บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องนึ่งอบฆ่าจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น SS 325 ของบริษัท TOMY Seiko Co.,Japan

1.2 เครื่องปั่นผสมอาหาร (Stomacher Lab-Blender 400) รุ่น BA 7021 ของบริษัท Seward.,UK

1.3 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Coliform Incubator Bath) รุ่น 368A ของบริษัท Precision Scientific., USA

1.4 เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA

1.5 ตู้บ่มจุลินทรีย์ (Incubator) รุ่น 800 ของบริษัท Memmert., Germany

1.6 เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น PG-5002 ของบริษัท Scientific Promotion Co., LTD. Switzerland

1.7 เครื่องนับโคโลนี (Colony Counter) รุ่น 3328 ของบริษัท Scientific Instrument., USA

1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น EB 3412 ของบริษัท Bausch & Lomb , Germany

2. เคมีภัณฑ์

2.1 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว Fluorocult^{R} LMX Broth ของบริษัท Merck , Germany

2.2 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแผ่นสำเร็จรูป Petrifilm™ *E. coli* Count Plates ของบริษัท 3 M , USA

2.3 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็ง Chromocult® Coliform Agar ของบริษัท Merck , Germany

2.4 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว Brilliant green bile lactose broth ของบริษัท Merck , Germany

2.5 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว Lauryl tryptose broth ของบริษัท Oxoid , England

2.6 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว EC broth ของบริษัท Merck , Germany

2.7 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว Tryptic soy broth ของบริษัท Merck , Germany

2.8 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว MR-VP broth ของบริษัท Merck , Germany

2.9 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลว Tryptone ของบริษัท Difco , USA

2.10 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็ง Nutrient Agar ของบริษัท Oxoid , England

2.11 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์วุ้นมาตรฐาน (Standard methods agar) ของบริษัท BBL , USA

2.12 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็ง EMB agar ของบริษัท Merck , Germany

2.13 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็ง Simmons citrate agar ของบริษัท BBL , USA

2.14 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck , Germany

2.15 สารละลาย Kovacs'

2.16 สีเมธิลเรด ของบริษัท Merck , Germany

2.17 แอลฟาแนพธอล ($C_{10}H_8O$) ของบริษัท Fluka , Switzerland

2.18 โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ของบริษัท Merck , Germany

3.จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาและการเก็บรักษา

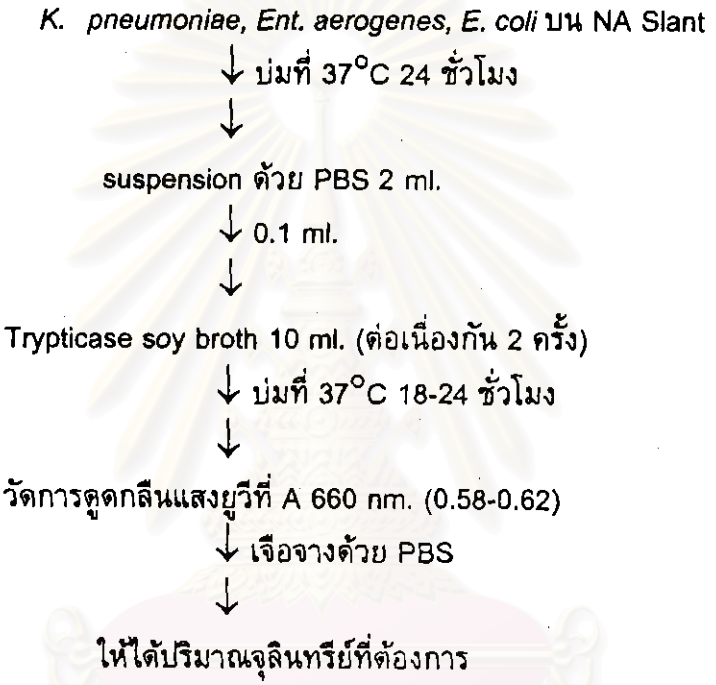
3.1 Coliforms ได้จากกองพยาธิ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter aerogenes* โดยเลี้ยงบน Nutrient agar (NA) slant (ภาคผนวก ก ข้อ 11) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 2-5 °C โดยทำการถ่ายเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุกเดือน

3.2 *Escherichia coli* จำนวน 2 สายพันธุ์ได้จากกองอาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารส่งออก และ *E. coli* ATCC 25922 โดยนำมาเพาะเลี้ยงบน Nutrient agar (NA) slant (ภาคผนวก ก ข้อ 11) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 2-5 °C โดยทำการถ่ายเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุกเดือน

4. การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง (รูปที่ 4)

4.1 Coliforms และ *E. coli*

ถ่ายจุลินทรีย์ที่เก็บสต็อกไว้ลงบน NA slant ซึ่งมีพื้นที่ผิวหน้าเท่ากันทุกหลอดโดยเกลี่ยจุลินทรีย์ให้ทั่วผิวหน้า บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง ทำสารแขวนลอยโดยใช้ phosphate buffer (ภาคผนวก ก ข้อ15) ที่ปราศจากจุลินทรีย์แล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้จุลินทรีย์กระจายอยู่ใน phosphate buffer จากนั้นใช้ปิเปตดูดจุลินทรีย์ครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Trypticase soy broth (TSB) (ภาคผนวก ก ข้อ 7) 10 มิลลิลิตร ต่อเนื่องกัน 2ครั้ง แต่ละครั้งบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงยูวีด้วย



รูปที่ 4 แผนภูมิการเตรียมจุลินทรีย์เพื่อปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

หมายเหตุ PBS = Phosphate Buffered Dilution Water

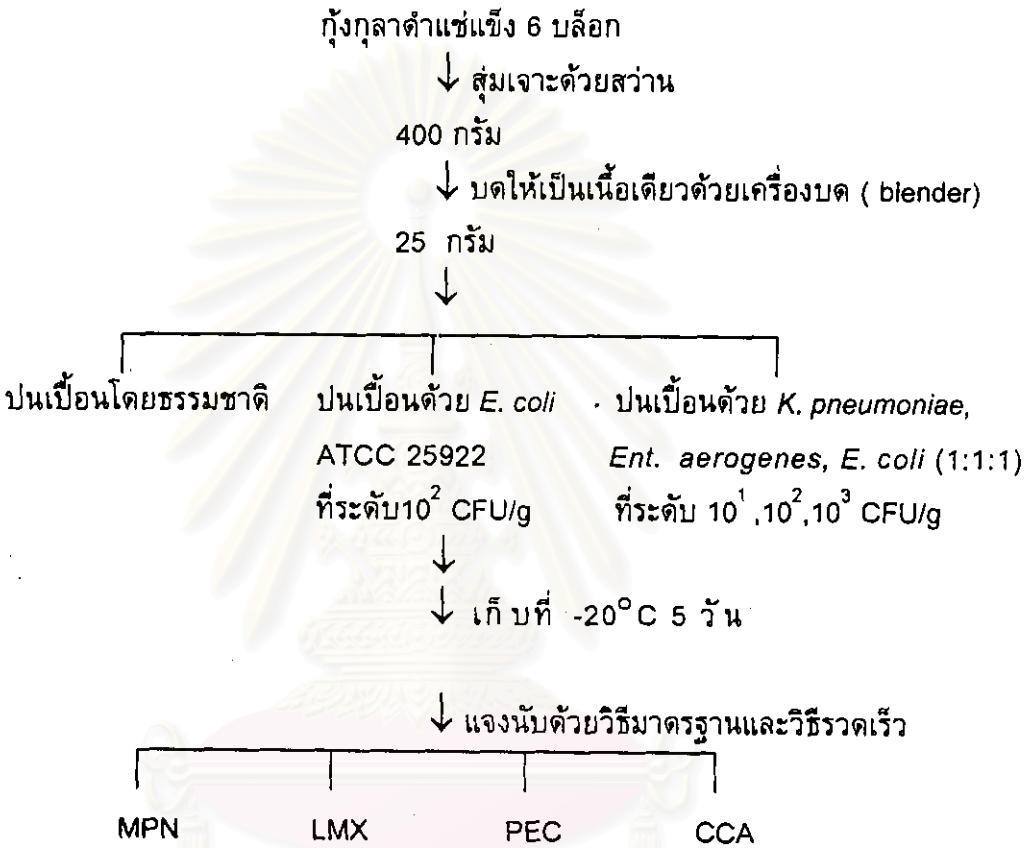
UV-Visible Spectrophotometer ปรับให้มีค่าดูดกลืนแสงระหว่าง 0.58 - 0.62 ที่ 660 nm ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution plate count โดยใช้ Trypticase soy agar (TSA) (ภาคผนวก ก ข้อ 8) เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำจุลินทรีย์ในหลอด TSB มาเจือจางด้วย phosphate buffer ให้ได้ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตรตามความต้องการ เพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์ที่จะเติมในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

5. การเก็บและเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็ง (รูปที่ 5)

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ใช้ในการศึกษา 192 ตัวอย่าง สุ่มจากตัวอย่างกุ้งแช่แข็งส่งออก มีน้ำหนัก 1-2 กิโลกรัมต่อบล็อก จำนวน 6 บล็อก ต่อ 1 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จาก กองอาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็งวางลงบนแท่นสแตนเลสสำหรับเจาะตัวอย่างอาหารที่ปราศจากจุลินทรีย์ ใช้สว่านซึ่งใบสว่านปราศจากจุลินทรีย์ เสียบผ่านกรวยโลหะที่ปราศจากจุลินทรีย์แล้ว กดปลายกรวยพร้อมสว่านลงบนบล็อกกุ้งกุลาดำแช่แข็ง (รูปที่ 6A) กุ้งกุลาดำแช่แข็งจะหลุดออกจากบล็อก ขึ้นมารวมอยู่ในกรวย (รูปที่ 6B) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆใส่รวมไว้ในขวดปราศจากจุลินทรีย์ ประมาณ 400 กรัม นำไปบดด้วย blender เพื่อให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งตัวอย่างมาชั่ง 25 กรัมใส่ในถุง Stomacher ที่ปราศจากจุลินทรีย์ ตามจำนวนตัวอย่างที่ทำในแต่ละครั้ง จากนั้นเติม *Kleb. pneumoniae* , *Ent. aerogenes* และ *E. coli* (จากข้อ 4.1) ซึ่งมีจุลินทรีย์ประมาณ $5x10^2$, $5x10^3$, $5x10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร เพื่อให้ส่วนผสมกุ้งกุลาดำในแต่ละถุงมี Coliforms และ *E. coli* ปนเปื้อนในระดับประมาณ 10^1 , 10^2 , 10^3 CFU/g โดยใช้ปิเปตดูดจุลินทรีย์ ที่เจือจางไว้ปริมาณชนิดละ 0.3 มิลลิลิตรเท่ากัน คือผสมด้วยสัดส่วน 1:1:1 ของ *Kleb. pneumoniae* : *Ent. aerogenes* : *E. coli* ใส่ในแต่ละถุง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 5 วัน เพื่อ stabilized cell หรือเพื่อให้เซลล์มี equilibrium เท่าๆกัน (Curiale, et al. 1991) แล้วจึงนำมาแจงนับต่อไป

การเลือกระดับการปนเปื้อน Coliforms และ *E. coli* ในระดับต่ำสุดที่ประมาณ 10^1 CFU/g เนื่องจากวิธีรวดเร็วที่นำมาเลือกใช้ในการแจงนับครั้งนี้คือ Petrifilm™ *E. coli* count plates(PEC) และ Chromocult® coliform agar (CCA) นั้นค่าต่ำสุดที่จะสามารถแจงนับได้คือ 10^1 CFU/g ขณะที่ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่เลือกใช้คือ 10^3 CFU/g เนื่องจากกฎระเบียบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่จะไม่ออกหนังสือรับรองคุณภาพ (Health Certificate) ในกรณีที่ตัวอย่างอาหารนั้นมีการปนเปื้อน Coliforms เกินกว่า 10^3 CFU/g



รูปที่ 5 แผนภูมิการเก็บและการเตรียมกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

<u>หมายเหตุ</u> MPN = Most Probable Number (Conventional Method)

LMX = Fluorocult® LMX Broth (Rapid Method)

PEC = Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (Rapid Method)

CCA = Chromocult® Coliforms Agar (Rapid Method)

(A)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 การสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็ง
(A)การกดปลายกรวยพร้อมสว่านลงบนกุ้งกุลาดำแช่แข็ง
(B) การนำกุ้งกุลาดำแช่แข็งออกจากปลายกรวย

(B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 การสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็ง
(A)การกดปลายกรวยพร้อมสว่านลงบนกุ้งกุลาดำแช่แข็ง
(B) การนำกุ้งกุลาดำแช่แข็งออกจากปลายกรวย

6.การแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli*

6.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter aerogenes* และ *Escherichia coli* โดยเตรียมจุลินทรีย์ตามรายละเอียดในข้อ 4.1

6.2 การเก็บและเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็ง ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5 ทำการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีมาตรฐาน วิธี Fluorocult^{R} LMX Broth (LMX) วิธี Petrifilm^{TM} *E. coli* Count Plates (PEC) วิธี Chromocult^{R} Coliform Agar (CCA) โดยแบ่งตัวอย่างกุ้งแช่แข็งเป็นส่วนๆ ดังนี้

ส่วนที่ 1 ไม่เติม Coliforms และ *E. coli* (Natural contamination)

ส่วนที่ 2 เติม *E. coli* ATCC 25922 ในปริมาณประมาณ 10^2 เซลล์ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม (สำหรับทดสอบยืนยันผลบวกจริง , positive control)

ส่วนที่ 3 เติม Coliforms และ *E. coli* ในปริมาณประมาณ 10^1 เซลล์ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม

ส่วนที่ 4 เติม Coliforms และ *E. coli* ในปริมาณประมาณ 10^2 เซลล์ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม

ส่วนที่ 5 เติม Coliforms และ *E. coli* ในปริมาณประมาณ 10^3 เซลล์ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม

6.3 การแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีต่างๆ

6.3.1 การแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีมาตรฐาน (MPN) (รูปที่ 7)

6.3.1.1 นำกุ้งกุลาดำแช่แข็งแต่ละส่วนจากข้อ 6.2 โดยนำตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่แข็งมาตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติม phosphate buffer ที่ปราศจากจุลินทรีย์แล้ว 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) ด้วยเครื่อง

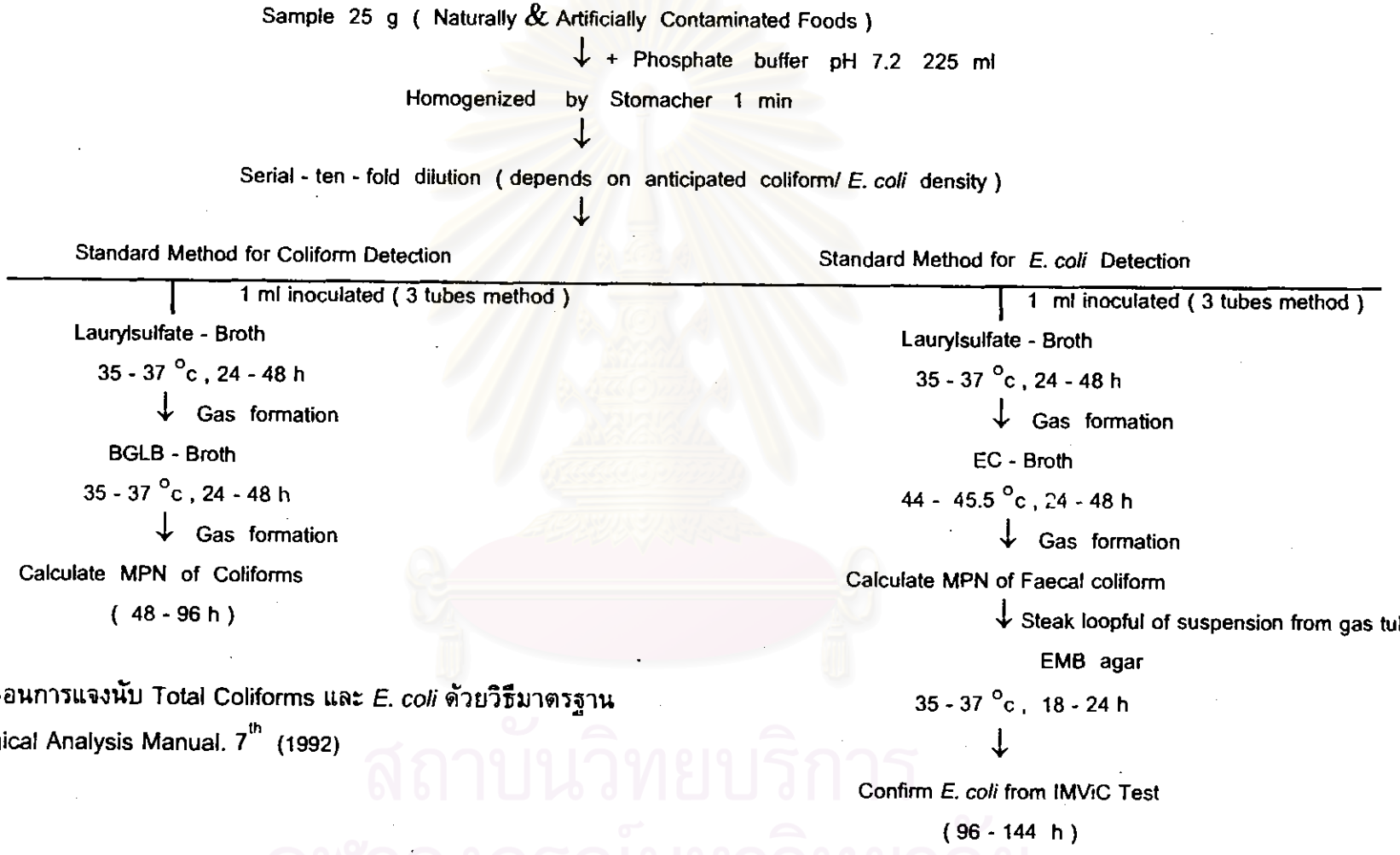
Stomacher 1-2 นาที จากนั้นทำให้เจือจางในระดับ 1:10 1:100 1:1000 หรือจนถึงระดับที่สามารถแจงนับได้(serial ten fold dilution)

6.3.1.2 ถ่ายตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 6.3.1.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Lauryl sulfate tryptose broth (LST) (ภาคผนวก ก ข้อ5) โดยแต่ละความเจือจางใช้ 3 หลอดๆละ 1มิลลิลิตร แปรผัน 3 ความเจือจางต่อเนื่องกันเป็นอย่างน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลบวกของการทดสอบคือจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในอาหาร LST เกิดเป็น กรดและแก๊ส แก๊สที่เกิดขึ้นจะสังเกตเห็นได้เพราะจะถูกดักอยู่ใน Durham tube

6.3.1.3 ถ่ายจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกจากข้อ 6.3.1.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง Coliforms จะสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในอาหาร BGLB เกิดเป็น กรดและแก๊ส แก๊สที่เกิดขึ้นจะสังเกตเห็นได้เพราะจะถูกดักอยู่ใน Durham tube นำจำนวนหลอดที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกไปเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ข ตารางที่ 1) จะได้จำนวนเซลล์ Coliforms ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม

6.3.1.4 ถ่ายจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกจากข้อ 6.3.1.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ EC broth บ่มที่อุณหภูมิ 44.5°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง Coliforms ที่พบเฉพาะในอุจจาระ (Faecal Coliforms) จะสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในอาหาร EC เกิดเป็น กรดและแก๊ส แก๊สที่เกิดขึ้นจะสังเกตเห็นได้เพราะจะถูกดักอยู่ใน Durham tube นำจำนวนหลอดที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกไปเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ข ตารางที่1) จะได้จำนวนเซลล์ Faecal Coliforms ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม

6.3.1.5 นำหลอดอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ EC broth ที่ให้ผลบวกในข้อ 6.3.1.4 มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็ง EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเป็น *E. coli* ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏให้เห็นจะเป็นสีม่วงเข้ม อาจจะสะท้อนแสงคล้ายโลหะหรือไม่ก็ได้ (metallic sheen) หลังจากนั้นนำโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีคือทดสอบปฏิกิริยา IMViC (ภาคผนวก ข ตารางที่2) เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าเป็น *E. coli* ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN จะได้ค่าจำนวนเซลล์ *E. coli* ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม (FDA, 1992)



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีมาตรฐาน
ที่มา : Bacteriological Analysis Manual. 7th (1992)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.3.2 การแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย วิธี Fluorocult® LMX Broth (LMX) (รูปที่ 8)

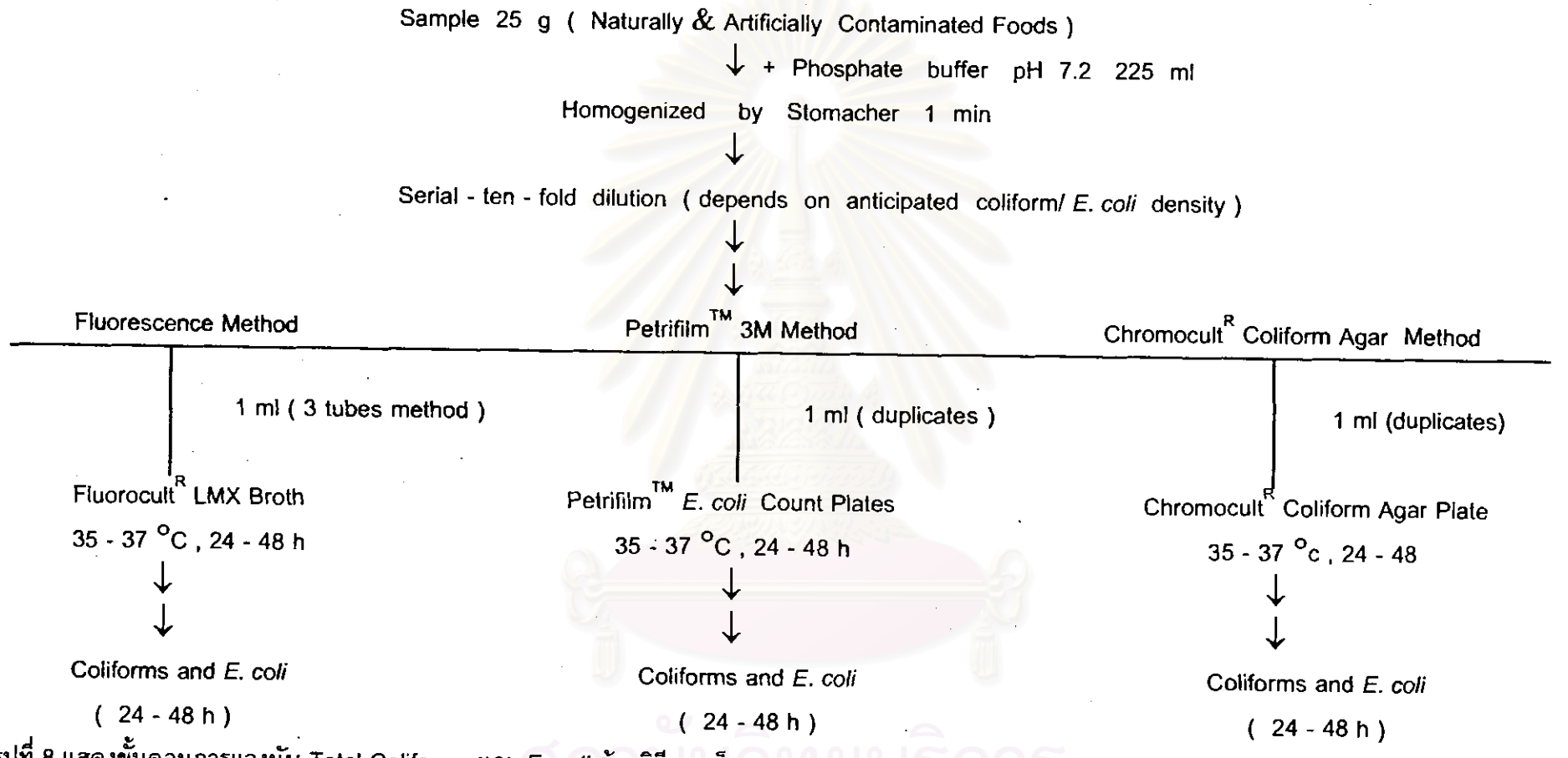
6.3.2.1 เตรียมและทำการเจือจางกุ้งกุลาดำแช่แข็งโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 6.3.1.1

6.3.2.2 ถ่ายตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 6.3.2.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Fluorocult® LMX Broth (LMX) โดยแต่ละความเจือจางใช้ 3 หลอดๆละ 1มิลลิลิตร แปรผัน 3 ความเจือจางต่อเนื่องกันเป็นอย่างน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลบวกของการทดสอบคือ Coliforms และ *E. coli* จะสร้าง β-D-galactosidase ได้ในภาวะที่มี 1- Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นสารเหนี่ยวนำ โดย β-D-galactosidase ที่สร้างขึ้นจะย่อย X-GAL ทำให้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอมฟ้าของ Bromchloroindigo ซึ่งแสดงให้ทราบว่าในตัวอย่างมี Coliforms หรือ *E. coli* ในขณะเดียวกันแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ยังคงเจริญต่อไป *E. coli* สามารถสังเคราะห์ β-D-glucuronidase ที่สามารถย่อยสลาย 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) ให้ได้สารเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (รูปที่ 9)

6.3.2.3 เติมสารละลาย kovacs' 2-3 หยด ลงในหลอดสีเขียวอมฟ้าที่เรืองแสงนี้ ซึ่ง *E. coli* จะสามารถย่อยสลาย tryptophan ในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ได้เป็น Indole โดยเมื่อ Indole นี้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย kovacs' จะได้สีชมพูแดงบนผิวหลอดอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แสดงว่ามี *E. coli* เจริญอยู่ (รูปที่ 10)

6.3.2.4 นำจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ให้สีเขียวอมฟ้า ไปเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ข ตารางที่1) จะได้จำนวนเซลล์ Coliforms ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม

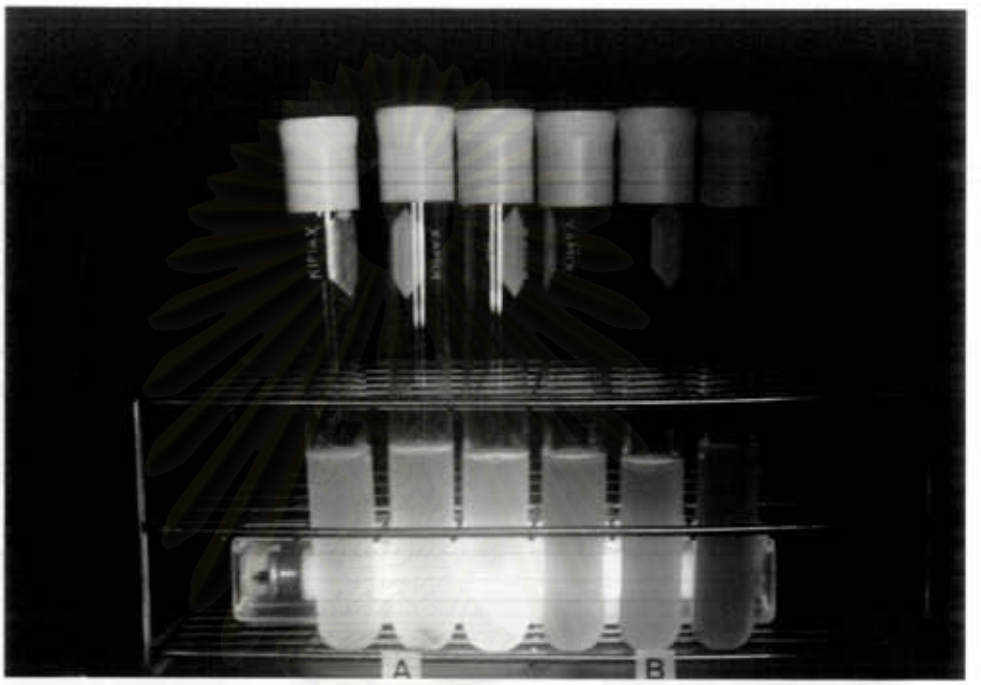
6.3.2.5 นำจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ให้สีเขียวอมฟ้า เรืองแสง สีชมพูบนผิวอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ไปเทียบกับตารางMPN (ภาคผนวก ข ตารางที่1) จะได้จำนวนเซลล์ *E. coli* ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม



รูปที่ 8 แสดงขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีรวดเร็ว

ที่มา : ดัดแปลงมาจากข้อมูลคู่มือการทดสอบจากบริษัท เมอร์ค จำกัด และ บริษัท 3M จำกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

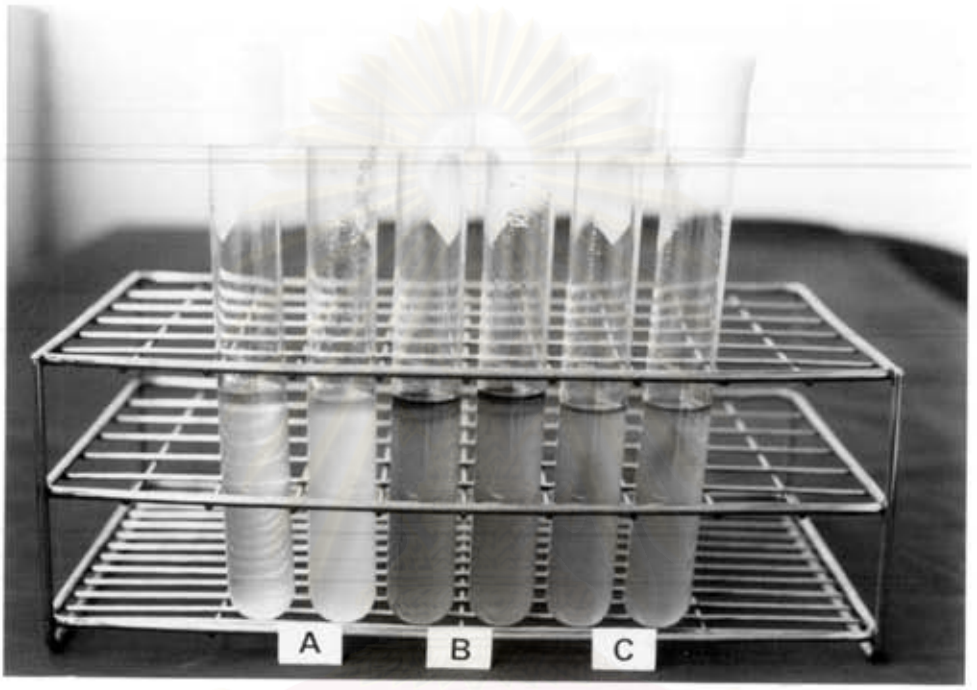


(A) (B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 การเรืองแสงของ *E. coli* ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

(A) *E. coli* (B) Coliforms



(A) (B) (C)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ผลบวกของการทดสอบอินโดลบวกของ *E. coli* ใน Fluorocult® LMX Broth

(A) Non Coliforms (B) *E. coli* (C) Coliforms

6.3.2.6 นำหลอดที่ให้ผลการทดสอบ *E. coli* เป็นบวกมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี คือทดสอบปฏิกิริยา IMViC (ภาคผนวก ข ตารางที่2) เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าเป็น *E. coli* ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ข ตารางที่1) จะได้ค่าจำนวนเซลล์ *E. coli* ต่อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 กรัม (FDA, 1992)

6.3.3 การแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธี Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (PEC) (รูปที่ 8)

6.3.3.1 เตรียมและทำการเจือจางกุ้งกุลาดำแช่แข็งโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 6.3.1.1

6.3.3.2 วางแผ่น Petrifilm™ *E. coli* count plates (PEC) (รูปที่ 11A) ซึ่งประกอบด้วยแผ่นฟิล์มรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 ซม^2 สองแผ่นประกบกัน แผ่นล่างมีอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ violet red bile (VRB) ดรึงอยู่ทำหน้าที่เสมือนจานเพาะจุลินทรีย์ที่มีอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์บรรจุอยู่ แผ่นบนทำหน้าที่เสมือนฝาปิดซึ่งมี guar gum cold water gelling agent และสี Tetrazolium indicator dye เคลือบอยู่บนที่ราบแล้วเปิดฟิล์มด้านฝาขึ้นแล้วปิเปดตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 6.3.3.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (รูปที่ 11B) แล้วปิดแผ่นฟิล์มลงทับตัวอย่างนั้น โดยแต่ละความเจือจางใช้ 2 แผ่น (duplicates) (รูปที่ 11C)

6.3.3.3 ใช้ประกับพลาสติกที่มีส่วนเว้ารูปวงกลมกดทับลงบน Petrifilm™ ด้านบนเบาๆเพื่อกระจายตัวอย่างให้ทั่วพื้นผิวอาหาร โดยไม่ให้ตัวอย่างแผ่ลันขอบอาหารออกไป (รูปที่ 11D) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลบวกของการทดสอบคือ Coliforms จะสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส เกิดเป็นกรดและแก๊ส แก๊สที่เกิดขึ้นจะถูกดักไว้ในฟิล์มรอบๆ โคโลนี ซึ่งมีสีแดงของสี Tetrazolium ทำให้สามารถแยก Coliforms ออกจากแบคทีเรียแรมลบชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ภายในฟิล์มยังมี 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG) เป็นองค์ประกอบทำให้สามารถจำแนก Coliforms ออกจาก *E. coli* ทั้งนี้เพราะ *E. coli* จะสร้าง glucuronidase ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยสลาย BCIG ทำให้เกิดตะกอนสีฟ้ารอบๆ โคโลนี ทำให้โคโลนีของ *E. coli* มีสีน้ำเงิน (รูปที่ 11E)

6.3.3.4 บันทึกจำนวนโคโลนีมีแก๊สสีแดงของ Coliforms และโคโลนีมีแก๊สสีน้ำเงินของ *E. coli* ในบริเวณพื้นที่ของแผ่น Petrifilm™ (20 ซม^2) โดยใช้เครื่องนับโคโลนี ควรนับฟิล์มที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 15-150 โคโลนี

6.3.3.5 ทำการตรวจสอบยืนยันผลบากที่ได้อีกครั้ง โดยเปิดแผ่นฟิล์มด้านฝาขึ้น ใช้ลูปหรือเข็มเขี่ยจุลินทรีย์เลือกโคโลนีที่อยู่ในเจล ไปทดสอบโดยเลือก 2-3 โคโลนีต่อ 1 แผ่นฟิล์ม (รูปที่ 11F)โดย Streak ลงบน EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC Test)

6.3.4 การแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย วิธี Chromocult® Coliform Agar (CCA) (รูปที่ 8)

6.3.4.1 เตรียมและทำการเจือจางกุ้งกุลาดำแช่แข็งโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 6.3.1.1

6.3.4.2 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 6.3.2.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Chromocult® Coliform Agar (CCA) โดยแต่ละความเจือจางใช้ 2 plates (duplicates) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลบวกของการทดสอบคือ Coliforms ซึ่งสามารถสร้าง β-D-galactosidase จะย่อยสลายซับสเตรท Salmon-GAL ได้สารสีส้มแกมแดง ส่วน *E. coli* สามารถสร้าง β-D-glucuronidase จะย่อยสลายซับสเตรท X-glucuronide จะได้สารสีน้ำเงินม่วง (รูปที่ 12)

6.3.4.3 บันทึกจำนวนโคโลนีสีแดงของ Coliforms และโคโลนีสีน้ำเงินม่วงของ *E. coli* โดยใช้เครื่องนับโคโลนี ควรนับโคโลนีระหว่าง 15-150 โคโลนี

6.3.4.4 ทำการตรวจสอบยืนยันผลบวกที่ได้อีกครั้ง ใช้ลูปเขี่ยจุลินทรีย์เพื่อเลือกโคโลนีในจานเพาะจุลินทรีย์ไปทดสอบโดยเลือก 2-3 โคโลนีต่อ 1 จานเพาะจุลินทรีย์ โดย Streak ลงบน EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC Test)

(A)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (A) แผ่น Petrifilm™ *E. coli* Count Plates

(B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (B) ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงบน Petrifilm™ *E. coli* Count Plates

(C)

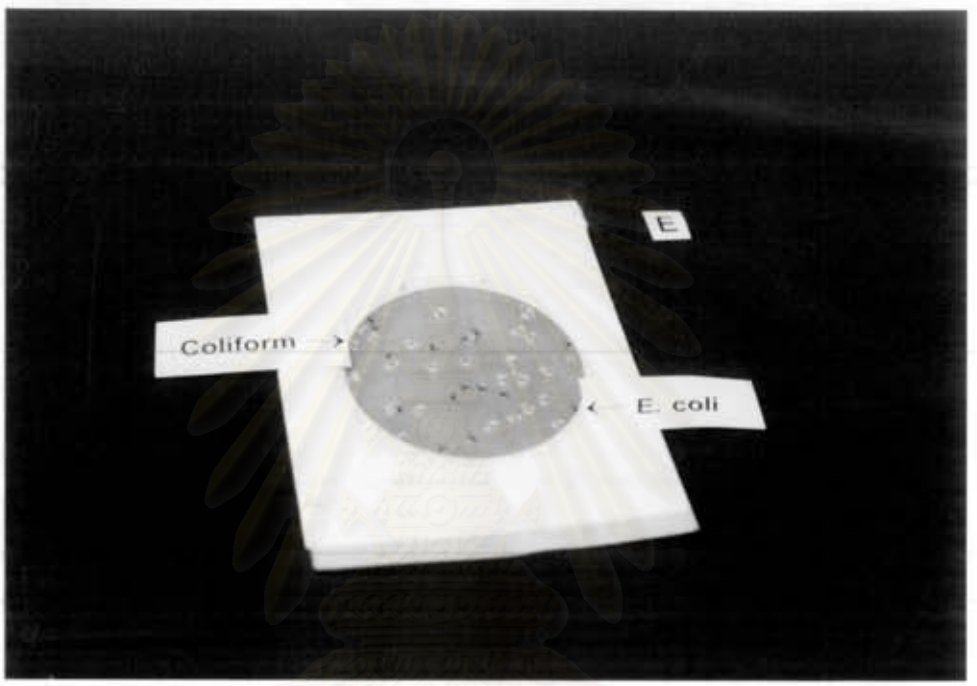
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (C) ค่อยๆปิดแผ่น Petrifilm™ *E. coli* Count Plates ทับตัวอย่าง

(D)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

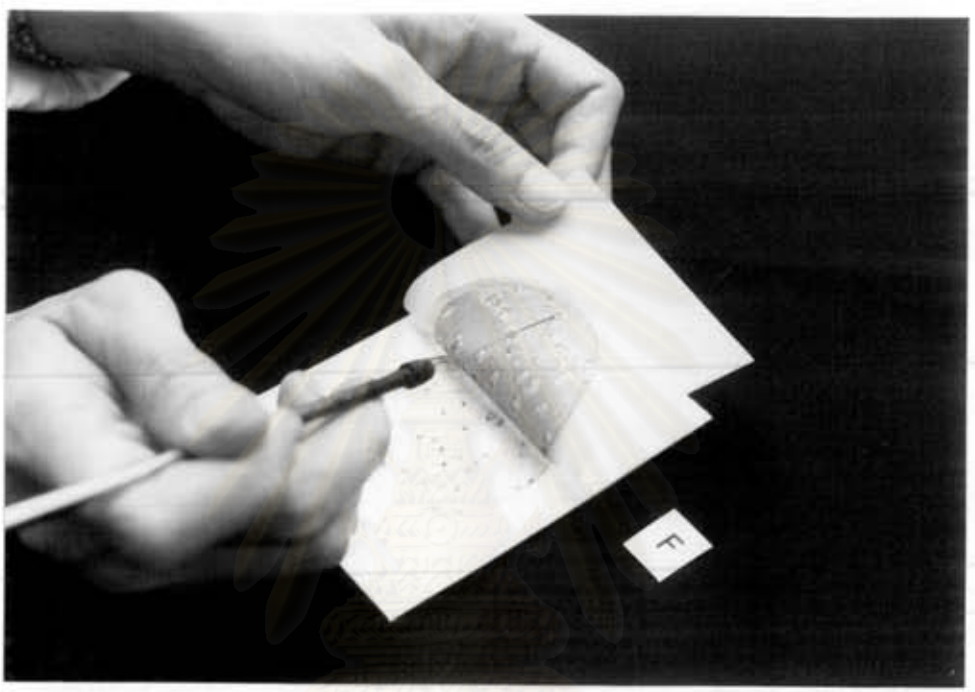
รูปที่ 11 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (D) กดทับแผ่น Petrifilm™ *E. coli* Count Plates ด้วยประกับพลาสติก



(E)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

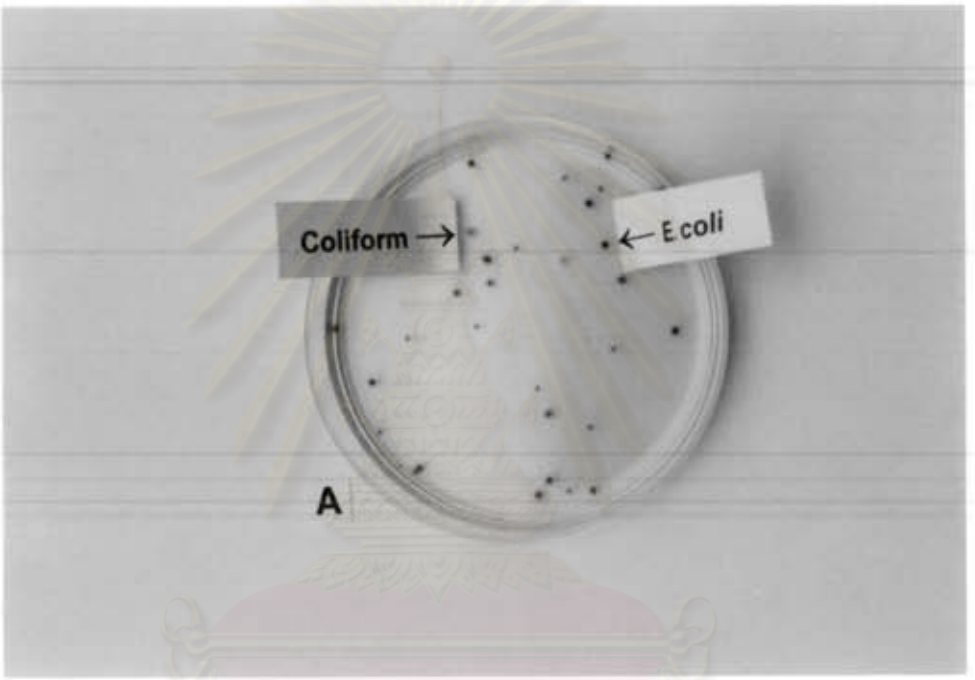
รูปที่ 11 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (E) ลักษณะโคโลนีของ Coliform และ *E. coli* บนแผ่น Petrifilm™



(F)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ขั้นตอนการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ด้วย Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (F) การเลือกโคโลนีของ Coliform และ *E. coli* บนแผ่น Petrifilm™ เพื่อทดสอบทางชีวเคมี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 ลักษณะโคโลนีของ Coliforms และ *E. coli* ใน Chromocult® Coliform Agar

7. เปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

7.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติด้านความไว (Sensitivity)

ความไวของการทดสอบ หมายถึง ร้อยละของความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเท่ากับ 100-เปอร์เซนต์ผลการทดสอบที่ให้ผลลบเท็จ (100 - % false negative) (Feldsine, et al. 1997)

7.2 เปรียบเทียบความจำเพาะของการทดสอบ (Specificity)

ความจำเพาะของการทดสอบหมายถึง ร้อยละของความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเท่ากับ 100-เปอร์เซนต์ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกเท็จ (100 - % false positive) (Feldsine, et al. 1997)

7.3เปรียบเทียบความสอดคล้องของการทดสอบระหว่างวิธีรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน (% Agreement) โดยเป็นการแสดงถึงความถูกต้อง (accuracy) หรือประสิทธิภาพของการทดสอบอย่างหนึ่งเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับสากล (สมพงษ์ จินายน, 2541)

ความสอดคล้องของการทดสอบระหว่างวิธีรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน หมายถึง ร้อยละของอัตราส่วนระหว่างความสามารถในการตรวจตัวอย่างของทั้ง 2 วิธีเปรียบเทียบกัน (Keith, 1997; Bolderdijk and Milas, 1996)

8. เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน Coliforms และ *E. coli* ระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

8.1การทดสอบยืนยัน Coliforms โดยนำหลอดทดลองหรือโคโลนีที่ให้ผลทดสอบ Coliforms เป็นบวกมาถ่ายใส่อาหารเหลวบริลเลียนกรีนไบรแลคโตส (Brilliant Green Bile Lactose Broth) เพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (Nelson, Fox and Busta, 1984)

8.2 การทดสอบยืนยัน *E. coli* โดยนำหลอดทดลองหรือโคโลนีที่ให้ผลทดสอบ *E. coli* เป็นบวกมาทำการทดสอบทางชีวเคมี (IMViC test) (BAM, 1992) ดังภาคผนวก ข ตารางที่ 2

9. เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง 1 ตัวอย่าง

ในการคำนวณค่าใช้จ่ายดัดแปลงจาก Chain and Fung, 1991โดยพิจารณาจาก 3 ปัจจัย ได้แก่

9.1 อุปกรณ์เครื่องแก้วและเบ็ดเตล็ด

9.2 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

9.3 แรงงาน (ภาคผนวก ง)

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูล นำผลจากวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1990)

11.สถานที่ทำการทดลอง

กองอาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยศเส กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย