ่งสกปรกออก โดยการกดไม้ SWAB กับผิวด้านในของหลอดทดสอบ ปิดจุกให้แน่นและเรียบร้อย

3.6.2.1.4 การ swab มือบุคคลที่เกี่ยวข้องหรือสัมผัสกับอาหาร

ทำเช่นเดียวกับการ SWAB ภาชนะเพียงแต่ในการป้ายมือผู้สัมผัสอาหารต้องป้ายที่มือจากปลายนิ้วถึงข้อมือ

3.6.2.2 รายละเอียดการทดลองโดยการ swab แบบ easy swab

3.6.2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้

อุปกรณ์สำหรับ Swab ตัวอย่างใน line การผลิต ประกอบไปด้วยถุง Easy Swab ซึ่งภายในบรรจุวัสดุสำหรับกวาดผิวหน้าตัวอย่าง

รูปที่ 3.4 อุปกรณ์สำหรับ swab แบบ easy swab

3.6.2.2.2 การเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างโดยการใช้เทคนิค easy swab ตัวอย่างที่จะเก็บจะเป็นตัวอย่างเดียวกับการใช้เทคนิควิธี swab ของทางโรงงาน โดยในการเก็บจะต้องระมัดระวังอย่าให้เกิดความสกปรกในระหว่างการเก็บเช่นกัน

3.6.2.2.3 การ swab จุดที่ต้องการตรวจ

1) ใช้ถุง Easy swab ที่บรรจุวัสดุสำหรับกวาดผิวหน้าตัวอย่าง 1 ถุงต่อภาชนะที่ตรวจ 1 ชิ้น

2) เปิดปากถุงแล้วใช้มือดันปลายถุงพลาสติกเข้าไปจับวัสดุสำหรับกวาดผิวหน้าตัวอย่างจากด้านล่างถุง ดันขึ้นไปที่ด้านบนโดยให้อยู่ในลักษณะที่มือพนักงานสามารถจับชิ้นวัสดุได้โดยไม่สัมผัสโดยตรงดังแสดงในรูปที่ 3.5

3) มือพนักงานที่จับวัสดุทำการกวาดผิวหน้าของภาชนะ พื้นที่ในการกวาดเท่ากับ 900 ตารางเซนติเมตรดังแสดงในรูปที่ 3.6

4) เมื่อกวาดภาชนะอันหนึ่งเสร็จแล้ว ให้ดึงถุงขึ้นมาเพื่อเก็บตัวอย่างไว้ในถุง จากนั้นนำถุงดังกล่าวไปทำการเติมบัพเฟอร์ที่ห้องปฏิบัติการ Lab

3.6.2.2.4 การ swab มือบุคคลที่เกี่ยวข้องหรือสัมผัสกับอาหาร

ทำเช่นเดียวกับการ SWAB ภาชนะเพียงแต่ใช้วัสดุกวาดบนมือผู้สัมผัสอาหาร โดยต้องกวาดที่มือจากปลายนิ้วถึงข้อมือ

รูปที่ 3.5 วิธีการใช้อีซี่ swab โดยเปิดปากถุงแล้วใช้มือดันวัสดุสำหรับกวาดผิวหน้าตัวอย่างจากด้านล่างถุงดันขึ้นไปที่ด้านบน

รูปที่ 3.6 การใช้อีซี่ swab : โดยการใช้วัสดุกวาดผิวหน้าของภาชนะขนาด 900 ตารางเซนติเมตร

3.7 เทคนิคการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารจริง

3.7.1 การวิเคราะห์จุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Pour plate อิงตามมาตรฐาน BAM

1) ชั่งตัวอย่างปริมาณ 25±0.5 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อ เติม BPB ปริมาตร 225 ml ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยนำไปตีด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที ความเร็วระดับปานกลางตัวอย่างที่ได้มีความเจือจาง 10 เท่า

2) ทำการเจือจางโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรโดยใส่ในหลอดที่มี BPP จำนวน 9 ml เขย่าอย่างน้อย 25 ครั้ง หรือใช้ผสมตัวอย่าง (vortex mixer) ตัวอย่างที่ได้ในตอนนี้มีการเจือจางเป็น 10^{2} และทำเช่นเดียวกันจนได้ตัวอย่างที่มีการเจือจางเป็น 1000, 10000 เท่า หรือเจือจางตามความเหมาะสมตามชนิดของตัวอย่าง

3) ปิเปตตัวอย่าง 1 ml ของแต่ละความเจือจาง ลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการบ่งชี้รหัสแล้ว โดยแต่ละการเจือจางให้ทำ 2 ซ้ำ (Duplicate)

4) เทอาหาร PCA ที่มีอุณหภูมิ 45±5 °C ลงในจานเพาะเชื้อ ทำให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันทันทีโดยการหมุนจานเพาะเชื้อตาม - ทวนเข็มนาฬิกาและขึ้น – ลงในแนวระนาบ รอจนอาหารแข็ง จำนวนครั้งเท่า ๆ กัน

5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 48 ± 2 h (สำหรับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด) หรือ 24 ± 2 h (สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค) โดยคว่ำจานเพาะเชื้อแล้วจึงนำมานับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25 – 250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อหรือ 30 – 300 CFU/g คำนวณและรายงานผลการทดสอบ

6) การคำนวณ

- กรณีที่จานเพาะเชื้อทุกความเจือจางมีโคโลนีอยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนี ใช้สูตรดังนี้

$$N = £c/[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_1)] \times (d)$$

N = จำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัม หรือมิลลิลิตรของอาหาร

£c = ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้

n_1 = จำนวนการเพาะเชื้อในการเจือจางแรก

n_2 = จำนวนการเพาะเชื้อในการเจือจางหลัง

d = การเจือจางแรกที่นับได้

- กรณีที่จานเพาะเชื้อมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 25โคโลนีจากทั้งสองการเจือจาง ให้นำจำนวนโคโลนี คูณ Dilution factor ที่ได้จากการเจือจางแรกที่นับ รายงานเป็นจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้โดยประมาณ (ESTIMATE THE AEROBIC PLATE COUNT/EAPC)

3.7.2 การวิเคราะห์จุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Spread plate ประยุกต์ลูกแก้วอิงตามมาตรฐาน BAM

1) ชั่งตัวอย่างปริมาณ 25±0.5 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อ เติม BPB ปริมาตร 225 ml ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยนำไปตีด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที ความเร็วระดับปานกลาง

2) ตัวอย่างที่ได้มีความเจือจาง 10 เท่า ทำการเจือจางโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 ml โดยใส่ในหลอด 9 ml BPB เขย่าอย่างน้อย 25 ครั้ง หรือใช้ผสมตัวอย่าง (vortex mixer) ตัวอย่างที่ได้ในตอนนี้มีการเจือจางเป็น 10^{-2} และทำเช่นเดียวกันจนได้ตัวอย่างที่มีการเจือจางเป็น 1000, 10000 เท่า หรือเจือจางตามความเหมาะสม ตามชนิดของตัวอย่าง

3) ปิเปตตัวอย่าง 0.1 ml ของแต่ละการเจือจางลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่แล้ว และทำการเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้ลูกแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5 เม็ด หมุนจานเพาะเชื้อตาม - ทวนเข็มนาฬิกาและขึ้น – ลงในแนวระนาบจำนวนครั้งเท่า ๆ กัน เทลูกแก้วออกในแต่ละการเจือจางให้ทำ 2 ซ้ำ (Duplicate)

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 h โดยคว่ำจานเพาะเชื้อแล้วจึงมานับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25 – 250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อหรือ 30 – 300 CFU/g คำนวณและรายงานผลการทดสอบ

5) การคำนวณ

- กรณีที่จานเพาะเชื้อทุกความเจือจางมีโคโลนีอยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนี ใช้สูตรดังนี้

$$N = £c/[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_1)] \times (d)$$

N = จำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัม หรือมิลลิลิตรของอาหาร

£c = ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้

n_1 = จำนวนการเพาะเชื้อในการเจือจางแรก

n_2 = จำนวนการเพาะเชื้อในการเจือจางหลัง

d = การเจือจางแรกที่นับได้

- กรณีที่จานเพาะเชื้อมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 25 โคโลนีจากทั้งสองการเจือจางให้นำจำนวนโคโลนี คูณ Dilution factor ที่ได้จากการเจือจางแรกที่นับ รายงานเป็นจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้โดยประมาณ (ESTIMATE THE AEROBIC PLATE COUNT/EAPC)

3.7.3 การวิเคราะห์หา *E. coli*/coliform โดยใช้ Petrifilm^{TM}EC plate อิงตามมาตรฐาน AOAC

1) ชั่งตัวอย่างปริมาณ 25 ±0.5 กรัมหรือมิลลิลิตร ใส่ในถุงปลอดเชื้อ (Stomacher bag) เติม BPB ปริมาตร 225 ml

2) ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยนำไปตีด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที ตัวอย่างที่ได้มีการเจือจางเป็น 10^{-1}

3) เจือจางตัวอย่าง โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 ml ใส่ใน 9 ml ของ BPB ตัวอย่างที่ได้ในตอนนี้มีการเจือจางเป็น 10^{-2} และทำซ้ำจนได้ตัวอย่างที่มีการเจือจางเป็น 10^{-3}, 10^{-4} หรือได้การเจือจางที่เหมาะสม

4) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 ml เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้นแล้วค่อย ๆ ปล่อยสารละลายตัวอย่างลงกลางแผนฟิล์มแผ่นล่าง ให้ปิเปตตั้งฉากกับแผ่นฟิล์มค่อย ๆ ปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนลง ระวังไม่ให้เกิดฟองแก๊ส

5) วางแผ่นสำหรับกด (Spreader) ลงบนแผ่นฟิล์มแผ่นบน โดยให้ด้านที่เรียบคว่ำหน้าลง ให้ส่วนวงกลมครอบบริเวณหยดตัวอย่าง ใช้นิ้วชี้ค่อย ๆ กดตรงกลาง Spreader จนเห็นตัวอย่างกระจายทั่วบริเวณวงกลม อย่าบิดหรือเลื่อนแผ่น Spreader ยกแผ่น Spreader ออก รอ 2 - 3 นาที เพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัว ก่อนเคลื่อนย้ายแผ่น Petrifilm

6) นำแผ่นฟิล์มไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 – 48 h โดยให้ด้านใสหงายขึ้น สามารถเรียงซ้อนแผ่น Petrifilm ได้ไม่เกิน 20 แผ่น

7) อ่านผลทันทีหลังจากครบกำหนดเวลา โดยนับโคโลนีเฉพาะที่อยู่ในขอบเขตพื้นที่วงกลม 20 ตร.ซม. เท่านั้น ไม่นับโคโลนีที่อยู่บนขอบโฟม เนื่องจากเป็นโคโลนีที่อยู่นอกขอบเขตของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ ช่วงการนับที่เหมาะสมของ Petrifilm™ *E.coli* / coliform คือ 15 - 150 โคโลนี

- โคโลนีสีน้ำเงินที่มีฟองแก๊สอยู่ในระยะไม่เกินหนึ่งช่วงโคโลนี อ่านผลเป็น *E. coli*
- โคโลนีสีน้ำเงินและแดงที่มีฟองแก๊สอยู่ในระยะไม่เกินหนึ่งช่วงโคโลนี อ่านผลเป็น coliforms

8) การคำนวณ

คำนวณจำนวนโคโลนีต่อกรัม โดยนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้บน 1 แผ่น (หรือค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้กรณีที่ทำการทดสอบซ้ำ) มาคูณด้วย Dilution Factor โดยนับโคโลนีของ *E. coli* ให้นับโคโลนีสีน้ำเงินที่มีฟองก๊าซอยู่ในรัศมีไม่เกิน 1 ช่วงโคโลนีและ coliform ให้นับโคโลนีสีน้ำเงินที่มีฟองก๊าซอยู่ในรัศมีไม่เกิน 1 ช่วงโคโลนี

- กรณีที่ทุกแผ่นมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 15 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีในแผ่นที่มีการเจือจางที่น้อยที่สุดมาคูณด้วย Dilution Factor แล้วรายงานผลออกมาเป็นค่าที่คาดคะเน (Estimated counts)
- กรณีที่นับจำนวนโคโลนีในแผ่นที่มี Dilution ที่ต่างกัน ให้คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละ Dilution ก่อน แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีทั้งหมดอีกที
- กรณีที่ทุกแผ่น มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 150 โคโลนี ให้นับแบบประมาณ โดยเลือกนับโคโลนีในช่องสี่เหลี่ยมซึ่งมีพื้นที่ 1 ตร.ซม. (เลือกจำนวนช่องที่จะนับตามความเหมาะสม) นำมาหาค่าเฉลี่ยต่อ ตร.ซม. แล้วคูณด้วย 20 เพื่อคำนวณเทียบกลับให้ได้พื้นที่เจริญของเชื้อในวงกลมทั้งหมด 20 ตร.ซม. ซึ่งจะได้จำนวนโคโลนีโดยประมาณให้รายงานผลเป็นค่าคาดคะเน (Estimated counts)
- กรณีที่มีจำนวนโคโลนีมากเกินกว่าจะนับได้ โดยมีลักษณะใดลักษณะหนึ่งหรือหลายลักษณะ ดังต่อไปนี้ เช่น มีโคโลนีเล็ก ๆ มากมาย มีฟองแก๊สมากมายและเนื้อเจลสีเข้มขึ้นจากแดงเป็นน้ำเงินอมม่วง ลักษณะเช่นนี้ให้รายงานผลเป็น Too numerous to count (TNTC)

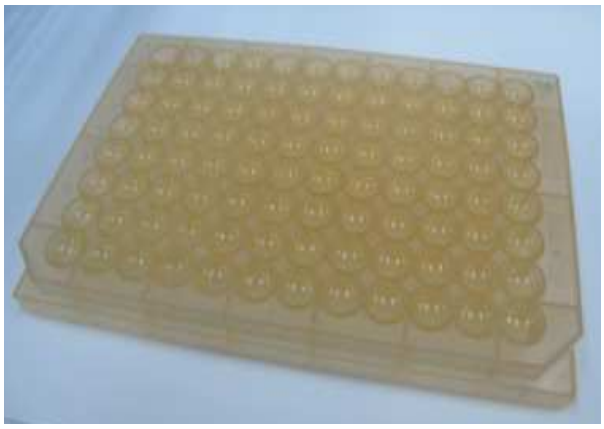
3.7.4 การวิเคราะห์จุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค MIC

3.7.4.1 การเตรียมจานเพาะเชื้อ

1) นำจานเพาะเชื้อชนิด 96-well U-bottomed polypropylene plate เช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งให้แห้งในตู้ Laminar จากนั้นฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย UV 15 นาที ระวังอย่าให้ผิวหน้าของจานเพาะเชื้อและพลาสติกสัมผัสมือ

2) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความร้อนประมาณ 60 °C ด้วย mechanical stepper ลงใน well แต่ละหลุมปริมาณ 0.5 ml

3) ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 – 20 นาที จากนั้นฆ่าเชื้อด้วย UV 15 นาที ได้เป็น 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่มี agar พร้อมทดสอบกับตัวอย่าง (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3.7 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่มี agar แข็งตัวแล้ว

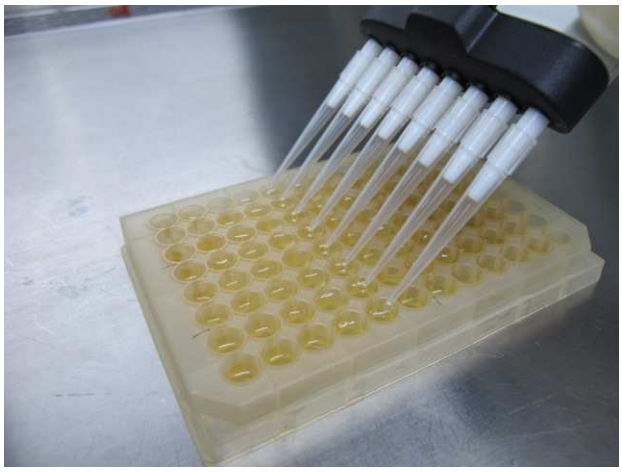
3.7.4.2 ขั้นตอนการทดสอบ

1) ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.5 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อ เติม BPB ปริมาตร 225 ml ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยนำไปตีด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที ความเร็วระดับปานกลางตัวอย่างที่ได้มีความเจือจาง 10 เท่า

2) ทำการเจือจางโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรโดยใส่ในหลอด 9 มิลลิลิตร BPB เขย่าอย่างน้อย 25 ครั้ง หรือใช้ผสมตัวอย่าง (vortex mixer) ตัวอย่างที่ได้ในตอนนี้มีการเจือจางเป็น 10^{2} และทำเช่นเดียวกันจนได้ตัวอย่างที่มีการเจือจางเป็น 1,000, 10,000 เท่า หรือเจือจางตามความเหมาะสมตามชนิดของตัวอย่าง

3) จากนั้นหยดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ด้วย Multichannel pipette (รูปที่ 3.8) ลงในจานเพาะเชื้อ 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่มีอาหารแข็ง โดยในจานเพาะเชื้อจะมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมซึ่งมี

วงกลม 96 วง การใช้งานคือตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างต่อหนึ่งวงกลม ดังนั้นเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถึง 96 ตัวอย่างในจานเพาะเชื้อจานเดียว



รูปที่ 3.8 การหยดตัวอย่างบน 96-well U-bottomed polypropylene plate ด้วยการใช้ Multichannel pipette

4) หลังจากหยดตัวอย่างแล้วทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อรอตัวอย่างซึมลงอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 ˚C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง โดยในระหว่างการบ่ม มีการตรวจติดตามโคโลนีด้วยการนำตัวอย่างออกมาบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง เพื่อตรวจติดการการเกิดโคโลนี เมื่อปรากฏเห็นเป็นโคโลนี คำนวณและรายงานผลการทดสอบ

5) การคำนวณ

$$N = \frac{n}{5}(10^3)(d)$$

N = จำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัม หรือมิลลิลิตรของอาหาร

n = จำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้

d = การเจือจางที่นับได้

3.8 การประเมินความพึงพอใจในการใช้เทคนิควิเคราะห์ MIC เปรียบเทียบกับวิธี pour plate

การประเมินความพึงพอใจในการใช้เทคนิควิเคราะห์จะประเมินผ่านแบบสอบถามที่มีการให้คะแนนความชอบในหัวข้อต่างๆ (ภาคผนวก) โดยการดำเนินการดังกล่าวจะปฏิบัติโดยเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการ QC ประมาณ 5 – 8 คน เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้งาน ทั้งนี้ในแต่ละหัวข้อจะมีคะแนนเต็ม 9 คะแนน

จาก 1 (ไม่ชอบมากที่สุด) ถึง 9 (ชอบมากที่สุด) จากนั้นนำคะแนนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Hasan et al., 2004; Juyun, 2011)

3.9 ประเมินต้นทุนในการออกแบบและสร้างชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปอย่างรวดเร็วและประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร

ในการคิดต้นทุนการวิเคราะห์ ทางผู้วิจัยได้ดำเนินการเปรียบเทียบค่าวัสดุอุปกรณ์และค่าดำเนินการจากทั้ง 2 วิธีที่นำเสนอ (MIC) เปรียบเทียบกับวิธีที่ทางโรงงานใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (Pour plate) โดยปริมาตรของอาหาร CCA และปริมาณของวัสดุที่ใช้ เช่น 96-well U-bottomed polypropylene plate และเพลทแก้ว จะถูกนำเข้ามาคิดเป็นต้นทุนการดำเนินงาน (Pavic et al., 2010; Chenu et al., 2013)

3.10 การทดสอบเพื่อยืนยันผลโคโลนี *E. coli* และ *E. coli* O157:H7

โคโลนีที่ปรากฏอยู่บนอาหาร MIC ที่เป็นอาหาร Chromocult®coloform agar จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส, เมลิไบโอส, แมนโนส, ฟรุคโตส, ซอร์บิทอล, แลคโตส, เด็กซ์โตส, อินโนซิทอล, แรมโนส, กาแลคโตส, เซลโลไบโอส, ดูซิทอล, ซาลิซิน, อะโดนิทอล, อะราบิโนส, ทรีฮาโลส, ไซโลสและแมนนิทอล และการใช้กรดอะมิโนไลซีน ออร์นิทินและอาร์จินิน ในรูปแบบอาหาร miniaturized biochemical broths เพื่อยืนยันผลเชื้อ *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 โดยรายละเอียดขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงดังต่อไปนี้

3.10.1 การเตรียม cell suspension ของโคโลนีเชื้อที่ต้องการตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

จากในขั้นตอน presumptive test เมื่อปรากฏเชื้อโคโลนีสีม่วงซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *E. coli* และโคโลนีสีแดงซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *E. coli* O157:H7 โคโลนีดังกล่าวจะถูก loop เกี่ยวลงในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาณ 1 ml ที่บรรจุใน eppendorf จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน cell suspension ของเชื้อที่ต้องการทดสอบจะถูกนำไปบรรจุใน miniaturized biochemical broths ชนิดต่างๆ ต่อไป

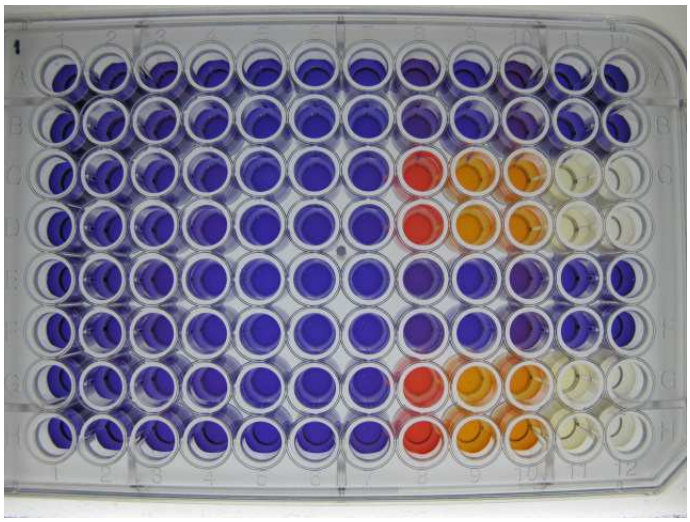
3.10.2 การเตรียม miniaturized biochemical broths ชนิดต่างๆ

ในการเตรียมอาหารเหลวจำเพาะซึ่งประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโต (i.e., เปปโตน, ซอยโตน) สารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา (กรดอะมิโนและน้ำตาลชนิดต่างๆ) และพีเอชอินดิเคเตอร์ ชั่งส่วนประกอบต่างๆของอาหาร แล้วเติมน้ำกลั่นตามสัดส่วนที่ได้คำนวณไว้ลงในภาชนะที่มีฝาปิด จากนั้น

เขย่าส่วนประกอบทั้งหมดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้มาปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วงพีเอช 7 แล้วจึงนำอาหารดังกล่าวไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.45 ไมครอนและเก็บภายใต้อุปกรณ์ที่ปราศจากเชื้อ อาหารเหลวจำเพาะดังกล่าวสามารถนำไปใช้ได้ทันที หรือสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 4 °C ได้นานประมาณ 1-2 สัปดาห์ ลักษณะอาหารจะต้องใส ไม่มีตะกอนขุ่น และมีสีเป็นไปตามที่ปรับพีเอชไว้ข้างต้น

3.10.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์

เมื่อต้องการจะทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง อาหารเหลวจำเพาะจะถูกถ่ายลงใน 96 – well flat bottom microplate ในปริมาณ 180 µl ดังแสดงในรูปที่ 3.9 จากนั้นนำตัวอย่าง cell suspension ที่เตรียมจากในข้อ 3.10.1 มาทดสอบในอาหารเหลวจำเพาะปริมาณ 20 µl แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 37°C เป็นเวลา 12 ถึง 48 h ทั้งนี้จะมีตัวอย่างควบคุมคือ อาหารเหลวจำเพาะที่ไม่ได้มีการใส่ตัวอย่างใดๆ เพื่อเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อน



รูปที่ 3.9 อาหารจำเพาะ biochemical broths ชนิดต่างใน 96 – well flat bottom microplate

3.10.4 การวิเคราะห์ผล

นำอาหารเหลวจำเพาะที่บ่มไว้มาตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Khueankhancharoen et al., 2016) สำหรับปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนและ 600 นาโนเมตร ของปฏิกริยาความสามารถในการใช้น้ำตาล โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง microplate

reader ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 และ 24 h จากนั้นนำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่มกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform และแนวทางเพื่อการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในเวลาอันสั้น เหมาะสำหรับนำไปใช้ตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกที่จำเป็นต้องมีการตรวจสอบเป็นปริมาณมาก ทั้งนี้การตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารแสดงว่าอาหารไม่สะอาด ขาดสุขลักษณะในการผลิต อาจไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *E. coli*/coliform เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น เช่น คน หรือสัตว์ต่างๆ การที่ผลิตภัณฑ์อาหารเกิดการปนเปื้อนอาจเนื่องมาจากพนักงานล้างมือไม่สะอาดหลังจากเข้าห้องน้ำ หรือสัตว์เลี้ยงมีการถ่ายสิ่งปฏิกูลที่ติดเชื้อลงไปในดินซึ่งอาจจะปนเปื้อนไปตามแหล่งน้ำ และเกิดการ contamination ติดมากับวัตถุดิบเช่น พืช ผัก ผลไม้ที่ส่งเข้าโรงงาน ดังนั้นการตรวจสอบจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงเป็นดัชนีบ่งชี้ (index microorganisms) ว่ากระบวนการผลิตอาหารถูกสุขลักษณะหรือไม่ โดยทั้งนี้ sample ที่มีการตรวจสอบพบเชื้อ *E. coli*/coliform ในผลิตภัณฑ์อาหารถือได้ว่าตัวอย่างนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 (Manafi, 2000) ซึ่งถ้าผลิตภัณฑ์อาหารมีการติดเชื้อของ *E. coli* สินค้า lot นั้นจำเป็นต้อง reject ในทันที เนื่องจากเชื้อ *E. coli* O157:H7 เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความรุนแรงกว่าเชื้อสายพันธุ์ของ *E. coli* ธรรมดา ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันความปลอดภัยของผู้บริโภคที่อาจจะเกิดขึ้น เมื่อตรวจพบเชื้อเพียงแค่ *E. coli* จำเป็นต้องมีการ reject สินค้า lot นั้นทันที ดังเช่นมาตรฐานการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารเข้าประเทศญี่ปุ่นจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *E coli* ในผลิตภัณฑ์ที่จะนำเข้าประเทศ

ในงานวิจัยนี้จึงเป็นการนำเสนอรูปแบบการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform เพื่อรองรับอุตสาหกรรมโรงงานอาหารที่มีผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่จำเป็นต้องวิเคราะห์จำนวนมากเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานการส่งออกและเป็นไปตามความต้องการของลูกค้า โดยจะเป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงวิธีการและเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจนับการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงลดระยะเวลาการวิเคราะห์ด้วยการใช้กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงเพื่อตรวจนับโคโลนีภายในระยะเวลาน้อย ซึ่งนวัตกรรมเทคนิคที่นำเสนอช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น นำไปสู่การพัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถวิเคราะห์การตรวจนับการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันทางการค้า อีกทั้งเพื่อ

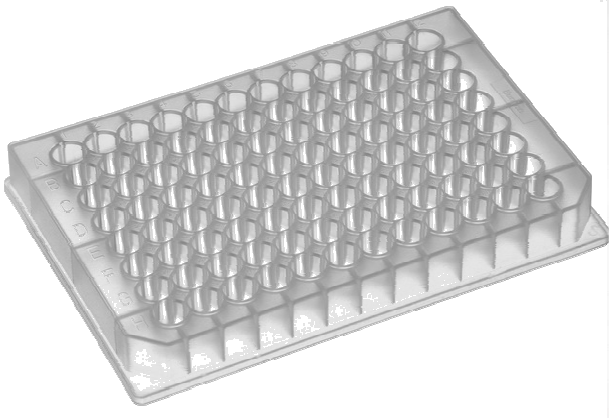
เป็นข้อมูลเบื้องต้นต่อการขยายผลเพื่อศึกษาวิจัยการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* O157:H7 เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจเชื้อดังกล่าว ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ในปัจจุบัน (i.e., pour plate, Petrifilm™ EC plate) โรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถและเทคนิคเฉพาะทางสูงอีกทั้งใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งถ้าโรงงานอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยยังคงใช้วิธีการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาแบบเดิมอยู่นั้น อาจทำให้ไม่สามารถจัดส่งสินค้าได้ทันต่อความต้องการของลูกค้า เนื่องจากการไหลของกระบวนการผลิตที่ช้าจากการที่ต้องรอผลการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์จากแผนกควบคุมคุณภาพ และเมื่อประเมินผลทางด้านเศรษฐศาสตร์พบว่าค่าใช้จ่ายที่ต้องสูญเสียเป็นจำนวนมากจากการตรวจสอบเชื้อในผลิตภัณฑ์สำหรับการประเมินสินค้าที่ผลิตเพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ รวมถึงการตรวจสอบเชื้อตลอดกระบวนการผลิตที่ต้องใช้เวลานาน มีผลกระทบต่อต้นทุนการผลิต ทำให้ผลกำไรที่ควรจะได้น่าจะสูงกว่านั้น แต่ต้องสูญเสียไปส่วนหนึ่งเนื่องจากค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงและพัฒนาวิธีการตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform ร่วมกับวิธีใหม่ ๆ ที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ จากเหตุผลและความจำเป็นดังที่กล่าวจึงเป็นที่มาของงานวิจัย การพัฒนานวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้นสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของประเทศและเพื่อต่อยอดงานวิจัยบ่งชี้การปนเปื้อนของสายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่าง โดยรายละเอียดการวิจัยแสดงดังต่อไปนี้

4.1 การนำเสนอรูปแบบอุปกรณ์เพื่อลดขนาดการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7

4.1.1 การใช้อุปกรณ์ 96-well U-bottomed polypropylene plate เพื่อลดขนาดการวิเคราะห์

เนื่องจากการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform มีหลายเทคนิควิธี เช่น Pour plate, Spread plate, Petrifilm™ EC plate, และ MPN (APHA, 2001) ซึ่งในแต่ละวิธีมีการใช้อุปกรณ์ที่แตกต่างกันไป ยกตัวอย่าง เช่น วิธีการวิเคราะห์แบบ pour plate เป็นการใช้ Petri dish แก้วและวิธี MPN เป็นการใช้หลอดแก้ว ในขณะที่ Petrifilm™ EC plate เป็นแผ่นเจลพร้อมใช้ซึ่งมีราคาแพง การใช้อุปกรณ์ที่เป็นแก้ว Petri dish กับ test tube การใช้อุปกรณ์ดังกล่าวมีข้อจำกัดโดยวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนน้อย ใช้ media อย่างน้อย 15 – 20 ml บางครั้งการทดสอบให้ผล negative ก็เป็นการสูญเสีย media ซึ่งก็จะเป็นค่าใช้จ่ายที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ อีกทั้งมีความยุ่งยากในการล้างทำความสะอาด ต้องใช้แรงงานคนจำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเสนอรูปแบบเทคโนโลยีการวิเคราะห์แบบใหม่โดยเป็นเทคนิคการลดขนาดการวิเคราะห์ด้วยการใช้อุปกรณ์ 96-

well U-bottomed polypropylene plate อุปกรณ์ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เทียบเท่ากับการใช้ Petri dish 96 เพลท ใช้ media ประมาณ 0.5 ml ต่อหลุม สามารถลดปริมาณการใช้ media ลงได้เกือบ 30 เท่า นอกจากนี้ด้วยรูปลักษณ์ของตัวอุปกรณ์ที่เป็น 8 แถว (ด้านกว้าง) หรือ 12 แถว (ด้านยาว) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ทำให้สะดวกในการลำเลียง media โดยการใช้อุปกรณ์ 8 หรือ 12 Multichannel pipette

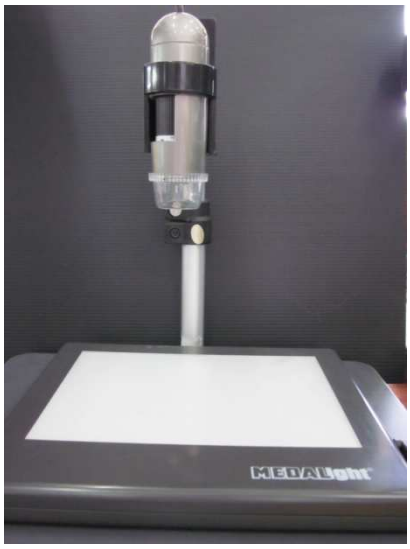


รูปที่ 4.1 96-well U-bottomed polypropylene plate สำหรับวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคโนโลยีการลดขนาดการวิเคราะห์

ในการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate เพื่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *E. coli*/coliform เทคนิคดังกล่าวใช้ media จำนวนน้อยและใช้ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ 10 μl (Liamkaew et al., 2014; Khueankhancharoen et al., 2016) เทคนิคการวิเคราะห์ดังกล่าวจัดได้ว่าเป็นเทคโนโลยี Micro Inoculation Culture (MIC) ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับโรงงานอุตสาหกรรมอาหารในการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกทั้งในและนอกประเทศ

4.1.2 การใช้เทคโนโลยีการตรวจติดตามโคโลนีเชื้อด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง (Digital microscope) เพื่อลดเวลาการตรวจวิเคราะห์

การวิเคราะห์จุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค MIC จะเป็นการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate จะทำให้สามารถลดระยะเวลาและต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากเทคนิค MIC เป็นเทคนิคใหม่ที่มีการประยุกต์ใช้ระบบการวิเคราะห์โดยใช้ภาพถ่าย (Image analysis) ที่มีกำลังขยายสูงสุด ทำให้สามารถเห็นโคโลนีภายในเวลาที่รวดเร็ว รวมไปถึงจานเพาะเชื้อที่ใช้อาหารปริมาณน้อย อีกทั้งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้พร้อมกัน 96 ตัวอย่าง โดยปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้เท่ากับ 10 μl ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง (Digital microscope) สำหรับวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคโนโลยีการลดขนาดการวิเคราะห์

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วย 96-well U-bottomed polypropylene plate ร่วมกับการใช้อุปกรณ์กล้องกำลังขยายสูง (Digital microscope) การทำงานร่วมกันของอุปกรณ์ดังกล่าว ช่วยทำให้โรงงานอุตสาหกรรมสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างหรือสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากซ้ำ ลดโอกาสความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากมีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่น้อยจำนวน อีกทั้งอุปกรณ์กล้องกำลังขยายสูงช่วยทำให้สามารถเห็นโคโลนีได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 18 ชั่วโมง โดยที่ไม่จำเป็นต้องรอให้เห็นเป็นโคโลนีขนาดใหญ่ ดังนั้นนวัตกรรมชุดตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform และ *E.coli* O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้นจึงประกอบไปด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ 96-well U-bottomed polypropylene plate ร่วมกับการใช้กล้องกำลังขยายสูงในการตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์อาหาร

4.2 การตรวจสอบความแม่นยำและถูกต้องของการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate เทียบกับวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน

จากที่ได้กล่าวมาในปัจจุบัน การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *E. coli*/coliform มีหลากหลายเทคนิคขึ้นกับความต้องการของลูกค้าและเป็นไปตามมาตรฐานของแต่ละประเทศ เช่น Pour plate, Spread plate, Petrifilm™ EC plate, และ MPN (Feng, 1982; Firstenberg-Eden, 1985; Fung, 1992) ซึ่งในแต่ละวิธีดังแสดงในตารางที่ 4.1 มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงเป็นการสอบเทียบการใช้เทคนิค MPN,

Pour plate, Petrifilm™ EC plate, และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เพื่อใช้ในการตัดสินใจในการหาวิธีที่เหมาะสมให้กับทางโรงงาน

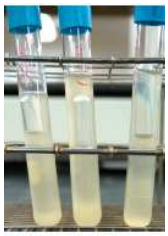
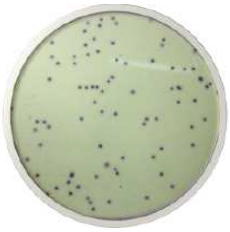
4.2.1 รายละเอียดการทดลอง

ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของเทคนิค MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ โดยการ inoculation เชื้อ *E. coli* DMST 4609 ในอาหารเหลวชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชม. ทำการ dilution ปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้สามารถแปรค่าอยู่ในช่วง 0 - 6 log CFU/ml และทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate Pour (ดังแสดงรายละเอียดวิธีการทดลองในบทที่ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.2.1 การสอบเทียบการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate

รูปแบบการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคที่นำเสนอ MIC โดยเป็นการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ที่มีการใช้ในปัจจุบัน เช่น MPN, pour plate และ Petrifilm™ EC plate แสดงรายละเอียดลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ media และ inoculums size ที่ใช้ดังในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ *E.coli* ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน

	MIC	MPN	Pour plate	Petrifilm™ EC plate
ขนาด	8 × 8 mm.	 N.A.	 90 × 90 mm.	47 × 47 mm.
เวลาที่ใช้ในการบ่ม	12 - 18 h	3 – 4 days	2 – 3 days	1 – 2 days
ปริมาณ media ที่ใช้	0.5 ml/well	9 ml/tube	25 ml/plate	5 ml/plate
ปริมาณของInoculum	0.01 ml	1 ml	1 ml	1 ml

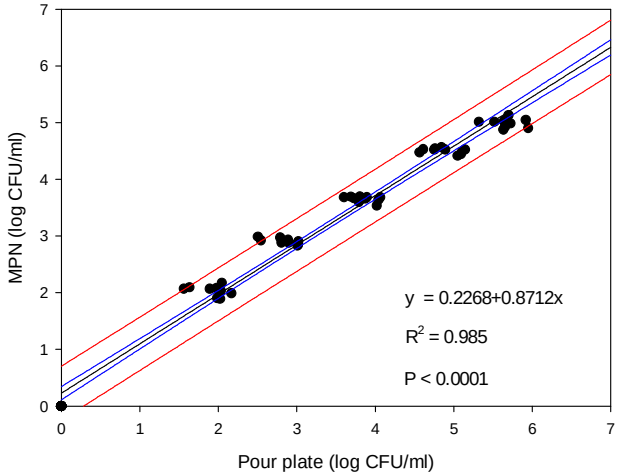
จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่ารูปแบบ miniaturized microwell สามารถที่จะเจือจางตัวอย่างอาหารและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมได้หลายความเข้มข้นเพื่อให้เพียงพอที่จะครอบคลุมช่วงปริมาณการปนเปื้อนในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในสถานะการณ์ การดำเนินงานในห้อง Lab วิเคราะห์มีการทำ dilution ของตัวอย่างจำนวนน้อยความเข้มข้น (under - diluted) เพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มีต้นทุนของการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสูง และอาหาร CCA ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมซึ่งอาหารดังกล่าวมีราคาแพง ทั้งนี้จากรูปลักษณ์ของ 96-well U-bottomed polypropylene plate มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm. (width) 10 mm. (length) และ 1.5 mm. (thickness) จำนวน 96 samples เปรียบเทียบได้กับ 96 เพลทแบบแก้ว โดยปกติ อีกทั้งรูปแบบ 96-well U-bottomed polypropylene plate สามารถรองรับการใช้อุปกรณ์ Multichannel pipette แบบ 8 channel สามารถที่จะทำการเจือจางตัวอย่างได้หลายระดับเพียงพอที่จะสามารถตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนได้ครอบคลุมที่ปริมาณเชื้อต่ำและสะดวกในการ load อาหารหรือ medium โดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

แต่อย่างไรก็ตามข้อด้อยของวิธี MIC เป็นการใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยบนพื้นที่ของ well ขนาด 50.28 mm^2 ที่บรรจุอาหาร CCA สามารถรองรับตัวอย่างปริมาณ 10 – 20 μl ทั้งนี้การใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณมากจะส่งผลทำให้เกิด smearing บนผิว agar ได้ ทำให้ไม่สามารถที่จะนับเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยปริมาณเชื้อที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ที่ระดับ 2 log CFU/ml เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์แบบอื่นให้ผลที่สอดคล้องยอมรับกันได้ที่ระดับปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เป็น 2 log CFU/ml ในขณะที่วิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐานเมื่อพิจารณาปริมาณตัวอย่างที่ตกค้างอยู่ที่ปลายปิเปตแก้ว ส่งผลทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการนับปริมาณเชื้อได้เมื่อใช้ไกด์ไลน์ในการนับเชื้อปริมาณ 30 – 300 โคโลนี ซึ่งไม่ practical ในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมเท่าที่ควร

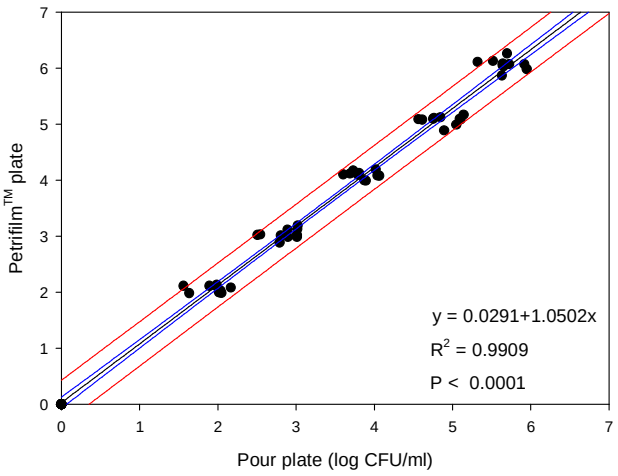
4.2.2.2 ผลการสอบเทียบการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ได้นำเสนอ (MIC) เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานอยู่ในปัจจุบัน (i.e., MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate Pour) โดยการใช้เชื้อ *E. coli* DMST 4609 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทราบ strain ที่แน่ชัดจัดได้ว่าเป็น pure strain เชื้อดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการเตรียมความเข้มข้นของ cell ที่ระดับต่างๆ ที่แน่นอน นักวิจัยโดยส่วนใหญ่ดำเนินการเตรียมขั้นตอนการตรวจสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่รวดเร็ว ง่ายและถูกต้อง (Finneya et al., 2003; Chenu et al.,

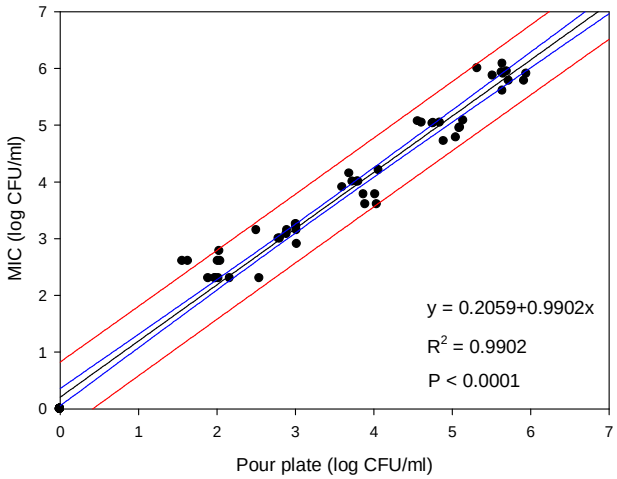
2013) ในการนับปริมาณเชื้อในระดับอุตสาหกรรม การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการที่นำเสนอ MIC กับวิธีการวิเคราะห์แบบอื่น การประเมินวิธีที่แตกต่างถูกดำเนินการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pour plate กับ วิธี MPN, Petrifilm™EC plate และ MIC



(a) pour plate and MPN



(b) pour plate and Petrifil™ plate



(c) pour plate and MIC

รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์นับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค (a) pour plate เปรียบเทียบกับ MPN, (b) Pour plate เปรียบเทียบกับ Petrifilm™ EC plate และ (c) Pour plate เปรียบเทียบกับ MIC

เมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate ในตัวอย่าง *E. coli* cultures เพื่อเป็นการตรวจสอบความสัมพันธ์ (validation) ของเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค MPN และ Pour plate จะให้ค่า R^2 = 0.985 (รูปที่ a) ส่วนความสัมพันธ์ของเทคนิค Petrifilm™ EC plate และ Pour plate จะให้ค่า R^2 = 0.990 (รูปที่ b) ในขณะเดียวกัน ความสัมพันธ์ของเทคนิค MIC และ Pour plate จะให้ค่า R^2 = 0.990 (รูปที่ c) ทั้งนี้โดยประมาณค่า R^2 ของทั้ง 4 เทคนิค อยู่ในช่วงระหว่าง 0.985 - 0.9909 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงทั้ง 3 รูป แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 4 วิธี คือ MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate สามารถใช้แทนกันได้เนื่องจากให้ผลความถูกต้องสอดคล้องกัน แต่เมื่อพิจารณาความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ เทคนิค MIC สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ใช้ media จำนวนน้อย สามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงงานสามารถเพิ่มความถี่ในการตรวจสอบเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ ดังนั้นการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค MIC จึงเป็นทางเลือกที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ต่อไป

โดยกราฟรูปที่ a, b และ c แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวิธีวิเคราะห์ของ MIC เทียบกับวิธีการวิเคราะห์แบบอื่น จะเห็นได้ว่าค่าความสัมพันธ์ของกราฟทั้ง 3 ใกล้เคียงกับ 1 โดยค่า correlation coefficient ของวิธีทั้ง 3 อยู่ระหว่าง 0.985 – 0.9909 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่า good agreement ระหว่างปริมาณเชื้อจริงกับที่นับได้นอกจากนี้ความสัมพันธ์ดังกล่าวยังเป็นเส้นตรงจากที่ความเข้มข้นของเชื้อ 0 ถึง 6 log CFU/ml โดยจากวิธีการนับปริมาณเชื้อจากทั้ง 4 วิธี ให้ค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก็ตามการอ่านค่า log CFU ด้วยวิธี MIC เทคนิคดังกล่าวยังให้ความน่าเชื่อถือน้อย โดยจุดด้อยของวิธีที่นำเสนอมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบซึ่งใช้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ส่งผลทำให้ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 10^2 CFU/ml ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์ปกติซึ่งเป็นการใช้ปิเปตสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^1 CFU/ml โดยเทคนิคที่นำเสนอจำเป็นที่จะต้องให้ผลที่มีปริมาณเชื้อเท่ากันที่ระดับปริมาณเชื้อที่เท่ากันและเหมาะสม จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการนับเชื้อด้วยเทคนิควิธีต่าง ๆ เช่น MIC, MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate ให้ค่าปริมาณเชื้อที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน ด้วยเทคนิคการนับเชื้อที่นำเสนอ MIC สามารถจัดการกับตัวอย่างเป็นปริมาณจำนวนมากด้วยการใช้ auto ปิเปตที่มีหลาย channel ซึ่งสามารถจัดการกับ 96-well U-bottomed polypropylene plate และสามารถตรวจนับปริมาณเชื้อได้ภายใน 12 – 16 ชั่วโมง การใช้เทคนิค MIC จึงมีประโยชน์ที่หลากหลายกว่าการใช้วิธีวิเคราะห์แบบทางการค้า (Petrifilm™ EC plate) และแบบปกติในเทอมของ compactness ใช้เวลาน้อยและใช้ปริมาณ media น้อย

ดังนั้นด้วยความสามารถในการนับเชื้อที่ให้ผลปริมาณเชื้อที่ใกล้เคียงกัน เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย MIC สามารถใช้แทนที่วิธีการวิเคราะห์แบบธรรมดา (i.e., MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate Pour) ซึ่งมีความซับซ้อนและใช้เวลานานได้เป็นอย่างดี อีกทั้งวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ เนื่องจากจะส่งผลต่อต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่รูปแบบการวิเคราะห์ที่นำเสนอจะสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากและสามารถเพิ่มความถี่ในการวิเคราะห์

4.3การศึกษาจลน์ศาสตร์การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*/coliform ด้วยเทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC

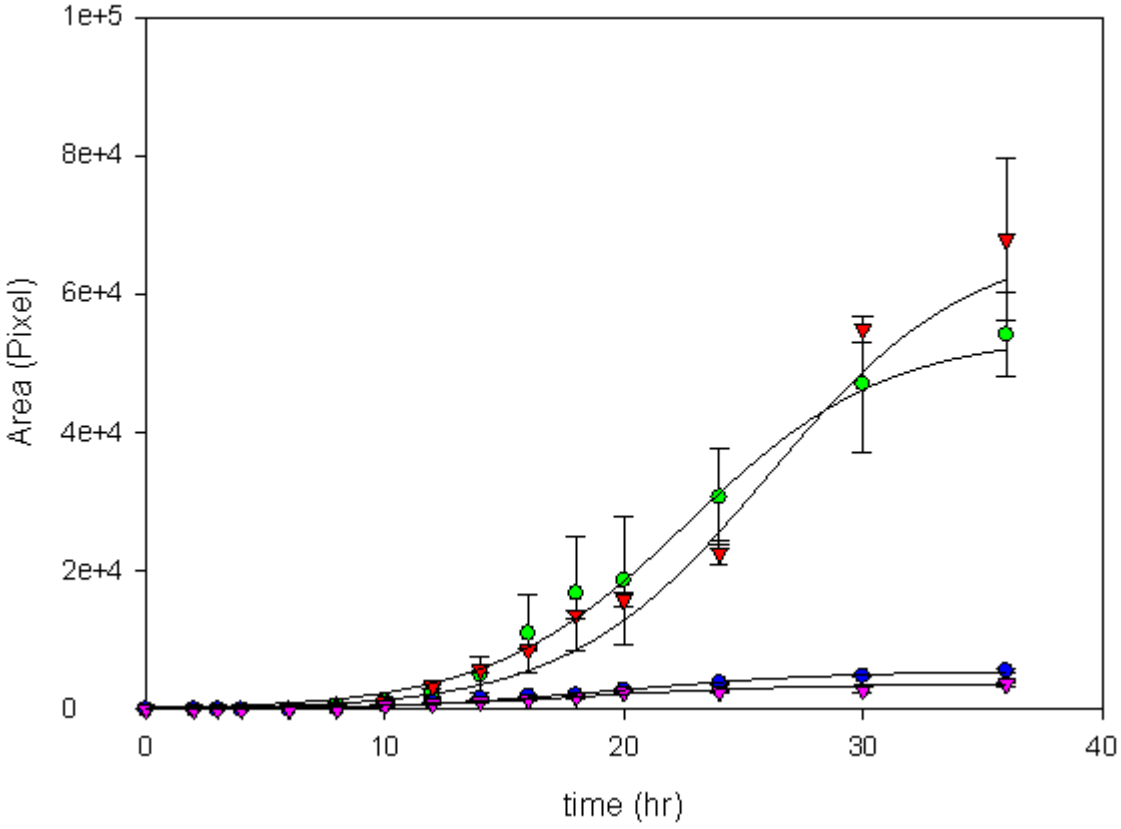
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการบ่ม

4.3.1 รายละเอียดการทดลอง

ในส่วนนี้เป็นการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate, Petrifilm™ EC plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เชื้อ *E. coli* DMST 4609 เป็นตัวแทนในการทดลอง ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยใช้ EMAMCAP – Direct show video capture version 9.0.05 ในการบันทึกภาพขนาดของโคโลนีทุกสองชั่วโมง และประมวลขนาดของโคโลนี ด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยภาพ (Image analysis) โดยใช้โปรแกรม Image J version 1.41o เมื่อได้ผลของขนาดโคโลนีที่ต้องการแล้ว นำมาพอร์ตกราฟด้วยโปรแกรม Sigma plot version 11 เพื่อหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของในแต่ละตัวอย่างการทดลอง

4.3.2 ผลการทดลองจลนพลศาสตร์ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค

จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* (pure cultures) ด้วยเทคนิค Spread plate, Petrifilm™ EC plate, Pour plate และ MIC พบว่าการขยายขนาดของโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ไม่เท่ากัน โดยการขยายขนาดของโคโลนีในการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MIC และ Spread plate จะมีการขยายขนาดของโคโลนีมากที่สุด ซึ่งจะพบว่าในช่วงแรกของกราฟเทคนิค Spread plate และ MIC จะมีการขยายขนาดของโคโลนีที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 20 พบว่าการขยายขนาดของโคโลนีเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MIC มีการขยายที่สูงกว่าการใช้เทคนิค Spread plate ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงจลนพลศาสตร์ของการขยายตัวโคโลนีในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli*) โดยใช้เทคนิค Pour plate ( ), Spread plate ( ), Petrifilm™ EC plate ( ) และ MIC ( )

ตารางที่ 4.2 แสดงปัจจัยของเทคนิค Spread plate, Petrifilm™EC plate, Pour plate และ MIC ที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการขยายตัวโคโลนีในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli*)

Incubation Type	Parameter			R^2
	t_0	A	μ_{max}	
Spread plate	22.70	54109.90	0.24	0.99
Pour plate	19.88	5614.77	0.21	0.99
MIC	26.08	67923.90	0.24	0.98
Petrifilm™ EC plate	18.00	3648.47	0.22	0.96

และเมื่อทำการพิจารณาค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดจำเพาะของเชื้อ หรือ μ_{max} ดังตารางที่ 4.2 พบว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของการวิเคราะห์ *E. coli* โดยใช้เทคนิค MIC และ Spread plate มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ Pour plate และ Petrifilm^{TM}EC plate ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากหลักการของวิธี MIC และ Spread plate จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์สัมผัสออกซิเจนโดยตรงเนื่องจากมีการเจริญเติบโตบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ (Supanivatin et al., 2010) ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ถ้าหากต้องการให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วควรใช้วิธี MIC หรือ Spread plate

4.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*/coliform

ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*/coliform เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ซึ่งปกติเป็นการบ่มที่อุณหภูมิ 35°C ซึ่งมีงานวิจัยจากผู้เขียนหลายท่านได้กล่าวว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อแต่ละชนิด จะใช้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันไป โดยจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละชนิด ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform ในงานวิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการบ่มที่ 30, 35, 37, 40 และ 45 °C ที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและขนาดของโคโลนีของเชื้อ *E. coli*

4.4.1 รายละเอียดการทดลอง

ในการทดลองจะทำการ Inoculation เชื้อ *E. coli* ที่ทราบปริมาณแน่ชัดที่เริ่มต้นประมาณ 10^3 CFU/ml บน 96-well U-bottomed polypropylene plate เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตกระจายโคโลนีบนผิว agar ได้อย่างสม่ำเสมอ ไม่ทับซ้อนกันซึ่งจะส่งผลทำให้ยากแก่การวิเคราะห์ จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 40 และ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ในระหว่างการบ่มจะทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดขนาดของโคโลนี *E. coli* ด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง โดยค่าที่วัดได้จะถูกนำมาศึกษา kinetic ต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของโคโลนี เพื่อหาสภาวะการบ่มที่เหมาะสม

4.4.1.1 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ

การใช้เชื้อ *E. coli* เป็น phenotype ต้องการอุณหภูมิในการบ่มค่อนข้างสูงเพื่อให้การขยายตัวของโคโลนีมีค่าสูง ทั้งนี้อุณหภูมิในการบ่มโดยปกติได้มีการปรับลดอุณหภูมิจากรูปแบบการวิเคราะห์เดิมที่ 35 °C พบว่าส่งผลทำให้เกิดความล่าช้าในการตรวจการปนเปื้อนของ *E. coli* บนอาหาร CCA ทั้งนี้อุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมดูเหมือนจะเป็นเรื่องสำคัญเมื่อต้องการลดเวลาในการวิเคราะห์ สำหรับการใช้เทคนิค MIC ต้องการตรวจพบการปนเปื้อนของโคโลนี *E. coli* อย่างรวดเร็ว ในขณะที่วิธีการวิเคราะห์แบบ conventional

method เช่นการใช้เทคนิค pour plate การเร่งการขยายตัวของโคโลนีถูกอยู่นอกประเด็นเพราะการเร่งการขยายตัวจะช่วยให้เห็นโคโลนีได้เร็วสำหรับการใช้สายตามนุษย์ซึ่งการดำเนินการดังกล่าวทำให้ใช้เวลานานและโดยทั่วไปใช้เวลาในการบ่มนาน

จากการทดลองบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ กันที่มีผลต่อการการนับจำนวนโคโลนีถูกนำเสนอผลดังในตารางที่ 4.3 โดยจะเห็นว่าที่อุณหภูมิการบ่ม 45 °C ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* บนอาหาร CCA ในขณะที่อุณหภูมิการบ่มระหว่าง 30 – 40°C จากการวิเคราะห์ทางสถิติผลของอุณหภูมิไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อโดยที่อุณหภูมิต่างๆ กัน โดยให้ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่มีค่าใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณเชื้อของ *E. coli* ที่อุณหภูมิการบ่มต่างกันโดยใช้อาหาร CCA

Incubation temperatures	No. of *E. coli* count (log CFU/ ml)
30°C	8.35[a] ±0.05
35°C	8.35[a] ±0.06
37°C	8.44[a] ±0.05
40°C	8.50[a] ±0.03
45°C	ND

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

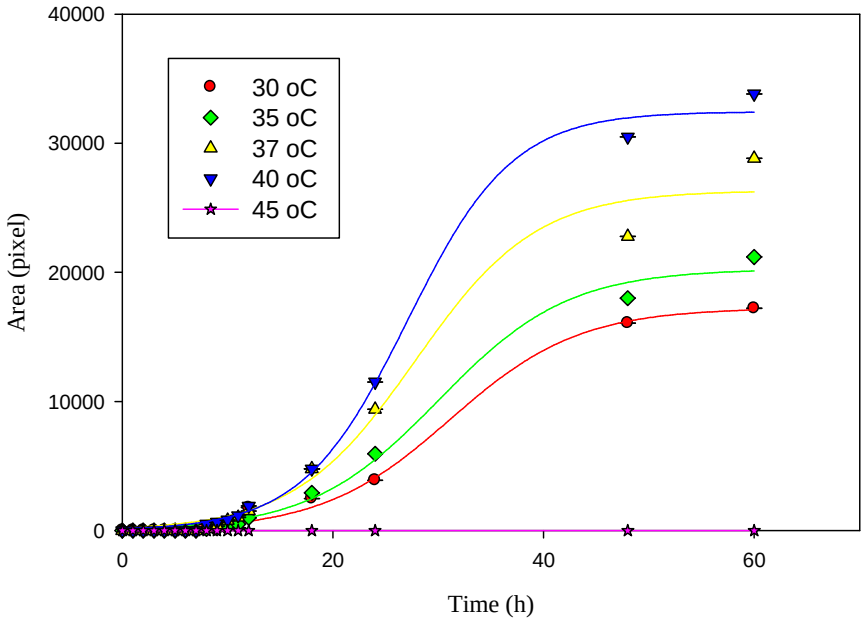
ND: not detected

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิในการบ่มระหว่าง 30 – 40°C ไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ ทั้งนี้เนื่องจาก *E. coli* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างๆ สามารถปรับตัวได้ง่าย โดยในการเลือกอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมนอกจากพิจารณาปริมาณเชื้อหลังการบ่มที่นับได้แล้ว อาจจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยอื่นร่วมด้วยในการพิจารณา เช่น อัตราการขยายตัวของโคโลนีที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งสามารถที่จะช่วยเป็นแนวทางในการเลือกอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสม โดยรายละเอียดผลของอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อการขยายตัวของโคโลนีแสดงดังรูปที่ 4.5 ในหัวข้อถัดไป

4.4.1.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการขยายตัวของโคโลนี *E. coli*

ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โคโลนีมีการเจริญเติบโตเนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนและสารอาหารอย่างไม่จำกัด โคโลนีจะเกิดการขยายตัวในแนวรัศมี โดยเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นการขยายตัว

ของโคโลนีจะมากขึ้นเนื่องจากปริมาณสารอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีมากพอต่อการขยายตัวของโคโลนี ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงการขยายตัวของโคโลนีในระหว่างการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิการบ่ม 30, 35, 37, 40 และ 45 ^{o}C

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ กัน มีผลต่อการขยายตัวของโคโลนี *E. coli* เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะที่อุณหภูมิการบ่ม 37 และ 40 ^{o}C ในขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 35 ^{o}C แนวโน้มการขยายตัวของโคโลนีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อหลังจากการบ่มที่ 24 h ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน จะมีปริมาณเท่ากัน จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สามารถทำให้โคโลนี *E. coli* ขยายขนาดโคโลนีสุดท้ายให้มีขนาดใหญ่เป็นที่อุณหภูมิการบ่ม 37 และ 40 ^{o}C ทั้งนี้มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ชี้แจง suggested เกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยอยู่ในช่วงที่ต่ำไม่เกิน 37 ^{o}C จากลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนี *E. coli* ในการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมควรเป็นอุณหภูมิที่ทำให้โคโลนีมีการขยายตัวได้ดี การเจริญเติบโตของ *E. coli* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 ^{o}C ส่งผลทำให้เกิดการขยายตัวของโคโลนีน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อุณหภูมิการบ่ม 30 ^{o}C ไม่เกิดการขยายตัวของโคโลนีที่อุณหภูมิการบ่มดังกล่าว อัตราการขยายตัวของโคโลนีน้อยมากแต่ก็ยังมีการเจริญเติบโตของโคโลนี แต่อย่างไรก็ตามเป็นลักษณะโคโลนีที่มีขนาดเล็ก อุณหภูมิการบ่มมีความสำคัญใน deteriorating หรือสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* บนอาหาร CCA ทั้งนี้การขยายตัวหรือพื้นที่ของโคโลนีที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถนำข้อมูลดิบมา

พิจารณา kinetic ของการขยายตัวของโคโลนีเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิการบ่มต่างกันได้ เพื่อให้เห็นข้อมูลอัตราการขยายตัวสูงสุดของโคโลนีที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแสดงดังรายละเอียดในตารางที่ 4.4 ในหัวข้อถัดไป

4.4.1.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อ kinetic ต่อการขยายตัวของโคโลนี *E. coli*

จากข้อมูลขนาดของโคโลนีที่ได้จากอุณหภูมิการบ่มต่าง ๆ ถูกนำมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการขยายตัวของโคโลนีด้วยโปรแกรม Sigma plot version 11 เพื่อหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของในแต่ละตัวอย่างการทดลอง ดังแสดงผลในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 จลนพลศาสตร์ต่อขนาดของโคโลนี *E. coli* บนอาหาร CCA ที่อุณหภูมิการบ่มต่างๆ

อุณหภูมิการบ่ม (^oC)	พารามิเตอร์ที่ได้จากขนาดของโคโลนีที่เวลาการบ่ม 24 h		
	μ_{max}	X_{max}	R^2
30^{o}C	0.163^a ± 0.002	17236 ± 100	0.994 ± 0.002
35^{o}C	0.163^a ± 0.002	20256 ± 375	0.993 ± 0.002
37^{o}C	0.174^b ± 0.002	26324 ± 456	0.984 ± 0.001
40^{o}C	0.200^c ± 0.002	32441 ± 461	0.997 ± 0.001
45^{o}C	ND	ND	ND

$^{a, b, c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ND: not detected

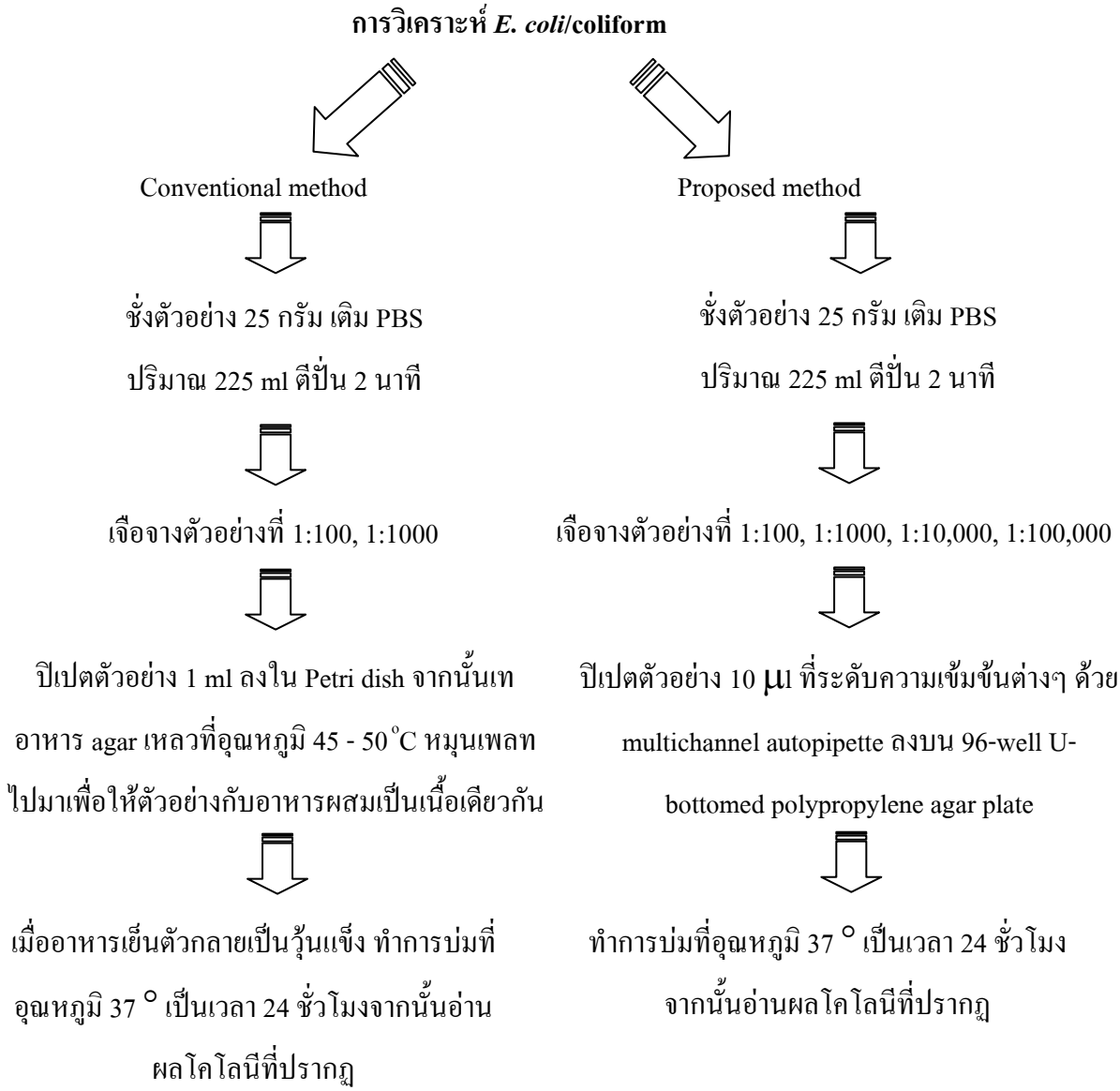
จากข้อมูลในตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าค่าอัตราการขยายตัวสูงสุดของโคโลนีที่อุณหภูมิต่างๆ สอดคล้องกับกราฟรูปที่ 4.5 โดยค่าอัตราการขยายตัวสูงสุดของโคโลนีที่อุณหภูมิการบ่ม 30 และ 35 ^{o}C ให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 และ 40 ^{o}C แสดงค่าอัตราการขยายตัวสูงสุดของโคโลนีมีความแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อหลังจากการบ่มที่ 24 h ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน จะมีปริมาณเท่ากันจากในตารางที่ 4.3 ก่อนหน้านั้น แต่ kinetic ขนาดของโคโลนีที่อุณหภูมิต่างๆ กันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.4 จากกราฟการขยายตัวของโคโลนีในรูปที่ 4.5 เมื่อนำค่าดังกล่าวมาพิจารณาในรูปของค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดโดยการใช้สมการ Sigmoid's model ในการคำนวณตัวแปรค่าต่างๆ เช่น (i.e., μ_{max}, X_{max} และ R^2) พบว่าอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมสำหรับการขยายตัวของโคโลนีจาก

ข้อมูลในตารางที่ 4.4 เป็นที่อุณหภูมิ 40°C ที่อุณหภูมิดังกล่าวให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและให้ค่าการขยายตัวของโคโลนีที่สูงมาก (i.e., 0.200±0.002 h^{-1} and 32441±470 pixels, respectively)

แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมควบคู่กับการใช้พลังงานพบว่า ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นอุณหภูมิที่ให้ปริมาณเชื้อ, การขยายตัวของโคโลนีและอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดไม่ต่างจากการบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C มากนัก ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานที่จะส่งผลต่อต้นทุนการวิเคราะห์ อุณหภูมิการบ่มที่ 37 °C จึงเป็นอุณหภูมิที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *E. coli*/coliform ในขั้นตอนการบ่มต่อไป

4.5 รูปแบบการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ที่ได้มีการพัฒนา

ในการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยรูปแบบใหม่ที่ได้มีการพัฒนาประยุกต์ โดยขั้นตอนถ้าเป็นอาหารแข็งจะต้องทำให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยก่อนโดยการชั่งอาหาร 25 กรัม แล้วใส่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 225 ml นำไปใส่ในเครื่องปั่นอาหารที่ปราศจากเชื้อ ปั่นให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันจะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 ถ้าอาหารเป็นของเหลวแต่ไม่ใช่เป็นเนื้อเดียวกันต้องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนเช่นกัน จากนั้นทำการ dilution ที่ความเข้มข้น 1:100, 1:1000 จากนั้นหยดตัวอย่างลงบน 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ได้มีการเตรียมไว้ก่อนหน้านั้น โดยรูปแบบการวิเคราะห์ได้เปลี่ยนจากวิธีการเดิมที่โรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นิยมใช้โดยเป็นการใช้ pour plate ซึ่งเป็นการผสมตัวอย่างเข้ากับอาหาร agar เหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 – 50 °C จากนั้นปล่อยให้ agar แข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C โคโลนีที่ปรากฏเป็นสีแดงแสดงว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นโคลิฟอร์ม ในขณะที่ถ้าโคโลนีเป็นสีม่วง จุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นอีโคไล การเกิดสีของโคโลนีดังกล่าวเป็นการตรวจความจำเพาะของเอนไซม์หรือการที่เอนไซม์สามารถที่จะทำให้เกิดผลในการแยกความแตกต่างและบ่งชี้จีนัสของเชื้อจุลินทรีย์, สปีชีส์ หรือกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ ในกรณีนี้ การเจริญเติบโตของโคโลนี *E. coli* บนอาหารที่มีองค์ประกอบของสารโครโมเจนิกรวมถึงผลผลิตของความจำเพาะของเอนไซม์ในการแยกเพื่อบ่งชี้เชื้อจุลินทรีย์ โดยจะเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นสีม่วงของโคโลนี *E. coli*. เอนไซม์ β-D glucuronidase จะทำการแยกสารสับสเตรท Salmon-Gal และ X-glucuronide ในอาหาร CCA ที่จะพัฒนาเป็นสีน้ำเงินเข้มในระหว่างกระบวนการบ่ม โดยอย่างน้อยที่ 8 ชั่วโมงโคโลนีสีม่วงเล็กสามารถถูกตรวจพบได้ โดยรูปแบบการวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนาแสดงดัง flow chart รูปที่ 4.6 ต่อไปนี้



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบขั้นตอนการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคนิควิธีการในปัจจุบัน (conventional method) กับวิธีการที่นำเสนอ (proposed method)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าด้วยเทคนิคที่นำเสนอสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลาย dilution ช่วยลดความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นจากการทดลองไม่ครอบคลุมปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อน ทำให้ไม่ทราบปริมาณเชื้อที่แท้จริงในตัวอย่าง ลดโอกาสที่จะทำให้การวิเคราะห์มีความผิดพลาดได้ ดังนั้นรูปแบบที่นำเสนอจึงเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันสั้น เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกของประเทศไทย

4.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค MIC ต่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดลองได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค MIC ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อตรวจสอบว่าอาหารมีระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ปริมาณเท่าไรหรือมีการปนเปื้อนหริอไม่ โดยเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับเทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่โรงงานได้ดำเนินการเป็น routine ปกติแต่ละวัน เพื่อทวนสอบผลการวิเคราะห์ (i.e., Pour plate, Spread plate) ดำเนินการทดลองโดยการนำผลการทดลองที่ได้จากการสอบเทียบของทั้ง 3 เทคนิคมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง เนื่องจากในผลิตภัณฑ์มีความซับซ้อนขององค์ประกอบมากกว่าการวิเคราะห์ในหลอดทดลอง อีกทั้งยังเป็นการยืนยันผลการทดลองว่าเทคนิคทั้ง 3 วิธีสามารถนำไปใช้จริงได้

4.6.1 รายละเอียดการทดลอง

ขั้นตอนนี้จะเป็นการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้เทคนิค MIC, Pour plate และ Spread plate ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่ ผัดไท เค้ก และ Topping ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17

4.6.2 ผลการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate, และ MIC ต่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate และ Spread plate ในตัวอย่างอาหารทั้ง 3 ชนิดพบว่า ในตัวอย่างอาหารผัดไทที่ 11, 13 และ 15 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์มีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยที่การใช้เทคนิค Spread plate จะสามารถตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดได้มากกว่าการใช้เทคนิค Pour plate ดังตารางที่ 4.5 เนื่องจากในการตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate อาหารที่เทใส่จานเพาะเชื้อค่อนข้างร้อน อาจยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม Psychrophile ได้ (อุษามาส วังชัยสุนทร, 2547) อีกทั้งผลิตภัณฑ์ของโรงงานบูโอโน่ เป็นอาหารสำเร็จรูปแช่แข็งจึงมักจะพบแบคทีเรียในกลุ่ม Psychrophile ได้ค่อนข้างสูง (Richard, 1975) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้น เช่น Buck และ Cleverdon พบว่าการใช้เทคนิค Spread plate จะสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้มากกว่าการใช้เทคนิค Pour plate ในขณะที่ตัวอย่างผัดไท (นอกเหนือจากที่กล่าวมา), เค้ก และ Topping พบว่าการใช้เทคนิค Pour plate และ Spread plate มีผลต่อการวิเคราะห์จำนวน

จุลินทรีย์ทั้งหมดอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoben และ Somasegaran (1982) ที่ทำการเปรียบเทียบการใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ Drop plate ในการนับจำนวน *Rhizobium* spp. พบว่าเทคนิคในการวิเคราะห์จำนวนทั้งสามวิธีสามารถใช้แทนกันได้ โดยที่การใช้เทคนิค Drop plate จะทำให้สามารถลดต้นทุนในการวิเคราะห์ได้มากที่สุด

(ก) **(ข)** **(ค)**

รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ผัดไท (ก) เค้ก (ข) Topping (ค)

ในส่วนของการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC พบว่าผัดไทตัวอย่างที่ 11 การใช้เทคนิค Pour plate สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้มากกว่าการใช้เทคนิค MIC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างอาหารผัดไทมีองค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตค่อนข้างมาก อาจไปขัดขวางการ inoculation ตัวอย่างบน agar ส่งผลให้ยากต่อการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถทำการแก้ไขปัญหานี้ได้โดยทำการกรองตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ก่อนที่จะนำไปทำการทดลอง

ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ Spread plate ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหาร

ตัวอย่าง		จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/ g)	
		Pour plate	**Spread plate**
ผัดไท	1-7	ND[a]	ND[a]
	8-10	TNTC[a]	TNTC[a]
	11	3.93[a]±0.03	4.12[b]±0.04
	12	3.71[a]±0.06	3.69[a]±0.02
	13	3.50[a]±0.04	3.66[b]±0.01
	14	3.77[a]±0.04	3.89[a]±0.05
	15	4.96[a]±0.04	5.22[b]±0.07
	16	3.85[a]±0.13	3.88[a]±0.04
เค้ก	1-8	ND[a]	ND[a]
Topping	1-7	ND[a]	ND[a]
	8	TNTC[a]	TNTC[a]
	9	3.51[a]±0.03	3.60[a]±0.08
	10	3.85[a]±0.13	3.69[a]±0.13
	11	3.56[a]±0.06	3.64[a]±0.03
	12	3.57[a]±0.04	3.47[a]±0.08

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.6 ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหาร

ตัวอย่าง		จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/ g)	
		Pour plate	**MIC**
ผัดไท	1-7	ND[a]	ND[a]
	8-10	TNTC[a]	TNTC[a]
	11	3.93[a]±0.03	3.78[a]±0.00
	12	3.71[a]±0.06	3.60[a]±0.00
	13	3.50[a]±0.04	3.69[a]±0.13
	14	3.77[a]±0.04	3.65[a]±0.07
	15	4.96[a]±0.04	4.53[a]±0.21
	16	3.85[a]±0.13	4.25[a]±0.07
เค้ก	1-8	ND[a]	ND[a]
Topping	1-6	ND[a]	ND[a]
	7	ND[a]	3.84[b]±0.08
	8	TNTC[a]	TNTC[a]
	9	3.51[a]±0.03	3.75[a]±0.21
	10	3.85[a]±0.13	3.69[a]±0.13
	11	3.56[a]±0.06	3.64[a]±0.08
	12	2.57[a]±0.04	ND[b]

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาตัวอย่าง Topping ที่ 12 พบว่าการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate มีค่าเท่ากับ 2.57±0.04 log cfu/g ในขณะที่การใช้เทคนิค MIC ในการวิเคราะห์ไม่สามารถอ่านค่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิค MIC จะสามารถวิเคราะห์จุลินทรีย์ได้ในกรณีที่มีความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่สูง

4.7 การประยุกต์ใช้เทคนิค MIC ต่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli*/coliform ในผลิตภัณฑ์อาหารและสายการผลิต

ในการทดลองได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค MIC ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli*/coliform โดยเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากเทคนิคที่นำเสนอกับวิธีที่ทางโรงงานได้ดำเนินการทดลองเป็น routine ปกติ เพื่อทวนสอบผลการวิเคราะห์ (i.e., Pour plate, Petrifilm^{TM}EC plate และ Spread plate) ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค คือ *E. coli*/coliform ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารและวิเคราะห์หาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์สุดท้ายเนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้เมื่อมีการปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์อาหารแล้วมักก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ดำเนินการทดลองโดยการนำผลการทดลองที่ได้จากการสอบเทียบของทั้ง 4 เทคนิคมาประยุกต์ใช้จริง เพื่อเป็นการหาวิธีที่เหมาะสมในการลดต้นทุนการวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาของทางโรงงานที่มีค่าใช้จ่ายสูง

4.7.1 รายละเอียดการทดลอง

ขั้นตอนนี้แบ่งการดำเนินงานออกเป็น 2 ส่วน ในส่วนแรกจะเป็นการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm^{TM}EC plate, Spread plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารคือ ผัดไทและข้าวเหนียวมะม่วงดัง ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17

สำหรับการทดลองในส่วนที่ 2 จะเป็นการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคในการตรวจสอบการปนเปื้อนในสายการผลิตด้วยเทคโนโลยี easy swab ซึ่งได้ตัวอย่างจากพนักงาน, มีด, เขียง, ถาดสแตนเลส, ชามสแตนเลส เป็นต้น ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17 เช่นเดียวกับการทดลองในส่วนที่ 1

4.7.2 ผลการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate, Petrifilm^{TM}EC plate, และ MIC ต่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหาร

จากการทดลองประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate, Petrifilm^{TM}EC plate, และ MIC ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่ ผัดไท และข้าวเหนียวมะม่วง (รูปที่ 4.8) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ก่อโรค

(*E. coli* และ coliform) พบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิคทั้ง 4 วิธีในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ *E. coli* ในขณะที่ตรวจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย coliforms ดังตารางที่ 4.7 - 4.9 เนื่องมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม coliform มีหลายชนิด ได้แก่ *E. coli* และ *Enterobactor aerogenes* ดังนั้นอาหารที่ตรวจพบเชื้อ coliform แสดงว่าอาหารนั้นไม่สะอาด อาจมีสิ่งสกปรก และอาจมีเชื้อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารเติบโตในอาหารนั้น ทำให้ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

(ก) **(ข)**

รูปที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค ผัดไท (ก), ข้าวเหนียวมะม่วง (ข)

เมื่อทำการพิจารณาผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ Petrifilm^{TM}EC plate ต่อการวิเคราะห์แบคทีเรียในกลุ่ม coliforms พบว่า ร้อยละ 60 ของการทดลองการใช้เทคนิคที่แตกต่างกันมีผลต่อจำนวน coliform อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.7 ซึ่งวิธี Pour plate และ Petrifilm^{TM}EC plate เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในโรงงานบูโอโน่ จากการทดลองพบว่ามีทั้งตัวอย่างที่ Pour plate ตรวจพบการปนเปื้อนแต่ Petrifilm^{TM}EC plate ไม่พบการปนเปื้อน (False negatives) และ Pour plate ไม่พบการปนเปื้อนในขณะที่ Petrifilm^{TM}EC plate ตรวจพบการปนเปื้อน (False positive) จึงทำให้ไม่สามารถอธิบายผลการทดลองนี้ได้ เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบเทคนิค Pour plate และ Spread plate ต่อการวิเคราะห์ coliforms ดังตารางที่ 4.8 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ส่งผลต่อจำนวน coliforms

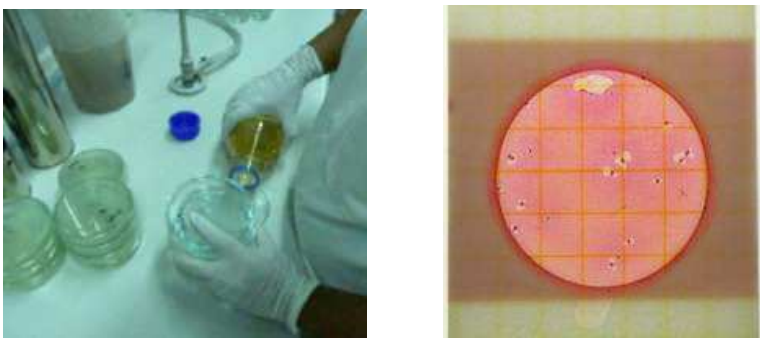
ในส่วนของการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ coliform โดยใช้เทคนิค MIC และ Petrifilm^{TM}EC plate ดังตารางที่ 4.9 พบว่าการใช้เทคนิค MIC จะไม่พบการปนเปื้อนของ coliforms ในขณะที่การใช้เทคนิค Petrifilm^{TM}EC plate ตรวจพบการปนเปื้อน ทั้งนี้เนื่องมาจากข้อจำกัดของเทคนิค MIC จะสามารถตรวจพบจุลินทรีย์เมื่อมี

จำนวนที่มากกว่า 2 log cfu/ ml ดังนั้นวิธี MIC จึงไม่เหมาะสมจะใช้ในการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อย

ตารางที่ 4.7 ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ Petrifilm ต่อการวิเคราะห์ *E. coli* และ coliforms ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ตัวอย่าง		จำนวน *E. coli* (log cfu/ g)		จำนวน coliforms (log cfu/ g)	
		Pour plate	Petri film	Pour plate	Petri film
ผัดไท	1	ND[a]	ND[a]	0.13[a]±0.55	ND[b]
	2	ND[a]	ND[a]	1.00[a]±0.00	ND[b]
	3	ND[a]	ND[a]	1.48[a]±0.67	ND[b]
	4	ND[a]	ND[a]	1.00[a]±0.00	ND[b]
	5	ND[a]	ND[a]	ND[a]	1.75[b]±0.21
	6	ND[a]	ND[a]	1.71[a]±0.57	1.83[b]±0.18
ข้าว	1	ND[a]	ND[a]	1.51[a]±0.21	ND[b]
เหนียว	2	ND[a]	ND[a]	0.50[a]±0.13	ND[a]
มะม่วง	3	ND[a]	ND[a]	ND[a]	0.50[b]±0.71
	4	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	5	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	6	ND[a]	ND[a]	0.50[a]±0.71	ND[b]
	7	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	8	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



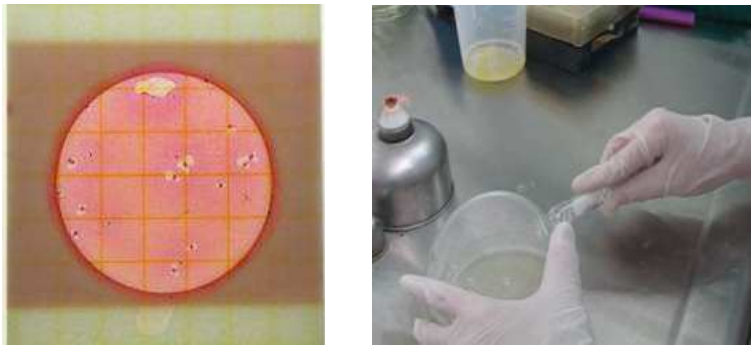
(ก) **(ข)**

รูปที่ 4.9 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Pour plate (ก) เทียบกับการใช้ Petrifilm (ข)

ตารางที่ 4.8 ผลของการใช้เทคนิค Petrifilm และ Spread plate ต่อการวิเคราะห์ *E. coli* และ coliforms ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ตัวอย่าง		จำนวน *E. coli* (log cfu/ g)		จำนวน Coliforms (log cfu/ g)	
		Petri film	Spread plate	Petri film	Spread plate
ผัดไท	1	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	2	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	3	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	4	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	5	ND[a]	ND[a]	1.75[b]±0.21	2.35[b]±0.49
	6	ND[a]	ND[a]	1.83[b]±0.18	ND[b]
ข้าวเหนียวมะม่วง	1	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	2	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	3	ND[a]	ND[a]	0.50[b]±0.71	ND[a]
	4	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	5	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	6	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	7	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	8	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



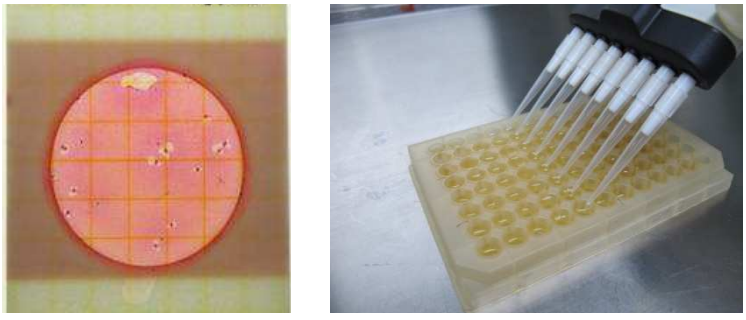
(ก) **(ข)**

รูปที่ 4.10 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Petrifilm (ก) เทียบกับการใช้ Spread plate (ข)

ตารางที่ 4.9 ผลของการใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์ *E. coli* และ coliforms ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ตัวอย่าง		จำนวน *E. coli* (log cfu/ g)		จำนวน Coliforms (log cfu/ g)	
		Petri film	MIC	Petri film	MIC
ผัดไท	1	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	2	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	3	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	4	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	5	ND[a]	ND[a]	1.75[b]±0.21	ND[a]
	6	ND[a]	ND[a]	1.83[b]±0.18	ND[b]
ข้าว	1	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
เหนียว	2	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
มะม่วง	3	ND[a]	ND[a]	0.50[b]±0.71	ND[a]
	4	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	5	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	6	ND[a]	ND[a]	ND[b]	ND[b]
	7	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]
	8	ND[a]	ND[a]	ND[a]	ND[a]

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



(ก) **(ข)**

รูปที่ 4.11 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Petri film (ก) เทียบกับการใช้ MIC (ข)

4.7.3 ผลการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของ จุลินทรีย์ก่อโรคในสายการผลิต

การทดลองการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค คือ *E. coli* และ coliform ที่ปนเปื้อนในสายการผลิตและวิเคราะห์หาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์สุดท้าย เนื่องจากหากพบว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีการปนเปื้อนจนไม่สามารถยอมรับได้ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะต้องนำกลับไปผ่านกระบวนการแปรรูปใหม่อีกครั้ง ซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นและอาจเป็นเหตุผลของการส่งผลิตภัณฑ์ล่าช้าผู้บริโภคเกิดความไม่เชื่อมั่น โดยการนำผลการทดลองที่ได้จากการสอบเทียบของทั้ง 3 เทคนิคมาประยุกต์ใช้จริง เพื่อเป็นการหาวิธีที่เหมาะสมในการลดต้นทุนการวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาของทางโรงงานที่มีค่าใช้จ่ายสูง

4.7.3.1 รายละเอียดการทดลอง

ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate และเทคนิค MIC โดยการทดลองได้ดำเนินการเทียบกับการใช้เทคนิค Pour plate ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่โรงงานใช้ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในปัจจุบัน โดยการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในสายการผลิต (Swab) ซึ่งจะแบ่งตามหลักการของ 4M 1E นั่นคือ พนักงาน (Man) เครื่องจักร (Machine) อุปกรณ์ (Material) วิธีการ (Method) และสิ่งแวดล้อม (Environment) การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในสายการผลิต (Swab) ได้แก่ ห้องน้ำสำหรับพนักงานสายการผลิต และสายการผลิตส้มตำ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17

ปัจจุบันโรงงานบูโอโน่มีเทคนิคการ Swab ที่ต้องใช้อุปกรณ์ 5 ชิ้นดังนี้ cotton swab, หลอดใส่น้ำ Buffer (NO Glass Control), rack, ตะเกียงแอลกอฮอล์ และไฟแช็ค (รูปที่ 4.12) วิธีการคือ นำไม้ cotton swab ไป swab ตามจุดต่างๆ ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน จากนั้นใส่ในหลอดที่บรรจุน้ำ Buffer เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนเทคนิคการ Swab ที่นำมาประยุกต์มีอุปกรณ์เพียงชิ้นเดียว คือ ถุงอีซี่ swab (รูปที่ 4.13) วิธีการคือ ใช้มือสอดกลับถุงอีซี่ swab แล้ว swab ตามจุดต่างๆ ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน จากนั้นดึงกลับถุง swab สำเร็จรูปตามเดิม เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ข้อดีของถุงอีซี่ Swab คือ เป็น Glass Control ซึ่งตรงตามระเบียบ GMP ของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และสามารถเพิ่มพื้นที่ในการ Swab แต่ละครั้งได้ถึง 36 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการดั้งเดิมที่โรงงานใช้อยู่ (ปัจจุบันโรงงานส่วนใหญ่ใช้พื้นที่ในการ Swab แต่ละครั้งประมาณ 5x5 cm แต่ถุงอีซี่ Swab สามารถมีพื้นที่ในการ Swab แต่ละครั้งได้ถึง 30x30 cm หรือมากกว่า)

นอกจากนั้นถุงอีซี่ Swab สามารถใช้แล้วทิ้งได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการล้างเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งถือว่าเป็นการประหยัดเวลา และลดต้นทุนในการวิเคราะห์

4.7.3.2 ผลการประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในสายการผลิต (Swab)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในการตรวจสอบการปนเปื้อนในห้องน้ำสำหรับพนักงานสายการผลิต (รูปที่ 4.14) โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* และ coliform พบว่าไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ *E. coli* ดังตารางที่ 4.12 แต่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย Coliforms ดังตารางที่ 4.13 โดยทั้งสองเทคนิค Pour plate และ MIC มีผลต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับจุดที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย coliform คือ ลูกบิดประตูห้องน้ำ และสายฉีดชำระของห้องน้ำพนักงานหญิง มีวิธีแก้ไขเบื้องต้นคือ การฉีด Alcohol 95% หรือ Hydrogen peroxide ก่อนและหลังการสัมผัสอุปกรณ์ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงดังกล่าว ส่วนการแก้ไขระยะยาวคือ ควรเปลี่ยนประตูห้องน้ำใหม่จากประตูลูกบิดเป็นประตูเปิด-ปิด อัตโนมัติเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอุปกรณ์ ส่วนสายฉีดชำระควรมีการติดตั้งอุปกรณ์ฆ่าเชื้อเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความมั่นใจทุกครั้งว่าไม่มีเชื้อปนเปื้อนมากับอุปกรณ์ดังกล่าว การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในการตรวจสอบการปนเปื้อนในสายการผลิตส้มตำ (รูปที่ 4.14)โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* และ coliforms พบว่าไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ *E. coli* ดังตารางที่ 4.10 แต่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย coliform ดังตารางที่ 4.11 โดยทั้งสองเทคนิค Pour plate และ MIC มีผลต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับจุดที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย coliform คือ ตะแกรงวางแพ็คส้มตำ, shelf วางแพ็คส้มตำ, รถเข็นสแตนเลส และโต๊ะสแตนเลส มีวิธีแก้ไขคือ การฉีด Alcohol 95% หรือ Hydrogen peroxide ก่อนและหลังการสัมผัสอุปกรณ์ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงดังกล่าว

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค Pour plate กับ MIC พบว่าผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ฉะนั้นเทคนิค Pour plate และ MIC จึงสามารถใช้แทนกันได้ แต่ทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันในเรื่องของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ Chromocult agar (CCA) ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง จึงมักเป็นข้อจำกัดในการวิเคราะห์ เทคนิค Pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ Chromocult® Coliform agar 15 ml/ตัวอย่าง/plate ส่วน MIC ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ Chromocult® Coliform agar 0.5

ml/well ดังนั้นการ Swab และวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค MIC จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในสายการผลิต และห้องน้ำ

(ก) (ข) (ค) (ง)

รูปที่ 4.12 อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการ Swab แบบวิธีดั้งเดิมของโรงงานบูโอโน่ (ก) Rack), (ข) ไม้ Cotton swab, (ค) ตะเกียงแอลกอฮอร์, (ง) ไฟแช็ค

รูปที่ 4.13 อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการ Swab แบบอีซี่ Swab

ตารางที่ 4.10 ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน *E.coli* ในห้องน้ำสำหรับพนักงานสายการผลิต

ตัวอย่าง	จำนวน coliforms (log CFU/10 ml)	
	Pour plate	MIC
ห้องน้ำหญิง		
ฝารองนั่งชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่กดน้ำชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่ล๊อกประตู	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
บานประตูห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่กดสบู่	ND[a]	ND[a]
ลูกบิดประตู	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่จับสายชำระ	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำชาย		
ฝารองนั่งชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่กดน้ำชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่ล๊อกประตู	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
บานประตูห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่กดสบู่	ND[a]	ND[a]
ที่กดน้ำโถปัสสาวะ	ND[a]	ND[a]
ลูกบิดประตู	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่จับสายชำระ	ND[a]	ND[a]

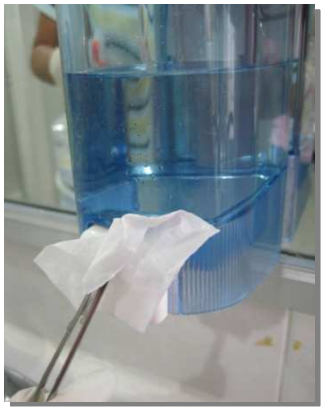
*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.11 ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน coliforms ในห้องน้ำสำหรับพนักงานสายการผลิต

ตัวอย่าง	จำนวน coliforms (log CFU/10 ml)	
	Pour plate	MIC
ห้องน้ำหญิง		
ฝารองนั่งชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่กดน้ำชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่ล๊อกประตู	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
บานประตูห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่กดสบู่	ND[a]	ND[a]
ลูกบิดประตูห้องน้ำ	4.19[a]±0.10	3.88[a]±0.14
ที่จับสายชำระ	4.49[a]±0.20	4.26[a]±0.01
ห้องน้ำชาย		
ฝารองนั่งชักโครก	4.55[a]±0.15	4.39[a]±0.18
ที่กดน้ำชักโครก	ND[a]	ND[a]
ที่ล๊อกประตู	ND[a]	ND[a]
ห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
บานประตูห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่กดสบู่	ND[a]	ND[a]
ที่กดน้ำโถปัสสาวะ	ND[a]	ND[a]
ลูกบิดประตูห้องน้ำ	ND[a]	ND[a]
ที่จับสายชำระ	TNTC[a]	TNTC[a]

*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

(ก)



(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

(ฉ)

(ช)

รูปที่ 4.14 อุปกรณ์ในห้องน้ำชายและหญิงที่ได้ทำการ Swab (ก) บานประตูห้องน้ำ, (ข) ที่กดสบู่, (ค) ที่ล๊อกประตูห้องน้ำ, (ง) ที่จับสายชำระ, (จ) ฝารองนั่งชักโครก, (ฉ) ลูกบิดประตูห้องน้ำ, (ช) ที่กดน้ำโถปัสสาวะ

ตารางที่ 4.12 ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน *E.coli* ในสายการผลิตส้มตำ

ตัวอย่าง	จำนวน coliforms (log CFU/10 ml)	
	Pour plate	MIC
ม่านพลาสติก	ND[a]	ND[a]
ถุงมือพนักงานแพ็ค	ND[a]	ND[a]
ถุงมือพนักงาน	ND[a]	ND[a]
ด้ามตักเส้นมะละกอ	ND[a]	ND[a]
Shelf วางแพ็คส้มตำ	ND[a]	ND[a]
โต๊ะสแตนเลส	ND[a]	ND[a]
กะละมังใส่เส้นมะละกอ	ND[a]	ND[a]
เขียง	ND[a]	ND[a]
หม้อปั่นแคลเซียม	ND[a]	ND[a]
รถเข็นสแตนเลส	ND[a]	ND[a]
ตะแกรงวางแพ็คส้มตำ	ND[a]	ND[a]
เครื่องชั่ง	ND[a]	ND[a]

ตารางที่ 4.13 ผลของการ Swab โดยใช้เทคนิค Pour plate และ MIC ต่อการวิเคราะห์จำนวน coliforms ในสายการผลิตส้มตำ

ตัวอย่าง	จำนวน coliforms (log CFU/10 ml)	
	Pour plate	MIC
ม่านพลาสติก	ND[a]	ND[a]
ถุงมือพนักงานแพ็ค	ND[a]	ND[a]
ถุงมือพนักงาน	ND[a]	ND[a]
ด้ามตักเส้นมะละกอ	ND[a]	ND[a]
Shelf วางแพ็คส้มตำ	ND[a]	ND[a]
โต๊ะสแตนเลส	ND[a]	ND[a]
กะละมังใส่เส้นมะละกอ	ND[a]	ND[a]
เขียง	3.75[a]±0.14	3.77[a]±0.12
หม้อปั่นแคลเซียม	3.35[a]±0.10	3.84[a]±0.07
รถเข็นสแตนเลส	2.54[a]±0.11	2.89[a]±0.10
ตะแกรงวางแพ็คส้มตำ	3.30[a]±0.11	3.91[a]±0.09
เครื่องชั่ง	3.41[a]±0.09	3.68[a]±0.08

*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

(ฉ)

(ช)

(ซ)

(ฌ)

รูปที่ 4.15 อุปกรณ์ในสายการผลิตส้มตำที่ทำการ Swab (ก) ม่านพลาสติก, (ข) ถุงมือพนักงานแพ็ค, (ค) ถุงมือพนักงาน, (ง) ด้ามตักเส้นมะละกอ, (จ) เครื่องชั่ง, (ฉ) หม้อปั่นแคลเซียม, (ช) กะละมังใส่เส้นมะละกอ, (ซ) ตะแกรงวางแพ็คส้มตำ, (ฌ) โต๊ะสแตนเลส

จากการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อเปรียบผลการวิเคราะห์พบว่าวิธี MIC กับวิธี pour plate ที่เป็น standard approved เทคนิคถูกนำมาดำเนินการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการวิเคราะห์กับตัวอย่างในระดับอุตสาหกรรม ผลการนับเชื้อของ *E. coli* ให้ผลที่เหมือนกันกับวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน การดำเนินงานดังกล่าวทดลองโดยเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการ QC ของโรงงานและได้มีการทดสอบกับตัวอย่างจริง รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป (ตารางที่ 4.7 – 4.9) และตัวอย่างจาก line การผลิตของโรงงาน swab test (ตารางที่ 4.10 – 4.13) ซึ่งได้มีการทดสอบจากผลของ Petrifilm™EC plate ก่อนหน้านี้ ผลที่ได้จากการใช้เทคนิค pour plate ถูก confirm กับผลที่ได้จาก Petrifilm™EC plate และ validate การใช้เทคนิค MIC กับ ISO standard protocol ผลจากการนับปริมาณเชื้อด้วยเทคนิคทั้ง 2 วิธีถูกเปรียบเทียบโดยการใช้สถิติโดยพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวิธีการวิเคราะห์แบบ MIC และ pour plate เทคนิค สำหรับตัวอย่างอาหาร ปริมาณเชื้อที่นับได้จาก MIC และ pour plate ให้ผลที่สอดคล้องกันโดยโคโลนีที่พบส่วนใหญ่จะเป็นสีชมพู ซึ่งการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารดังกล่าวโดยส่วนมากเป็น coliform ซึ่งมีโอกาสน้อยมากที่จะเป็น *E.coli* strain

จากการทดลองจะเห็นว่าการนำเสนอเทคนิค MIC ช่วยการวิเคราะห์การนับปริมาณเชื้อที่เป็น routine ของโรงงานอุตสาหกรรมและการตรวจสอบความสะอาดของอุปกรณ์ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องมีการดำเนินการทำบ่อยครั้ง นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างในแต่ละวันของโรงงานมีปริมาณของ swab samples จำนวนมาก ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ MIC จึงสามารถตอบสนองกับความต้องการของโรงงานได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 4.10 – 4.13 เป็นตัวอย่างปริมาณส่วนหนึ่งของปริมาณทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ โดยส่วนใหญ่พบว่าตัวอย่างที่ได้จากการ swab ไลน์การผลิตให้ผล “ไม่ตรวจพบเชื้อ” และตัวอย่างเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นที่ถูกตรวจพบการปนเปื้อนของ coliform โดยทั่วไปเทคนิค MIC จะให้ผลการวิเคราะห์การนับเชื้อที่สูงเมื่อเทียบกับเทคนิค pour plate แต่อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวอยู่ใน order ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การดำเนินการประเมินความสะอาดของสิ่งแวดล้อมกระบวนการผลิตโดยการใช้ MIC เทคนิค เป็นวิธีการที่เร็วและถูกต้องในการนับจำนวนของ *E.coli*/coliform ทั้งนี้ในขณะที่เทคนิค pour plate ให้ผลการวิเคราะห์ที่ช้าและมีประสิทธิภาพต่ำในการประเมินความสะอาดของกระบวนการผลิตและบ่อยครั้งที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ส่งผลให้มูลค่ารายได้ที่สูญเสียไปเป็นปริมาณมากเนื่องจากรอผลการตรวจวิเคราะห์ เกิดการสูญเสียรายได้โดยเปล่าประโยชน์ นอกจากนี้โรงงานยังต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากเนื่องจากถ้ายังคงมีการใช้วิธีการวิเคราะห์แบบเดิม ในทางทฤษฎีความถี่ของการตรวจสอบความสะอาดของกระบวนการผลิตจะต้องเพียงพอที่จะมั่นใจในความสะอาดเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นใจใน good

hygienic practice อย่างไรก็ตามโรงงานอุตสาหกรรมในปัจจุบันหลีกเลี่ยงที่จะทำการทดสอบสุ่มตรวจความสะอาดของ line การผลิต เป็นเพราะว่าการดำเนินการดังกล่าวเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

จากผลการทดลองโดยรวมเมื่อเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่นำเสนอ (MIC) กับวิธีการวิเคราะห์เชิงมาตรฐานซึ่งเป็นเทคนิค pour plate โดยหลัก (Conventional method) พบว่าทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สามารถใช้แทนกันได้ ในเทอมของการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเทคนิค MIC เป็นประโยชน์สำหรับโรงงานในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นอย่างมากสำหรับวิเคราะห์ *E. coli*/coliform เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายต่อหน่วยไม่สูงมาก ใช้วัสดุอุปกรณ์ที่สามารถล้างทำความสะอาดได้ง่าย สะดวกต่อการใช้งาน ใช้ media ปริมาณน้อย

4.8 การวิเคราะห์ต้นทุนการดำเนินงาน

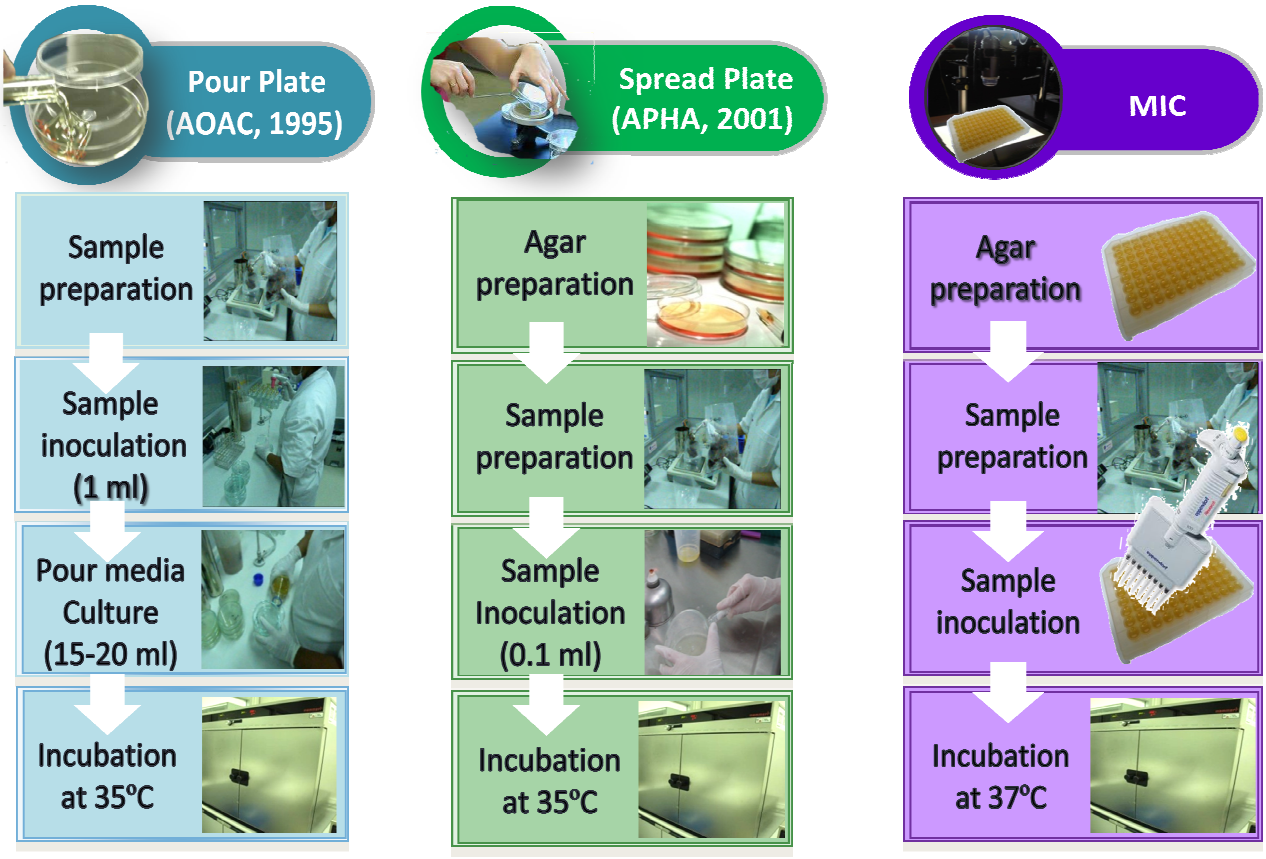
จากผลการเปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าทั้ง 4 เทคนิคสามารถใช้แทนกันได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ต้นทุนจะเป็นการดูความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาตร์เพื่อช่วยในการตัดสินใจในการเลือกวิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่มีความเหมาะสมมากที่สุดมาประยุกต์ใช้กับโรงงาน

4.8.1 รายละเอียดการทดลอง

ในขั้นตอนการวิเคราะห์ต้นทุนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา ดำเนินการโดยทำการเปรียบเทียบวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ในด้านต้นทุน (อาหารเลี้ยงเชื้อ, ไฟฟ้า, เงินเดือนพนักงาน, อุปกรณ์เช็คเชื้อ เช่น plate) เวลาในการบ่ม และ คนงาน (ความสนใจเทคนิค) โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน ประกอบด้วยการคำนวณต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดซึ่งจะทำการเปรียบเทียบเทคนิค Pour plate และ Spread plate ในส่วนที่ 2 จะเป็นการคำนวณต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งจะทำการเปรียบเทียบเทคนิค Pour plate, Spread plate, MIC และ Petrifilm^{TM}EC plate

4.8.2 ผลการวิเคราะห์ต้นทุนในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC

การวิเคราะห์ต้นทุนในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยทำการเปรียบเทียบทั้งสองเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อใช้ในการพิจารณาความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์มีลำดับขั้นตอนโดยย่อดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC

จากการวิเคราะห์การเปรียบเทียบต้นทุนของแต่ละเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดดังตารางที่ 4.14

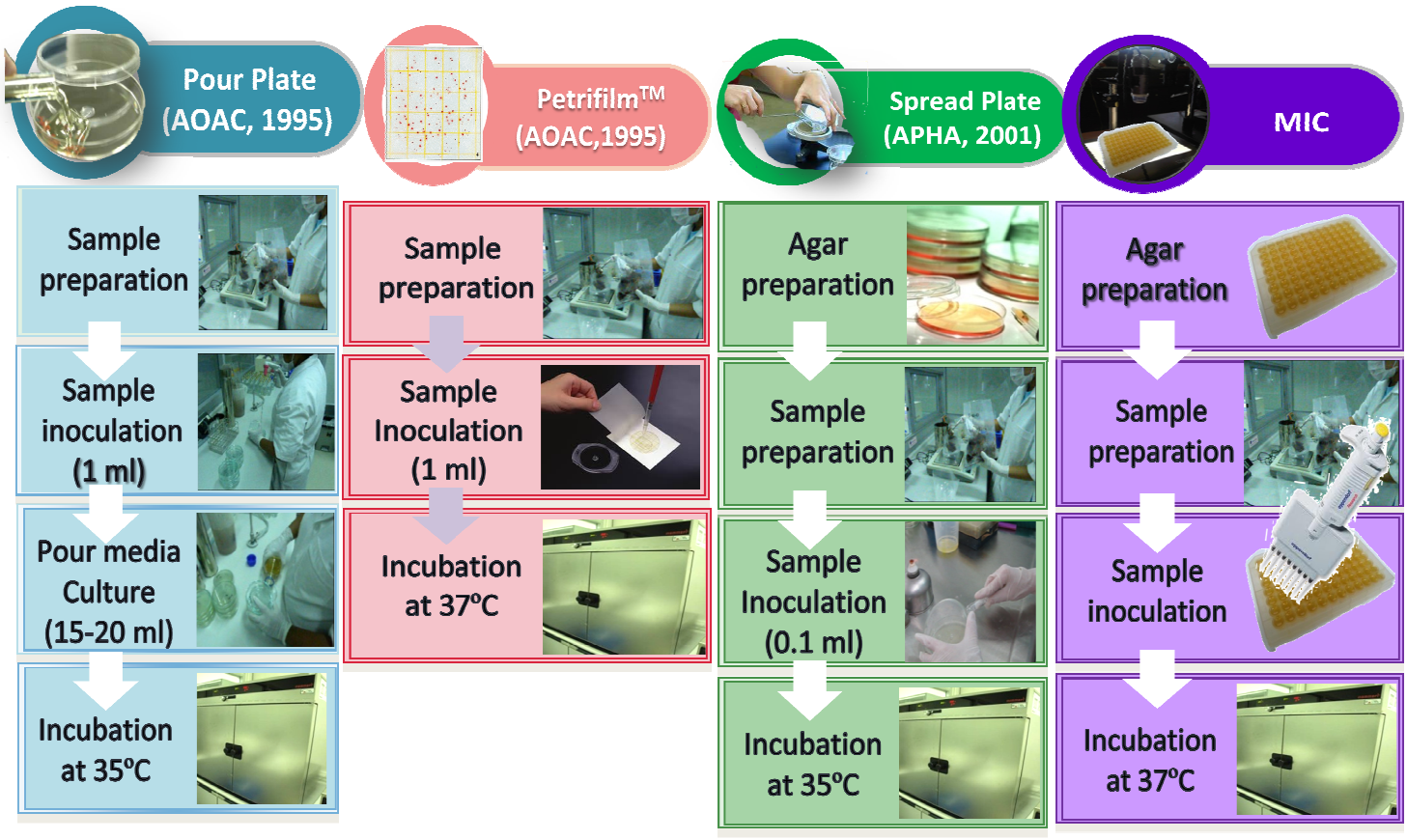
ตารางที่ 4.14 แสดงการเปรียบเทียบต้นทุนของการใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

รายการต้นทุน	Pour plate	Spread plate	MIC
พนักงาน (คน)	4	4	4
เวลาการวิเคราะห์ (นาที/ตัวอย่าง)	15.25	4.25	2.53
บ่ม (ชั่วโมง/lot)	48	18 - 24	12 - 15
ราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ (บาท/ตัวอย่าง)	1.6	0.96	0.02

พบว่า ในด้านของจำนวนคนงานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมีจำนวน 4 คน โดยแบ่งออกเป็น ขั้นตอนการตัดตัวอย่าง (Product sampling) จำนวน 2 คน, เตรียมตัวอย่าง (Sample preparation) จำนวน 1 คน และขั้นตอนการวิเคราะห์ จำนวน 1 คน ในด้านของเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์พบว่า วิธี Pour plate จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานที่สุด เนื่องมาจากต้องรออาหารแข็งตัวก่อนที่จะนำเข้าตู้บ่ม อีกทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต้องใช้เวลาถึง 2 วัน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำให้เกิดการสูญเสียรายได้ที่ผลิตภัณฑ์ต้องรอการยืนยันผลเชื้อก่อนที่จะทำการส่งออกไปยังผู้รับปลายทาง ดังนั้นการใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Pour plate จึงไม่เหมาะสมเมื่อเทียบกับการใช้เทคนิค Spread plate ที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยกว่าและง่ายต่อการใช้งาน อีกทั้งยังสามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มลงได้ถึงร้อยละ 50 ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Spread plate จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์และแปรเปลี่ยนเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับทางโรงงาน เช่นเดียวกับการใช้เทคนิค MIC ที่สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มให้เหลือเพียง 12 - 15 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อของแต่ละเทคนิคพบว่า เทคนิค Pour plate มีต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงที่สุดเนื่องจากมีการใช้ปริมาตรมากที่สุด รองลงมาคือ Spread plate และ MIC ซึ่งหากทางโรงงานมีการเปลี่ยนจากเทคนิค Pour plate มาเป็น Spread plate และ MIC จะสามารถลดค่าใช้จ่ายในด้านอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปได้ร้อยละ 40 และร้อยละ 99 ตามลำดับ

4.8.3 ผลการวิเคราะห์ต้นทุนในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคเมื่อใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm^{TM}EC plate, Spread plate และ MIC

ในส่วนของขั้นตอนของการวิเคราะห์ต้นทุนที่ใช้ในในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคจะแบ่งเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น 3 ส่วนประกอบด้วย วิธีดั้งเดิมที่โรงงานใช้วิเคราะห์ปกติคือ Pour plate วิธีที่ใช้ในการตอบสนองความต้องการของลูกค้าคือ Petrifilm^{TM}EC plate และในส่วนสุดท้ายคือวิธีที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ในการลดต้นทุนในการวิเคราะห์คือ Spread plate และ MIC ขั้นตอนของแต่ละวิธีแสดงโดยย่อดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm™EC plate, Spread plate และ MIC

จากการวิเคราะห์การเปรียบเทียบต้นทุนของแต่ละเทคนิคพบว่า ในด้านของจำนวนคนงานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ก่อโรคมีจำนวน 4 คน โดยแบ่งออกเป็น ขั้นตอนการตัดตัวอย่าง (Product sampling) จำนวน 2 คน เตรียมตัวอย่าง (Sample preparation) จำนวน 1 คน และขั้นตอนการวิเคราะห์ จำนวน 1 คน ในด้านของเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์พบว่า วิธี Pour plate จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานที่สุด เนื่องมาจากต้องรออาหารแข็งตัวก่อนที่จะนำเข้าตู้บ่ม รองลงมาคือ Spread plate, MIC และ Petrifilm™EC plate ถึงแม้ว่า Petrifilm จะง่ายต่อการใช้งานแต่ราคาต่อแผ่นค่อนข้างสูง ดังนั้นวิธีการนี้จะเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่สิ้นเปลือง จึงควรใช้ในกรณีที่ลูกค้าต้องการ ในทางกลับกันหากเปลี่ยนจากการใช้ Petrifilm เป็น Spread plate หรือ MIC จะทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายลงไปได้ร้อยละ 80 และร้อยละ 99 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงการเปรียบเทียบต้นทุนของการใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm™EC plate, Spread plate และ MIC ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรค

รายการต้นทุน	Pour plate	Petrifilm	Spread plate	MIC
พนักงาน (คน)	4	4	4	4
เวลาการวิเคราะห์ (นาที/ตัวอย่าง)	15.25	2.50	4.25	2.53
บ่ม (ชั่วโมง/lot)	24	24	18.24	12 - 15
ราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ (บาท/ตัวอย่าง)	17	52	10	0.15

4.9 การประเมินผลการตอบรับการวิธีการวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ด้วยเทคนิค MIC

เนื่องจากเทคนิค MIC สามารถเพิ่มความถี่ในการสุ่มตัวอย่างในการตรวจหา *E. coli*/coliform ได้เป็นอย่างดี และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารและสายการผลิต เทคนิคดังกล่าวจะต้องถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ QC & QA ตั้งแต่กระบวนการรับวัตถุดิบจนกระทั่งได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย อีกทั้งจะมีการนำเทคนิค MIC ไปใช้ในการตรวจสอบความสะอาดของกระบวนการผลิตและเครื่องจักร ดังนั้นเพื่อให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานสูง การตรวจสอบหรือรับทราบความเห็นของพนักงาน QC ที่เป็นเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เป็นสิ่งสำคัญเพื่อประเมินความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้จริงในโรงงาน ทางผู้วิจัยจึงได้ทำแบบสอบถามเกี่ยวกับความพึงพอใจในการใช้เทคนิค MIC โดยในแบบสอบถามประกอบไปด้วยรายละเอียดหัวข้อต่างๆ ในการประเมินเช่น ความสะดวกในการใช้งาน, ความง่ายในการวิเคราะห์และทำความสะอาด เป็นต้น ทั้งนี้ในแต่ละหัวข้อจะมีคะแนนเต็ม 9 คะแนน ใช้พนักงานประมาณ 5 – 8 คนประเมิน จากนั้นนำคะแนนที่ได้ในแต่ละหัวข้อมาหาค่าเฉลี่ย ในการประเมินจะให้พนักงานให้คะแนนจากแบบสอบถามแสดงดังตารางที่ 4.16 การดำเนินงานดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยให้ผู้ประกอบการตัดสินใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานจริง ซึ่งนอกจากจะพิจารณาในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และต้นทุนในการดำเนินงานแล้ว ความยากง่ายในการใช้งานก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณาร่วมด้วย เนื่องจาก คนที่จะมาใช้งานจริงๆ จะเป็นพนักงานของห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการรับทราบความเห็นเกี่ยวกับการใช้งานของเทคนิค MIC จากผู้ใช้จริง จะเป็นประโยชน์อย่างมากช่วยให้สามารถประเมินสถานการณ์ความพึงพอใจของ

เจ้าหน้าที่ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการใช้งานได้เต็มที่หรือไม่ โดยรายละเอียดผลการประเมินแสดงดังต่อไปนี้

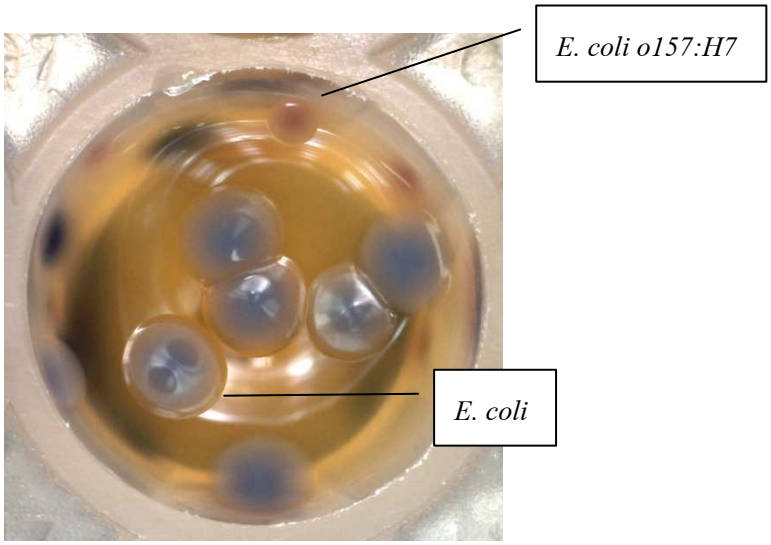
ตารางที่ 4.16 แสดงคะแนนการยอมรับเฉลี่ยของเทคนิคการวิเคราะห์ MIC เทียบกับวิธี Pour plate

ตัวอย่าง	คะแนนเฉลี่ย (คะแนนเต็มที่ 9 คะแนน)	
	Pour plate	MIC
ความสะดวกในการใช้งาน	6	9
ง่ายต่อการวิเคราะห์	6.5	8
ง่ายต่อการทำความสะอาด	7	9
ใช้แรงงานน้อย	7	9
ให้ผลวิเคราะห์เร็ว	5	9
ใช้เวลาในการทราบผลเร็ว	6	9
ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูง	6	8
คะแนนการยอมรับโดยรวม	6	9
คะแนนเฉลี่ย	8.75	6.18

จากผลการทดสอบดังกล่าวเป็นคะแนนเฉลี่ยที่ได้จากการประเมินโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ จากตารางจะเห็นได้ว่าเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ QC ให้คะแนนเฉลี่ยโดยรวมของการใช้เทคนิค MIC มากกว่าการใช้เทคนิค pour plate ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่พนักงานโดยส่วนใหญ่มีความพึงพอใจในการใช้เทคนิค MIC ช่วยให้ทางโรงงานมีข้อมูลประกอบการพิจารณาในการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าว โดยจากแบบสอบถามซึ่งมีรายละเอียดเรื่องของการทำความสะอาดง่าย ใช้แรงงานน้อย และสามารถตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ได้ในเวลาที่รวดเร็ว เป็นจุดเด่นของเทคนิคการวิเคราะห์ MIC ประโยชน์ที่จะได้รับจากเทคนิคดังกล่าวจะเน้นไปที่วิธีที่รวดเร็ว เพื่อที่จะลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี pour plate (conventional method) การวิเคราะห์ที่รวดเร็วช่วยเป็นการ screening ตัวอย่างว่าจะมีโอกาสที่จะมีการปนเปื้อนของเชื้อหรือไม่ และช่วยในการปล่อยผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็น negative samples ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและพื้นที่ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

4.10 เทคนิคการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 บนอาหาร Chromocult® Coliform agar (CCA)

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 บนอาหาร Chromocult® Coliform agar (CCA) โดยการใช้เทคนิค 96 – well flat bottom microplate ร่วมกับการใช้กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ พบว่าอาหาร Chromocult® Coliform agar (CCA) สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวด้วยเทคนิคการที่อาหารประกอบไปด้วยซับเสตรท X-glucuronide จะให้โคโลนีของสีน้ำเงินม่วง เนื่องจากเอนไซม์ β-glucuronidase จาก *E. coli* ซับเสตรท Salmon – Gal โดยจะให้โคโลนีสีแดงของ coliforms หรือ *E. coli* O157:H7 (รูปที่ 4.18) เนื่องจากเอนไซม์ β-galactosidase ที่อยู่ในอาหารและ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกและ non-enteric bacteria บางส่วนถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้ง Tergitol – 7



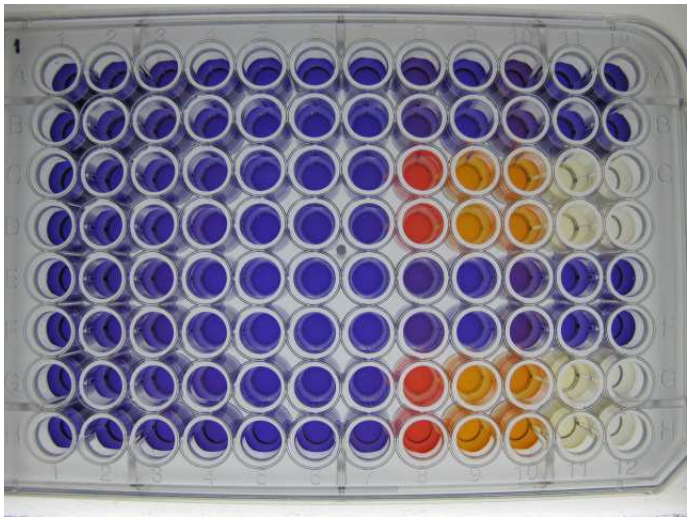
รูปที่ 4.18 ลักษณะโคโลนีของ *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 ที่ปรากฏบนอาหาร CCA

เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อดังกล่าวในกรณีที่ลูกค้าต้องการผล confirmation เพื่อความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Finney et al., 2003) การตรวจสอบโคโลนีเชื้อดังกล่าวในอาหาร miniaturized biochemical broths เป็นทางเลือกที่ผู้วิจัยนำเสนอ เนื่องจากวิธีการเดิมของทางโรงงานเป็นวิธีการที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 2 – 3 วัน กว่าจะทราบผลวิเคราะห์ และใช้อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ปริมาณมาก ทั้งนี้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วย miniaturized biochemical broths ประกอบไปด้วยอาหาร Sugar fermentable ของน้ำตาลชนิดต่างๆ กันเช่น ซูโครส, เมลิไบโอส, แมนโนส, ฟรุคโตส, ซอร์บิทอล, แลคโตส, เด็กซ์โตส, อินโนซิทอล, แรมโนส, กาแลคโตส, เซลโลไบโอส, ดูซิทอล, ซาลิซิน, อะโดนิทอล, อะราบิโนส, ทรีฮาโลส

, ไซโลสและแมนนิทอล อาหารกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น ไลซีน ออร์นิทินและอาร์จินิน โดยรายละเอียดการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

4.10.1 การทดลองตรวจสอบเพื่อยืนยันผลเชื้อโคโลนี *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7

ในการทดลองได้มีการเตรียมอาหารสูตรต่างๆ เช่น การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ดังที่ได้กล่าวก่อนหน้านั้น ความสามารถในการใช้กรดอะมิโน โดยในการทดลองจะทำการเตรียมอาหารที่ส่วนผสมสูตรต่างๆ และละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิค aseptic filling โดยเป็นการกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 μm ซึ่งเทคนิคดังกล่าวช่วยควบคุมไม่ให้สีเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความร้อน เป็นการควบคุมสภาวะเริ่มต้นให้ใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการบรรจุอาหารชนิดต่างๆ ปริมาณ 180 μl ลงใน 96 – well flat bottom microplate ด้วยอุปกรณ์ Multichanell pipette ดังแสดงในรูปที่ 4.19



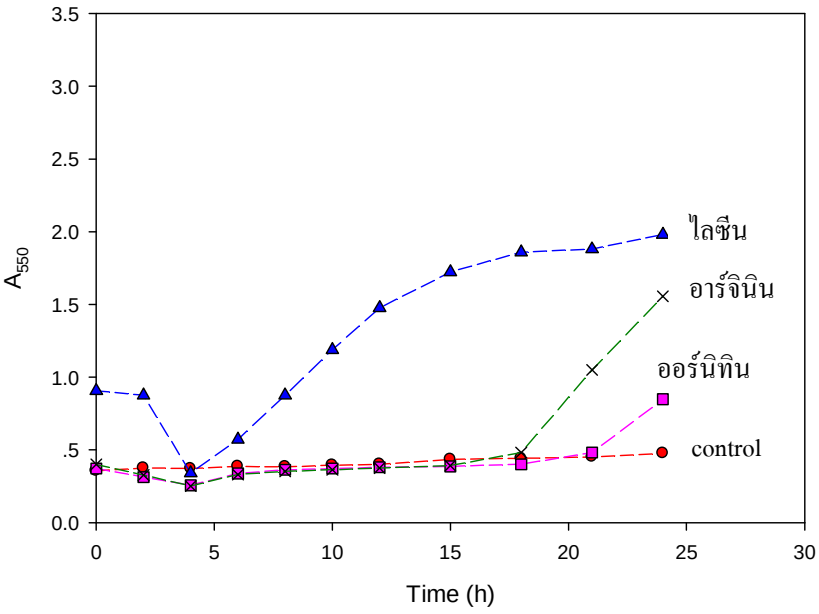
รูปที่ 4.19 ชุด miniaturized biochemical broths ที่ประกอบไปด้วยอาหารชนิดต่างๆ ซึ่ง *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 จะมีความสามารถในการใช้อาหารที่แตกต่างกัน

หลังจากที่เตรียมอาหารสูตรต่างๆ แล้ว ทำการเขี่ยโคโลนีเป้าหมายลงในอาหาร Tryptic soy broth ที่บรรจุอยู่ใน eppendoft ปริมาณ 1 ml จากนั้นทำการเขย่าด้วย Vortex ปั่นให้ cell suspension เป็นเนื้อเดียวกัน นำ cell ที่เตรียมดังกล่าวไปบรรจุลง miniaturized biochemical broths ชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 μl จากนั้นนำเข้าตู้บ่ม โดยในระหว่างบ่มจะนำตัวอย่างออกมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 และ 600 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการ

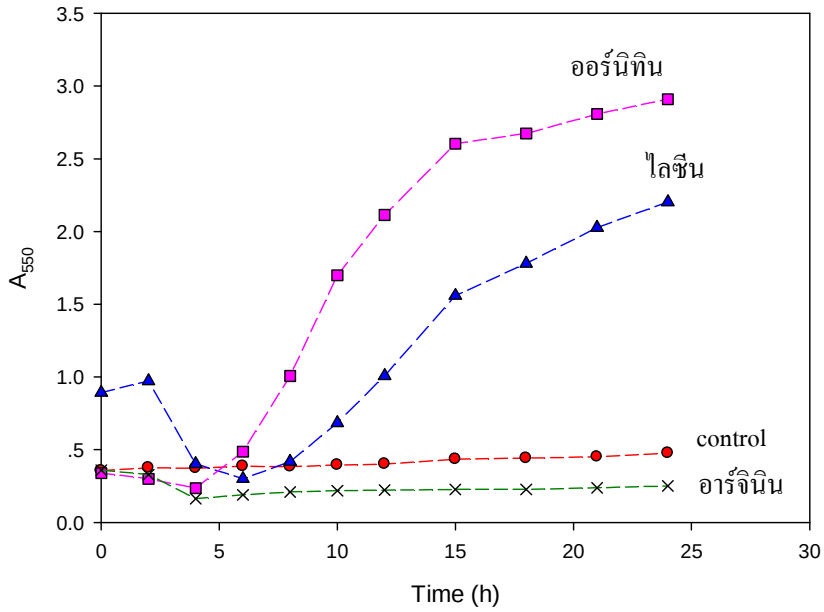
บ่มกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง เพื่อยืนยันผลเชื้อโคโลนีเป้าหมายซึ่งเป็น *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ค่อนข้างที่จะจำเป็นต้องเฝ้าระวัง

4.10.2 ผลการทดลองเพื่อยืนยันผลเชื้อโคโลนี *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 ด้วย miniaturized biochemical broths

ในการทดลองรูปแบบการตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 ด้วยเทคโนโลยี MIC ที่มีการใช้อาหาร CCA หลังจากการบ่มเมื่อปรากฏโคโลนีสีม่วงของ *E. coli* และโคโลนีสีแดงของ *E. coli* O157:H7 เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบว่าเป็นเชื้อดังกล่าวหรือไม่ ที่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วภายในเวลา 18 ชั่วโมงและขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน จากวิธีการวิเคราะห์แบบปกติที่ใช้เวลา 2 – 3 วัน ทางผู้วิจัยนำเสนอแนวทางวิเคราะห์โดยการนำโคโลนีดังกล่าวทดสอบใน miniaturized biochemical broths แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 และ 600 นาโนเมตรตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้



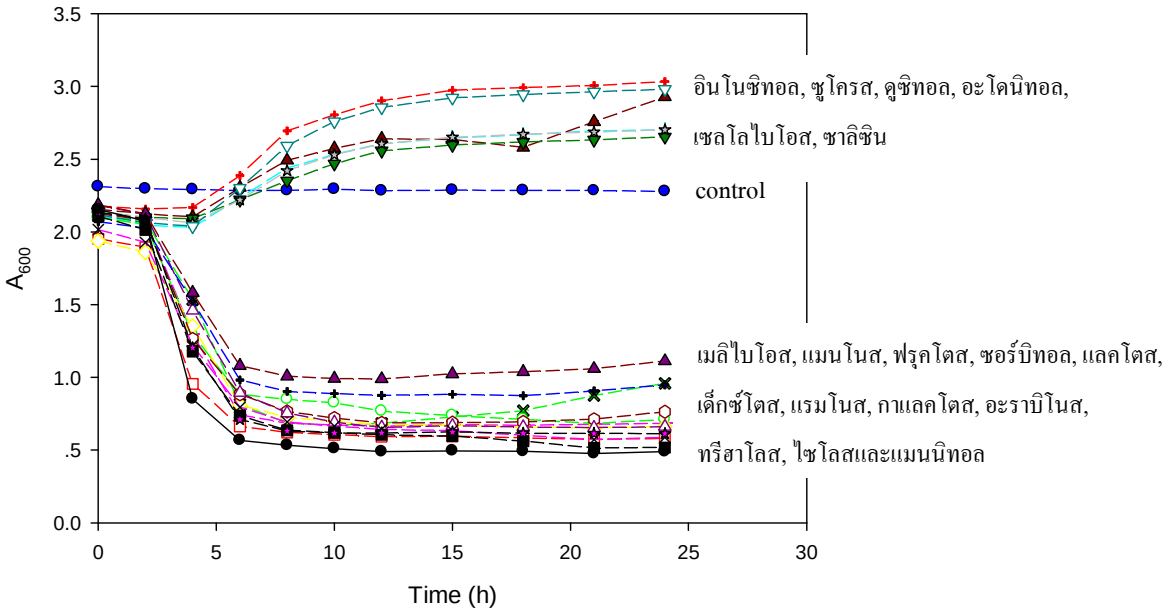
รูปที่ 4.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* ในอาหาร amino decarboxylation



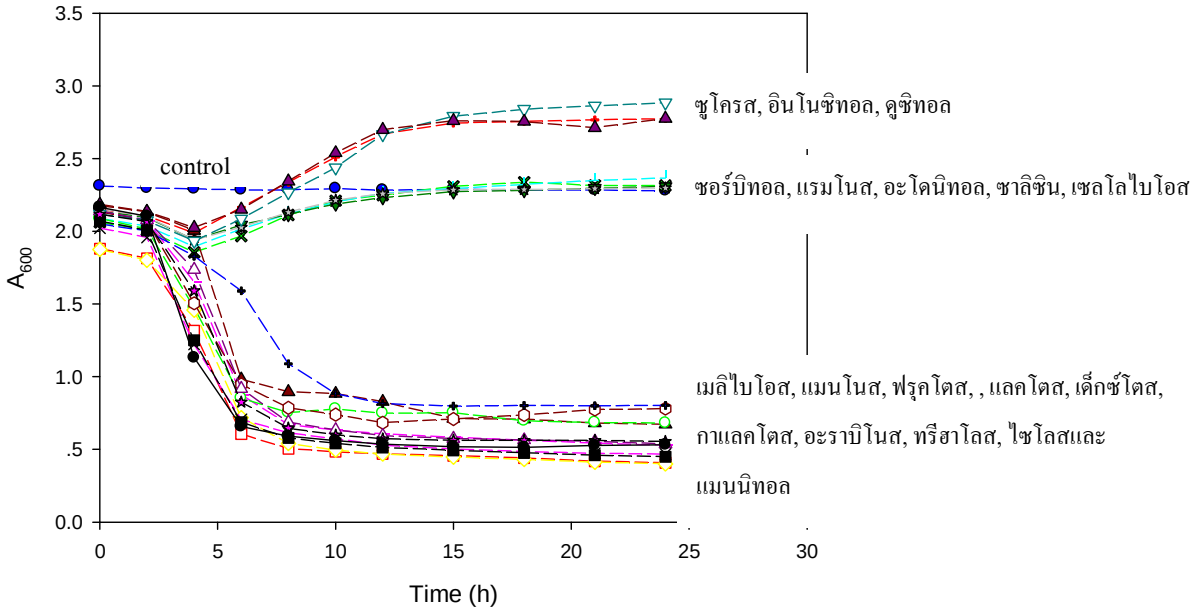
รูปที่ 4.21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร amino decarboxylation

จากกราฟรูปที่ 4.20 และ 4.21 ซึ่งเป็นกราฟแสดงปฏิกริยาความสามารถในการใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ของ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร amino decarboxylation เชื้อโคโลนี *E. coli* สามารถใช้กรดอะมิโนไลซีน ออร์นิทิน และอาร์จินิน โดยจากกราฟรูปที่ 4.20 จะเห็นว่าในช่วงเวลาการบ่ม 4 – 5 ชั่วโมงแรก ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงจากนั้นเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากกลไกของการใช้กรดอะมิโนดังกล่าวเกิดจากในช่วงแรกจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสใช้น้ำตาลเด็กซ์โตสเป็นแหล่งพลังงานก่อน ให้ผลพลอยได้เป็นกรดซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารจำเพาะลดลง ดังนั้นในช่วงแรกสีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลืองและแนวโน้มของกราฟค่าการดูดกลืนแสงลดลงในช่วงแรกสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน จากนั้นที่สภาวะกรดดังกล่าวจะเร่งปฏิกริยาให้เอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสใน *E. coli* ใช้กรดอะมิโนในอาหาร broth ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารคาร์ดาร์วารีน ทำให้ pH ของอาหารสูงขึ้น ส่งผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นด้วยเช่นกัน และสีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู ทั้งนี้จากกราฟรูปที่ 4.20 จะเห็นได้ว่าความสามารถหรืออัตราการใช้กรดอะมิโนของ *E. coli* จะต่างกัน โดยกรดอะมิโนไลซีน แบคทีเรีย *E. coli* จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงปรากฏค่อนข้างชัดเจนในช่วงเวลาการบ่มแรก ๆ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนไลซีนถูกใช้ภายในเวลาไม่นานหลังจากทำการบ่ม ในขณะที่กรดอะมิโนออร์นิทินและอาร์จินิน แสดงค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการ

ดูดกลืนคลื่นแสงที่เวลาหลังจากการบ่มไป 18 ชั่วโมงแล้ว จากกราฟดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าชนิดของกรดอะมิโนที่ใช้มีผลต่ออัตราความสามารถในการใช้ของเอนไซม์ ทั้งนี้เมื่อพิจารณากราฟรูปที่ 4.21 ซึ่งเป็นกราฟกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* O157:H7 จะเห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถใช้กรดอะมิโนไลซีน ออร์นินทินได้แต่ไม่สามารถใช้กรดอะมิโนอาร์จินินได้ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากกราฟค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนอาร์จินินมีแนวโน้มคงที่ใกล้เคียงกับ control sample ที่ไม่ได้มีการ inoculation เชื้อใดๆ ลงไป ซึ่งความแตกต่างระหว่างความสามารถในการใช้กรดอะมิโนต่างชนิดกันสามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งชี้ strain ของ *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 ในการทดสอบในผลิตภัณฑ์อาหารจริงได้



รูปที่ 4.22 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* ในอาหาร sugar fermentable



รูปที่ 4.23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร sugar fermentable

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของ *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 จากกราฟรูปที่ 4.22 และ 4.23 ตามลำดับ พบว่า *E. coli* สามารถที่จะ metabolized น้ำตาลเมลิไบโอส, แมนโนส, ฟรุคโตส, ซอร์บิทอล, แลคโตส, เด็กซ์โตส, แรมโนส, กาแลคโตส, อะราบิโนส, ทรีฮาโลส, ไซโลสและแมนนิทอลได้ โดยลักษณะกราฟค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของน้ำตาลชนิดต่างๆ จะมีแนวโน้มลดลงทั้งนี้เนื่องจากเมื่อ *E. coli* มีการ metabolized น้ำตาลจะเกิด by product เป็นกรด ทำให้ pH ของอาหารลดลง ส่งผลทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองและกราฟค่าการดูดคลื่นแสงมีแนวโน้มลดลงด้วย ในขณะที่น้ำตาลอินโนซิทอล, ซูโครส, ดูซิทอล, อะโดนิทอล, เซลโลไบโอสและซาลิซิน *E. coli* ไม่สามารถที่จะใช้น้ำตาลดังกล่าว ดังนั้นเพื่อการเจริญเติบโต *E. coli* จึงใช้แหล่งอาหารอื่นในส่วนประกอบของ biochemical broth ซึ่งเป็นเปปโตน ยีสต์สกัด ซึ่งอาหารดังกล่าวเมื่อมีการถูกใช้โดยแบคทีเรียจะส่งผลทำให้อาหารอยู่ในสภาะเป็นเบสที่สูงขึ้น แนวโน้มของกราฟค่าการดูดกลืนของแสงจึงมีสูงขึ้นสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร โดยผลการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *E. coli* O157:H7 แสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงของปฏิกริยาเช่นเดียวกับในอาหารที่มี *E. coli* โดย *E. coli* O157:H7 สามารถที่จะ metabolized น้ำตาลเมลิไบโอส, แมนโนส, ฟรุคโตส, แลคโตส, เด็กซ์โตส, กาแลคโตส, อะราบิโนส, ทรีฮาโลส, ไซโลสและแมนนิทอล ในขณะเดียวกันไม่สามารถใช้น้ำตาล ซูโครส, อินโน

ซิทอล, ซอร์บิทอล, แรมโนส, อะโดนิทอล, ซาลิซิน, เซลโลไบโอส และดูซิทอล โดยกลไกการเปลี่ยนแปลงของปฏิกริยาความสามารถในการใช้น้ำตาลเช่นเดียวกับ *E. coli*

จากปฏิกริยาความสามารถในการใช้กรดอะมิโนและการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกันของทั้ง *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 สามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งบอกเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ในกรณีที่ลูกค้าต้องการข้อมูลเพิ่มเติมจากผลการวิเคราะห์ตรวจคุณภาพในระดับ presumptive test แล้ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะในการเกิดปฏิกริยา amino decarboxylation และ sugar fermentable ต่างกัน ในการตรวจติดตามปฏิกริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนไป เทคนิคดังกล่าวมีประโยชน์เป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถประเมินปฏิกริยาที่ให้ผลถูกต้องน่าเชื่อถือกว่าการใช้สายตามนุษย์ซึ่งมีความไม่แน่นอน สามารถวิเคราะห์ตัดสินใจผลได้อย่างมั่นใจ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การนำเสนอรูปแบบอุปกรณ์เพื่อการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7 โดยการประยุกต์ใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate แทนจานเพาะเชื้อแบบแก้ว ทำให้สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ถึง 96 ตัวอย่าง ส่งผลทำให้สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากครั้งขึ้นและมีความถี่มากขึ้น ช่วยลดความผิดพลาดที่จะเกิดจากการวิเคราะห์เนื่องจากใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย สามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นการลดปริมาณการใช้อาหาร อีกทั้งมีการนำเทคโนโลยีการตรวจ detect เชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยายสูงทำให้สามารถเห็นโคโลนีภายในเวลาที่รวดเร็ว ทดแทนการตรวจนับด้วยสายตาหรือทดแทนการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์นำเข้าราคาแพง โดยเทคนิค MIC ที่นำเสนอทำให้สามารถลดระยะเวลาและต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์

2. การตรวจสอบความแม่นยำและถูกต้องของการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate เทียบกับวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน พบว่าวิธี MIC สามารถที่จะนับปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^2 – 10^6 CFU/ml ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบกับวิธี MPN, Pour plate และ Petrifilm™ EC plate โดยให้ค่าปริมาณเชื้อที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นวิธี MIC ที่นำเสนอสามารถใช้แทนวิธีมาตรฐานในปัจจุบันได้

3. การวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของเทคนิค Pour plate, Petrifilm™ EC plate, Spread plate และ MIC ที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* ค่าการเจริญเติบโตสูงสุดจำเพาะของเชื้อ หรือ μ_{max}ของเทคนิค Spread plate และ MIC มีค่าสูงที่สุด ซึ่งจะทำให้สามารถเห็นโคโลนีได้เร็วที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ Petrifilm™ EC plate และ Pour plate

4. ในการศึกษาผลของอุณหภูมิในการบ่ม (i.e., 30, 35, 37, 40 และ 45°C) ที่มีผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้และ kinetic ต่อการขยายตัวของโคโลนี *E. coli* พบว่าที่อุณหภูมิการบ่ม 30, 35, 37, 40°C ให้ค่าปริมาณเชื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่อุณหภูมิ 45°C ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อพิจารณาความสามารถในการมองเห็น (visual detection) ด้วยอุณหภูมิการบ่มที่ 37 และ 40°C ให้ค่าอัตราการขยายตัวของโคโลนีสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาความสามารถในการ

detection และการประหยัดพลังงาน อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C จึงเหมาะสมที่จะปรับใช้เป็น protocol ร่วมกับการใช้ 96-well U-bottomed polypropylene plate ในการวิเคราะห์ *E, coli*/coliform และ *E. coli* O157:H7

5. การประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Spread plate และ MIC ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร เทคนิค Spread plate และ MIC สามารถใช้แทนเทคนิค Pour plate ได้

6. การประยุกต์ใช้เทคนิค Pour plate, Petrifilm™ EC plate, Spread plate และ MIC ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคที่มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ *E. coli* พบเพียงแต่การปนเปื้อนของแบคทีเรีย coliform โดย เทคนิค Spread plate และ MIC สามารถใช้แทนเทคนิค Pour plate และ Petrifilm™ EC plate ได้ สำหรับตัวอย่างที่ขุ่นอาจกรองตัวอย่างก่อนที่จะนำเทคนิค MIC มาประยุกต์ใช้เช่นเดียวกับในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

7. ในการตรวจสอบหาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนในสายการผลิตด้วยถุง easy swab ทำให้สามารถ swab ตัวอย่างไปตามจุดต่างๆ ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้สะดวก ช่วยเพิ่มพื้นที่ในการ swab แต่ละครั้งได้ถึง 36 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการดั้งเดิมที่โรงงานใช้อยู่ นอกจากนั้นถุงอีซี่ Swab สามารถใช้แล้วทิ้งได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการล้างเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งถือว่าเป็นการประหยัดเวลา และลดต้นทุนในการวิเคราะห์

8. การวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคที่มีการปนเปื้อนในสายการผลิตในตัวอย่างที่เก็บจากเทคนิค easy swab และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Pour plate และ MIC พบว่าไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ *E. coli* พบเพียงแต่การปนเปื้อนของแบคทีเรีย coliform โดยทั้ง 2 เทคนิค Pour plate และ MIC ให้ผลต่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

9. ต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจะสามารถลดลงได้ร้อยละ 40 และร้อยละ 99 เมื่อทำการใช้เทคนิค Spread plate และ MIC แทน Pour plate ตามลำดับ สำหรับในส่วนต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* จะลดลงโดยคิดเป็นร้อยละ 80 และร้อยละ 99 เมื่อทำการใช้เทคนิค Spread plate และ MIC แทน Petrifilm™ EC plate ตามลำดับ

10. ในการประเมินความพึงพอใจในการใช้งานของเทคนิค MIC พบว่าเทคนิคดังกล่าวได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ QC โดยมีคะแนนเฉลี่ยของการใช้เทคนิค MIC ในหัวข้อต่างๆ อยู่ในเกณฑ์สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับประสบการณ์ที่ผ่านมาของการใช้ pour plate ที่เป็น routine ดั้งเดิมของโรงงาน ดังนั้นการใช้เทคนิค MIC จึงเป็น protocol ที่มีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/coliform ในผลิตภัณฑ์อาหารและตัวอย่างอุตสาหกรรมใน line การผลิต

11. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผลเชื้อโคโลนี *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร miniaturized biochemical broths ที่ประกอบไปด้วยสารตั้งต้นเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ และกรดอะมิโนที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความจำเพาะในการใช้ต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นดัชนีในการระบุความจำเพาะของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งการตรวจติดตามปฏิกริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเป็นเทคนิคที่ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำสูงกว่าการตรวจติดตามด้วยสายตามนุษย์ โดยจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เวลาการบ่มต่างๆ สามารถที่จะชี้ชัดปฏิกริยาได้ว่าเป็น positive หรือ negative เมื่อเทียบกับ control sample ที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อลงไป

เอกสารอ้างอิง

บุษกร อุตรภิชาติ (2550). จุลชีววิทยาทางอาหาร. โครงการส่งเสริมการผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

อุษามาส วังชัยสุนทร (2547). คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยาคืออะไร What is the Microbiological Quality of Food. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. กรุงเทพฯ. 24.

Adams, M.R., Grubb, S.M., Hamar, A., and Clifford, M.N., 1990, "Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on beta - glucuronidase activity", Applied and Environmental Microbiology**,** Vol. 56**,** pp. 2021 - 2024.

Alonso, J.L., Amoros, I. and Alonso, M.A., 1996, "Differential susceptibility of Aeromonads and coliforms to Cefsulodin", Applied and Environmental Microbiology**,** Vol. 62, pp. 1885 - 1888.

American Public Health Association, 1995, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19^{th} 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 Microbiology, Vol. 39, pp. 111 - 117.

Andrews, W., 1992, Manual of Food Quality Control 4, Microbiological Analysis, Rev. 1.; Washington, DC: FAO Consultant, Food and Drug Administration, (Chapter 3).

Anonymous, 1985, Standard methods for the examination of water and waste water, 16^{th} ed., American Public Health Association, Washington, DC, pp. 886 - 899.

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

AOAC International, Official Method 2005.03, "Detection and Confirmed Quantitation of Coliforms and *E. coli* in Foods SimPlate Coliform and *E. coli* Color Indicator".

AOAC (1995). Official methods of analysis. 16th Edition. Association of official analytical chemists. Washington. D. C.

Berg, J.D. and Fiksdal, L., 1988, "Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4 – methylumbelliferone – β - D - galactoside", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, pp. 2118 – 2122.

Beuchat, L.R., Copeland, F., Curiale, M.S., Danisavich, T., Gangar, V., King, B.W., Lawlis, T.L., Likin, R.O., Okwusoa, J., Smith C.F. and Townsend, D.E., 1998, "Comparison of the SimPlate (TM) total plate count method with Petrifilm (TM), Redigel (TM), and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods", Journal of Food Protection, Vol. 61, pp. 14 - 18.

Beumer, R.R., Curtis, G.D.W., 2003, "Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*", In: Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. (Eds.), Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Elsevier, Amsterdam, pp. 79 – 90.

Blackburn, C. de W. and McCarthy, J.D., 2000, "Modification to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods", International Journal of Food Microbiology, Vol. 55, pp. 285 – 290.

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

Buck., J.D. and Cleverdon., R.C., 1960, "The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria", LIMNOL OCEANOGR., Vol.5, pp. 78 – 80.

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.

Cox, N.A., Bailey, J. S. and Thomson, J.E., 1983, "Evaluation of five miniaturized systems for identifying Enterobacteriaceae from stock cultures and raw foods", Journal of Food Protection, Vol. 46, pp. 914 - 916.

Doyle, M.P. and Schoeni, J.L., 1984, "Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 48, pp. 855 – 856.

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.

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.

Finney, M., Smullen, J., Foster, H.A., Brokx, S. and Storey, D.M., 2003, "Evaluation of chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects", Journal of Microbiological Methods, Vol. 54, pp. 353 – 358.

Firstenberg-Eden, R., 1985, "Electrical impedance method for determining microbial quality of foods", In : K.O. Hobermehl, Editor, *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.

Gonzalez, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D. and G.B. de Sousa, 2003, "Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods", Food Microbiology, Vol. 20, pp. 601 – 604.

Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G., Pathak, K., 2005, "Evaluation of chromogenic media for the detection of Listeria species in food", Journal of Applied Microbiology**,** Vol. 99, pp. 1340 - 1345.

Hasan, A., Belgin, S. and Serdar, C., 2004, "Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey", Food Control, Vol. 15(5), pp. 379-384.

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.

Juyun, L.H., 2011, "A review of methods and theory", Food Quality and Preference, Vol. 22, pp. 733-747.

Kang, D.H. and Fung, D.Y.C., 1999, "Development and evaluation of a 24 well microtitre plate method for isolation of *Listeria* spp. or *Listeria monocytogenes* from foods", Letters in Applied Microbiology, Vol. 28, pp. 280-284.

Khueankhancharoen, J., Thipayarat, A. and Saranak, J., 2016, "Optimized microscale detection of amino acid decarboxylase for rapid screening of *Salmonella* in the selective enrichment step", Food Control, Vol.69, pp.352-367.

Kornacki, J. L. and Marth, E.H., 1982, "Foodborne illness caused by *Escherichia coli* : a review", Journal of Food Protection**,** Vol. 45, pp. 1051- 1067.

Liamkaew, R., Thipayarat, A. and Saranak, J., 2014, "*Listeria* detection in microscale solid state inoculation with minimal selective agents", Food Control, Vol. 43, pp. 183-192.

Loessner, M.J., Bell, R.H., Jay, J.M. and Shelef, L.A., 1988, "Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp.", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, pp. 3003-3007.

Manafi, M., 1996, "Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests", International Journal of Food Microbiology**,** Vol. 31, pp. 45 - 58.

Manafi, M., 1998, "Culture media containing fluorogenic and chromogenic substrates", De Ware (n)-Chemicus, Vol. 28, pp. 12 - 17.

Manafi, M., 2000, "New developments in chromogenic and fluorogenic culture media", International Journal of Food Microbiology, Vol. 60, pp. 205 - 218.

Matner, R.R., Fox, T.L., Mciver, D.E. and Curiale, M.S., 1990, "Efficacy of Petrifilm™ *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration", Journal of Food Protection**,** Vol. 53, pp. 145 – 150.

Pangloli, P., Jackson, F., Richards, H.A., Mount, J.R. and Draughon, F.A., 2006, "Comparison of conventional plating and SimPlate methods for enumeration of aerobic microorganisms, coliform and *Escherichia coli* in farm environmental samples", Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, Vol. 14, pp. 258 - 265.

Pavic, A., Groves, P.J., Bailey, G. and Cox, J.M., 2010, "A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices", Journal of Applied Microbiology, Vol. 109, pp. 25–34.

Perry, J.D. and Freydiere, A.M., 2007, "The application of chromogenic media in clinical microbiology", Journal of Applied Microbiology, Vol. 103, pp. 2046 - 2055.

Rice, E.W., Allen, M.J., Brenner, D.J. and Edberg, S.C., 1991, "Assay for β - glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its application for drinking – water analysis", Applied and Environmental Microbiology**,** Vol. 57, pp. 592 - 593.

Schonenbrucher, V., Mallinson, E.T. and Bulte, M., 2008, "A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne Salmonella species including three new chromogenic plating media", International Journal of Food Microbiology, Vol. 123, pp. 61 - 66.

Schraft, H. and Watterworth, L.A., 2005, "Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water : comparison of 3M™ Petrifilm™ plates with standard plating procedures", Journal of Microbiological Methods**,** Vol. 60, pp. 335 - 342.

Seo, K.K., Brackett, R.E. and Frank, J.F., 1998, "Rapid detection of *Escherichia coli* o157:H7 using immunomagnetic flow cytometry in ground beef, apple juice and milk", International Journal of Food Microbiology, Vol. 44, pp. 115 – 123.

Supanivatin, P., Khueankhancharoen, J., Saeaung, W., Boonyaprapasorn, A. and Thipayarat, A., 2010, "Industrial Implementation of Fast Total Plate Count Analysis Applying Micro Inoculation Culture

on Frozen Ready-to-eat Food Products", International Conference for a Sustainable Greater Mekong Subregion, 26 - 27 August 2010, Bangkok, Thailand.

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.

Warren, L.S., Benoit, R.E. and Jessee, J.A., 1978, "Rapid Enumeration of Fecal Coliforms in Water by a Colorimetric β - Galactosidase Assay", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 35, pp. 136 - 141.

Weagant, S.D. and Grant, M.A., Bacteriological Analytical Mannual (BAM) Online: Chapter 4 Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, 4th Ed, [online], Available: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm [2015, July 2].

http://www.obiecorp.com/products_technologies/fluorogenic_chromogenic_analysis

ภาคผนวก

แบบประเมินผลความพึงพอใจในการใช้เทคนิคการวิเคราะห์

ตารางแสดงการประเมินผลความพึงพอใจในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Pour plate และเทคนิคที่นำเสนอ MIC โดยผู้ประเมินจะทำการให้คะแนนในหัวข้อต่างๆ ซึ่งในแต่ละหัวข้อมีคะแนนเต็ม 9

ตารางที่ ก.1 แสดงหัวข้อประเมินความพึงพอใจในการใช้งานระหว่างเทคนิคการวิเคราะห์ Pour plate เปรียบเทียบกับ MIC

หัวข้อ	**คะแนน (1 – 9)**	
	Pour plate	**MIC**
ความสะดวกในการใช้งาน		
ง่ายต่อการวิเคราะห์		
ง่ายต่อการทำความสะอาด		
ใช้แรงงานน้อย		
ให้ผลวิเคราะห์เร็ว		
ใช้เวลาในการทราบผลเร็ว		
ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูง		
คะแนนการยอมรับโดยรวม		

หมายเหตุ: 1 (ไม่ชอบมากที่สุด) ถึง 9 (ชอบมากที่สุด)

ตารางที่ ก.2 ตารางดัชนี MPN ซึ่งจะบอกจำนวน *E. coli*/coliforms ที่มีอยู่ในอาหาร 100 กรัม โดยค่าในตารางดัชนีเป็นค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งเป็นการประมาณทางสถิติถึงปริมาณโคลิฟอร์มที่น่าจะตรวจพบได้ในอาหาร (Most Probable Number per 100 g of sample)

For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.

Pos. Tubes				Conf. lim.		Pos. tubes				Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High	0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100

For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.

Pos. Tubes				Conf. lim.		Pos. tubes				Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High	0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

BENTHAM OPEN

CrossMark

The Open Conference Proceedings Journal

Content list available at: www.benthamopen.com/TOPROCJ/

DOI: 10.2174/2210289201607010126

RESEARCH ARTICLE

Applicability of Micro Inoculation Culture (MIC) for Rapid Monitoring of Total Coliform Contaminants in the Food Industry

Wipavadee Sangadkit[1], Anat Deepatana[2] and Aluck Thipayarat[3,*]

[1]*Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 126 Pracha u-tid Rd., Bangmod, Tungkru, Bangkok 10140, Thailand*

[2]*Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-district, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand*

[3]*Office of Education, Faculty of Engineering, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-district, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand*

Received: June 29, 2015 Revised: May 20, 2016 Accepted: May 31, 2016

Abstract: Unlike medical samples from clinics, samples associated with food products and the environment they come into contact with during their processing are characterized by low initial cell counts and large sample volumes. This calls for different strategies of handling, especially in low-resource settings and in less advanced food industrial laboratories. This paper compares three popular industrial methodologies; MPN method, Petrifilm™ by 3M, and the standard pour plate technique, relative to a modified surface spread technique using 96-well microtiter plates (MIC). The colony enumeration results obtained from each technique showed good agreement. The miniaturized rapid protocol efficiently managed a large number of samples using multichannel autopipettes and a high-throughput design utilizing 96-well microtiter plates. Useful colony counts were obtained within 12-16 h. The analytical efficacy of the miniaturized protocol surpassed those of the three conventional methods. The colony counts from ready-to-eat product samples showed comparable results to the pour plate technique, displaying good agreement with the universally-accepted standard. The feedback by QC staff from a local Thai food factory revealed good overall acceptance of the MIC method with respect to usability, protocol design and method efficiency. The proposed miniaturized technique gave highly consistent results of colony count numbers and good colony separation. This colony enumeration consistency suggests that the miniaturized rapid protocol can economically replace the slower more complex standard protocols as an in-house protocol for food processing environment swabs.

Keywords: Chromocult® Coliform agar, Coliforms, Environmental sample, *Escherichia coli*, Practical miniaturized technique, Rapid colony enumeration.

1. INTRODUCTION

Sanitary assessment of water, workers, and processing environment, is of vital importance to the food industry. It could help prevent food products from pathogen contamination. The rapid and accurate detection of bacterial indicators for sanitation, *Escherichia coli* (*E. coli*) total coliforms (TC), is needed to provide emergency feedback for monitoring the processing line. There are several options available for the qualitative enumeration of *E. coli* and total coliform in foods. The most probable number (MPN) technique has been widely accepted and usually employed for routine investigation [1 - 4]. The MPN technique, however, has some obvious drawbacks. It is labor-intensive, expensive, and time-consuming [4, 5]. To obtain the final colony counts, this technique requires up to 10 days. Industry commonly replaces the conventional MPN with commercial available media and protocols, for example Chromocult® Coliform agar (CCA), Fluorocult® LMX broth, and Petrifilm™ *E. coli* count plates. Industry is constantly seeking more efficient methods with shorter detection times and more prompt and useful microbial information to monitor the routine

* Address correspondence to this author at the Office of Education, Faculty of Engineering, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-district, Mueang District, Chonburi 2013 1, Thailand; Tel.: +66 2 4709246; Fax: +66 2 4709240; Email: athipaya@yahoo.com

manufacturing.

There have been attempts to develop rapid alternatives and shorten the detection time for *E. coli* in food and environmental samples [6 - 9]. Most rapid techniques based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and DNA hybridization are fast and sensitive, but are not yet practical for routine screening of large numbers of industrial samples. Pre-enrichment is often required to obtain high enough cell concentrations (more than 4 log CFU/ml) for accurate detection [10]. Although the identification time is reduced, long incubation time made them as unattractive as the conventional methods. Alternatively, miniaturization of microbiological assessment through reduction of media and culture volumes has shown potential to decrease the detection time and provided better efficacy of microbial enumeration [11].

Several authors have demonstrated that miniaturization methods facilitate detection and enumeration of target bacteria without altering sensitivity or specificity [12 - 14]. A rapid method utilizing 24-well microplates successfully detected *Listeria* spp. in food samples [15]. This technique was shown to be superior to the conventional streak plate or spread plate techniques when handling large volume industrial samples. Previous studies using multiple microwell techniques (both 24- and 96-well formats) for viable cell counts of various bacteria have proven practical for routine inspection of industrial food and environmental samples, because large numbers of samples can be handled effectively saving both money and analytical time [3, 16, 17]. In this paper, several common protocols to estimate coliforms and *E. coli* were evaluated. A novel miniaturization method was also proposed to reduce the cultivation volume of CCA and decrease the detection time on both pure culture and industrial samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of Test Microorganism

Escherichia coli DMST 4609 was obtained from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand. One loopful of the stock culture was inoculated into tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Sparks, MD) at 37 °C for 24 h to reach the initial cell stock density of approximately 10^7 CFU/ml. To validate the proposed miniaturized method against the MPN, pour plate and Petrifilm™ techniques, the initial cell stock was diluted to 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, and 10^6 CFU/ml.

2.2. Detection of *E. coli* and TC From Commercial Foods and Its Production Line Facilities

2.2.1. Most Probable Number Method

In the MPN method [18], 1 ml of a sample suspension at a proper dilution was pipetted into triple tubes containing lactose broth (Oxoid CM451) and these tubes were incubated at 37 °C for 24 h. Tubes with gas formation were gently agitated and a loopful of each suspension then transferred to tubes of EC medium (DIFCO 0314-01-0) that were subsequently incubated at 44.5 °C for 48 h to confirm test for *E. coli*. And then a loopful of suspension from each gassing EC medium was streaked onto eosin methylene blue agar (EMB) (Oxoid CM63) and incubated at 37 °C for 24 h to complete test for *E. coli*. Their numbers per 1 ml of sample were calculated from the MPN table.

2.2.2. Pour Plate Method

The pour plate cell count was performed using CCA. The sample suspension at 1 ml was pipetted onto an empty Petri dish and homogeneously mixed with melting CCA. The inoculated plate was incubated at 37 °C for 24 h. Each dilution was tested using duplicates of CCA plates. Coliform colonies appear pink red and *E. coli* colonies purple.

2.2.3. Petrifilm™ E. coli/Coliform Method

Again, 1 ml of the same sample suspension was inoculated onto the surface of a Petrifilm™ *E. coli*/coliform count (EC) plate. The cover film was reinstalled slowly on the plate which was then incubated at 35 °C for 24 h according to the manufacturer's manual [19]. Red colonies surrounded by trapped gas were coliforms and purple colonies with trapped gas were *E. coli*. Duplicate trials were performed per dilution.

2.2.4. Miniaturized Technique

Micro inoculation culture (MIC) plates were fabricated using CCA in a 96-well microtiter plate format (Nunc, Rochester, NY, USA). Each microwell contained up to 0.5 ml of CCA and the inoculation volume was fixed at 10 µl

applied onto solidified CCA. The miniaturized microwells were incubated at 37 ºC and it took normally 12–15 h to detect bacterial colonies. Total coliforms and *E. coli* from all methods were reconfirmed by reisolation on EMB agar and IMViC testing [20]. Real samples from a local food exporter, including green papaya salad, fried rice, and cake topping as well as environmental swab samples from its production lines, were collected to evaluate coliforms and *E. coli* enumeration by each technique described above.

2.2.5. Preference Testing

Preference surveys evaluated the panelist's likes and dislikes of the proposed techniques. All ten staff members from the quality control department who had experienced using the conventional agar culture protocol were participated in the survey. The questionnaires were formulated to determine the intrinsic characteristics of employee satisfaction using a nine-point hedonic scale from 1 to 9. The score meaning can be interpreted as follows: 9 = like extremely, 8 = like very much, 7 = like moderately, 6 = like slightly, 5 = neither like nor dislike, 4 = borderline of acceptability, 3 = dislike moderately, 2 = dislike very much, and 1 dislike extremely [21, 22]. The scores were the average value from the ten panelists and the standard deviations were included in the report to show the range of variability of responses.

2.2.6. Financial Comparison

The cost of material and operating time from the two techniques were compared. The volume of media (CCA) and the amount of disposable materials (glass Petri dishes and 96 micro-deep wells) were monitored. Pavic *et al*. [3] and Chenu *et al*. [16] recommended the method for calculating the operating cost with slight modification. The times to analyze 36 samples by ISO 4833-1:2013 and the microscale technique were measured.

2.2.7. Statistical Analysis

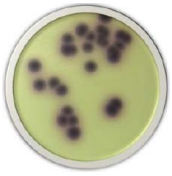
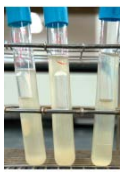
TC counts obtained were transformed to log CFU/ml. All data were analyzed at $p<0.05$ for significant values by ANOVA. Paired *t*-test was used to test the significant differences between the means of two sets of data and to assess the agreement.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Comparison of MIC to Other Commercial and Standard *E. coli* Enumeration Techniques

The use of the MIC technique has several advantages over other commercial and standard protocols in terms of compactness, short detection time and less medium usage (Table **1**). The miniaturized microwells allowed multiple dilutions of food and environment samples to adequately cover the normally encountered range of industrial contamination. In industrial situations, there are often cases of under-diluted samples since most factories are cost-conscious and CCA is rather costly for many environmental swab samples. The compactness of the 96-well microtiter plate (5 mm width, 10 mm length and 1.5 mm thickness) accommodates 96 samples, equivalent to 96 Petri dishes using the pour plate protocol. Also the 96-well format facilitates the use of commercial multi-channel auto pipettes, either 8- or 12-channel, and diminishes the sample dilution and liquid transferring loads of lab workers. Our interviews with QC&QA personnel carrying out the MIC protocol in a food factory setting have generally been positive since our first MIC implementations. This is particularly true, if these factory microbiologists had been previously following mostly ISO protocols using the pour plate technique as their regular routine.

Table 1. Comparison of the key analytical characteristics for *E. coli* detection among different techniques.

	MIC	MPN	pour plate	Petrifilm™ EC plate
Dimension	 8 × 8 mm.	 N.A.	90 × 90 mm.	47 × 47 mm.
Detection time	12 - 18 h	3 – 4 days	2 – 3 days	1 – 2 days
Medium usage	0.5 ml/well	9 ml/tube	25 ml/plate	5 ml/plate
Inoculum size	0.01 ml	1 ml	1 ml	1 ml

The only obvious disadvantage of the MIC protocol was the smaller inoculum volume. The 50.28 mm^2 agar surface was able to accept optimally 10-20 µl of sample inoculums. Higher inoculum volume resulted in smearing on the agar surface or less well-defined colonies after incubation. The two orders of magnitude smaller sample volume compared to the other protocols results in a minimum detection limit of 2 log CFU/ml.

Considering the sample residue in transferring glass pipettes, the inherent analytical errors using the standard methods never permit the colony enumeration accuracy to single digit CFU counts. There is a counting guideline between 30 and 300 CFU per plate, which is never practical in industrial applications, since it is rare that under normal circumstances lab personnel have any real idea of the degree of contamination a priori. Hence, there is always some inherent error of at least 1 log CFU/ml for all other routine methods included in this study. To validate the use of MIC compared to the standard techniques, pure culture was first used to prepare the standards of known cell densities. Many authors have performed the same validation procedure in search of a rapid, easy and accurate way to assess industrial viable cell counts and replace the current microbial analytical routines shown in Fig. (**1**).

To validate the MIC method against other standard protocols, an evaluation of different methods was conducted to contrast the performance of the pour plate technique to MPN, Petrifilm™ EC plate and MIC techniques. Other investigators have done similar evaluations to test newly-developed methodology [16, 23]. In Fig. (**1**), all regression lines showed slopes close to 1. The correlation coefficient between any of these methods ranging from 0.985 to 0.9902 suggested good agreement between the data and linear approximation from 0 to 6 log CFU/ml. Multiple analysis of variance showed that there were no differences between the methods at the 5% confidence level. However, the log CFU readings from the MIC technique were less reliable due to its higher lower bound limitation (2 log CFU/ml). At this low cell concentration, other techniques allowing more sample volume were more accurate. Only MPN returned slightly lower cell counts on average. Essentially all techniques resulted in practically the same readings providing the sample inoculums were prepared with proper dilution for colony evaluation. The short detection time, user-friendliness, and high throughput nature by MIC technique made this protocol practical for cell enumeration in food industry, especially with resource-poor settings. Our previous studies also demonstrated the versatility and practicality of the similar MIC format in enumerating other types of bacterial colonies (*i.e.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.) [24, 25]. Therefore, the miniaturized colony counting technique is certainly an economical and adequate replacement for the standard plating technique for industrial colony enumeration of *E. coli*.

3.2. Application of Cell Enumeration For Food Samples and Environmental Swabs

A statistical comparison of colony counts generated by the MIC and ISO-approved pour plate techniques was performed to compare the techniques in an industrial setting. The colony counts of the two *E. coli*/coliform enumeration strategies were the same as would be utilized by QC staffs and were applied to real samples, including samples of some ready-to-eat products (Table **2**) and swabs of food preparation environments from production lines (Table **3**) previously rejected using Petrifilm™ kits. The use of the pour plate technique was to confirm the results with the Petrifilm™ and validate the use of the MIC techniques to that ISO standard protocol. The resulting number of colony forming units (CFU) generated in each sample by the two methods were compared using *t*-tests. There were no statistical differences between the MIC and the pour plate technique. For most samples, the cell counts of MIC and pour plate results agreed. All colonies found were pink in color suggesting all contaminated samples were mostly contaminated by coliforms with a few possibilies of atypical *E. coli* strains [26].

Table 2. Cell count results by MIC and Pour plate techniques applying to 6 samples of actual frozen food products rejected by Petrifilm™ kits.

Sample	No.	Coliforms (log CFU/ml)	
		MIC	Pour plate
Papaya green salad	1	3.27^a±0.02	3.12^a±0.03
	2	2.55^a±0.02	2.18^a±0.07
	3	3.55^a±0.04	3.15^a±0.18
	4	3.47^a±0.07	3.35^a±0.06
	5	2.80^a±0.01	2.57^a±0.05
	6	3.69^a±0.04	3.52^a±0.07

(Table 2) contd.....

Sample	No.	Coliforms (log CFU/ml)	
		MIC	Pour plate
Fried rice	1	2.46[a]±0.02	2.44[a]±0.03
	2	2.66[a]±0.03	2.63[a]±0.03
	3	2.70[a]±0.07	2.63[a]±0.05
	4	2.37[a]±0.01	2.35[a]±0.10
	5	2.51[a]±0.10	2.49[a]±0.08
	6	2.83[a]±0.09	2.83[a]±0.07
Cake topping	1	2.52[a]±0.08	2.49[a]±0.13
	2	2.22[a]±0.02	2.19[a]±0.12
	3	2.32[a]±0.06	2.40[a]±0.05
	4	2.62[a]±0.10	2.67[a]±0.18
	5	2.82[a]±0.08	2.87[a]±0.14
	6	2.42[a]±0.04	2.53[a]±0.11

[a] values in each row determine significantly differences at P<0.05.

Table 3. Actual samples of preparative environmental swabs for *E. coli*/coliform enumeration determined by MIC and Pour plate techniques.

Sample	Coliforms (log CFU/ml)	
	MIC	Pour plate
Chopping board	3.77[a]±0.12	3.75[a]±0.14
Blender interior	3.84[a]±0.07	3.35[a]±0.10
Food cart	2.89[a]±0.10	2.54[a]±0.11
Screening sieve	3.91[a]±0.09	3.30[a]±0.11
Weighing scale	3.68[a]±0.08	3.41[a]±0.09
Groves of belt conveyor	3.45[a]±0.18	3.28[a]±0.16
Stainless steel bowl	ND	ND
Stainless steel table	ND	ND
Storage shelf	ND	ND
Conveyor surface	ND	ND

ND = no bacterial growth detected.

The proposed MIC technique facilitates routine measurement of processing and equipment cleanliness and accommodates frequent and large numbers of swab samples. The samples shown in Table **3** were a small fraction of the total number of samples actually tested. Most of the swab results were "not-detected" (ND) samples and only few samples were contaminated by coliforms. Generally the MIC technique produced higher CFU counts than did the pour plate technique Tables **2** and **3**. A practical cleanliness evaluation of a processing environment such as provided by the MIC technique, calls for fast and accurate estimation of *E.coli*/coliform numbers. The pour plate counterpart is slower and less efficient in evaluating production facility hygiene and often increased evaluation time can cause serious monetary loss to food manufacturers. In theory, the frequency of production line swabs must be adequate to ensure good hygienic practice. However, at the present most food factories avoid more frequent swab sampling merely because it increases the production cost.

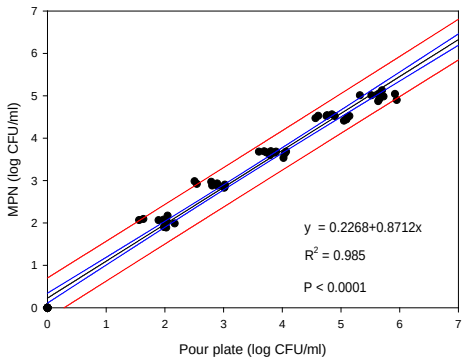
To decrease the cost associated with increased sampling frequency the cultivation time of *E. coli*/coliform was minimized to streamline the protocol and, hence, reduce the analytical cost. Also the feedback from industrial lab personnel trained to use the MIC was collected following their first experience using this technique. Table **4** provides an overview of how QC personnel from a local food factory perceived the MIC method compared with the pour plate technique. From all of the questions we asked, easy cleaning, less labor-intensity and rapid time to detection were among the highlighted perceived benefits of the MIC. It should be emphasized that the rapid detection significantly reduced the overall assay time compared to the conventional method. The high throughput provided quick screening of large industrial sample volumes and facilitated industrial batch release of product yielding negative contamination samples.

Table 4. Assessment of analytical methods between MIC and standard pour plate technique on hedonic scale from 1 to 9 points (dislike extremely to like extremely).

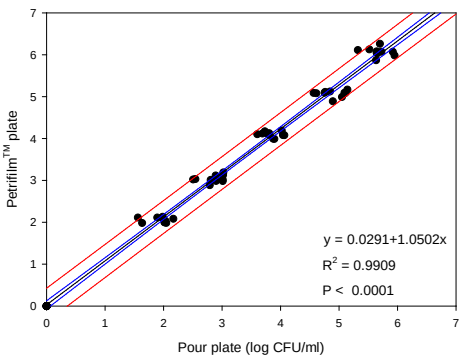
Factors influencing method adoption	Average score (total of 9 points)	
	MIC	Pour plate
- comfortable usage	8.8±0.4	6.0±0.6
- simple analytical method	7.9±0.7	6.5±0.7
- easy cleaning	8.7±0.4	7.0±0.6
- less labor-intensity	8.9±0.3	7.0±0.4
- high throughput	8.8±0.6	5.0±0.6
- time to detection	8.7±0.4	5.9±0.7
- effective use of utility	8.0±0.4	6.0±0.6
- total acceptance	8.9±0.3	6.0±0.6
Average score	**8.5±0.4**	**6.1±0.6**

Note: The average scores with standard deviation were calculated from the 10 QC staff members at Buono factory.

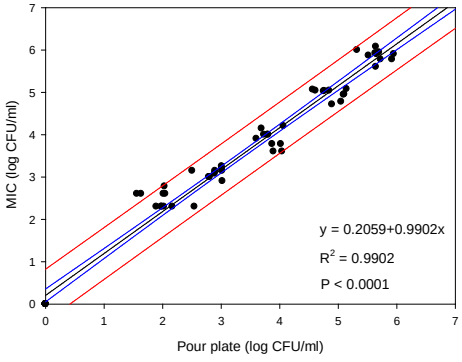
Although there is no significant statistical difference between the MIC technique and the standard pour plate technique in terms of detecting contamination, the authors feel there are several advantages to be gained from using the MIC technique. Monetary comparison of the consumption of all disposables, utilities and media by the MIC technique and pour plate method for *E.coli*/coliform detection in 36 food samples is presented in Table **5**. The total cost of supplies including preparation, media, disposable material, and utility was US$6.12 for the MIC method and US$36 for the pour plate technique. Total saving for material cost was US$29.88/36 samples or 83%.



(a) Pour plate and MPN



(b) Pour plate and Petrifilm™ plate



(c) Pour plate and MIC

Fig. (1). Scatter plots comparing different methods in counting colony to the ISO pour plate technique with 95% predictive (-) and confidence (-) interval using various concentrations of pure *E. coli* cultures at low (10^2 CFU/ml), mid (10^4 CFU/ml), and high (10^6 CFU/ml).

Table 5. Estimated analytical cost ($US) for *E. coli*/coliform detection of 36 food samples comparing between the MIC technique and pour plate method.

Factors influencing method adoption	Techniques	
	MIC	Pour plate
Total analytical cost (*e.g.*, preparation, media, disposable material, utility, *etc*.)	$6.12	$36
Cost saving	**$29.88**	

CONCLUSION

An alternative protocol (*i.e.*, MIC technique) was proposed and validated with the common industrial practices (MPN, pour plate, and Petrifilm™ EC protocols) to detect and enumerate *E. coli*/coliform contamination. The MIC enabled rapid and accurate readings of *E. coli*/coliform colonies to those of conventional methods tested using the pure cultures as well as food and environmental samples commonly found in resource-poor industrial settings. This new less costly technique will enable a producer to sample product more frequently without increasing the quality control budget. Together with the integration of already existing technology for handling liquid samples, like multichannel autopipettes and 96-well microtiter plates, the use of MIC technique not only helps reduce the expense of analytical cost and expensive CCA, but also it can shorten incubation time to 12-15 h when comparing with the conventional method and enable the analysis of high volume microbial enumeration samples. This MIC technique was well received by lab operators and technicians from a local medium-size food factory, especially in comparison with their past experiences using the pour plate routines. Hence, the MIC technique is a more practical protocol to enumerate the *E. coli* and coliforms counts for finished food samples and production lines samples in industrial settings. Moreover this method can be applied for detecting other foodborne pathogens from clinical samples.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by a Research Grant from Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant No. 114/2558) and a graduate scholarship from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0216/2552) to Wipavadee Sangadkit and Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat. We thank Professors Gustav A. Engbretson, Brenda G. Engbretson and Kenneth W. Foster for helpful discussion and critical reading of the manuscript. We also thank our industrial partnership with Buono (Thailand) Co., Ltd. who provided the food samples tested.

REFERENCES

[1] Oblinger, J.L.; Koburger, J.A. Understanding and teaching the most probable number technique. *J. Milk Food Technol.,* **1975**, *38*, 540-545.

[2] Oblinger, J.L.; Koburger, J.A. The Most Probable Number Technique. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*; 2nd ed.; American Public Health Association: USA. **1984**.

[3] Pavic, A.; Groves, P.J.; Bailey, G.; Cox, J.M. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. *J. Appl. Microbiol.,* **2010**, *109*(1), 25-34.
[PMID: 20059618]

[4] Suwansonthichai, S.; Rengpipat, S. Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp Penaeus monodon by conventional and rapid methods. *Int. J. Food Microbiol.,* **2003**, *81*(2), 113-121.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00190-3] [PMID: 12457585]

[5] Bredie, W.L.; de Boer, E. Evaluation of the MPN, Anderson–Baird– Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin. *J. Food Microbiol.,* **1992**, *161*, 197-208.
[http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(92)90080-M]

[6] Anderson, J.M.; Baird-Parker, A.C. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. *J. Appl. Bacteriol.,* **1975**, *39*(2), 111-117.
[http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1975.tb00551.x] [PMID: 1104553]

[7] Anonymous, *Microbiological Methods for the Dairy Industry*; Australian Standard 1095, Standard Association of Australia: Sydney, Australia, **1987**.

[8] Feng, P.C.; Hartman, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.,* **1982**, *43*(6),

1320-1329.
[PMID: 7049088]

[9] Firstenberg-Eden, R. Electrical Impedance Method for Determining Microbial Quality of Foods. In: *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*; Hobermehl, K.O., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, **1985**.
[http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-69943-6_83]

[10] Franco, W.; Hsu, W.Y.; Simonne, A.H. Survival of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in mexican red salsa in a food service setting. *J. Food Prot.,* **2010**, *73*(6), 1116-1120.
[PMID: 20537270]

[11] Fung, D.Y. Historical development of rapid methods and automation in microbiology. *J. Rapid. Meth. Aut. Mic.,* **1992**, *1*, 1-14.
[http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4581.1992.tb00066.x]

[12] Khueankhancharoen, J.; Thipayarat, A. Application of modified drop plate technique (MDPT) and logistic model to optimize non-selective substrates for *Salmonella typhi* resuscitation. *Asian. J. Food. Agro. Ind.,* **2011**, *4*(6), 349-358.

[13] Sangadkit, W.; Rattanabumrung, O.; Supanivatin, P.; Thipayarat, A. Practical coliforms and *Escherichia coli* detection and enumeration for industrial food samples using low – cost digital microscopy. *Procedia Eng.,* **2012**, *32*, 126-133.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1246]

[14] Supanivatin, P.; Khueankhancharoen, J.; Saeaung, W.; Boonyaprapasorn, A.; Thipayarat, A. Industrial Implementation of Fast Total Plate Count Analysis Applying Micro Inoculation Culture on Frozen Ready-to-eat Food Products In: *Proceeding of the International Conference for a Sustainable Greater*; Mekong Subregion: Bangkok, Thailand, **2010**.

[15] Kang, D.H.; Fung, D.Y. Development and evaluation of a 24 well microtitre plate method for isolation of *Listeria* spp. or *Listeria monocytogenes* from foods. *Lett. Appl. Microbiol.,* **1999**, *28*(4), 280-284.
[http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00532.x] [PMID: 10212440]

[16] Chenu, J.W.; Pavic, A.; Cox, J.M. A novel miniaturized most probable number method for the enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry-associated matrices. *J. Microbiol. Methods,* **2013**, *93*(1), 12-19.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.013] [PMID: 23384829]

[17] Kim, S.; Fung, D.Y. Modified microtiter count method for viable cell counts from pure cultures and food model samples. *Food Microbiol.,* **2005**, *22*, 595-599.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.11.011]

[18] Weagant, S.D.; Grant, M.A. *Bacteriological Analytical Mannual (BAM) Online: Chapter 4 Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria.* Available at: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm [2015, July 2].

[19] Coliforms and *Escherichia coli* Counts in Foods: Petrifilm™ *E.coli* / Coliform Count Plate Method. *AOAC Official Method 991.14,* **1991**.

[20] Andrews, W. *Manual of Food Quality Control*; Food and Agriculture Organizations of the United Nation: USA, **1992**.

[21] Hasan, A.; Belgin, S.; Serdar, C. Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. *Food Contr.,* **2004**, *15*(5), 379-384.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00101-4]

[22] Juyun, L.H. A review of methods and theory. *Food Qual. Prefer.,* **2011**, *22*, 733-747.

[23] Finney, M.; Smullen, J.; Foster, H.A.; Brokx, S.; Storey, D.M. Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *J. Microbiol. Methods,* **2003**, *54*(3), 353-358.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00068-X] [PMID: 12842481]

[24] Liamkaew, R.; Thipayarat, A.; Saranak, J. *Listeria* detection in microscale solid state inoculation with minimal selective agents. *Food Contr.,* **2014**, *43*, 183-192.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.007]

[25] Khueankhancharoen, J.; Thipayarat, A.; Saranak, J. Optimized microscale detection of amino acid decarboxylase for rapid screening of *Salmonella* in the selective enrichment step. *Food Contr.,* **2016**. (in press).

[26] Manafi, M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int. J. Food Microbiol.,* **2000**, *60*(2-3), 205-218.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00312-3] [PMID: 11016610]

© Sangadkit *et al.*; Licensee *Bentham Open.*

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International Public License (CC BY-NC 4.0) (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode), which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

Sangadkit, A, Deepatana, A. and Thipayarat, A., 2016, "Application of Practical Miniaturized Protocol to Facilitate Enumeration of *Escherichia coli* and Coliforms for Food Industry", The Open Conference Proceeding Journal, 2016, pp. 127 – 133.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป

มีการนำผลงานไปทดลองใช้จริงที่บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด เพื่อการทดสอบประสิทธิภาพของนวัตกรรมผลงานที่นำเสนออีกทั้งเป็นการช่วยควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้ายของโรงงานให้สอดคล้องกับมาตรฐานและความต้องการของลูกค้า รวมถึงยังนำเทคโนโลยีดังกล่าวไปใช้ทดสอบความสะอาดของวัสดุ อุปกรณ์เครื่องจักร ด้วยการ swab testing เพื่อเป็นการควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดีของโรงงาน เทคโนโลยีการวิเคราะห์ด้วย micro inoculation culture (MIC) ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โรงงานสามารถที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ช่วยเพิ่มความถี่ในการทำซ้ำ ทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ อีกทั้งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยเมื่อเทียบกับวิธีการในปัจจุบันที่โรงงานใช้อยู่ ส่งผลให้สามารถส่งสินค้าได้ทันกับความต้องการของลูกค้า ช่วยลดค่าใช้จ่ายของสินค้าคงคลัง

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

มีการแนะนำให้นักศึกษาในระดับปริญญาโทและปริญญาเอก นำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนหาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ เพื่อลดอุปกรณ์และขั้นตอนการวิเคราะห์ ทำให้นักศึกษามีความสะดวกในการใช้งาน สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ปริมาณ ให้ผลวิเคราะห์ภายในเวลาอันรวดเร็ว ช่วยทำให้งานวิจัยมีความก้าวหน้ามากขึ้น จนสามารถที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.อาณัติ ดีพัฒนา

ประวัติการศึกษา Ph.D. (Chemical Engineering), The University of Sydney, Australia
วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
169 ถ. ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

ประวัติการศึกษา Ph.D. (Chemical Engineering), Syracuse University
วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

หน่วยงานที่สังกัด สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา