

การดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์
กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

THE MODIFICATION OF COLIFORMS ANALYTICAL METHODS
FOR FROZEN COOKED SHRIMP

อภิชนัทพร ศรีอ่อนนวด
APINPORN SRIONNUAL

วิทยานิพนธ์เสนอเป็นผลงานหนึ่งของภาควิชาคณาจารย์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขอนามัยอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2003-AI-M-054-164

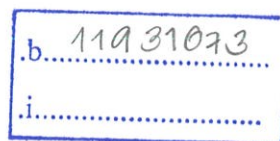
การดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์
กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

THE MODIFICATION OF COLIFORMS ANALYTICAL METHODS
FOR FROZEN COOKED SHRIMP



อภิณหพร ศรีอ่อนนวล
APINPORN SRIONNUAL

จพ.
ค 2537
2551
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 81381
วัน,เดือน,ปี..... 11 ส.ย. 2551



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2551

KMITL-2008-AI-M-054-164

**THE MODIFICATION OF COLIFORMS ANALYTICAL METHODS
FOR FROZEN COOKED SHRIMP**

APINPORN SRIONNUAL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN SANITATION
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2008

KMITL-2008-AI-M-054-164

COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KINGMONGKUT' S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแปลงวิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง
นักศึกษา	นางสาวอภิญห์พร ศรีอ่อนนวล
รหัสประจำตัว	48068760
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงานในปี 2549 ในตัวอย่างทั้งหมด 267 ตัวอย่าง พบเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างคิดเป็น 40.1 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างที่พบเชื้อโคลิฟอร์ม พบว่ามีจำนวนระหว่าง 3.0 MPN/กรัม ถึง > 1100 MPN/กรัม โดยมีจำนวนระหว่าง 3.0 - 38 MPN/กรัม มากที่สุด สายพันธุ์ที่พบคือ *Escherichia coli* และ *Enterobacter cloacae* และเมื่อทำการเปรียบเทียบการพบเชื้อโคลิฟอร์ม จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นกับวิธี MPN Method พบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN Method ตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นตรวจพบ 26.7 - 41.3 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่พบโคลิฟอร์ม หากพบในปริมาณ 93 MPN/กรัม ขึ้นไป จึงจะพบเชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นได้ทั้งหมด

เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการที่คัดแปลงขึ้น 4 วิธีคือ วิธีคัดแปลงที่ 1 ใช้ 0.1 % Peptone ร่วมกับ 0.85 % NaCl เป็น diluent แล้ว pour plate อาหารเลี้ยงเชื้อ Desoxycholate Lactose agar (DCLA) ซึ่งเป็นอาหารแข็งสำหรับวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์ม ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วทันที วิธีคัดแปลงที่ 2 ใช้ 0.1 % Peptone ร่วมกับ 0.85 % NaCl เป็น diluent ตามด้วยการ pour plate DCLA ที่เติม 1% Sodium pyruvate วิธีคัดแปลงที่ 3 ใช้ Butterfield's phosphate buffer dilution water เป็น diluent และ pour plate ด้วย Tryptic soy agar (TSA) บ่มจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ก่อนเททับ ด้วย DCLA วิธีคัดแปลงที่ 4 ใช้ 0.1 % Peptone ร่วมกับ 0.85 % NaCl เป็น diluent และ pour plate ด้วย TSA บ่มจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ก่อนเททับด้วย DCLA เทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นซึ่งใช้ Butterfield's phosphate buffer dilution water เป็น diluent และ pour plate ด้วย DCLA โดยตรงลงในตัวอย่างกุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่มีการทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *E.coli* และ *Ent. cloacae* คือมีตัวอย่างควบคุม ที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ และที่มีการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองเชื้อละ 2 ระดับคือ ระดับต่ำที่ 2 Log_{10} CFU/กรัม และ ระดับสูงที่ 4 Log_{10}

CFU/กรัม พบว่าทุกชุดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และ *Ent. cloacae* วิธีดัดแปลงที่ 4 ให้ผลดี ที่สุดคือ และลักษณะโคโลนิขนาดใหญ่มาก ชัดเจน และมีแนวโน้มของจำนวนเชื้อโคลิฟอร์มมากกว่า วิธีดัดแปลงที่ 3 เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงที่ 4 เทียบกับ วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น โดยใช้ตัวอย่างกึ่งปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่พบที่มีการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มใน ตัวอย่าง พบว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างในการตรวจหาโคลิฟอร์มในตัวอย่างดังกล่าว อย่างมี นัยสำคัญ ($P > 0.05$)

เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกที่ทำการเติมเชื้อ *E. coli* ที่ 4 Log_{10} CFU/กรัม ใน สภาวะแช่แข็งในที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส โดยเก็บเป็นเวลา 7 14 21 28 35 42 50 วัน โดย เมื่อเก็บไว้ตั้งแต่ 7-14 วันพบว่าเชื้อโคลิฟอร์ม มีการลดลงเล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โดย วิธีดัดแปลงที่ 4 พบว่าปริมาณเชื้อจะมีอัตราการลดลงอย่างชัดเจนและมีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นเวลา 21 วัน และในวันที่ 35 การวิเคราะห์ โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น พบว่าเชื้อ *E. coli* ลดลงจากช่วงก่อนการแช่แข็ง 1.23 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายมากถึง 29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการวิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลง พบว่าเชื้อ *E. coli* ลดลง จากช่วงก่อนการแช่แข็ง 1.08 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายลดลงเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ครบ 50 วัน การวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น พบว่าเชื้อ *E. coli* ลดลงจากช่วง ก่อนการแช่แข็ง 2.17 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายมากถึง 52 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการ วิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลง พบว่าเชื้อ *E. coli* ลดลงจากช่วงก่อนการแช่แข็ง 2.00 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายลดลง 47 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เซลล์ขาดชีพของโคลิ ฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ 4 และวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น เทียบกับปริมาณโคลิฟอร์มจากการใช้ Non selective agar (TSA) พบว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 มีปริมาณของเซลล์ขาดชีพเกิดน้อยกว่าการวิเคราะห์ โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นคือ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 - 14 วัน โดยพบ เซลล์ขาดชีพ 20.0 - 21.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเซลล์ขาดชีพ 36.7 - 47.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิดังกล่าว 50 วัน พบว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 มีปริมาณเซลล์ ขาดชีพ 25.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเซลล์ขาดชีพ 67.5 เปอร์เซ็นต์ ผลจาก การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า วิธีดัดแปลงที่ 4 มีแนวโน้มในการตรวจหาปริมาณโคลิฟอร์มที่ขาดชีพ ได้ดีกว่าวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

Thesis Title	The Modification of Coliforms Analytical Methods for Frozen Cooked Shrimp
Student	Miss Apinporn Srionnual
Student ID.	48068760
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2008
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Coliforms contamination level of 267 raw shrimp samples in a frozen fishery manufacturing plant was investigated in the year 2006. It was implied that detected in 40.1% of raw shrimp samples and found contaminated between 3.0 - >1,100 MPN/g, while the highest coliforms contamination samples were between 3.0 – 38.0 MPN/g. The dominant species of detected coliforms were belonged to *Escherichia coli* (80%) and *Enterobacter cloacae* (20%), respectively. When compared the coliforms detection results by using MPN method and Japanese method, it was informed that the positive number of coliforms detection in raw shrimp samples by using MPN method was shown higher than using Japanese method. The positive coliforms detection results in using Japanese method were exhibited when the samples were contaminated in a high number of coliforms (more than 93 MPN/g).

In comparison of 4 modified coliforms detection methods (Method 1 : using 0.1% peptone (w/v) + 0.85% NaCl (w/v) as samples' diluent and pour plate of all diluted samples with Desoxycholate Lactose agar (DCLA) as a coliforms detection medium; Method 2 : using 0.1% peptone (w/v) + 0.85% NaCl (w/v) as samples' diluent and pour plate of all diluted samples with DCLA + 1% sodium pyruvate (w/v); Method 3 : Using Butterfield's phosphate buffer dilution water as samples' diluent and pour plate of all diluted samples with Tryptic soy agar (TSA) incubated all TSA plates at room temperature for 2 h and overlaid with DCLA; Method 4 : using 0.1% peptone (w/v) + 0.85% NaCl (w/v) as samples' diluent and pour plate of all diluted samples with Tryptic soy agar (TSA) incubated all TSA plates at room temperature for 2 h and overlaid with DCLA) in spiked (2 Log₁₀ CFU/g and 4 Log₁₀ CFU/g of *E. coli* or *Ent. cloacae* in frozen

cooked shrimp samples) and unspiked (control samples) frozen shrimp samples with Japanese coliforms detection method (Using Butterfield's phosphate buffer dilution water as samples' diluent and pour plate of all diluted samples with DCLA), the results revealed that the detection of *E. coli* and *Ent. cloacae* shown the 4th modified method exhibited the trend in more *E. coli* or *Ent. cloacae* detection in the frozen cooked shrimp samples and more distinctive colonies appeared on selective DLCA than using Japanese method and the 3rd modified method. The 4th modified method was then validated in the coliforms spiked frozen shrimp samples and compared the coliforms detection results to the Japanese detection method. The results of coliforms count revealed that there was no significantly difference ($P > 0.05$) by using these 2 methods.

The results of coliforms detection of *E. coli* spiked (initial load of 4 Log₁₀ CFU/g) frozen cooked shrimp samples and kept at -18° C for 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 50 days that the study informed that, during the first 2 weeks period of keeping the samples, the coliforms detection of using the 4th modified method and Japanese method was shown non significantly difference from each other ($P > 0.05$). The significantly difference of coliforms detection ($P \leq 0.05$) between both methods was exhibited when the samples were kept for 3 more weeks. In day 35, coliforms count using Japanese method decreased to 1.23 Log₁₀ CFU/g (29 %), while the 4th modified method decreased to 1.08 Log₁₀ CFU/g (25 %). The 50 day of keeping the samples at -18° C, coliforms count was decreased by using Japanese method decreased to 2.17 Log₁₀ CFU/g (50 %) while coliforms count by using the 4th modified method was decreased to 2.00 Log₁₀ CFU/g (47 %). When compared the cell number by using Japanese method and the 4th modified method with the cell number detected on direct non selective agar (TSA), The freeze injury cells of coliforms in the frozen shrimp products after keeping at -18° C implied that using Japanese method exhibited higher injury cells (36.7-47.4 %) than the 4th modified coliforms detection method (20.0 – 21.1 %). After keeping the products at -18° C for 50 day, the 4th modified coliforms detection method showed 25 % of injury cells, while the Japanese method revealed 67.4 % of injury cells. The study implied the beneficial of using the 4th modified coliforms detection method for recovery of coliforms freeze injury cells in long keeping period of frozen products.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาจากอาจารย์ผู้ควบคุม วิทยานิพนธ์ รศ.ดร. อศิสร เสวตวิวัฒน์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์ในการให้ความช่วยเหลือ คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบุลย์ และ รศ.ดร. วราวุฒิ ครุส่ง กรรมการสอบหัวข้อ และโครงร่างวิทยานิพนธ์ ดร.กิตติชัย บรรจง ที่ให้คำแนะนำเรื่องสถิติ รศ.ดร. สุเมธ ต้นตระเชียร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำชี้แนะจน วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ คุณวิมลมาศ ลอวี กรรมการบริหาร คุณอาภา รักชุมคง ผู้จัดการอาวุโสฝ่าย ควบคุมคุณภาพและวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บริษัท คิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้งส์ จำกัด ที่อนุญาติให้ศึกษาต่อ และสนับสนุนเครื่องมืออุปกรณ์ สถานที่สำหรับการปฏิบัติการ และคุณสุจิรา หวดสวัสดิ์ ผู้จัดการฝ่าย ควบคุมคุณภาพ ที่ให้คำแนะนำดี ๆ ตลอดจนข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ น้องๆ ทุกคนในแผนกห้องปฏิบัติการกลาง บริษัท คิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้งส์ จำกัด ที่เสียสละเวลาในการช่วยกันทำการวิเคราะห์ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณ คุณเพชร สังข์ทองและบริษัทบีไอเมรียเออร์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่เอื้อเฟื้อ เครื่องมือในการหาความเข้มข้นของเชื้อ และคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ ให้ความช่วยเหลือ ในเรื่องเอกสาร และการดำเนินการต่างๆ ในการจัดทำวิทยานิพนธ์นี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ป้า และคุณทรงกลด เขียวสลับที่เป็น คู่คิด เป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุนและให้การดูแลในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแต่บิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และ ถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

อภิสิทธิ์พร ศรีอ่อนนวล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะ และคุณสมบัติของเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	3
2.2 ผลของกระบวนการแช่แข็งต่อผลิตภัณฑ์อาหาร.....	8
2.3 ผลของกระบวนการแช่แข็งอาหารกับอัตราการรอดเชื้อจุลินทรีย์.....	10
2.4 อัตราการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	13
2.5 สภาพกระตุ้นที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของจุลินทรีย์.....	14
2.6 ผลของสิ่งกระตุ้นที่มีผลต่อเซลล์บาดเจ็บของจุลินทรีย์.....	15
2.7 ลักษณะของเซลล์บาดเจ็บ.....	15
2.8 การตอบสนองของเซลล์บาดเจ็บและผลกระทบของเซลล์แบคทีเรีย ก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย.....	17
2.9 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเซลล์จุลินทรีย์.....	19
2.10 วิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม.....	25
2.11 การทดลองเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์โดยวิธีต่างๆ เพื่อหาเซลล์บาดเจ็บ.....	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
3.1 วัตถุประสงค์.....	28
3.2 อุปกรณ์การทดลอง.....	28
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	29

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4 สถานที่ทำการทดลอง.....	29
3.5 วิธีการทดสอบ.....	29
3.5.1 การเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม ตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงาน โดยวิธี MPN Method เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	29
3.5.2 การหาปริมาณที่เหมาะสมและศึกษาสายพันธุ์ เชื้อ โคลิฟอร์มเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	31
3.5.3 การทดลองดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์มใน ตัวอย่างกุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	31
3.5.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม.....	38
3.5.5 การทดลองวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐาน ของประเทศญี่ปุ่นและวิธีที่ดัดแปลงต่อระยะเวลา ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล.....	42
4.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม ตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงาน โดยวิธี MPN Method เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	42
4.2 ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมและศึกษาสายพันธุ์ เชื้อ โคลิฟอร์มเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	45
4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม โดย วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น และวิธีที่ดัดแปลงขึ้น.....	47
4.4 ผลการคำนวณค่า Parameter ต่างๆ ของการตรวจสอบความ ถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของวิธีดัดแปลงที่ 4 กับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	51
4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐาน ของประเทศญี่ปุ่นและวิธีที่ดัดแปลงขึ้น ต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	52

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	56
ข้อเสนอแนะ.....	59
บรรณานุกรม.....	60
ภาคผนวก.....	65
ภาคผนวก ก : วิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม โดย MPN Method.....	65
ภาคผนวก ข: วิธีการจำแนกชนิดและสายพันธุ์เชื้อ โดยใช้ API 20 E.....	67
ภาคผนวก ค : ผลการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม.....	70
ภาคผนวก ค.1 : ผลการเปรียบเทียบวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์มคัดแปลงต่างๆ โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีคัดแปลงต่างๆ.....	70
ภาคผนวก ค.2 : ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ระดับความเข้มข้น $4 \log_{10}$ CFU/กรัม ในกึ่งปรงสุกแช่แข็งหลังการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	81
ภาคผนวก ค.3 : ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ระดับความเข้มข้น $4 \log_{10}$ CFU/กรัม ในกึ่งปรงสุกแช่แข็งหลังการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีโดยวิธีคัดแปลงที่ 4.....	81
ภาคผนวก ง : การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	82
ประวัติผู้เขียน.....	88

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม โคลิฟอร์ม.....	4
2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ โคลิฟอร์มในแต่ละสายพันธุ์.....	5
2.3 ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มและ <i>E. coli</i> ระหว่างกระบวนการต่างๆ ในการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง.....	13
2.4 แสดงปริมาณเชื้อ Coliforms และ <i>E. coli</i> ของตัวอย่างกุ้งระหว่าง การเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งตามระยะเวลาต่างๆ.....	14
2.5 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและวัตถุประสงค์การใช้.....	21
3.1 สรุปความแตกต่างวิธีการทดลองเปรียบเทียบวิธีวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น และวิธีดัดแปลงต่างๆ.....	37
4.1 ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งที่รับเข้าโรงงาน โดยวิธี MPN Method ตั้งแต่เดือนมกราคม 2549 ถึง ธันวาคม 2549.....	43
4.2 การศึกษาปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุดิบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น เปรียบเทียบกับวิธี MPN Method ตั้งแต่เดือนสิงหาคม- ธันวาคม 2549.....	44
4.3 หาปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น ตั้งแต่เดือน เมษายน- กรกฎาคม 2550.....	46
4.4 แสดงผลการคำนวณการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ โคลิฟอร์มของวิธีดัดแปลงที่ 4.....	51
4.5 แสดงการคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการตรวจสอบความถูกต้อง ของวิธีดัดแปลงที่ 4.....	52
4.6 แสดงผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เซลล์บาดเจ็บของ โคลิฟอร์ม จากการวิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงที่ 4 เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	54

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก.1 ค่า MPN ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ของเชื้อ Coliforms วิธี 3 : 3 : 3.....	66
ค.1 ผลการเปรียบเทียบวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น และวิธีดัดแปลงต่างๆ.....	70
ค.2 ปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ที่ระดับความเข้มข้น $4 \log_{10}$ CFU/กรัม ในกึ่งปรุรงสุกแช่แข็ง หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น.....	81
ค.3 ปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ที่ระดับความเข้มข้น $4 \log_{10}$ CFU/กรัม ในกึ่งปรุรงสุกแช่แข็ง หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ โดยวิธีดัดแปลงที่ 4	81

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์เชื้อ โคลิฟอร์ม.....	5
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิ ระหว่างการแช่เยือกแข็ง.....	9
2.3 การเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยการแช่ในเซลล์เนื้อเยื่อแข็ง.....	10
4.1 กราฟแสดงค่า Log_{10} CFU/กรัม ของเชื้อ โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น เปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลง ทั้ง 4 วิธีที่ระดับ Low level.....	48
4.2 กราฟแสดงค่า Log_{10} CFU/กรัม ของเชื้อ โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น เปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลง ทั้ง 4 วิธีที่ระดับ High level.....	48
4.3 ลักษณะโคโลนีเชื้อ โคลิฟอร์มบนอาหาร DCLA ที่ระดับ Low level โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น(ก) วิธีดัดแปลงที่ 1 (ข) วิธีดัดแปลงที่ 2 (ค) วิธีดัดแปลงที่ 3 (ง) และวิธีดัดแปลงที่ 4 (จ).....	49
4.4 ลักษณะโคโลนีเชื้อ โคลิฟอร์มบนอาหาร DCLA ที่ระดับ High level โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น(ฉ) วิธีดัดแปลงที่ 1 (ช) วิธีดัดแปลงที่ 2 (ซ) วิธีดัดแปลงที่ 3 (ฅ) และวิธีดัดแปลงที่ 4 (ญ).....	50
4.5 ปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ที่ระดับความเข้มข้น 4Log_{10} CFU/กรัม ในกึ่งปรงสุกแช่เยือกแข็ง ที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง ที่เวลาต่าง ๆ โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่ 4.....	53

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัจจุบัน อุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งเป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่ใหญ่และสามารถทำรายได้เข้าประเทศไทยได้สูง การเปิดตลาดการค้าเสรีระหว่างประเทศทำให้ ประเทศไทยสามารถส่งผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็งไปขายยังต่างประเทศได้มากขึ้น ดังนั้นทางโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง จึงต้องมีการประกันสินค้าหรือผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออกให้มีความปลอดภัยให้มากที่สุด เพื่อลดปัญหาการห้ามนำเข้าสินค้าจากประเทศไทยปัญหาที่ทางโรงงานอุตสาหกรรมพบส่วนใหญ่เป็นปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ เนื่องจากการปนเปื้อนมาในวัตถุดิบ การออกแบบกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม และการปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์หลังการผลิต เป็นต้น ดังนั้นกระบวนการในการประกันว่าสินค้าปลอดภัย คือการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่ได้มาตรฐานซึ่งอาจให้หลักเกณฑ์จากมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เข้ามาใช้เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ว่ามีความถูกต้องแม่นยำสามารถประกันได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัย ซึ่งโคลิฟอร์มถือว่าเป็นแบคทีเรียที่สำคัญตัวหนึ่งที่ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความปลอดภัยในการผลิตอาหาร และได้มีการศึกษาหามาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มดังกล่าวในตัวอย่างอาหาร โดยวิธีการวิเคราะห์มักจะมุ่งเน้นถึงการวิเคราะห์หาเชื้อโคลิฟอร์มที่บดเจ็บหลังจากกระบวนการผลิต

วิธีการวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยวิธี MPN ตามมาตรฐานของ Feng et al.(2002) มีการใช้ Lauryl sulfate Tryptose broth เป็น Recovery medium ซึ่งจะช่วยให้ฟื้นฟูเซลล์โคลิฟอร์มที่บดเจ็บและเพิ่มจำนวนก่อน แล้วจึงนำวิเคราะห์ต่อโดยใช้ 2% Brilliant green Bile broth และ EMB agar ซึ่งเป็น Selective media เพื่อวิเคราะห์ยืนยันเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์ม และ *Escherichia coli* ต่อไป

JETRO (2006) กล่าวถึงวิธีการในการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์ม ตามวิธีตามมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่น ใช้เทคนิคการ pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Selective media ชื่อ Desoxycholate Lactose agar (DCLA) กรณีเกิดโคโลนีสีแดงหรือชมพูถือว่าเป็นโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นโคลิฟอร์ม จากนั้นนำไปทดสอบต่อบน EMB agar แล้วนำไปทำการทดสอบยืนยันผลโคลิฟอร์ม โดยการนำไปทดสอบใน Lactose broth และทำการย้อมแกรม

การศึกษการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นด้วยเทคนิคการ pour plate เนื่องจากวิธีการใช้การ pour plate ด้วย DCLA ซึ่งเป็น Selective media โดยตรงอาจทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาเซลล์เชื้อที่บดเจ็บที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตได้

จึงทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าความเป็นจริง ซึ่งการผลิตอาหารส่งออกประเทศญี่ปุ่น ยังยืนยันการใช้วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว ดังนั้นเพื่อให้เกิดความมั่นใจในวิธีการวิเคราะห์หาเชื้อโคลิฟอร์ม ทางบริษัทจึงต้องทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้ถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาใช้ต้องได้รับการตรวจสอบความถูกต้องและมีวิธีการเป็นที่ยอมรับในระดับการวิเคราะห์ของมาตรฐานสากล

1.2 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์โคลิฟอร์ม ที่ตัดแปลงจากมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นที่เหมาะสมกับตัวอย่างกุ้งปรุงสุกที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนและการแช่เยือกแข็ง และวิธีวิเคราะห์ทำการตัดแปลงที่เลือกมาใช้ ต้องนำมาตรวจสอบความถูกต้องให้เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โคลิฟอร์มตามมาตรฐานของญี่ปุ่นในตัวอย่างกุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์หาเซลล์บาดเจ็บที่เกิดจากกระบวนการผลิตได้
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์โคลิฟอร์มที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเดิมตามมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่น และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์
3. ศึกษาผลของการวิเคราะห์โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นและวิธีที่ตัดแปลงต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เยือกแข็ง

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อโคลิฟอร์ม (Coliforms bacteria)

Coliforms หมายถึงแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae มีคุณสมบัติสำคัญคือมีรูปร่างเป็นแท่งหรือท่อนสั้น (rod shape) ย้อมสีแกรมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน มีคุณสมบัติเฉพาะคือสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดและก๊าซภายในเวลา 24 - 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งการหมักน้ำตาลแลคโตสแล้วให้ก๊าซนี้เป็นคุณสมบัติเด่นของกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่ทำให้แยกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นได้ดี เชื้อโคลิฟอร์มสามารถรีดิวซ์ไนโตรทให้เป็นไนไตรท์ ให้ผลลบเมื่อทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase negative) และที่สำคัญคือสามารถทนต่อ Bile Salt สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ -2 ถึง 50 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดต่าง (pH) 4.4 ถึง 9.0 ค่า a_w ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 0.95 โดยแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Escherichia, Citrobacter, Klebsiella และ Enterobacter (มันทนา, 2538) ซึ่งสามารถแบ่งแยกสายพันธุ์ในแต่ละสกุลได้ตามตารางที่ 2.1 โดยโครงสร้างของของเซลล์เชื้อโคลิฟอร์มประกอบด้วยส่วนของตัวเซลล์ ผนังเซลล์ชั้นต่างๆ และแฟลกเจลลาร์วมถึงแอนติเจนต่างๆ ตามภาพที่ 2.1 และเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มจะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ตามตารางที่ 2.2

สำหรับ Fecal Coliforms หรือโคลิฟอร์มในอุจจาระเป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดและก๊าซที่อุณหภูมิประมาณ 44.5 - 45.5 องศาเซลเซียสได้ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่สกุล Escherichia และ Klebsiella บางชนิด (มันทนา, 2538)

ตารางที่ 2.1 การจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในกลุ่มโคลิฟอร์ม

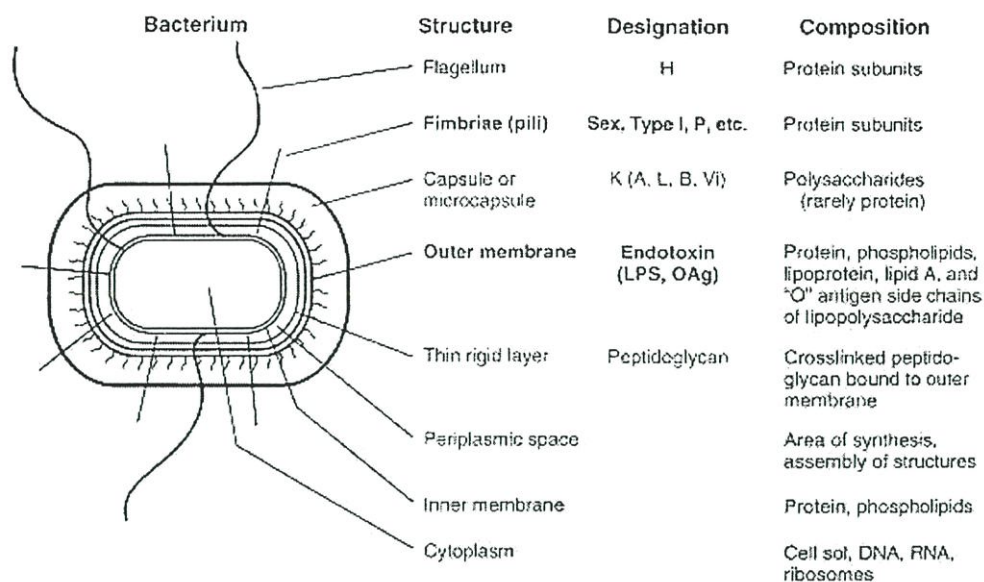
Organism	Other and Older Designations
<i>Escherichia</i> (6 species in Bergey's Manual)*	
<i>E. coli</i>	
<i>E. coli</i> inactive	<i>E. coli</i> (lactose negative, nonmotile, anaerogenic)
<i>E. fergusonii</i>	
<i>E. hermannii</i>	
<i>E. vulneris</i>	
<i>Klebsiella</i> (7 species)	
<i>K. pneumoniae</i> [†]	Friedlander's bacillus
<i>K. oxytoca</i>	Indole positive <i>K. pneumoniae</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. ornithinolytica</i>	Ornithine-positive <i>K. oxytoca</i>
<i>K. planticola</i>	
<i>Enterobacter</i> (13 species)	
<i>E. aerogenes</i> [‡]	
<i>E. cloacae</i> [‡]	
<i>E. agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Erwinia herbicola</i>
<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i> (yellow pigmented)
<i>E. gergoviae</i>	
<i>Serratia</i> (11 species)	
<i>S. marcescens</i> [‡]	
<i>S. rubidaea</i>	
<i>S. liquefaciens</i> group	<i>S. liquefaciens</i> , <i>S. grimesii</i> , <i>S. proteamaculans</i>
<i>S. ficaria</i>	
<i>S. fonticola</i>	
<i>S. odorifera</i>	
<i>S. plymuthica</i>	
<i>Citrobacter</i> (3 species)	
<i>C. freundii</i>	
<i>C. diversus</i>	<i>C. koseri</i>
<i>C. amalonaticus</i>	<i>C. intermedius</i> biotype
<i>Proteus</i> [§] (4 species)	
<i>P. mirabilis</i> [‡]	
<i>P. vulgaris</i>	
<i>P. penneri</i>	

*Holt, J.G., et al. 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed. The William & Wilkins Co., Baltimore.

[†]Major coliforms in nosocomial and/or community-acquired human diseases (prevalent in published reports).

[‡]Organisms previously designated as *Proteus morganii* and *Proteus rettgeri* are now classified in the genera *Morganella* and *Providencia*, respectively.

ที่มา : Guentzel (2007)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์เชื้อโคลิฟอร์ม

ที่มา : Guentzel (2007)

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ โคลิฟอร์ม ในแต่ละสายพันธุ์กับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ

Organism	Motility	Lactose	Indole	Urease	H ₂ S	Other
<i>Escherichia</i>						
<i>E coli</i>	+	+	+	—	—	
<i>Klebsiella</i>						
<i>K pneumoniae</i>	—	+	—	+	—	large mucoid colonies
<i>K oxytoca</i>	—	+	+	+	—	large mucoid colonies
<i>Enterobacter</i>						
<i>E aerogenes</i>	+	+	—	—	—	some strains mucoid, LD+, AD—
<i>E cloacae</i>	+	+	—	d	—	LD—, AD+
<i>E sakazakii</i>	+	+	[—]	—	—	yellow pigment, LD—, AD+
<i>E gergoviae</i>	+	d	—	+	—	LD+, AD—
<i>Pantoea</i>						
<i>P agglomerans</i>	+	d	[—]	[—]	—	some strains yellow pigment, LD—, AD—
<i>Serratia</i>						
<i>S marcescens</i> ^a	+	—	—	—	—	some strains red pigment
<i>S rubideae</i> ^b	+	+	—	—	—	red pigment
<i>Citrobacter</i>						
<i>C freundii</i>	+	d	—	d	+	
<i>C koseri</i> ^c	+	d	+	d	—	
<i>Proteus</i>						
<i>P mirabilis</i>	+	—	—	+	+	"swarming" motility
<i>P vulgaris</i>	+	—	+	+	+	"swarming" motility

+ (≥ 90% strains positive), d (26-75% strains positive), [—] (11-25% strains positive), — (0-10% strains positive)

LD (lysine decarboxylase), AD (arginine dihydrolase)

^a *S liquefaciens* group and *S ficaria* have same live reactions shown.

^b *S fonticola*, *S odorifera*, and *S plymuthica* have same live reactions shown.

^c *C amalonaticus* and other *Citrobacter* have same live reactions shown.

ที่มา : Guentzel (2007)

2.1.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มแต่ละสายพันธุ์สามารถแบ่งได้ดังนี้

DPLM MEDIC , University of Texas - Houston Medical School (1995)

2.1.1.1 Enterobacter

ลักษณะเป็นรูปท่อนตรงขนาดกว้าง 0.6 - 1.0 μm สามารถเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella (ยกเว้น *Ent. asburiae*) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-37 องศาเซลเซียส พบในอุจจาระคนและสัตว์ น้ำ ดิน พืชผัก และมีลักษณะทางชีวเคมีคล้ายกับ *Klebsiella* แต่ไม่ใช่ flagella เชื้อ *Klebsiella* Enterobacter นี้เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้แต่มีบางสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่ฉวยโอกาสเข้าสู่ร่างกาย เช่น *Ent. aerogenes* และ *Ent. cloacae* ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์นี้ไม่ได้ทำให้ท้องเสีย บางครั้งทำให้เกิดการติดเชื้อต่อทางเดินปัสสาวะและระบบทางเดินหายใจนอกจากนี้ ยังมีสายพันธุ์ *Ent. sakazakii*, *Ent. agglumerans*, *Ent. gergoviae* ซึ่ง Enterobacter ให้ผลทางชีวเคมีดังนี้

- Lysine เป็นลบ ยกเว้นสายพันธุ์ *Ent. gergoviae*
- Citrate เป็นบวก
- Indole เป็นลบ
- Ornithine เป็นบวก ยกเว้นสายพันธุ์ *Ent. agglumerans*
- Voges-Proskauer เป็นบวก
- Methyl Red เป็นได้ทั้งบวกและลบขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

2.1.1.2 Citrobacter

ลักษณะเป็นรูปท่อนตรง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 μm และยาว 2.0 – 6.0 μm สามารถเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส พบในอุจจาระคนและสัตว์ น้ำ ดิน และในอาหาร เป็นแบคทีเรียกลุ่มเล็ก ๆ ซึ่งมีบางสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ *Ci. freundii* เป็นสาเหตุของอาการท้องเสีย *Ci. diversus* เป็นสาเหตุของอาการท้องเสียที่เพิ่งมีการค้นพบเช่นกัน Citrobacter ให้ผลทางชีวเคมีดังนี้

- Lysine Decarboxylase เป็นลบ
- Oxidase เป็นลบ
- Catalase เป็นบวก
- Hydrogen sulfide เป็นบวก เช่น *Ci. freundii*
- Citrate เป็นบวก
- Voges-Proskauer เป็นลบ
- Methyl Red เป็นบวก

2.1.1.3 Klebsiella

ลักษณะเป็นรูปท่อนตรง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3- 1.0 μm และยาว 0.6 – 6.0 μm ไม่เคลื่อนที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่งเช่น *Kl. pneumoniae* และสามารถสร้างโคโลนีขนาดใหญ่บน Nutrient media Klebsiella สามารถสร้าง Enterotoxin ที่ทนความร้อน สายพันธุ์ Klebsiella สามารถสร้าง Enterotoxin ที่ทนความร้อน สายพันธุ์ *Kl. pneumoniae* เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุของโรคนิวโมเนีย Klebsiella ให้ผลทางชีวเคมีดังนี้

- Lysine เป็นบวก
- Citrate เป็นบวก
- Oxidase เป็นลบ
- Catalase เป็นบวก
- Indole เป็นลบ
- Ornithine เป็นลบ

2.1.1.4 Escherichia coli

มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรง ขนาดกว้าง 1.1 - 1.5 μm ยาว 2.0 – 6.0 μm สามารถเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่งเนื่องจากมีหลายสายพันธุ์ที่ก่อโรค *E. coli* ให้ผลทางชีวเคมีดังนี้

- Citrate เป็นลบ
- Oxidase เป็นลบ
- Catalase เป็นบวก
- Indole เป็นลบ
- Methyl Red เป็นบวก
- Voges-Proskauer เป็นลบ
- Hydrogen sulfide เป็นลบ

แต่เดิมแบคทีเรียที่ใช้เป็นครรชนีความปลอดภัยของอาหาร ใช้หลักการว่าต้องเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้และปนเปื้อนในอุจจาระ ไม่ทางตรงก็ทางอ้อม แต่ปัจจุบันมีการเพิ่มเติมเกณฑ์ เช่น ควรมีลักษณะที่เฉพาะและเกิดในสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกับสภาวะในลำไส้ ควรพบมากในอุจจาระเพื่อจะได้สามารถตรวจพบได้สภาวะที่ทำการเจือจางสูงๆ ควรมีความต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่มีมลพิษสูง ควรง่ายต่อการถูกวิเคราะห์ แต่มีความมั่นใจสูงแม้จะตรวจพบในปริมาณน้อยก็ตาม ด้วยเกณฑ์ต่างๆดังกล่าวมานี้ เป็นคุณสมบัติที่เด่นของเชื้อ โคลิฟอร์ม จึงมีผลทำให้เชื่อในกลุ่ม

โคลิฟอร์มเหมาะสมที่ใช้เป็นครรชนบ่งชี้เชื้อโรคทางเดินอาหาร โดยเริ่มต้นกับตัวอย่างน้ำ และแบคทีเรียตัวที่นำมาใช้เป็นครรชนที่บ่งถึงอุจจาระในน้ำมากที่สุดคือ *E. coli* เนื่องจากระยะเวลาในการยู่รอด โดยทั่วไป *E. coli* จะตายพร้อมๆ กับแบคทีเรียในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ และ *E. coli* ทนต่อสภาวะที่มี pH ต่ำได้ (สุมณฑา ,2545)

2.2 ผลของกระบวนการแช่เยือกแข็งต่อผลิตภัณฑ์อาหาร

2.2.1 หลักพื้นฐานในการแช่เยือกแข็ง

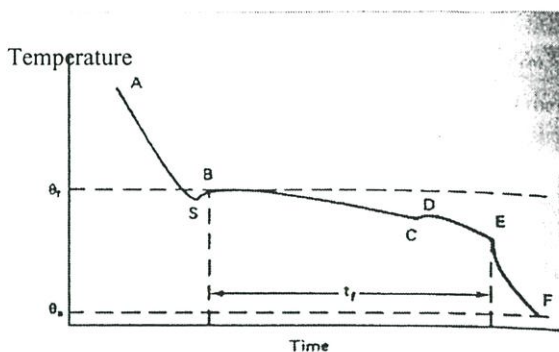
จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารจะชะงักการเจริญเติบโต และหยุดกระบวนการทางเมแทบอลิซึมลงแต่เนื้อเยื่อของอาหารยังคงลักษณะอยู่ได้ การลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำลงจนถึงระดับที่สิ่งมีชีวิตนั้นไม่สามารถจะดำเนินปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไปได้ โดยทั่วไปมักจะเป็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า หลักสำคัญคือ การเปลี่ยนสถานะของน้ำในอาหารที่เป็นของเหลวให้เป็นน้ำแข็ง เพื่อมิให้น้ำนั้นสามารถทำหน้าที่ต่างๆ ในปฏิกิริยาเคมี และไม่เป็น Substrate ให้กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ปะปนมากับอาหารได้

2.2.2 ทฤษฎีการแช่เยือกแข็ง

มีการกำจัดความร้อนสัมผัสออกในระหว่างการแช่เยือกแข็ง ทำให้อาหารลดลงสู่จุดเยือกแข็ง ความร้อนจากการหายใจในอาหารสดก็จะถูกกำจัดออกไปเช่นกัน ความร้อนแฝงในการตกผลึกจะถูกกำจัดออกไปและทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้น

2.2.3 กระบวนการแช่เยือกแข็งแบ่ง ออกเป็น 3 ขั้นตอน

1. Pre-cooling ทำให้ผลิตภัณฑ์เย็นลงจนถึงจุดเยือกแข็ง
2. Latent zone เปลี่ยนน้ำในผลิตภัณฑ์ให้เป็นน้ำแข็ง โดยกำจัดความร้อนแฝง (latent heat) ออกไป
3. Sub-cooling ทำให้ผลิตภัณฑ์เย็นลงจนถึงอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง คือที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิระหว่างการแช่เยือกแข็ง

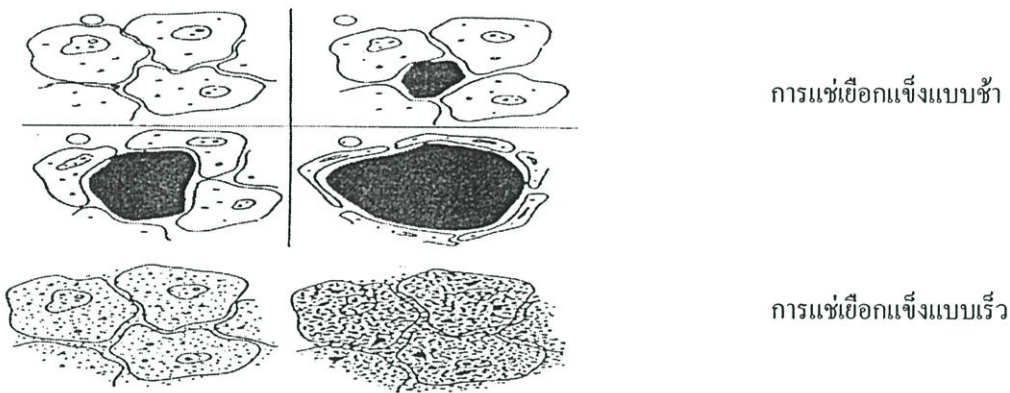
ที่มา : วิไล (2546)

จากเส้นกราฟ พบว่าจาก A ถึง S อุณหภูมิของอาหารจะลดลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง θ_f ซึ่งนอกจากน้ำบริสุทธิ์แล้วจะต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสเสมอ ที่จุด S น้ำจะยังคงเป็นของเหลว ถึงแม้ว่าจะมีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ปรากฏการณ์นี้เรียกว่าการทำให้เย็นยิ่งยวด (supercooling) จากจุด S ถึง B อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงจุดเยือกแข็งในขณะที่เริ่มมีผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นและมีการปล่อยความร้อนแฝงสำหรับการตกผลึก จาก B ถึง C มีการกำจัดความร้อนออกจากอาหารในอัตราเร็วที่เร็วขึ้น เกิดน้ำแข็งขึ้นในขณะที่มีการกำจัดความร้อนแฝงออกไป แต่อุณหภูมิยังคงค่อนข้างเท่าเดิม จุดเยือกแข็งจะลดลงเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายในของเหลวที่ยังไม่แข็งตัวเพิ่มมากขึ้น อุณหภูมิจะลดลงเล็กน้อย น้ำแข็งส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในช่วงนี้ จาก C ถึง D สารละลายจะเกิดการอึดตัวยิ่งยวดและตกผลึกออกมา ความร้อนของการตกผลึกจะถูกปล่อยออกมา จาก D จาก E มีการตกผลึกของน้ำและสารละลายดำเนินต่อไป กำหนดเวลาทั้งหมด t_f (freezing plateau) ได้โดยอัตราการกำจัดความร้อน จาก E ถึง F อุณหภูมิของส่วนผสม น้ำ-น้ำแข็ง ลดลงสู่อุณหภูมิของเครื่องแช่เยือกแข็ง มีน้ำส่วนหนึ่งจะยังไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิที่ใช้ในการแช่เยือกแข็งในระดับอุตสาหกรรม ปริมาณน้ำดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของอาหารและอุณหภูมิของอาหารแช่เยือกแข็ง

2.2.4 การเกิดผลึกน้ำแข็ง

จุดเยือกแข็งของอาหาร คือ อุณหภูมิที่มีผลึกเล็กๆ ในปริมาณที่สมดุลกับน้ำที่อยู่รอบๆ ก่อนที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นต้องมีนิวเคลียส (nucleus) ของโมเลกุลน้ำก่อน โดยที่การแช่เยือกแข็งแบบช้าจะเกิดผลึกขนาดใหญ่และเกิดภายนอกเซลล์ (extracellular) นำภายในเซลล์จะถูกดึงมาช่วยเพิ่มขนาดของผลึกที่ภายนอกเซลล์เป็นผลให้เซลล์หดตัวลดขนาดลง ส่วนการแช่เยือกแข็งแบบ

รวดเร็ว จะให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กรวมๆ ผลึกเกิดขึ้นทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์พร้อมๆ กัน มีขนาดของผลึกสม่ำเสมอกระจายทั่วไป จึงไม่ทำให้เซลล์เกิดการหดตัว (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 การเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการแช่ในเซลล์เนื้อเยื่อ

ที่มา : วิไล (2546)

2.3 ผลของกระบวนการแช่แข็งอาหารกับอัตราการรอดเชื้อจุลินทรีย์

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้ลดต่ำลงในกระบวนการแช่แข็งนั้นจะส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดังนี้ (บุษกร, 2545)

2.3.1 การทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์ (Catalytic activity of microbial enzyme) ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิลดลง ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงด้วย โดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีนเอสและไลเปส ที่ทนความร้อน (Heat-Stable proteinases และ lipases) เอนไซม์ถูกทำลาย โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลง

2.3.2 อุณหภูมิต่ำทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็ง ทำให้อาหารมีปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ลดลง โดย a_w ของอาหารลดลง มีผลทำให้จุลินทรีย์ขาดอาหารและอาจตายได้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีผลทำลายเซลล์ โดยจะไปทิ่มตำเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์และเยื่อเซลล์เกิดการฉีกขาด สารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์จะรั่วไหลออกนอกเซลล์ ในที่สุดจุลินทรีย์จะตายเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะเครียด เช่น การได้รับความเย็น (Freezing) เซลล์บางเซลล์จะยังคงสภาพอยู่ได้ โดยที่บางเซลล์อาจถูกทำลายจนบาดเจ็บหรือตาย ทั้งนี้อันตรายของกระบวนการแช่แข็งที่เกิดขึ้นกับเซลล์ของจุลินทรีย์ เกิดเนื่องมาจากการทำให้อุณหภูมิลดลงมาที่ 0 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว ความเป็นพิษของความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เป็นผลทำให้ค่า a_w ลดต่ำลง (Calcott and

Macleod, 1974) การแช่เยือกแข็งมักจะลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหาร เนื่องจากผลของการทำลาย (Lethal effect) หรือกึ่งทำลาย (Sublethal effect) ก็ได้ โดย Lethal effect นั้นเซลล์หลายเซลล์อาจถูกทำลายได้โดยการแช่เยือกแข็งแต่ไมใช่วิธีการทั่วไปที่ใช้มาเชื่อทั้งหมดในอาหาร ผลของ Lethal effect เกิดจากการที่โปรตีน หรือ เอนไซม์ที่จำเป็นในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งอาจเป็นผลจากความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่เพิ่มขึ้นจากเดิมก่อนแช่แข็ง หรือเป็นเพราะสภาพทางกายภาพเกิดความเสียหายเนื่องจากผลึกน้ำแข็ง รวมถึงการให้ความเย็นกับเซลล์อย่างรวดเร็วจากอุณหภูมิที่เหมาะสมจนถึง 0 องศาเซลเซียส ก็อาจทำให้เซลล์ตายได้เฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มเทอร์โมไฟล์และมีโซไฟล์ เรียกกระบวนการนี้ว่าการช็อกด้วยความเย็น (Cold shock) นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับไขมันที่เชื่อมเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดเซลล์เกิดการรั่วหรือทำให้การปล่อยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เกิดความเสียหาย ในขณะที่ Sublethal effect พบว่าจำนวนของจุลินทรีย์ที่ลดลงนั้นอาจจะไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ตายแล้วทั้งหมด แต่จะมีบางเซลล์ที่เกิดความเสียหายเพียงบางส่วนเท่านั้น แต่ถ้าทิ้งระยะเวลาให้นานพอสมควรให้มีการซ่อมแซมความเสียหาย หรือมีการเติมสารอาหารให้เซลล์ ก็อาจจะเจริญต่อไปได้อีก (วราวุฒิ, 2538)

การแช่เยือกแข็งไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิที่ลดต่ำลงเท่านั้น ยังส่งผลกระทบต่อปัจจัยของการใช้น้ำอิสระหรือที่เรียกว่าค่า a_w คือเมื่อน้ำในเซลล์ได้รับความเย็นจนกลายเป็นน้ำแข็ง ทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดต่ำลง หมายความว่า ค่า a_w จะลดต่ำลงด้วย ซึ่งค่า a_w ดังกล่าวเป็นอีกปัจจัยหนึ่งของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นเมื่อค่า a_w ลดต่ำลงเชื้อจุลินทรีย์จึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำลายจุลินทรีย์ในอาหารแช่เยือกแข็ง เช่น ชนิดของแบคทีเรียแกรมลบหรือแกรมบวก อายุและช่วงเวลาการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต ลักษณะจำเพาะของอาหาร รูปแบบและอุณหภูมิในการแช่แข็ง ระยะเวลาในการจัดเก็บในสภาพแช่แข็ง ซึ่งในแต่ละปัจจัยนั้นส่งผลให้เกิดการทำลายจุลินทรีย์ในกระบวนการแช่แข็งมากหรือน้อยต่างกัน (Erickson and Hung, 1997)

ปัจจัยแรกเรื่องชนิดของจุลินทรีย์และภาวะในขณะนั้น แบคทีเรียที่กำลังอยู่ในสถานะสร้างสปอร์ หรืออยู่ในลักษณะเป็นเซลล์ปกติ (Vegetative cell) และคาดกันว่าถ้าแบคทีเรียกำลังอยู่ในระยะแบ่งเซลล์ จะถูกทำลายได้ง่ายกว่าระยะอื่นๆ โดยเฉพาะถ้าแบคทีเรียสร้างสปอร์จะมีความทนทานมากกว่าพวกเซลล์ปกติจากข้อมูลซึ่งมีผู้ทดลองแช่แข็งอาหารที่ - 70 องศาเซลเซียสภายในเวลาน้อยกว่า 15 วินาที พบสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* และเซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ยังมีชีวิตอยู่ ในขณะที่เซลล์ของพวก *E. coli* รอดอยู่ได้ร้อยละ 70 และ *Pseudomonas aeruginosa* รอดเพียงร้อยละ 20 ส่วนพวกเซลล์ของยีสต์ถูกทำลายเป็นจำนวนมากในขณะสปอร์ของเชื้อรามีความทนทานปานกลางต่ออุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (มันทนา, 2538) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะทนต่ออุณหภูมิแช่เยือกแข็งได้แตกต่างกัน โดยพบว่า (บุษกร, 2545)

- แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมจะทนต่อการแช่แข็งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน
- ในระหว่างการแช่เยือกแข็งอาหารพบว่า จุลินทรีย์ในอาหารจะค่อยๆ ลดลงโดยแบคทีเรียแกรมบวกจะรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ
- แบคทีเรียแกรมบวกจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยทนต่อการแช่เยือกแข็งสลับการละลายน้ำแข็งการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในที่เย็นจัดจะมีมากกว่าในมีแช่เยือกแข็ง
- การแช่เยือกแข็งสามารถทำลายเชื้อ *Yersinia enterocolitica* ได้มากกว่าการฉายรังสีเซลล์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เชื้อในกลุ่มไซโครฟายล์เมื่ออยู่ในที่มีอุณหภูมิต่ำเช่นการแช่เย็นเชื้อจะเติบโตช้าลง หรือ แม้จะเป็นเชื้อไซโครฟายล์ก็ตาม หากอยู่ในอาหารแช่เยือกแข็งที่มีอุณหภูมิต่ำมากเซลล์จะได้รับบาดเจ็บหรือตายเซลล์ที่บาดเจ็บอาจสามารถซ่อมแซมตัวเองใหม่ได้ ส่วนเซลล์ที่ตายไปแล้วไม่มีโอกาสจะฟื้นหรือซ่อมแซมตัวเองได้อีก

ปัจจัยเรื่องอุณหภูมิระหว่างการผลิตและการเก็บรักษา เชื้อจุลินทรีย์จะตายอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -1 ถึง -5 องศาเซลเซียส ดังนั้นในกระบวนการผลิตอาหารแช่เยือกแข็ง ระดับของการทำลายจะสูงสุดเมื่ออาหารเริ่มแข็งตัวและถ้า Freezing process ใช้เวลานานเชื้อจุลินทรีย์จะถูกฆ่าตายมากขึ้น แต่ถ้า Freezing process ใช้เวลาสั้นเชื้อจุลินทรีย์ก็จะรอดตายมากขึ้นด้วย โดยปกติถ้าทำให้อาหารเย็นจัดอย่างรวดเร็วกลไกต่างของจุลินทรีย์จะหยุดทันที การทำอาหารให้เย็นจัดช้าๆ มีผลในการทำลายสูงแต่อาหารจะเสื่อมคุณภาพมากกว่า แต่หากอาหารผ่านจุดวิกฤติ (Critical zone) ได้เร็วมากเท่าไร อาหารจะมีลักษณะสดและคุณภาพดี

ปัจจัยเรื่องระยะเวลาในการเก็บอาหารแช่เยือกแข็ง (The time of storage in the frozen condition) จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์จะลดลง ถ้าเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นานขึ้น แต่เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะมีชีวิตอยู่ได้หลังจากเก็บอาหารไว้หลายๆปี การตายของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับการทำให้อาหารตาย (starvation)

ปัจจัยเรื่องชนิดของอาหาร (The kind of food) ส่วนประกอบของอาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการตายของเชื้อจุลินทรีย์ ระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาอาหารแช่เยือกแข็ง พบว่า น้ำตาล เกลือ ไขมัน และสารเจือปนอื่นๆ อาจทำหน้าที่ในการป้องกันแต่ถ้าความชื้นสูงและค่า pH ต่ำจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในค่า pH ที่เป็นกลางหรือค่อนข้างเป็นด่างเล็กน้อย เมื่อนำอาหารไปแช่แข็งส่วนที่เป็นน้ำ หรือส่วนที่มีความชื้นสูงและเป็นน้ำแข็ง ทำให้ solute เพิ่มมากขึ้น pH จึงเริ่มเปลี่ยน เมื่อต่ำลงจะมีฤทธิ์เป็นกรด สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้

ปัจจัยเรื่องความทนทานของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง การนำอาหารที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง ที่ต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส จะ

ทำให้จุลินทรีย์ที่ยังรอดชีวิตอยู่ถูกทำลายและอยู่ในสภาพบาดเจ็บมากยิ่งขึ้น จนทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวตายลงได้ในระหว่างการเก็บรักษา

2.4 อัตราการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์ม

อรัญ (2518) ได้ทำการศึกษาปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มและ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตกึ่งกลาดำแช่แข็ง โดยการเก็บตัวอย่างกึ่งในแต่ละกระบวนการผลิตเริ่มตั้งแต่รับวัตถุดิบเข้าโรงงาน ก่อนเค็ดหัว หลังคัดขนาดและสภาพ ก่อนการแช่แข็ง และหลังการแช่แข็ง มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 2.3 พบว่าในวัตถุดิบรับเข้าโรงงานมีปริมาณการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มสูงมากและมีการพบเชื้อ *E. coli* แต่เมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่างๆมีบางกระบวนการที่ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องมาจากการควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อการควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามมีบางกระบวนการที่ทำให้ปริมาณเชื้อลดลง ได้แก่ กระบวนการแช่แข็ง ในการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มและ *E. coli* ลดลงเมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าว

ตารางที่ 2.3 ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มและ *E. coli* ระหว่างกระบวนการต่างๆ ในการผลิตกึ่งแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่างกึ่งแต่ละกระบวนการ	Most probable number/ กรัม	
	Coliforms	<i>E. coli</i>
วัตถุดิบกึ่งสด	>1100	9
หลังจากแกะหัว	>1100	28
หลังจากคัดขนาด	460	9
ก่อนแช่แข็ง	>1100	9
หลังแช่แข็ง	460	0

ที่มา : อรัญ (2518)

นอกจากนี้อรัญ (2518) ได้ทำการทดลองเก็บรักษา กึ่งกลาดำแช่แข็งในห้องเย็นควบคุมอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 14, 28, 42, 56 และ 70 วัน แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ Coliforms และ *E. coli* ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 2.4 พบว่าปริมาณของเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาเก็บที่นานขึ้น จึงแสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งนั้นเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สามารถทำให้เชื้อลดปริมาณลงได้

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณเชื้อ Coliforms และ *E. coli* ของตัวอย่างกึ่งระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งตามระยะเวลาต่างๆ

เวลาการเก็บที่ อุณหภูมิต่ำ -18 องศาเซลเซียส	Most probable number/ กรัม	
	Coliforms	<i>E. coli</i>
1 วัน	460	0
14 วัน	93	9
28 วัน	75	14
42 วัน	240	0
56 วัน	43	0
70 วัน	23	9

ที่มา : อนุรักษ์ (2518)

2.5 สภาวะที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของจุลินทรีย์

2.5.1 การใช้อุณหภูมิสูง เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งจุลินทรีย์ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญออกเป็น 3 ชนิดคือ ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) และชอบอุณหภูมิสูง (Thermophile) ดังนั้นถ้าจุลินทรีย์ได้รับสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่าที่อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ก็จะทำให้เกิดการตายหรือบาดเจ็บขึ้น โดยความร้อนจะไปทำให้โปรตีนในเซลล์เกิดการตกตะกอน (Coagulase)

2.5.2 การใช้อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากอุณหภูมิต่ำช่วยลดอัตราการเมตาบอลิซึมของเซลล์ นอกจากนี้ความเย็นยังทำให้โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์เกิดการตกตะกอนเป็นก้อน และทำให้เซลล์ฉีกขาดมีผลในการทำให้เซลล์นั้นบาดเจ็บและตายได้

2.5.3 การใช้สารเคมี ความเข้มข้นของสารเคมีบางชนิดอาจทำให้เซลล์บาดเจ็บ เช่น แอลกอฮอล์ ทำให้โปรตีนและเอนไซม์เสียสภาพและยังเป็นตัวทำลายทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย นอกจากนี้ยังเป็นตัวดึงน้ำออกจากเซลล์ ทำให้กิจกรรมของเซลล์หยุดชะงักจึงสามารถทำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายได้

2.5.4 แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) แรงดันของออสโมติกที่แตกต่างกันระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ มีผลทำให้เซลล์จุลินทรีย์เต่งหรือเหี่ยว ซึ่งทำให้ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ชะงัก

นอกจากนี้ยังมีรังสี แรงตึงผิว ความเป็นกรด-ด่าง โดยจะทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สมบัติการยอมให้สารผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นเซลล์จึงขาดเจ็บ (นงลักษณ์, 2544)

2.6 ผลกระทบต่อเซลล์ขาดเจ็บของจุลินทรีย์

2.6.1 ทำลาย Cytoplasmic membrane การทำลาย Cytoplasmic membrane ของเซลล์เชื้อ *Clostridium perfringens* ในสภาวะ Cold shocked (Traci and Duncan, 1974) ไขมันและ phospholipids ของเชื้อ *Staph. aureus* ถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อนสูง (Hurst et al., 1973)

2.6.2 ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และกลุ่มสายพันธุ์ *Pseudomonas* มีฤทธิ์ต้าน lipophilic dye, bile salt และสารปฏิชีวนะต่างๆ ซึ่งจะไปมีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก เช่น bile salt ก็จะมีเซลล์ที่สามารถทนเกลือได้เท่านั้น จะสามารถมีชีวิตเหลือรอด ซึ่งจะไปมีผลต่อเซลล์ที่ Lipopolysaccharide (LPS) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Hitchener and Egan, 1977)

2.6.3 ทำลายที่ Ribosome และ RNA มีรายงานว่าความร้อนที่จะทำลายเซลล์ของ *Salmonella Typhimurium* จะถูกทำลายที่ตำแหน่ง 16S และ 30S ซึ่งจะเข้าไปขัดขวางการทำให้เป็นกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์จุลินทรีย์ (Tomlins and Ordal, 1971)

2.6.4 ทำลายที่ DNA Sato and Takahashi (1970) พบว่า DNA ของเชื้อ *E. coli* จะแตกออกทำให้ Mg^{2+} จากเซลล์ลดลงมีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA ligase

2.7 ลักษณะของเซลล์ขาดเจ็บ

2.7.1 มีความไวต่อ Selective agent

Busta และ Jezeski (1963) กล่าวว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือต่ำลงจะสามารถสร้างโคโลนีขึ้นได้ และ *Staph. aureus* ที่ถูกความเย็นก็จะสูญเสียความทนทานต่อเกลือเช่นกัน ความไวของเชื้อ *E. coli* ที่ถูกสารฆ่าเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate broth Violet Red Bile agar และ Desoxycholate agar ความแตกต่างของสีและเกลือจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มนี้ Iandolo and Ordal (1966) ยังกล่าวว่าเทคนิคการเจานเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar ที่มีหรือไม่มี 7.5 % Sodium chloride จะสามารถนับ

จำนวนของเซลล์ทั้งหมดทั้งที่บาดเจ็บและไม่บาดเจ็บของเชื้อ *Staph. aureus* ได้ซึ่งความแตกต่างระหว่างจำนวนที่นับได้ทั้ง 2 วิธี คือวิธีสามารถทราบจำนวนเซลล์บาดเจ็บได้ Scheusner et al.(1971) Mackey (1983) กล่าวว่า *E. coli* จากการถูกความร้อน การแช่แข็ง ความแห้งแล้งและรังสีแกมมาจะมีความไวต่อสารปฏิชีวนะ เช่น Novobiocin Nalidixic acid และ Bacitracin และเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งแบบแห้งจะมีความไวต่อสารปฏิชีวนะ Chloramphenicol Streptomycin และ Actinomycin D. ซึ่งในเซลล์บาดเจ็บของ *Campylobacter jejuni* ก็เช่นกัน

Clark and Ordal (1996) ได้ทำการศึกษาว่าการใช้ L-EMB agar ที่มีการเติม 2 % Sodium chloride จะทำให้เซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella Typhimurium* ที่บาดเจ็บจากความร้อนจะมีความไวต่อ Brilliant green agar *Salmonella Shigella* agar และ Desoxycholate agar

Janet et al. (2003) กล่าวว่าในทางจุลชีววิทยาอาหารมีการเติมสารที่มีความไวต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีในตัวอย่างซึ่งจะปะปนมากับเชื้ออื่นๆ แบคทีเรียที่มีความแข็งแรงก็จะถูกกระตุ้นต่อ Selective agent เช่น Sodium desoxycholate หรือ Sodium lauryl sulfate เป็นต้น และสารประกอบที่เป็นพิษ ได้แก่ Selenite หรือ Tellurite Sodium chloride และ Antibiotic และสารประกอบที่เป็นกรด เมื่อเซลล์เกิดการบาดเจ็บ เซลล์เหล่านั้นจะมีความไวต่อสาร Selective agent เช่น เซลล์บาดเจ็บของ *Staph. aureus* ที่ถูกความร้อนซึ่งไม่สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 7.5 % ได้

2.7.2 มีความไวต่อผลกระทบในครั้งที่ 2

Janet et al. (2003) กล่าวว่า เซลล์บาดเจ็บของ *Cam. jejuni* จะลดความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น ซึ่งผลคือไม่สามารถมีชีวิตรอดจากการบ่มโดยตรงใน Broth แต่จะสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้จากการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงขึ้นลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ซึ่งเป็นผลกระทบในครั้งที่ 2 จะทำให้เซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บจะมีความไวมากขึ้น

Hazel and Williams (1990) กล่าวว่า การแช่แข็งทำให้แบคทีเรียปรับตัวจากสภาวะอุณหภูมิต่ำ (Cold shock) โดยปรับตัวที่ส่วนประกอบของไขมันในเซลล์ เพื่อรักษาระดับของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือที่เรียกว่าการปรับตัวโดยการรักษาความหนืด (Homeoviscous adaptation) การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อก่อโรค *Listeria monocytogenes* ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำและมีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งเป็นผลของการสะสมของการป้องกันการซึมผ่านของ glycine betaine และ Carnitine

นอกจากนี้การตอบสนองต่อสภาวะ Cold shock ในเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจาก 6 องศาเซลเซียสถึง 35 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์สามารถอยู่ได้แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงต่อได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสยัง

พบการปรับตัวได้และยังพบว่าธาตุเหล็ก มีความจำเป็นสำหรับการปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ อุณหภูมิแช่เย็น (Bryan et al. , 1999)

Glodstein et al. (1990) รายงานว่าเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ที่มีการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปแช่แข็งจากนั้นนำมาละลาย แล้วนำไปบ่มก่อนที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจะทำให้มีจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้น 70 เท่าของเซลล์ที่เหลืรอดเมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ที่นำไปแช่แข็งและนำมาละลาย แล้วไม่ได้นำมาบ่มก่อนที่ 10 องศาเซลเซียส

2.8 การตอบสนองของเซลล์บาดเจ็บและผลกระทบของเซลล์แบคทีเรียก่อโรคและ แบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียมีดังนี้

2.8.1. *Salmonella* spp.

Sal. enteritica serovar Enteritidis มีความต้านทานต่อความร้อนและกรดในช่วง stationary phase โดยที่มีการใช้กลูโคส เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอน ซึ่งน้ำตาลจะสามารถสนับสนุนการผลิตกรด แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถต้านทานต่อ ต่อสภาวะอากาศที่แห้งได้ Wilde et al. (2000) Bunning et al. (1990) รายงานว่า *Sal. enteritica* serovar Typhimurium ใ้ได้รับสภาวะ heat-shock จะเพิ่มความต้านทานต่อความร้อนในอาหารเลี้ยง เชื้อ Trypticase soy/yeast extract broth เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสภาวะที่ได้รับความร้อน นอกจากนี้ ผลของการใช้สารฆ่าเชื้อกับเซลล์ของเชื้อ *Sal. enteritica* serovar Typhimurium ซึ่งมีส่วนประกอบของคลอรีน (Hypochorous acid) และไอโอดีน การปรับตัวจาก สภาวะที่มีกรดของเซลล์นี้ จะมีความต้านทานมากขึ้น ซึ่งสารฆ่าเชื้อจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของการผ่านเข้าออกของสารที่เชื่อมุ่เซลล์ชั้นนอก ปฏิกิริยาที่จำเป็นของ Sulfhydryl group ในโปรตีนและการทำลายพลังงานในการเผาผลาญ แต่กลไกอื่นๆ เช่นการเปลี่ยนแปลง พันธุกรรมโดยกระบวนการ Oxidation ยังไวต่อผลกระทบ ซึ่งการศึกษานี้ยังทำให้เกิดการ พัฒนาใช้เทคโนโลยีในการเพิ่มประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่จะนำมาใช้ในการรักษาภาวะ แวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหาร (Leyer and Johnson, 1997)

2.8.2. *Escherichia coli* O157 : H7

ในการผลิตอาหารประเภทนม การหมักเนื้อ เช่น Salami และน้ำผลไม้ น้ำแอปเปิ้ลหมักซึ่งทำให้ เป็นกรดทำให้เกิดการเหลืรอดของเซลล์ *E. coli* O157 : H7 (Leyer et al., 1995)

2.8.3 *Yersinia enterocolitica*

ในสภาวะ stationary phase ของเชื้อ *Y. enterocolitica* สามารถเพิ่มเติมความต้านทานในสภาวะที่มีกรด แต่สามารถต้านทานได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Urea และจะกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์ Urease ซึ่งการย่อยสลายของ Urea จะให้แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ (Koning-Ward and Robins-Browne, 1995) เป็นต้น

2.8.4 *Campylobacter jejuni*

หลักฐานการบ่งชี้ว่า *Campylobacter* spp. ตอบสนองลดลงในช่วง stationary phase ในทำนองเดียวกับเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ความต้านทานของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ความต้านทานของเชื้อ *Cam. jejuni* ที่ได้รับความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส หรือได้รับออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นในช่วง exponential phase และตายในช่วงก่อน stationary phase ทันที (Kelly et al., 2001)

2.8.5 *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio cholerae*

Koga et al. (1999) กล่าวว่าเซลล์ขาดชีพของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถทนทานต่อกรดได้ ส่วนใน *V. cholerae* มีการศึกษาเพียงในหนูเท่านั้น แต่ในคนยังไม่มีผลความสามารถในการต้านทาน (Merrell et al., 2002)

2.8.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Suh et al. (1999) กล่าวว่ามีการกลายพันธุ์เพื่อสร้างความต้านทานความร้อนของเชื้อ *Ps. aeruginosa* ในสัตว์ทดลอง แต่การติดเชื้อในพืชและในอาหาร ไม่มีการเหลือรอดของเชื้อกลุ่มนี้

2.8.7 *Staphylococcus aureus*

Shebuski et al. (2000) ศึกษาถึงการเจริญที่มีผลจากการต้านทานความร้อนของเชื้อ *Staph. aureus* คือการเจริญของ *Staph. aureus* ที่ค่า a_w เท่ากับ 0.94 จะเพิ่มความสามารถในการทนร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส ในเชื้อ *Staph. epidermidis* จะสามารถสร้าง biofilm ได้เมื่อได้รับ Ethanol และเกลือ (Knobloch et al., 2001)

2.8.8 *Listeria monocytogenes*

การปรับปรุงเซลล์ขาดชีพของเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถปรับปรุงได้อย่างหลากหลายในอาหาร การตายเกิดขึ้นบางส่วนโดย Ethanol 5% กรด HCl ที่ pH 4.5-5.5 H_2O_2 ที่ 500 ppm หรือ NaCl 7% ในขณะที่ระยะ exponential Phase ของเชื้อสามารถป้องกันการตายได้ภายใน 1 ชั่วโมงเมื่อได้รับ Ethanol 11.5%, NaCl 25% H_2O_2 0.1% หรือ กรดที่ pH 3.5 (Lou and Yousef, 1997)

กระบวนการ heat shock ของเชื้อ *L. monocytogenes* ในระยะ log phase ในอาหารเหลวหรือในเนื้อบดมีผลทำให้เกิดความต้านทานต่ออุณหภูมิ (Farber and Brown, 1990 ; Jorgensen et al., 1999) ซึ่งความต้านทานต่อความร้อนจะขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญ pH และความเข้มข้นของ Lactic acid โดยเฉพาะความเข้มข้นของ Lactic acid นี้จะทำให้เกิดความต้านทานความร้อนได้มากที่สุด จึงทำให้การศึกษาเพิ่มเติมขึ้นมากมายเพื่อจะทำการควบคุมเชื้อ *L. monocytogenes* ให้ได้ ซึ่ง Barker และ Park (2001) ได้ทำการศึกษาว่าผลของหลายปัจจัยรวมกัน คือการใช้ Ethanol เป็นสารฆ่าเชื้อที่ pH ต่ำใช้กรดอินทรีย์ และแรงดันออสโมติกจึงจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes*

2.8.9 *Clostridium* spp.

Clostridium spp. ที่อุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส สามารถทำให้เกิดความต้านทานความร้อนของเชื้อ *Cl. perfringens* (Novak et al., 2001) และที่สำคัญสภาวะ heat shock สามารถเพิ่มความต้านทานความร้อนให้กับ *Cl. perfringens* ได้ถึง 10 สายพันธุ์ ในเนื้อวัว (Juneja et al., 2001)

2.9 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเซลล์จุลินทรีย์

2.9.1 ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.9.1.1 Agar เป็นสารที่เพิ่มความแข็งไม่ใช้สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น Polysaccharide ซึ่งแยกได้จากสาหร่าย (Marine algae) ใช้สำหรับเตรียมอาหารแข็ง (Solid media) สามารถละลายได้ที่ 100 องศาเซลเซียส และแข็งตัวที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสโดยทั่วไปใช้ที่ความเข้มข้น 1.5 %

2.9.1.2 Body fluids ส่วนของร่างกายที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกและส่งเสริมการเจริญของเชื้อบางชนิด โดยเฉพาะเชื้อที่ก่อโรค (pathogens) ได้แก่ Blood, Plasma , Serum, Bile และของเหลวอื่นๆ เนื่องจากมี growth factor และสารยับยั้งบางชนิดที่เชื้อไม่ต้องการ

2.9.1.3 Extracts เป็นสารสกัดจากเนื้อเยื่อของ Eucaryotic (Yeast ,beef muscle, liver, brain, heart) ใช้เป็นแหล่งกรดอะมิโน วิตามิน โคเอ็นไซม์

2.9.1.4 Selective agents คือสารที่เติมลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ สารที่ใช้ได้แก่ Crystal violet , brilliant green , Potassium tellurite, Bile salt , Sodium azide และ Antibiotic

2.9.1.5 Buffer มีหน้าที่รักษา pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ สารที่ใช้เป็น buffer ได้แก่ Sodium potassium phosphate, Calcium, 0.1 % Peptone ที่นิยมคือ Phosphate buffer

2.9.1.6 Reducing agent ช่วยกระตุ้นการเจริญโดยเข้าร่วมในปฏิกิริยา Oxidation-reduction มักใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม Anaerobe ที่ใช้บ่อยได้แก่ Cystine และ Thioglycollate เช่นในอาหาร Thioglycollate medium ซึ่งใช้ในการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนกับการเจริญเติบโต

2.9.1.7 pH Indicator เป็น Acid-base indicator นิยมเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Differential media เช่น Simmon Citrate agar , MacConkey agar , TSI เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อาหารแต่ละตัวจะมี Indicator ต่างชนิดกันตามความสามารถในการแตกตัวในช่วง pH ที่เหมาะสม

2.9.1.8 Peptones มาจากภาษากรีกแปลว่า การย่อย peptone เป็นส่วนผสมของ Polypeptides, peptides และ amino acid ที่สามารถละลายน้ำได้ วัตถุประสงค์สำหรับผลิต Peptones เช่น เนื่อนม (Casein), ธัญพืช (Soyameal) และเจลาตินจากนั้นนำมาย่อยโดยใช้กระบวนการ Enzymetic hydrolysis เช่นใช้ Peptic, papain เป็นต้น จากนั้นนำไปกรองและทำให้เข้มข้นแล้วนำไปกรองอีกครั้ง จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดย Spray drying สามารถแบ่งชนิดของ Peptones ได้ดังนี้

- Meat Peptones (Peptone from meat) คือ Peptone ที่ใช้เนื้อเยื่อจากสัตว์เป็นวัตถุดิบแล้วใช้เอนไซม์ Proteolytic enzymes ในการย่อย
- Soya peptones คือ peptone ที่ใช้พืชเป็นวัตถุดิบและใช้เอนไซม์ Papain ย่อย
- Casein peptones คือ peptone ที่ใช้นมหรือผลิตภัณฑ์นมเป็นวัตถุดิบ โดยใช้เอนไซม์pancreaticในการย่อย (สุทธิลักษณ์, 2550)

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและวัตถุประสงค์การใช้

ส่วนประกอบ	วัตถุประสงค์การใช้	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่
ส่วนประกอบหลัก		
Peptone/Peptide/Amino acid	- เป็นแหล่งไนโตรเจน	- ใช้ได้ทั้งหมด
1. Meat Infusion/Meat extract	- มีน้ำน้อย ใช้ละลาย ส่วนประกอบของ Peptide	
2. Peptone จาก meat	- มีน้ำมาก ใช้ละลาย ส่วนประกอบของ Peptide	
3. Peptone จาก casein	- ประกอบด้วย Tryptophan สูง	
4. Peptone จาก vegetable protein	- ประกอบด้วย Carbohydrate สูง	
Carbohydrate		
1. glucose	- เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน	- ใช้ได้ทั้งหมด
2. Other carbohydrate	- เป็นแหล่งพลังงานทั้งหมด เป็นแหล่งพลังงานเฉพาะที่จะทำให้วินิจฉัยปฏิกิริยาได้	- จุดประสงค์ใช้ในการวินิจฉัย ยืนยันชนิดเชื้อ
metal and mineral ที่สำคัญ		- ใช้ได้ทั้งหมด
1. Sodium		
2. Potassium		
3. Chlorine		
4. Phosphorus	- พบใน DNA RNA และใน Phospholipid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	
5. Sulphur	- พบใน amino acid cystine และ Methionine	
6. Calcium	- ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์คงตัว เป็นส่วนประกอบหลักของ Endospore	
7. Magnesium	- รักษาโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ไรโบโซม DNA และ RNA	

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	วัตถุประสงค์การใช้	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้
8. Iron	- เป็นส่วนประกอบของไซโตโครม มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ	
Horse blood /Sheep blood	- เป็นแหล่ง growth factor	- จุดประสงค์ใช้ในการวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อ
1. Oxalate		
2. Haemolysed		
Agar	- เป็นสารที่ทำให้เกิด gel	- Solid/semi-solid media
ส่วนประกอบรอง		
Essential metal and mineral	- จำเป็นต่อกระบวนการเผาผลาญของจุลินทรีย์	
1. Zine		
2. Manganese		
3. Bromine		
4. Boron		
5. Copper		
6. Cobalt		
7. Molydenum		
8. Vanadium		
9. Strontium		
Complex anion		
1. Phosphate	- รักษาความเป็นกรด-ด่าง	- ใช้ได้ทั้งหมด
2. Acetate		
3. Citrate		
4. specific amino acid		
Dye	- เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลง	- จุดประสงค์ใช้ในการวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อ
1. Phenol red		
2. Bromocresol purple		
Miscellaneous chemical		- Selective media
1. Antimicrobial		
2. Bile salt		

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	วัตถุประสงค์การใช้	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้
3. Dyes 4. Selenite 5. Tetrathionate 6. Tellurite 7. Azide Elective agent 1. Lactose 2. Ethanol 3. Vitamin 4. Thioglycolate 5. Cysteine 6. Peptic digest	- จำเป็นต่อการเจริญเฉพาะ จุลินทรีย์บางชนิด	- Elective media

ที่มา : Chris et al. (2005)

2.9.2 ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.9.2.1 Diluent ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ Diluent สามารถป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้รับสภาวะเครียดจากกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งจะรักษาเซลล์ไม่ให้ตาย แต่จะไม่ทำให้เพิ่มจำนวน เมื่อก่อนใช้น้ำเป็น Diluent ต่อมามีการใช้เกลือ (Saline) ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.85 % และมีกาเดียม 0.1 % Peptone ตามตารางที่ 2.5 จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ 0.1 % Peptone แล้วเติมเกลือ 0.85 % ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Maximum Recovery Diluent (MRD) อย่างไรก็ตาม อาจมีการเติม Detergent เช่น Tween 80 ลงไปใน Diluent เพื่อให้ลดแรงตึงผิวสำหรับการวิเคราะห์ เนื่องจากสปอร์ไม่ชอบน้ำ และนอกจากนี้ Diluent ที่มีการเติมกลูโคสลงไป 40 , 50 หรือ 60 % จะทำให้สามารถรักษา Osmotic Pressure ในการวิเคราะห์แยกยีสต์และรา

2.9.2.2 Liquid growth media หรือที่เรียกว่า broth เพื่อให้เซลล์ที่มีการเจริญเพิ่มขึ้นในระดับที่สามารถวิเคราะห์หาได้ ซึ่ง broth มักใช้ในขั้นตอนต้นของการวิเคราะห์ เช่นการใช้ Lactose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อตอนต้นในการวิเคราะห์ Salmonella เป็นต้น

2.9.2.3 Gel/Solid growth media agar จะสามารถทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็น gel ซึ่ง agar เป็นส่วนประกอบของ galactan ซึ่งจะเค็มลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1-2 % และบางครั้งอาจมีการเติม agar ลงไปในปริมาณที่น้อยกว่า 1 % เรียกว่า Semi-solid agar ซึ่งมักใช้ในการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเคลื่อนที่

2.9.2.4 General purpose growth media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม Selective agent เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต คือ Total Viable Count (TVC) หรือ Aerobic Plate Count (APC)

2.9.2.5 Enrichment media มักเป็นอาหารเหลวซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวนและเป็นอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายจากเชื้อประจำถิ่นในตัวอย่างที่วิเคราะห์อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แบ่งเป็น elective media ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารที่เฉพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายนั้นๆ สามารถใช้ได้แก่จุลินทรีย์อื่นๆ จะถูกขัดขวาง เช่น Ethanol เป็น elective agent สำหรับการเจริญของ Acetic acid bacteria และน้ำตาลแลคโตส สำหรับเป็น elective agent สำหรับการเจริญของยีสต์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์นมเสีย และอีกชนิดคือ selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารที่ยับยั้ง การคัดเลือกการเจริญของเชื้อที่แข่งขัน แต่ให้จุลินทรีย์เป้าหมายเจริญเติบโต เช่น แบคทีเรียหลายชนิดที่จะถูกยับยั้งโดย Sodium biselenite แต่เชื้อ Salmonella สามารถเจริญได้และ Potassium tellurite ใช้เป็น selective agent ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เชื้อ *Staph. aureus* การแยกของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แยกโดยใช้ pH เช่น Citric acid ใน Citric acid agar ใช้ในการวิเคราะห์แยก Fungi แยกโดยใช้ a_w หรือใช้ความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาล แยกโดยส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Nitrate โดยที่จุลินทรีย์ที่สามารถรีดิวซ์ Nitrate ไปเป็น Ammonia ได้ ใช้สารที่เป็น Reducing agent เช่น ใช้แยกแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน แยกโดยใช้ตัวยับยั้งที่สามารถหยุดกระบวนการที่จะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Sodium azide

2.9.2.6 Pre- Enrichment media จุลินทรีย์เมื่อผ่านกระบวนการผลิตอาหารจะทำให้เกิดเซลล์บาดเจ็บหรือถูกทำลาย และถ้านำเชื้อเหล่านี้มาวิเคราะห์โดยใช้ Selective media โดยตรง เซลล์นั้นจะตาย หรือไม่เจริญ วิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาจึงต้องมีขั้นตอนที่ทำให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ฟื้นคืนชีพขึ้นมาก่อนที่จะถูกนำมาคัดเลือกจาก Selective agent เช่น ในการวิเคราะห์เชื้อ Salmonella ต้องนำมาวิเคราะห์ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer Peptone water ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วย Selective broth

2.9.2.7 Diagnostic media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีที่มีคุณสมบัติเฉพาะ และสามารถวิเคราะห์หาพบได้ง่าย มีจุดประสงค์หลักเพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อ เพื่อการบ่งชี้ชนิดและสายพันธุ์ อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มักใช้การผลิตกรด

จากน้ำตาล เช่น กลูโคส ซูโครส แลคโตสและ pH Indicator ในการวิเคราะห์โดยการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีจาก pH ที่เปลี่ยนแปลงลดลง เช่น Violet Red Bile agar (VRBGA) ในการแยกการวิเคราะห์เชื้อที่อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ใช้ความแตกต่างของสารเคมีที่ทำให้เกิดสี ใช้สารประกอบที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เช่น Lecithinase, Proteinase, Haemolysin และ DNase เป็นต้น Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD) ประกอบด้วยสารยับยั้งเชื้อที่แข่งขันกับเชื้อเป้าหมายคือเชื้อ Salmonella และใช้ 5 ปฏิกิริยาที่สำคัญในการแยกคือ Xylose fermentation Lactose fermentation, Sucrose fermentation, Lysine decarboxylation และ การผลิต Hydrogen sulfide เพื่อใช้ในการแยกเชื้อ Salmonella ออกจากเชื้อ Shigella Providencia และ Edwardsiella

ปัจจุบันมีการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น MUG (4 - methylumbelliferol - β -D glucuronide) ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ซึ่งเชื้อ *E. coli* มีเอนไซม์ glucuronidase ซึ่งจะแยก MUG โดยผลิต 4-methylumbelliferone ที่จะทำให้เกิดการเรืองแสงโดยทำให้เกิดแสงสีเขียวในน้ำเงินภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต นอกจากนี้ยังมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเกตความแตกต่างของการเกิดสี ของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกว่า Chromogenic agar ซึ่งจะมีสารที่ทำให้เกิดสี โดยสังเกตความแตกต่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อในงานเพาะเชื้อเดียวกัน (Chris et. al, 2005)

2.10 วิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์ม

2.10.1 การวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยวิธี MPN (Feng et al ,2002)

โดยใช้ Lauryl Sulfate Tryptose เตรียมเป็นความเจือจางละ 3 หลอดหรือ 5 หลอด จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง Coliforms จะเจริญและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น และเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส และการวิเคราะห์ยืนยันผลใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวคือ Brilliant green Bile broth (BGLB) จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดย Ox bile และ Brilliant green จะยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียแกรมบวก Coliforms เมื่อใช้ Lactose จะให้กรด ทำให้อาหารขุ่นและเกิดแก๊ส

2.10.2 การวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

Feng et al , (2002) ใช้ Violet Red Bile agar (VRBA) โดยเทคนิคการ pour plate หรือ spread plate ลงบน VRBA นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ Coliforms จะใช้ Lactose เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดโดยสังเกตจากสีโคโลนีจะเป็นสีแดง โดยมี Neutral Red เป็น indicator และ Crystal violet และ Bile salt mixture เป็นตัวใช้สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

JETRO (2006) กล่าวถึงวิธีการวิเคราะห์ Coliforms โดยใช้อาหารแข็งอีกชนิดคือ DCLA โดยการ pour plate จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ Sodium citrate และ Sodium desoxycholate เป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก โดยที่ Coliforms จะใช้ Lactose เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด โดยสังเกตจากโคโลนีจะเป็นสีแดง โดยมี Neutral Red เป็น indicator

2.11 การทดลองเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์โดยวิธีต่างๆ เพื่อหาเซลล์บาดเจ็บ

นิรชาและคณะ (2539) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา *Salmonella* ที่เติมลงไปเพื่อให้เกิดการปนเปื้อนในถังแช่เยือกแข็งโดยใช้ *Salmonella* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sal. Weltevreden*, *Sal. Derby* และ *Sal. Typhimurium* แล้วทำการวิเคราะห์เชื้อมัดดังกล่าวด้วยวิธี Standard conventional Method, Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) พบว่าการ pre-enrichment เชื้อด้วย Lactose broth จะให้ผลการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้ดีกว่าการใช้ Buffer peptone water และในขั้นตอน Enrichment ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (Selective media) พบว่าการใช้ Tetrathionate broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จะให้ผลการตรวจพบ *Salmonella* ดีกว่าการใช้ Tetrathionate broth และ Selenite systine broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Ray et al. (1972) กล่าวว่าในตัวอย่างอาหารแช่แข็งที่มีเชื้อ *Sal. Anatum* เมื่อนำมาละลายอย่างช้าๆ ทำให้เกิดเซลล์บาดเจ็บมากกว่า 90% เซลล์บาดเจ็บจะถูกยับยั้งการเกิดโคโลนีบน Xylose-lysine-peptone agar ซึ่งมี 0.2% Sodium desoxycholate ซึ่งเป็น Selective medium แต่สามารถสร้างโคโลนีบน Xylose-lysine-peptone-agar ซึ่งไม่มีการเติม 0.2% Desoxycholate ลงไป และใน Tryptic soy broth ที่มีการเติม Yeast extract ลงไป 0.3% ก็จะสามารถซ่อมแซมเซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บจากกระบวนการผลิต ภายในเวลา 1-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้ และพบว่า Phosphate หรือ Citrate สามารถซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บได้ เพียงบางเซลล์เท่านั้นและเป็นจำนวนน้อยกว่า Tryptic soy broth + 3% yeast extract ซึ่งมี Peptone เป็นส่วนประกอบ

นอกจากนี้ Ray et al. (1972) ได้ทำการศึกษาถึง Suspension ของเชื้อ *E. coli* NCSM เมื่อนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ - 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาละลายในน้ำที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีอัตราการตายของ เชื้อ *E. coli* ประมาณ 50 % และไม่สามารถสร้างโคโลนีบน Trypticase soy agar (TSA) ซึ่งมี 0.3% Yeast extract (TSYA) ในขณะที่เซลล์ที่เหลือรอดบาดเจ็บถึง 90% และเซลล์เหล่านี้ไม่สามารถเจริญบน TSYA ที่มี 0.1% Desoxycholate ได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่า Phosphate ก็สามารถซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บได้บ้าง แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ phosphate

Warseck et al. (1973) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์โคลิฟอร์ม เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่บาดเจ็บจากการฆ่าเชื้อและการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อ *E. coli* 2 สายพันธุ์ พบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไป pour plate ลงบน Violet Red Bile agar (VRBA) หรือ Desoxycholate agar จะทำให้พบ *E. coli* มากกว่าการใช้เทคนิค pour plate โดยตรง โดยไม่ใช้ Tryptic soy broth

Joseph and Gary (1990) ทำการศึกษาค้นหาผลของการเติม Catalase หรือ Sodium pyruvate หรือ สารผสมระหว่าง Catalase และ Sodium pyruvate และ Acetic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Selective media) เช่น M-FC agar mT7 agar, M-Endo agar และ TGY agar พบว่า Catalase, Sodium pyruvate หรือสารผสมระหว่าง Catalase และ Sodium pyruvate มีผลทำให้ตรวจพบ Coliforms ตัวอย่างน้ำที่บาดเจ็บจากการเติมคลอรีนมากขึ้น โดยจะแตกต่างกันตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเติม Catalase ลงใน M-FC agar ทำให้พบโคลิฟอร์มจำนวนมากที่สุด การเติม Sodium pyruvate ลงใน mT7 agar ทำให้พบ Coliforms ปริมาณน้อยที่สุด เป็นต้น

Sheridan et al. (1994) พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Listeria* spp. โดยการใช้ Buffered peptone water ซึ่งเป็น non-selective media จะทำให้สามารถตรวจพบเซลล์ที่มีการบาดเจ็บของเชื้อ *Listeria* spp. ได้มากขึ้นและยังสามารถช่วยฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วย

Hernandez and Beuchat (1995) พบว่า การใช้ 0.1% Peptone water เป็น diluent ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC agar หรือ TGY agar หรือ DG18 ในการวิเคราะห์หาเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* ในตัวอย่างน้ำบูลเบอร์รี่ จะทำให้สามารถพบเชื้อยีสต์ชนิดนี้ได้มากขึ้น

Sophia et al. (1996) ได้ทำการศึกษาค้นหาผลของการเติม Sodium pyruvate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการพบเซลล์ *E. coli* O157:H7 ที่บาดเจ็บจากการใช้อุณหภูมิสูง โดยที่ทำการวิเคราะห์โดยการเติม 1% Sodium pyruvate ลงใน Plate Count agar (PCA) Tryptic soy agar (TSA) และ Phenol red sorbital agar (PhRSA) ด้วยเทคนิค spread plate พบว่าการเติม 1% Sodium pyruvate ลง Plate count agar สามารถตรวจพบเซลล์ *E. coli* O157: H7 ที่บาดเจ็บจากการใช้อุณหภูมิสูงมากกว่าอาหาร

Mian et al. (1997) ได้ทำการศึกษาค้นหาผลของการใช้ diluent ต่างกัน 7 ชนิดในการวิเคราะห์หาจำนวนยีสต์ โดยใช้ 0.85% NaCl 0.1% Sodium phosphate buffer pH 7.0, 0.1% Peptone 0.1% Yeast extract, 0.1% Peptone ใน 0.1M Sodium phosphate buffer pH 7.0 และ 0.1% malt extract และน้ำกลั่น (Distilled water) โดยเตรียม Suspension ของยีสต์ด้วยการใช้ diluent แต่ละชนิดแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วนำมา pour plate พบว่าการใช้น้ำกลั่นจะทำให้เซลล์ยีสต์ตายลงไปมากที่สุดและการใช้ 0.1% Peptone water ทำให้วิเคราะห์พบได้มากที่สุด

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุประสงค์

3.1.1 ใช้กึ่งกลางค่าและกึ่งกลางขาที่ได้มาจากการแปรรูปในโรงงานอาหารทะเลแช่เยือกแข็ง

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.2.1 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert	เยอรมัน
3.2.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Memmert	เยอรมัน
3.2.3 เครื่องชั่ง (Balance)	Sartorius	เยอรมัน
3.2.4 Stomacher	Sewart	อังกฤษ
3.2.5 เครื่องวัดความเข้มข้นเชื้อ	Densimate	ฝรั่งเศส
3.2.6 ตู้อบ (Oven)	Memmert	เยอรมัน
3.2.7 หม้อนึ่งมาเชื้อ (Autoclave)	Hirayama	ญี่ปุ่น
3.2.8 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Nikon	ญี่ปุ่น
3.2.9 ตู้แช่แข็ง (Freezer)	Sharp	ญี่ปุ่น
3.2.10 Microwave	Sharp	ญี่ปุ่น
3.2.11 Vortex mixer	Vortex genies 2	สหรัฐอเมริกา
3.2.12 Autopipette	Trefflab	สวิสเซอร์แลนด์
3.2.13 Forceps		
3.2.14 Spatula		
3.2.15 Loop และ Needle		
3.2.16 จานเพาะเชื้อ (Petridish)		
3.2.17 หลอดดัดก้ำก๊าซ (Durham tube)		
3.2.18 แผ่นสไลด์		
3.2.19 หลอดทดลองขนาด 16 x 125 mm screw cap		
3.2.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์		
3.2.21 กรรไกรตัดตัวอย่าง		
3.2.22 มีดสำหรับตัดตัวอย่าง		

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 Desoxycholate Lactose agar (DCLA)	Merck	เยอรมัน
3.3.2 EMB agar	Merck	เยอรมัน
3.3.3 Sodium pyruvate	Merck	เยอรมัน
3.3.4 Nutrient agar	Merck	เยอรมัน
3.3.5 Lactose broth	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.3.6 Tryptic soy agar (TSA)	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.3.7 Bacto peptone	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.3.8 Sodium chloride	Sharlau	สเปน
3.3.9 Peptone For meat	Merck	เยอรมัน
3.3.10 Lauryl Sulfate Tryptose broth	Sharlau	สเปน
3.3.11 Brilliant green Bile broth	Merck	เยอรมัน
3.3.12 API 20 E	Biomerieux	ฝรั่งเศส
3.3.11 Gram strain reagent		
3.3.12 Butterfield's phosphate buffered dilution water		

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

โรงงานผลิตอาหารทะเลแช่เยือกแข็ง ห้องปฏิบัติการกลางบริษัท คิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้งส์ จำกัด 1261 ถ.วิเชียร ไชยภูมิ ต.มหาชัย อ.เมือง จ.สมุทรสาคร 74000

3.5 วิธีการทดสอบ

3.5.1 การเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงานโดยวิธี MPN Method เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

3.5.1.1 ทำการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม ในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงานทุกวันเป็นเวลา 1 ปี โดยวิธี MPN Method ตามภาคผนวก ก

3.5.1.2 ทำการเก็บข้อมูลผลการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม และนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Median) และค่าน้อยที่สุด (Minimum)

3.5.1.3 ในขณะเดียวกันทำการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม ในวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงานเปรียบเทียบกับวิธี MPN Method ตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม 2549 กับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น (JETRO, 2006) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- 1) ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- 2) เติม Butterfield's phosphate buffered dilution water 225 มิลลิลิตร ลงในถุงตัวอย่างแล้วนำไปตีให้เข้ากัน โดย Stomacher เป็นเวลา 2 นาที
- 3) ทำการเจือจางโดยการปิเปตจากตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Butterfield's phosphate buffered dilution water 9 มิลลิลิตร จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} วางหลอดที่ทำการเจือจางแล้วที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 4) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} มาระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- 5) ทำการ pour plate ด้วย DCLA ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร ทำการหมักจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากันดี แล้วทิ้งให้ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวนานประมาณ 10 นาที
- 6) เททับผิวหน้าจานเพาะเชื้อด้วย DCLA ปริมาตร 3-4 มิลลิลิตร มาทับผิวหน้าจานเพาะเชื้อ DCLA ที่แข็งตัวแล้วเพื่อให้เกิดสภาวะ (Semi-Anaerobic condition) ในขณะบ่มแล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวอีกครั้ง
- 7) นำจานเพาะเชื้อที่แข็งตัวแล้วไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง
- 8) เมื่อครบเวลาบ่ม นำจานเพาะเชื้อออกจากตู้บ่ม มาสังเกตโคโลนีโดยที่โคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อ โคลิฟอร์มมีโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู
- 9) เลือกโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู มา 3 โคโลนี มา Streak ลงบน EMB agar เพื่อทำการยืนยันต่อว่าเป็นเชื้อ โคลิฟอร์มหรือไม่
- 10) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน
- 11) เมื่อครบเวลาบ่ม นำออกมาสังเกตโคโลนีของโคลิฟอร์มบน EMB agar โคลินีโคลิฟอร์มมีลักษณะสีม่วงน้ำเงิน หรือสีฟ้าเขียวหรือมีสีดำ ตรงกลางโคโลนีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen)
- 12) ทำการทดสอบยืนยันเชื้อ โคลิฟอร์ม โดยการทดสอบการใช้น้ำตาล Lactose โดยทำการถ่ายเชื้อจาก EMB agar ด้วย Loop ถ่ายเชื้อลงเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะสีม่วงน้ำเงิน หรือสีฟ้าเขียวหรือมีสีดำ ตรงกลางโคโลนีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen) ลงใน Lactose broth ซึ่งมี Durham tube อยู่ด้วยและนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มนำออกมาจากตู้บ่ม สังเกตและบันทึกผล ถ้า Lactose broth ขุ่นและเกิดแก๊สในหลอด Durham tube อ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น หรือขุ่นแต่ไม่เกิดแก๊ส ให้อ่านผลเป็นลบในขณะเดียวกันใช้

โคโลนีเดียวกับที่ทดสอบการใช้ Lactose นำมา streak บน Nutrient agar slant นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงนำมาทำการย้อมแกรม โดยเชื้อโคลิฟอร์มจะติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์และรูปร่างเป็นท่อน

3.5.2 การหาปริมาณที่เหมาะสมและศึกษาสายพันธุ์เชื้อโคลิฟอร์มเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

3.5.2.1 นำตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงานมาวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นตามข้อ 3.5.1.3 ทุกวันเป็นเวลา 4 เดือน

3.5.2.2 ทำการเก็บข้อมูลผลการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม และนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Median) และค่าน้อยที่สุด (Minimum) และนำมาวิเคราะห์ต่อเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์

3.5.2.3 ทำการศึกษาสายพันธุ์เชื้อ โคลิฟอร์มที่พบในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดโดยนำผลจากตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณที่เหมาะสมของเชื้อ โคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดมาวิเคราะห์ต่อเพื่อหาสายพันธุ์ของเชื้อ โคลิฟอร์มที่พบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป API 20 E ตามวิธีการในภาคผนวก ข

3.5.3 การทดลองดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างกุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

3.5.3.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลอง

1) ทำการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างกุ้งกุลาดำ หรือกุ้งกุลาดำขาวที่ผ่านกระบวนการปรุงสุกจากสายการผลิตแต่ละวัน เป็นผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่มีขนาด 71-90 ตัวต่อกิโลกรัม ครั้งละ 500 กรัม สำหรับการเตรียมตัวอย่างต่อครั้ง ครั้งละ 2 ตัวอย่างต่อวิธี ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

2) นำตัวอย่างที่ได้รับจากสายการผลิตแบ่งมา 200 กรัม มาทดสอบว่าตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ โคลิฟอร์ม โดยวิธี MPN Method ตามวิธีการในภาคผนวก ก และเก็บตัวอย่างส่วนที่เหลือ 300 กรัมในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3) ทำการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ โคลิฟอร์มให้มีความแตกต่างของเชื้อ โคลิฟอร์ม 3 ระดับดังนี้ ระดับที่ 1 แรก คือตัวอย่าง Unspike sample หรือ Negative sample คือตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ หรือไม่มีเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์ม ทั้งหมด 5 ชุด โดยทำการทดลองในแต่ละวิธีครั้งละ 2 ตัวอย่าง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ ระดับที่ 2 Low level คือตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ โคลิฟอร์มในช่วง 1×10^2 ถึง 3×10^2 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง ทั้งหมด 5 ชุด โดยทำการทดลองในแต่ละวิธีครั้งละ 2 ตัวอย่าง และทำซ้ำ

ทั้งหมด 3 ซ้ำ ระดับที่ 3 High level คือตัวอย่างที่มีมีการเติมเชื้อ โคลิฟอร์มในระดับสูงกว่าระดับ Low level ซึ่งอยู่ในช่วง 1×10^4 ถึง 3×10^4 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง ทั้งหมด 5 ชุด โดยทำการทดลองในแต่ละวิธีครั้งละ 2 ตัวอย่าง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ

4) นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3) มาทำการวิเคราะห์หาเชื้อ โคลิฟอร์มตามวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่ 1 ถึงวิธีดัดแปลงที่ 4 ในข้อ 3.5.3.2 – 3.5.3.6

3.5.3.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานของญี่ปุ่น (JETRO, 2006)

1) ทำการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์มตามข้อ 3.5.1.3

3.5.3.3 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงวิธีที่ 1 โดยทำการเปลี่ยนแปลง diluent เป็น 0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl (ดัดแปลงจาก Chris et al. , 2005)

1) ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

2) เติม 0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl 225 มิลลิลิตร ลงในถุง ตัวอย่างนำไปตีให้เข้ากัน โดย Stomacher เป็นเวลา 2 นาที

3) ทำการเจือจางโดยการปิเปตจากตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 9 มิลลิลิตรของ 0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} วางหลอดที่ทำการเจือจางแล้วที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

4) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} มาระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ลงในงานเพาะเชื้อ

5) ทำการ pour plate ด้วย DCLA ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร ทำการหมუნงานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากันดี แล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวนานประมาณ 10 นาที

6) เททับผิวหน้างานเพาะเชื้อด้วย DCLA ปริมาตร 3-4 มิลลิลิตร มาทับผิวหน้างานเพาะเชื้อ DCLA ที่แข็งตัวแล้วเพื่อให้เกิดสภาวะ (Semi-Anaerobic condition) ในขณะที่บ่มแล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวอีกครั้ง

7) นำงานเพาะเชื้อที่แข็งตัวแล้วไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง

8) เมื่อครบเวลาบ่มนำงานเพาะเชื้อมาสังเกตโคโลนี โดยที่โคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อ โคลิฟอร์มมีโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู

9) เลือกโคโลนีสีแดงหรือสีชมพูมา 3 โคโลนีมา Streak ลงบน EMB agar เพื่อทำการยืนยันต่อว่าเป็นเชื้อโคลิฟอร์มหรือไม่

10) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงโดยคว่ำจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน

11) เมื่อครบเวลาบ่มนำออกมาสังเกตโคโลนีของโคลิฟอร์มบน EMB agar มีลักษณะสีม่วงน้ำเงิน หรือสีฟ้าเขียวหรือมีสีดำ ตรงกลางโคโลนีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen)

12) ทำการทดสอบยืนยันเชื้อโคลิฟอร์มตามวิธีการข้อ 3.5.1.3 ข้อ 12)

3.5.3.4 วิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ 2 โดยทำการเติม 0.1 % Sodium pyruvate ลงใน DCLA (ดัดแปลงจาก Sophia et al., 1996)

1) ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

2) เติม Butterfield's phosphate buffered dilution water 225 มิลลิลิตร ลงในถุงตัวอย่างแล้วนำไปตีให้เข้ากัน โดย Stomacher เป็นเวลา 2 นาที

3) ทำการเจือจางโดยการปิเปตจากตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 9 มิลลิลิตรของ 0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} วางหลอดที่ทำการเจือจางแล้วที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

4) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} มา ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

5) ทำการ pour plate ด้วย DCLA ที่มีการเติม 0.1 % Sodium pyruvate ลงไปปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร ทำการหมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ผสมเข้ากันดี แล้วทิ้งให้ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวนานประมาณ 10 นาที

6) เททับผิวหน้างานเพาะเชื้อด้วย DCLA ที่มีการเติม 0.1 % Sodium pyruvate ลงไป 3-4 มิลลิลิตร มาเททับผิวหน้างานเพาะเชื้อ DCLA ที่แข็งตัวแล้วเพื่อให้เกิดสภาวะ (Semi-Anaerobic condition) ในขณะที่บ่มแล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวอีกครั้ง

7) นำงานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง

8) เมื่อครบเวลาบ่มนำงานเพาะเชื้อมาสังเกตโคโลนี โดยที่โคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อโคลิฟอร์มมีโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู

9) เลือกโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู มา 3 โคโลนี มา Streak ลงบน EMB agar เพื่อทำการยืนยันต่อว่าเป็นเชื้อโคลิฟอร์มหรือไม่

10) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงโดยคว่ำจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน

11) เมื่อครบเวลาบ่ม นำออกมาสังเกตโคโลนีของโคลิฟอร์มบน EMB agar มีลักษณะสีม่วงน้ำเงิน หรือสีฟ้าเขียว หรือมีสีดำตรงกลางโคโลนีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen)

12) ทำการทดสอบยืนยันเชื้อ โคลิฟอร์มตามวิธีการข้อ 3.5.1.3 ข้อ12)

3.5.3.5 วิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ 3 โดยการใช้ Butterfield's phosphate buffer เป็น diluent และ pour plate ด้วย TSA และ DCLA (ดัดแปลงจาก Feng et al. , 2002)

1) ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

2) เติม Butterfield's phosphate buffered dilution water 225 มิลลิลิตร ลงในถุงตัวอย่างแล้วนำไปตีให้เข้ากันโดย Stomacher เป็นเวลา 2 นาที

3) ทำการเจือจางโดยการปิเปตจากตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 9 มิลลิลิตรของ 0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} วางหลอดที่ทำการเจือจางแล้วที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

4) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} มา ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

5) ทำการ pour plate ด้วย TSA ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร ทำการหมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากันดีทิ้งให้แข็งตัวนานประมาณ 10 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6) เททับผิวหน้าจานเพาะเชื้อด้วย DCLA ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร มาเททับผิวหน้าจานเพาะเชื้อ DCLA ที่แข็งตัวแล้วเพื่อให้เกิดสภาวะ (Semi-Anaerobic condition) ในขณะบ่มแล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวอีกครั้ง

7) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง

8) เมื่อครบเวลาบ่มนำจานเพาะเชื้อ มาสังเกตโคโลนีโดยที่โคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อโคลิฟอร์มมีโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู

9) เลือกโคโลนีสีแดงหรือสีชมพูมา 3 โคโลนีมา Streak บน EMB agar เพื่อทำการยืนยันต่อว่าเป็นเชื้อโคลิฟอร์ม

10) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงโดยคว่ำจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน

11) เมื่อครบเวลาบ่มนำออกมาสังเกตโคโลนีของเชื้อโคลิฟอร์มบน EMB agar มีลักษณะสีม่วงน้ำเงิน หรือสีฟ้าเขียวหรือมีสีดำ ตรงกลางโคโลนีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen)

12) ทำการทดสอบยืนยันเชื้อโคลิฟอร์มตามวิธีการข้อ 3.5.1.3 ข้อ12)

3.5.3.6 วิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ 4 โดยการใช้ 0.1%

Peptone water + 0.85 % NaCl เป็น Diluent และ pour plate

ด้วย TSA และ DCLA (ดัดแปลงจาก Feng et al. , 2002 และ Chris et al , 2005)

1) ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

2) เติม 0.1 % Peptone water+ 0.85 % NaCl 225 มิลลิลิตร ลงในถุง ตัวอย่างนำไปตีให้เข้ากัน โดย Stomacher เป็นเวลา 2 นาที

3) ทำการเจือจางโดยการปิเปตจากตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 9 มิลลิลิตร ของ 0.1 % Peptone water+ 0.85 % NaCl จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} วางหลอดที่ทำการเจือจางแล้วที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

4) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} มา ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

5) ทำการ pour plate ด้วย TSA ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร ทำการหมუნจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากันดี แล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวนานประมาณ 10 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6) ทับผิวหน้าจานเพาะเชื้อด้วย DCLA ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร มาเททับผิวหน้าจานเพาะเชื้อ DCLA ที่แข็งตัวแล้วให้เกิดสภาวะ (Semi-Anaerobic condition) ในขณะบ่มแล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวอีกครั้ง

7) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง

8) เมื่อครบเวลาบ่มนำจานเพาะเชื้อ มาสังเกตโคโลนีโดยที่โคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อโคลิฟอร์มมีโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู

9) เลือกโคโลนีสีแดงหรือสีชมพู มา 3 โคโลนี มา Streak ลงบน EMB agar เพื่อทำการยืนยันต่อว่าเป็น เชื้อโคลิฟอร์มหรือไม่

10) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงโดยคว่ำจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน

11) เมื่อครบเวลาบ่ม นำออกมาสังเกตโคโลนีของโคลิฟอร์มบน EMB agar มีลักษณะสีม่วงน้ำเงิน หรือสีฟ้าเขียวหรือมีสีดำ ตรงกลางโคโลนีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen)

12) ทำการทดสอบยืนยันเชื้อโคลิฟอร์มตามวิธีการข้อ 3.5.1.3 ข้อ12)

ตารางที่ 3.1 สรุปความแตกต่างวิธีการทดลองเปรียบเทียบวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงต่างๆ

ขั้นตอนการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์				
	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	วิธีดัดแปลงที่ 1	วิธีดัดแปลงที่ 2	วิธีดัดแปลงที่ 3	วิธีดัดแปลงที่ 4
1. Diluent	Butterfield's phosphate buffer dilution water และวางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที	0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl และวางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที	Butterfield's phosphate buffer dilution water และวางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที	Butterfield's phosphate buffer dilution water และวางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที	0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl และวางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
2. การ pour plate	pour plate ด้วย DCLA และเททับด้วย DCLA แล้วบ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง	pour plate ด้วย DCLA และเททับด้วย DCLA แล้วบ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ± 2 ชั่วโมง	pour plate ด้วย DCLA ที่มี การ เติม 1 % Sodium pyruvate และเททับด้วย DCLA ที่มี การ เติม 1 % Sodium pyruvate แล้วบ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 20 ± 2 ชั่วโมง	pour plate ด้วย TSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย DCLA แล้วบ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 20 ± 2 ชั่วโมง	pour plate ด้วย TSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย DCLA แล้วบ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 20 ± 2 ชั่วโมง

3.5.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มของวิธีการ ดัดแปลง (ISO 16140 , 2003)

3.5.4.1 ทำการเลือกวิธีการวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีค่าเฉลี่ยของจำนวน โคโลนีใกล้เคียงกับสถานะจริงที่ทำการเติมลงไปมากที่สุดในข้อ 3.5.3.3-3.5.3.6 และนำมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่เลือกโดยวิธี Qualitative และรายงานผลเป็น Positive หรือ Negative ต่อตัวอย่าง 25 กรัม

1) ทำการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างกึ่งกุกูลาค่า หรือกึ่งกุกูลาขาวที่ผ่านกระบวนการปรุงสุกจากสายการผลิตแต่ละวัน เป็นผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่มีขนาด 71-90 ตัวต่อกิโลกรัม ครั้งละ 500 กรัม สำหรับการเตรียมตัวอย่างต่อครั้ง ครั้งละ 5 ตัวอย่างต่อวิธี ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

2) นำตัวอย่างที่ได้รับจากสายการผลิตแบ่งมา 200 กรัม มาทดสอบว่าตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ โคลิฟอร์มโดยวิธี MPN Method ตามวิธีการในภาคผนวก ก และเก็บตัวอย่างส่วนที่เหลือ 300 กรัม ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส

3) ทำการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบ ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์มให้มีความแตกต่างของเชื้อ โคลิฟอร์ม 3 ระดับ ดังนี้ ระดับที่ 1 แรก คือตัวอย่าง Unspike sample หรือ Negative sample คือตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ โคลิฟอร์ม ทั้งหมด 2 ชุด ๆ ละ 20 ตัวอย่าง ระดับที่ 2 Low level คือตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ โคลิฟอร์มอยู่ในช่วง 1×10^2 ถึง 3×10^2 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง ทั้งหมด 2 ชุด ๆ ละ 20 ตัวอย่าง และระดับที่ 3 High level คือตัวอย่างที่มีระดับของการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์มสูงกว่าระดับ Low level ซึ่งมีการเติมเชื้อ โคลิฟอร์มอยู่ในช่วง 1×10^4 ถึง 3×10^4 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง ทั้งหมด 2 ชุด ๆ ละ 20 ตัวอย่าง

4) ทำการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์ม โดยตัวอย่างชุดที่ 1 ของแต่ละระดับทำการวิเคราะห์ตามวิธีการมาตรฐานญี่ปุ่นในข้อ 3.5.1.3 ตัวอย่างชุดที่ 2 ของแต่ละระดับทำการวิเคราะห์ตามวิธีการดัดแปลงที่เลือกใช้

3.5.4.2 การคำนวณและการแปลผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
(ISO 16140 , 2003)

1) การใช้ Paired results เปรียบเทียบผลระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือกโดยการหาค่า Relative sensitivity (SE) หาค่าความไวของการทดสอบคือความสามารถของวิธีที่เป็นทางเลือกในการตรวจพบเชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างที่ตรวจพบโดยใช้วิธีมาตรฐาน ซึ่งหาได้จากสูตร $SE = (PA/+N) \times 100 \%$

- โดยที่ PA คือ Positive agreement ค่าที่ให้ผลบวกทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก

- +N คือจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน

หาค่า Relative specificity (SP) คือค่าความจำเพาะของการทดสอบคือความสามารถของวิธีที่เป็นทางเลือกในการตรวจไม่พบเชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ โดยวิธีมาตรฐาน

ซึ่งหาได้จากสูตร $SP = (NA/N) \times 100\%$

- โดยที่ NA คือ Negative agreement ค่าที่ให้ผลลบทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก

- N คือจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธีมาตรฐาน

หาค่า Relative accuracy (AC) คือระดับของความเหมือนกันจากผลการทดสอบโดยวิธีมาตรฐานและผลการทดสอบโดยวิธีที่เป็นทางเลือกในตัวอย่างที่เหมือนกัน

ซึ่งหาได้จากสูตร $AC = ((PA+NA)/N) \times 100\%$ เมื่อ N คือจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด

2) การหานัยสำคัญของความแตกต่าง (Significant Difference) โดยใช้สูตร

$$X^2 = \frac{(|a-b|-1)^2}{a+b}$$

a = ผลบวกปลอมหรือผลบวกที่เบี่ยงเบนไปคือกรณีที่วิธีมาตรฐานในผลลบแต่วิธีที่เป็นทางเลือกให้ผลทางบวก

b = ผลลบปลอมหรือผลลบที่เบี่ยงเบนไป คือ กรณีที่วิธีมาตรฐานให้ผลบวกแต่วิธีที่เป็นทางเลือกให้ผลลบ

ซึ่งกรณีที่ค่า X^2 มากกว่า 3.84 แสดงว่าอัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น = 0.05

3) การหาค่า Relative detection level โดยการเตรียมตัวอย่างดังนี้

ระดับที่ 1 คือระดับที่ไม่มีอาการทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม (Negative sample)

ระดับที่ 2 ระดับนี้ ทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม 10 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง

ระดับที่ 3 ระดับนี้ ทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม 20 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง

ระดับที่ 4 ระดับนี้ ทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม 25 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง

ระดับที่ 5 ระดับนี้ ทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม 30 CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง

ทำการทดสอบทั้งระดับ 5 ระดับ ระดับละ 6 ซ้ำ โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบวิธีมาตรฐาน ญี่ปุ่นและวิธีทางเลือกคือวิธีตัดแปลงที่เลือกใช้ และใช้เกณฑ์การตัดสินใจช่วงของค่า Relative detection level โดยการเลือกช่วงการปนเปื้อนที่อยู่ระหว่างระดับการปนเปื้อน 2 ระดับคือ น้อยกว่าและมากกว่า 50% ของ detection level โดยวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก

3.5.5 การทดลองวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นและวิธีที่ ดัดแปลงต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

3.5.5.1 เตรียมตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างกึ่งกุดาคำ หรือกึ่งกุดาขาวที่ผ่านกระบวนการปรุงสุกจากสายการผลิตแต่ละวัน เป็นผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่มีขนาด 71-90 ตัวต่อ กิโลกรัม ครั้งละ 500 กรัม สำหรับการเตรียมตัวอย่างต่อครั้ง ครั้งละ 7 ตัวอย่างต่อวิธี ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง

3.5.5.2 นำตัวอย่างที่ได้รับจากสายการผลิตแบ่งมา 180 กรัม มาทดสอบว่าตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN Method ตามวิธีการในภาคผนวก ก และเก็บตัวอย่างส่วนที่เหลือ 420 กรัม ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.5.5.3 ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการเติมเชื้อโคลิฟอร์มให้ตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้อ *E.coli* ระดับความเข้มข้น $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$ แบ่งตัวอย่างเป็นถุง ถุงละ 30 กรัม ปิดปากถุงให้สนิท นำไปเก็บในตู้ที่ตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส โดยวางเรียงกันในแนวอนไม่ให้ซ้อนกัน เก็บไว้เป็นเวลา 7 14 21 28 35 42 50 วันตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.5.5.4 นำตัวอย่างกึ่งต้มที่มีการเติมเชื้อ *E.coli* หลังจากการเก็บรักษา ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ตามข้อ 3.5.5.3 ไปวิเคราะห์หาเชื้อโคลิฟอร์มที่บาดเจ็บหรือหาอัตราการตายของเชื้อโคลิฟอร์ม โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นและวิธีที่ทำการดัดแปลงที่เลือกใช้

3.5.5.5 วางแผนการทดลองแบบ RCBD วิเคราะห์สถิติโดยโปรแกรม SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.5.5.6 นำข้อมูลจากการผลการวิเคราะห์หาโคลิฟอร์มทั้งวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่เลือกใช้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์บาดเจ็บ (% Injured cell) ดังนี้

1) นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.5.3 มาทำการวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นตามวิธีการในข้อ 3.5.1.3 แต่เพิ่มขั้นตอนในการ pour plate ด้วย TSA ไปพร้อมกับการ pour plate ด้วย DCLA เพื่อหาปริมาณโคลิฟอร์มหน่วยเป็น CFU/กรัม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Non selective agar

2) นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.5.3 มาทำการวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่เลือกใช้ แต่เพิ่มขั้นตอนในการ pour plate ด้วย TSA ไปพร้อมกับการ pour plate ด้วย DCLA เพื่อหาปริมาณโคลิฟอร์มหน่วยเป็น CFU/กรัม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Non selective agar

3) นำมาคำนวณหาเซลล์บาดเจ็บของวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่เลือกใช้ โดยหาผลต่างของปริมาณโคลิฟอร์มจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Non selective agar กับปริมาณของโคลิฟอร์มจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Selective agar (DCLA) หน่วยเป็น CFU/กรัม เทียบกับปริมาณ โคลิฟอร์มจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Non selective agar (TSA) แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ และคำนวณโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Injured cell} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อจาก Non selective agar} - \text{ปริมาณเชื้อจาก Selective agar}}{\text{ปริมาณเชื้อจาก Non selective agar}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

4.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุบักุงสดที่รับเข้าโรงงานโดยวิธี MPN Method เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

จากการสุ่มตัวอย่างวัตถุบักุงสดที่รับเข้าในโรงงานมาตรวจสอบเชื้อโคลิฟอร์ม ด้วยวิธี MPN Method โดยเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม 2549 ถึงเดือนธันวาคม 2549 ในตัวอย่างทั้งหมด 267 ตัวอย่าง พบเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดคิดเป็น 40.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำผลการพบเชื้อโคลิฟอร์มมาวิเคราะห์ โดยใช้สถิติในการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Medium) และค่าน้อยที่สุด (Minimum) ซึ่งได้ผลการทดลอง ตามตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในวัตถุบักุงสดที่รับเข้าในโรงงานโดยวิธี MPN Method พบที่ระดับต่ำสุดคือ 3.0 MPN/กรัม และระดับกลางพบที่ 9.2 MPN/กรัม ที่พบระดับสูงที่สุดคือ > 1,100 MPN/กรัม ซึ่งในช่วงเดือนมีนาคมจนถึงเดือนกรกฎาคม พบเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณมาก และในเดือนมีนาคมพบโคลิฟอร์มมากที่สุดคิดเป็น 57.1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในเดือนมีนาคมเป็นช่วงฤดูร้อน ไปจนถึงเดือนกรกฎาคมซึ่งเป็นช่วงต้นฤดูฝน เป็นช่วงที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ 30-35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงาน โดยวิธี
MPN Method ตั้งแต่เดือนมกราคม 2549 ถึง ธันวาคม 2549

เดือน	จำนวนตัวอย่าง ที่เช็คทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ที่ พบ โคลิฟอร์ม	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่พบ (MPN/ กรัม)		
			Maximum	Median	Minimum
มกราคม	12	33.3	120	9.2	3.0
กุมภาพันธ์	15	40.0	1100	9.2	3.0
มีนาคม	14	57.1	>1100	9.2	3.0
เมษายน	28	53.6	>1100	9.2	3.0
พฤษภาคม	20	40.0	1100	9.2	3.0
มิถุนายน	16	43.8	>1100	75	9.2
กรกฎาคม	14	42.9	1100	75	11.0
สิงหาคม	22	27.3	240	9.2	3.6
กันยายน	12	33.3	93	15	3.6
ตุลาคม	43	32.6	290	15	3.6
พฤศจิกายน	31	38.7	460	38	3.0
ธันวาคม	40	37.5	240	3.6	3.0
รวม	267	40.1			

ตารางที่ 4.2 การศึกษาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุดิบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับวิธี MPN Method ตั้งแต่เดือนสิงหาคม- ธันวาคม 2549

เดือน	จำนวนตัวอย่างที่เช็คทั้งหมด	ผลวิเคราะห์โคลิฟอร์ม				เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ผล ตรงกัน ทั้ง 2 วิธี
		MPN Method		วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น		
		ผลวิเคราะห์ (MPN/กรัม)	จำนวน ตัวอย่าง (ตัวอย่าง)	ผลวิเคราะห์ (Negative / Positive/25กรัม)	จำนวน ตัวอย่าง (ตัวอย่าง)	
สิงหาคม	135	<3.0	69	Negative	69	100.0
		3.0 - 36	63	Positive	26	41.3
		93-240	3	Positive	3	100.0
กันยายน	75	<3.0	59	Negative	59	100.0
		3.0-23	15	Positive	4	26.7
		93	1	Positive	1	100.0
ตุลาคม	30	<3.0	6	Negative	6	100.0
		3.0-38	21	Positive	8	38.1
		93-290	3	Positive	3	100.0
พฤศจิกายน	20	<3.0	10	Negative	10	100.0
		3.0-23	8	Positive	3	37.5
		93 - 460	2	Positive	2	100.0
ธันวาคม	24	<3.0	14	Negative	14	100.0
		3.0-23	10	Positive	4	40.0
		93-240	2	Positive	2	100.0

ขณะเดียวกันในเดือนสิงหาคม 2549 ถึงเดือนธันวาคม 2549 เมื่อนำตัวอย่างมาทดสอบหาปริมาณ เชื้อโคลิฟอร์มเปรียบเทียบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น เปรียบเทียบกับวิธี MPN Method พบว่าทุกๆ เดือน ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นจะตรวจไม่พบโดยวิธี MPN Method ด้วย ในเดือนสิงหาคมวิเคราะห์ทั้งหมด 135 ตัวอย่าง ให้ผลไม่พบเชื้อโคลิฟอร์มเหมือนกันทั้งวิธี MPN Method และวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นทั้งหมด 69 ตัวอย่าง และพบโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN

Method ในช่วง 3.0 – 36 MPN/กรัม 63 ตัวอย่าง ในขณะที่การวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเพียง 26 ตัวอย่างซึ่งคิดเป็น 41.3 เปอร์เซ็นต์ในช่วงที่พบ 93-240 MPN/กรัม จึงจะพบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคมก็เช่นเดียวกันกรณีที่ตัวอย่างไม่พบโคลิฟอร์มก็จะไม่พบทั้งวิธี และช่วงที่พบโคลิฟอร์ม 3.0 - 38 MPN/กรัม จะพบโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และช่วงที่พบโคลิฟอร์มตั้งแต่ 93 MPN/กรัม ขึ้นไปจึงพบโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองแสดงตามตารางที่ 4.2 ดังนั้นจะเห็นว่าการวิเคราะห์โดยวิธี MPN Method แม้ว่าจะมีเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณน้อยก็สามารถตรวจพบได้ ซึ่งต่างกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นจะตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์ม เมื่อมีการปนเปื้อนในปริมาณมาก ซึ่งในที่นี้ต้องมีปริมาณอย่างน้อยถึง 93 MPN/กรัม จึงจะตรวจพบเนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN Method มีการใช้ Lauryl sulfate Tryptose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เซลล์บาดเจ็บของเชื้อจุลินทรีย์แข็งแรงขึ้นมากก่อนที่จะถูกนำมาคัดเลือก กรณีที่ตัวอย่างผ่านกระบวนการผลิตจะทำให้ตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มได้น้อยลง ซึ่งในขั้นตอนการขนส่งกึ่งสดมายังโรงงาน กึ่งสดจะผ่านการล้างด้วยน้ำที่มีคลอรีนมา ทำให้มีเชื้อบางส่วนถูกทำลาย และการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นทำให้พบโคลิฟอร์มน้อยกว่าวิธี MPN Method ดังนั้นวิธีนี้เมื่อนำไปใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการผลิตหลายขั้นตอน อาจไม่เหมาะสม แต่ทางประเทศญี่ปุ่นยังยืนยันให้ใช้วิธีนี้ แต่ในการตรวจสอบเพื่อทำการประกันคุณภาพหากมีการใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ หรือความไวของการวิเคราะห์มากจะทำให้สามารถประกันภาพได้ดีมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์ขึ้นเพื่อให้การตรวจสอบมีความเชื่อมั่นว่ามีความจำเพาะ ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

4.2 ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมและศึกษาสายพันธุ์เชื้อโคลิฟอร์มเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

เชื้อโคลิฟอร์มเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น จากการวิเคราะห์หาเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุดิบกึ่งสดที่รับเข้าในโรงงาน โดยวิธีการมาตรฐานญี่ปุ่นเพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนที่จะนำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อทดลองตามตารางที่ 4.3 จากการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบกึ่งสดทุกวันเป็นระยะเวลา 4 เดือนตั้งแต่เดือน เมษายนถึงเดือนกรกฎาคม 2550 นำผลมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้สถิติในการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Median) และค่าน้อยที่สุด (Minimum) พบว่าปริมาณที่พบค่าที่สุดคือ 1.60 ถึง 1.90 Log₁₀ CFU/กรัม หรือประมาณ 2 Log₁₀ CFU/กรัม ระดับกลางพบที่ 1.87 ถึง 2.16 Log₁₀ CFU/กรัม และระดับสูงพบที่ 2.43 ถึง 4.30 Log₁₀ CFU/กรัม ซึ่งในเดือนเมษายนพบเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณมาก

ที่สุด เนื่องจากเป็นช่วงฤดูร้อนที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ 30-35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 หาปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น ตั้งแต่เดือน เมษายน- กรกฎาคม 2550

เดือน	ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์ม (Log_{10} CFU/กรัม)		
	Maximum	Median	Minimum
เมษายน	4.30	2.16	1.90
พฤษภาคม	2.43	1.87	1.60
มิถุนายน	2.52	2.08	1.60
กรกฎาคม	3.82	1.95	1.60

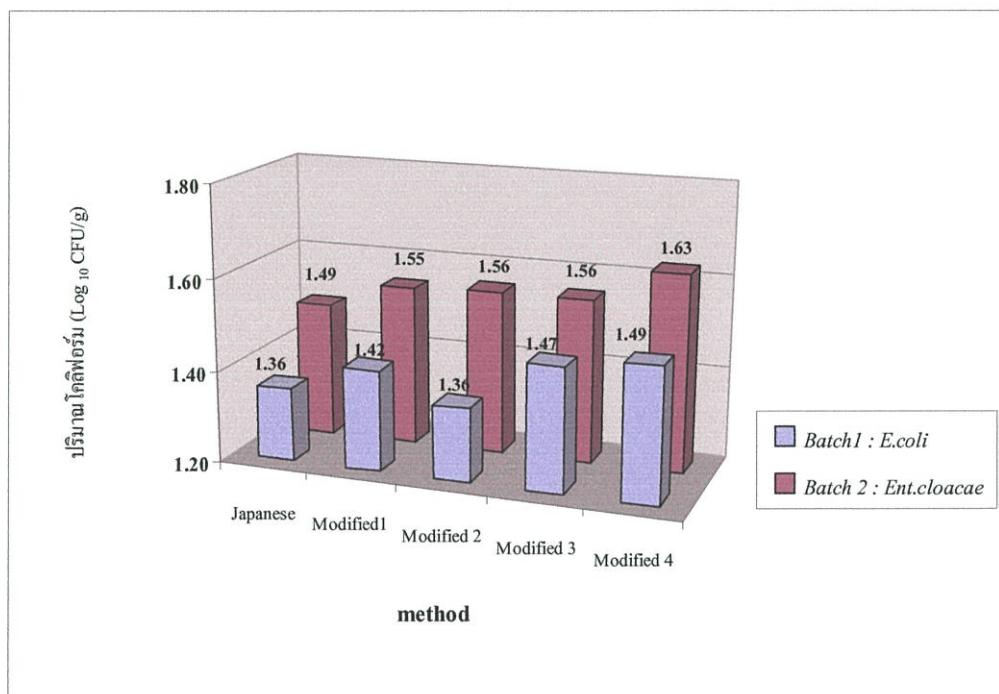
การเลือกปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดลองเลือกปริมาณที่พบจริงในระดับต่ำที่ 2 Log_{10} CFU/กรัม และระดับสูงที่ 4 Log_{10} CFU/กรัม ซึ่งเป็นระดับที่เกิดอันตรายสูงที่สุดซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการตรวจยืนยัน (Validation) กระบวนการว่าสามารถลดอันตรายให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยหรือไม่และป้องกันความเสี่ยงของการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจมาจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น ความไม่สะอาดของอุปกรณ์การผลิต สุขลักษณะของพนักงาน เป็นต้น

ดังนั้นจึงสรุปว่าปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่เหมาะสมจะใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 2 ระดับ คือ 2 Log_{10} CFU/กรัม และ 4 Log_{10} CFU/กรัม

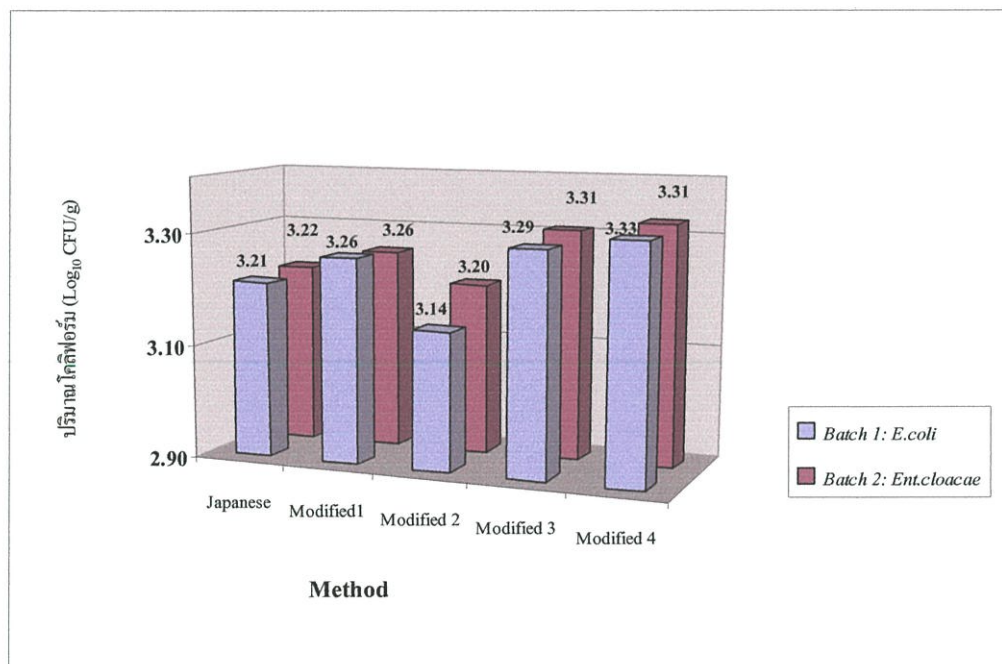
จากการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อโคลิฟอร์ม โดยใช้ชุดทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป API 20 E พบว่าจากการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นในตัวอย่างวัตถุคิบกึ่งสด ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์พบสายพันธุ์ *E. coli* 4 ตัวอย่างคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์และพบสายพันธุ์ *Ent. cloacae* 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาสายพันธุ์เพื่อนำมาเป็นข้อมูลเพื่อเลือกสายพันธุ์เชื้อ จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาทำการเตรียมตัวอย่างในการทดลองเปรียบเทียบการคัดแปลงวิธีการวิเคราะห์ และใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น และวิธีที่ดัดแปลงขึ้น

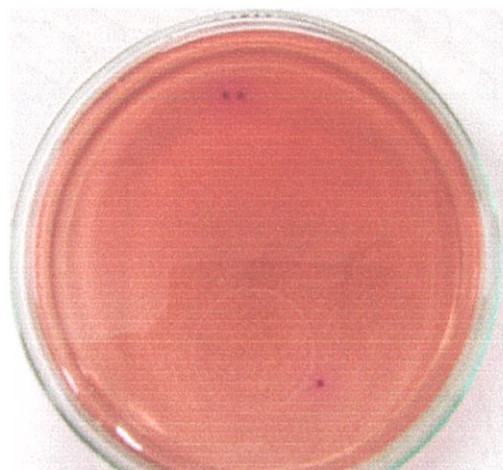
จากผลการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงทั้ง 4 วิธี โดยแบ่งเป็น 3 ระดับให้ผลดังนี้คือ ในระดับที่ไม่มีการเติมเชื้อ (Unspike sample) ซึ่งการทดสอบพบว่าทั้งวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงให้ผลไม่ต่างกันคือไม่พบ ซึ่งพบว่าไม่มีการเกิด False Positive ส่วนตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อทั้งระดับต่ำ (Low level) และระดับสูง (High level) พบว่าปริมาณการพบเชื้อโคลิฟอร์มทั้ง 2 ชุดคือชุดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *E. coli* วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 1 และวิธีดัดแปลงที่ 2 ($P > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 3 และวิธีดัดแปลงที่ 4 ($P \leq 0.05$) วิธีดัดแปลงที่ 1 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 3 และวิธีดัดแปลงที่ 4 ($P > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 2 ($P \leq 0.05$) ส่วนชุดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Ent. cloacae* วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 1 วิธีดัดแปลงที่ 2 และวิธีดัดแปลงที่ 3 ($P > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 4 ($P \leq 0.05$) และแนวโน้มปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีดัดแปลงวิธีที่ 4 สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงทั้งหมดและวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นสามารถเห็นโคโลนีของโคลิฟอร์มชัดเจนมากขึ้น เนื่องจากวิธีดัดแปลงที่ 4 มีการใช้ 0.1 % Peptone water+ 0.85 % NaCl เป็น Diluent ซึ่งมี Peptone ช่วยในการฟื้นฟู ซ่อมแซมเซลล์ที่เป็นบาดเจ็บ และยังมีการ pour plate ด้วย TSA ก่อนแล้วจึงเททับด้วย DCLA จึงทำให้โคลิฟอร์มสามารถสร้างโคโลนีที่ใหญ่ขึ้นชัดเจนขึ้น ซึ่งเป็นไปทางเดียวกับการทดลองของ Warseck และคณะ (1973) ซึ่งปริมาณเซลล์ที่บาดเจ็บจากการฆ่าเชื้อและการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อ *E. coli* 2 สายพันธุ์ พบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไป pour plate ลงบน Violet Red Bile agar (VRBA) จะทำให้พบ *E. coli* มากกว่าการใช้เทคนิค pour plate โดยตรงโดยไม่ใช้ Tryptic soy broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเสริมที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อเหมือน TSA ทำให้ผู้วิเคราะห์มีความมั่นใจในการอ่านมากขึ้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น ตามภาพที่ 4.1, 4.2 4.3 และ 4.4 ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีดังกล่าวนี้ มาใช้ในการวิเคราะห์แทนวิธีการมาตรฐานญี่ปุ่นได้ แต่ต้องนำวิธีการที่เลือกมาทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีก่อนนำมาใช้วิเคราะห์จริงในโรงงาน



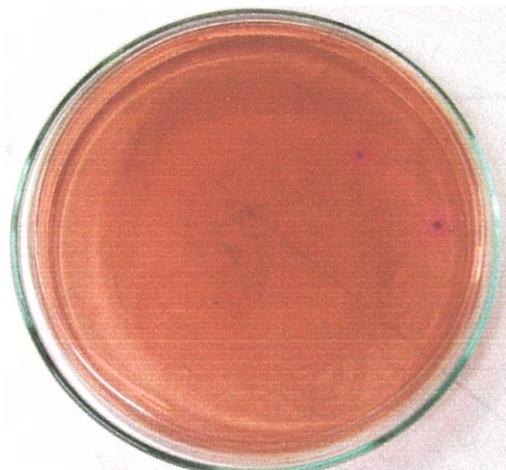
ภาพที่ 4.1 ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม (Log₁₀ CFU/กรัม) โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลง ทั้ง 4 วิธีที่ระดับ Low level



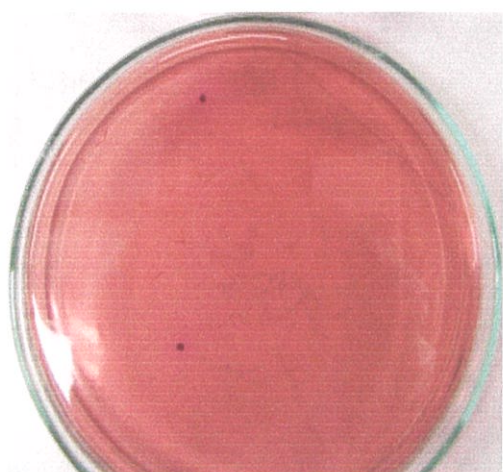
ภาพที่ 4.2 ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม (Log₁₀ CFU/กรัม) โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลง ทั้ง 4 วิธีที่ระดับ High level



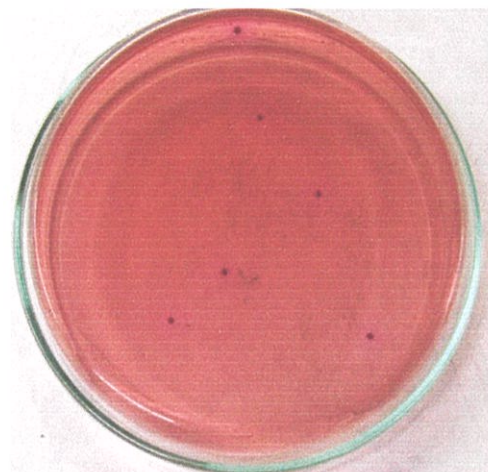
(ก)



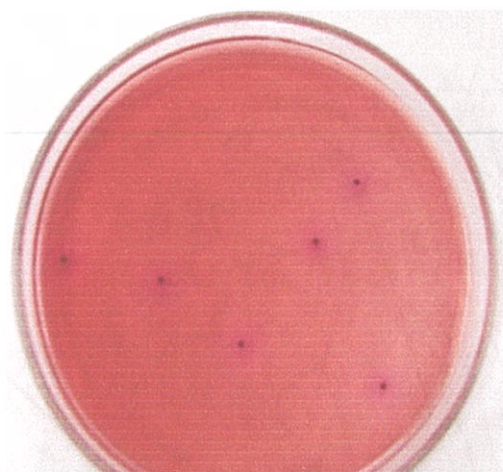
(ข)



(ค)



(ง)

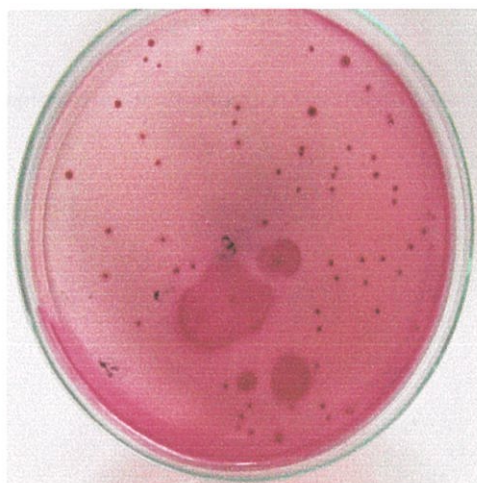


(จ)

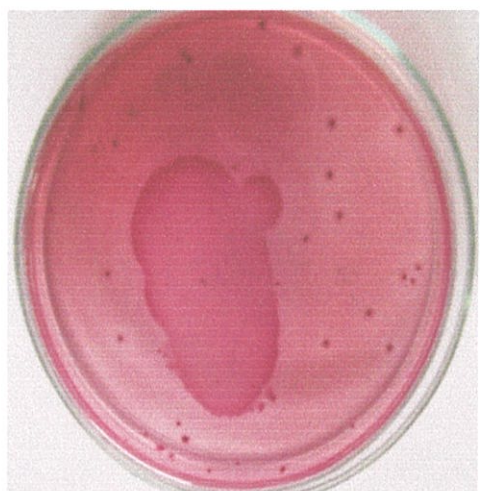
ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีเชื้อโคลิฟอร์มบนอาหาร DCLA ที่ระดับ Low level โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น
 (ก) วิธีดัดแปลงที่ 1 (ข) วิธีดัดแปลงที่ 2 (ค) วิธีดัดแปลงที่ 3 (ง) และวิธีดัดแปลงที่ 4 (จ)



(ก)



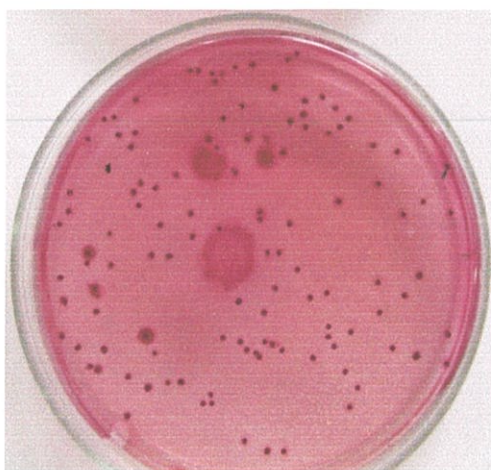
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีเชื้อโคลิฟอร์มบนอาหาร DCLA ที่ระดับ High level โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น
(ก) วิธีดัดแปลงที่ 1 (ข) วิธีดัดแปลงที่ 2 (ค) วิธีดัดแปลงที่ 3 (ง) และวิธีดัดแปลงที่ 4 (จ)

4.4 ผลการคำนวณค่า Parameter ต่างๆ ของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของวิธีดัดแปลงที่ 4 กับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ 20 ตัวอย่างต่อวิธี และทำการเติมเชื้อ *E. coli* ทั้งที่ระดับต่ำ (1×10^2 ถึง 3×10^2 Log₁₀ CFU/25 กรัม ตัวอย่าง) และระดับสูง (1×10^4 ถึง 3×10^4 Log₁₀ CFU/ 25 กรัม) พบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ (Unspiked sample) การวิเคราะห์ทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลงที่ 4 ทั้ง 20 ตัวอย่างไม่พบโคลิฟอร์มทั้ง 2 วิธี ซึ่งแสดงว่าวิธีดัดแปลงไม่พบผลบวกปลอม (False Positive) เนื่องจากไม่มีโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นโคลิฟอร์มเกิดขึ้น ที่ระดับที่มีการเติมเชื้อระดับต่ำ (Low level) พบว่าทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างคือ วิเคราะห์ทั้งหมด 20 ตัวอย่างพบโคลิฟอร์ม 19 ตัวอย่าง ไม่พบ 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลลบปลอม (False Negative) อาจเนื่องมาจากปริมาณโคลิฟอร์มที่มีอยู่น้อยระดับที่วิธีทั้งสองสามารถตรวจพบหรือที่เรียกว่า Relative detection level และที่ระดับที่มีการเติมเชื้อระดับสูง (High level) พบว่าทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างเช่นกันคือ จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 พบโคลิฟอร์มทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ทั้ง 2 วิธี และคำนวณค่า X^2 ได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.84 แสดงว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 และวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05 ($P > 0.05$) จากการหาค่า Relative detection level พบว่าอยู่ที่น้อยกว่าระดับการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์ม 25 CFU/ 25 กรัมตัวอย่าง ถึงมากกว่า 30 CFU/ 25 กรัมตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4.4 นอกจากนี้วิธีดัดแปลงที่ยังมี ค่าความไว (Sensitivity) ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity) เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการคำนวณการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โคลิฟอร์มของวิธีดัดแปลงที่ 4

สถานะของตัวอย่าง	ผลการทดสอบ					
	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น			วิธีดัดแปลงที่ 4		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Unspiked Sample	0	20	20	0	20	20
Low level	19	1	20	19	1	20
High level	20	0	20	20	0	20
Total	39	21	60	39	21	60
					Grand Total	120

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์สรุปได้ว่าทุกระดับของการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี วิธีการที่ดัดแปลงขึ้นไม่มีความแตกต่างจากวิธีที่เป็นมาตรฐานของญี่ปุ่นซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานระดับชาติที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องมาแล้ว ดังนั้นถ้าวิธีที่ดัดแปลงขึ้นไม่มีความแตกต่างจากวิธีมาตรฐานก็สามารถนำวิธีการที่ดัดแปลงนี้มาใช้ในการทดสอบตัวอย่างกุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็งได้จริง

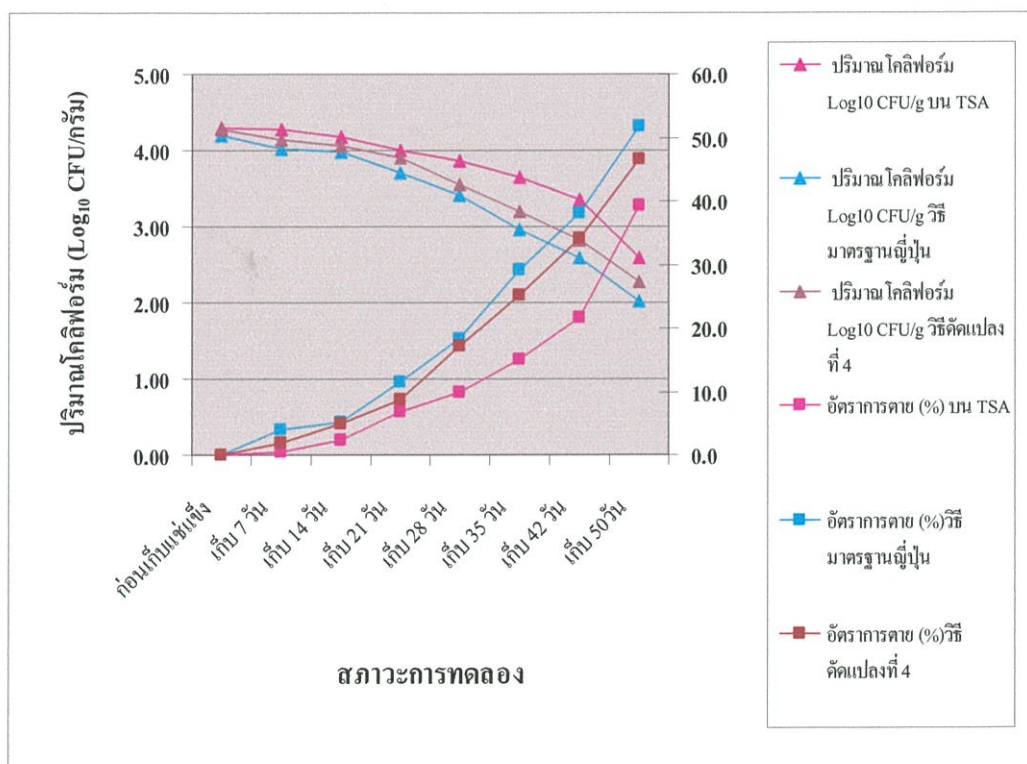
ตารางที่ 4.5 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

Parameter	Reference Method (วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น)			In-House Method (วิธีดัดแปลงที่ 4)		
	Low Level	High Level	Overall	Low Level	High Level	Overall
False Negative (%)	5.0	0.0	5.0	5.0	0.0	5.0
False Positive (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sensitivity (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Relative Accuracy (%)	-	-	-	100.0	100.0	100.0
Specificity (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์โคลิฟอร์ม โดยวิธีมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่ 4 ต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

หลังจากการทดลองนำตัวอย่างกุ้งที่ผ่านกระบวนการต้มฆ่าเชื้อที่มีการเติมเชื้อ *E. coli* ปริมาณ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$ ไปเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 14 21 28 35 42 และ 50 วัน จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่รอดชีวิตด้วยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่ 4 เทียบกับการตรวจหาเชื้อโดยใช้ Non selective agar (TSA) โดยตรง โดยทำการตรวจหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนการแช่แข็ง (0 วัน) ควบคุมไปด้วย พบว่าการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงที่ 4 พบว่าตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 14 มีการลดลงของโคลิฟอร์มอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงทำให้มีอัตราการตายของเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นระยะเวลานานขึ้นคือในวันที่ 21 28 35 42 และ 50 วัน ปริมาณเชื้อจะมีอัตราการลดลงอย่างชัดเจนและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยที่ในวันที่ 35 วิธีการวิเคราะห์วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเชื้อลดปริมาณลงประมาณ $1.23 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$ และมี

อัตราการตายมากถึง 29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธีดัดแปลงที่ 4 พบโคลิฟอร์มลดปริมาณลง 1.08 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายลดลง 25 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อเก็บตัวอย่างแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ครบ 50 วัน วิธีการวิเคราะห์ห้วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบโคลิฟอร์มลดลง 2.17 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายมากถึง 52 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธีดัดแปลงพบโคลิฟอร์มลดลง 2.00 Log_{10} CFU/กรัม และมีอัตราการตายลดลง 47 เปอร์เซ็นต์ และสาเหตุของการลดปริมาณโคลิฟอร์มจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็งในระยะเวลาเก็บมากขึ้นนี้ เนื่องจากการนำตัวอย่างกุ้งไปเก็บในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสทันทีนั้นเป็นการแช่แข็งแบบช้า (Slow freezing) ซึ่งการแช่แข็งแบบช้า ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่เข้าไปที่ผนังเซลล์ทำให้ฉีกขาดและทำให้จุลินทรีย์ขาดเจ็บและตายได้มากกว่า โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มซึ่งมีความทนทานต่อการลดลงของอุณหภูมิน้อย ดังนั้นเมื่อเชื้ออยู่ในอุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานเป็นผลทำให้เชื้อถูกทำลายจนลดปริมาณลง รวมถึงระยะเวลาการเก็บที่ยาวนานจะทำให้เชื้อขาดอาหาร (บุษกร, 2545)



ภาพที่ 4.5 ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น 4 Log_{10} CFU/กรัม ในกุ้งปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น และวิธีดัดแปลงที่ 4

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและเปอร์เซ็นต์เซลล์บาดเจ็บของโคลิฟอร์มจากการวิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงที่ 4 เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

ระยะเวลาเก็บที่ อุณหภูมิ -18 องศา เซลเซียส (วัน)	ปริมาณเชื้อ (Log ₁₀ CFU/กรัม)			เซลล์บาดเจ็บ (เปอร์เซ็นต์)	
	TSA	วิธีดัดแปลง ที่ 4	วิธีมาตรฐาน ญี่ปุ่น	วิธีดัดแปลง ที่ 4	วิธีมาตรฐาน ญี่ปุ่น
7	4.28	4.18	4.01	21.1	47.4
14	4.18	4.08	3.98	20.0	36.7
21	3.99	3.91	3.74	17.3	43.9
28	3.86	3.77	3.62	18.1	41.7
35	3.64	3.56	3.39	18.2	43.2
42	3.35	3.21	3.08	30.4	47.8
50	2.59	2.46	2.00	25.0	67.5

จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เซลล์บาดเจ็บของโคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ 4 และวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโคลิฟอร์มจากการใช้ Non selective agar (TSA) โดยตรงพบว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 ทำให้ปริมาณของเซลล์บาดเจ็บเกิดน้อยกว่าการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น(ภาพที่ 4.5)คือ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 - 14 วัน พบเซลล์บาดเจ็บ 20.0 - 21.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเซลล์บาดเจ็บ 36.7 - 47.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิดังกล่าว ถึงวันที่ 50 พบว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 พบเซลล์บาดเจ็บ 25.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเซลล์บาดเจ็บ 67.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) ซึ่งตามมาตรฐานที่ Feng et al., (2002) กล่าวในการวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยใช้อาหารแข็ง ว่าการใช้ TSA สามารถทำให้ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่างๆ มา จะสามารถวิเคราะห์หาเซลล์บาดเจ็บได้มากขึ้น ซึ่งวิธีดัดแปลงที่ 4 มีการใช้ 0.1 % Peptone water ร่วมกับ 0.85 % NaCl เป็น diluent และ pour plate ด้วย TSA ก่อน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง อาจทำให้เซลล์บาดเจ็บกลับแข็งแรงขึ้นยังไม่สมบูรณ์ทุกเซลล์ เมื่อทำการเททับ TSA ที่บ่มครบ 2 ชั่วโมงด้วย DCLA ซึ่งเป็น Selective agar มีสารยับยั้ง เช่น Sodium citrate และ Sodium desoxycholate มีผลทำให้เซลล์บาดเจ็บที่ยังไม่สามารถปรับเซลล์ให้สมบูรณ์แข็งแรงขึ้นอาจตายหลังจากเททับด้วย DCLA นี้ (Warseck et al.,1973) จึงทำให้เซลล์บาดเจ็บเหล่านี้ไม่สามารถตรวจนับได้

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งในระยะเวลาสั้นไม่สามารถลดปริมาณเชื้อลงในระดับที่ทำให้เกิดความปลอดภัยในการบริโภคได้ แต่การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งในระยะเวลา นานอาจสามารถทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้ แต่ไม่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้จริง ซึ่ง เกิดผลเสียหลายประการให้กับผู้ผลิตได้ เช่น ค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา และเกิดปัญหาอายุสินค้า ดังนั้นผู้ผลิตจึงจำเป็นต้องหาแนวทางควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นในวัตถุดิบ และการป้องกัน ไม่ให้เชื้อเกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน รวมไปถึงการป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม อื่นๆ โดยอาศัยเครื่องมือการประกันคุณภาพ การคัดเลือกวัตถุดิบ การควบคุมสุขลักษณะของการ ขนส่ง และภาชนะอุปกรณ์ต่างๆ ตั้งแต่ต้นจนถึงโรงงาน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าโรงงาน การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อโคลิฟอร์มที่พบในโรงงาน ผลของการทดลองเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์ม และการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสต่อการลดของเชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุก เพื่อลดและป้องกันความเสี่ยงของผู้บริโภคที่จะได้รับอันตรายจากอาหารเมื่อบริโภคเข้าไป รวมถึงให้ผลิตภัณฑ์ได้มาตรฐานทางการค้าสามารถสรุปได้ดังนี้

1. จากการสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าในโรงงานมาตรวจสอบเชื้อโคลิฟอร์ม ด้วยวิธี MPN Method ตั้งแต่เดือนมกราคม 2549 ถึงเดือนธันวาคม 2549 ทั้งหมด 267 ตัวอย่าง พบเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดคิดเป็น 40.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำผลการพบเชื้อโคลิฟอร์มมาวิเคราะห์ พบว่าปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในวัตถุดิบกุ้งสดที่รับเข้าในโรงงานโดยวิธี MPN Method พบที่ระดับต่ำสุดคือ 3.0 MPN/กรัม และระดับกลางพบที่ 9.2 MPN/กรัม ที่พบระดับสูงที่สุดคือ > 1,100 MPN/กรัม ซึ่งในช่วงเดือนมีนาคมจนถึงเดือนกรกฎาคม พบเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณมาก และในเดือนมีนาคมพบโคลิฟอร์มมากที่สุดคิดเป็น 57.1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในเดือนมีนาคมเป็นช่วงฤดูร้อนไปจนถึงเดือนกรกฎาคมซึ่งเป็นช่วงต้นฤดูฝน เป็นช่วงที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ 30-35 องศาเซลเซียส

จากการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์มเปรียบเทียบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นกับวิธี MPN Method พบว่าในตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN Method จะไม่พบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นด้วย ในตัวอย่างที่พบโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN Method ในช่วง 3.0 – 38 MPN/กรัม จะพบโคลิฟอร์มตรงกันโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และในช่วงที่พบโคลิฟอร์มที่ระดับ 93 MPN/กรัมขึ้นไป จึงจะพบโดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นตรงกันทุกตัวอย่างซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นว่าการวิเคราะห์โดยวิธี MPN Method แม้ว่าจะมีเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณน้อยก็สามารถตรวจพบได้ ซึ่งต่างกับวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นจะตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์ม เมื่อมีการปนเปื้อนในปริมาณมาก ซึ่งในที่นี้ต้องมีปริมาณอย่างน้อยถึง 93 MPN/กรัม จึงจะตรวจพบ เนื่องจากวิธี MPN Method มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Enrichment media ซึ่งใช้ LST broth (Feng et al, 2002) สามารถซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บที่เกิดจากกระบวนการผลิตหรือเก็บรักษาได้ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นนี้ โดยใช้ Selective media ซึ่งใช้ DCLA มาแทนงานเพาะเชื้อโดยตรงเลย (JETRO , 2006) จึงทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งในการตรวจสอบเพื่อทำการ

ประกันคุณภาพหากมีการใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ หรือความไวของการวิเคราะห์มากจะ ทำให้สามารถประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้มากยิ่งขึ้น

2. จากการหาปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลอง พบว่าปริมาณที่พบต่ำที่สุดคือ 1.30 ถึง 1.90 Log_{10} CFU/กรัม หรือประมาณ 2 Log_{10} CFU/กรัม ระดับกลางพบที่ 1.87 ถึง 2.16 Log_{10} CFU/กรัม และระดับสูงพบที่ 2.43 ถึง 4.30 Log_{10} CFU/กรัม ซึ่งในเดือนเมษายนพบเชื้อ โคลิฟอร์มในปริมาณมากที่สุด การเลือกปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดลองเลือกปริมาณที่พบจริงในระดับต่ำที่ 2 Log_{10} CFU/กรัม และระดับสูงที่ 4 Log_{10} CFU/กรัม และสายพันธุ์ของเชื้อ โคลิฟอร์มที่พบในตัวอย่างวัตถุดิบกุ้งสดในห้องปฏิบัติการภายในโรงงานคือสายพันธุ์ *E. coli* คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ *Ent. cloacae* คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์

3. จากผลการทดลองหาวิธีการวิเคราะห์เชื้อ โคลิฟอร์มวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลง ทั้ง 4 วิธี จากตัวอย่างทดลอง 3 ระดับคือ ในระดับที่ไม่มีการเติมเชื้อ (Unspike sample) ระดับต่ำ (Low level) และระดับสูง (High level) พบว่าชุดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *E. coli* วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 1 และวิธีดัดแปลงที่ 2 ($P > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 3 และวิธีดัดแปลงที่ 4 ($P \leq 0.05$) วิธีดัดแปลงที่ 1 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 3 และวิธีดัดแปลงที่ 4 ($P > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 2 ($P \leq 0.05$) ส่วนชุดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Ent. cloacae* วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 1 วิธีดัดแปลงที่ 2 และวิธีดัดแปลงที่ 3 ($P > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีดัดแปลงที่ 4 ($P \leq 0.05$) และปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มวิธีดัดแปลงวิธีที่ 4 สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงทั้งหมดและวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

4. ผลการตรวจสอบความถูกต้อง ของวิธีวิเคราะห์โคลิฟอร์มที่ดัดแปลงที่ 4 โดยการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ 20 ตัวอย่างต่อวิธี และทำการเติมเชื้อ *E. coli* ทั้งที่ระดับต่ำ (1×10^2 ถึง 3×10^2 Log_{10} CFU/ 25 กรัม ตัวอย่าง) และระดับสูง (1×10^4 ถึง 3×10^4 Log_{10} CFU/ 25 กรัม) พบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ (Unspiked sample) การวิเคราะห์ทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลงที่ 4 ทั้ง 20 ตัวอย่างไม่พบโคลิฟอร์มทั้ง 2 วิธี ซึ่งแสดงว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 นี้ไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอม (False Positive) ที่ระดับที่มีการเติมเชื้อระดับต่ำ (Low level) พบว่าทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างคือ วิเคราะห์ทั้งหมด 20 ตัวอย่างพบโคลิฟอร์ม 19 ตัวอย่าง ไม่พบ 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลลบปลอม (False Negative) คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกรณีที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์มในปริมาณที่น้อย อาจวิเคราะห์ไม่พบโดยวิธีนี้ และที่ระดับที่มีการเติมเชื้อระดับสูง (High level)

พบว่าทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างเช่นกันคือ จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 พบโคลิฟอร์มทั้งหมด 20 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์สรุปได้ว่าทุกระดับของการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี วิธีการที่ดัดแปลงขึ้นไม่มีความแตกต่างจากวิธีที่เป็นมาตรฐานของญี่ปุ่นซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานระดับชาติที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องมาแล้ว ดังนั้นถ้าวิธีที่ดัดแปลงที่ 4 ไม่มีความแตกต่างจากวิธีมาตรฐานก็สามารถนำวิธีการที่ดัดแปลงนี้มาใช้ในการทดสอบตัวอย่างกึ่งปรุงสุกแช่เยือกแข็งได้จริง อีกทั้งยังทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เนื่องจากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ซึ่งราคาถูกกว่า DCLA

5. ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกที่ทำการเติมเชื้อ *E. coli* ที่ 4 Log CFU/กรัม ในสถานะแช่แข็งในที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียสเป็น 0 7 14 21 28 35 42 50 วัน พบว่าปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยการลดปริมาณที่เห็นผลชัดเจนใช้เวลาประมาณ 35 วัน สามารถลดเชื้อได้ประมาณ 1 Log cycle ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของอริญ (2518) ที่เก็บกึ่งสุกแช่แข็งในห้องเย็นอุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อโคลิฟอร์มลดปริมาณลง 1 Log cycle ในระยะเวลา 28 วัน โดยอัตราการลดลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บรักษา จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เซลล์บาดเจ็บของโคลิฟอร์มโดยวิธีดัดแปลงที่ 4 และวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น เทียบปริมาณโคลิฟอร์มจากการใช้ Non selective agar (TSA) พบว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 ทำให้ปริมาณของเซลล์บาดเจ็บเกิดน้อยกว่าการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่นคือ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 - 14 วัน โดยพบเซลล์บาดเจ็บ 20.0 - 21.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเซลล์บาดเจ็บ 36.7 - 47.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกถึงวันที่ 50 พบว่าวิธีดัดแปลงที่ 4 พบเซลล์บาดเจ็บ 25.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีมาตรฐานญี่ปุ่นพบเซลล์บาดเจ็บ 67.5 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

การดัดแปลงวิธีวิเคราะห์โคลิฟอร์ม อาจทำได้หลายวิธีเพื่อให้เซลล์บำบัดสามารถฟื้นฟูแข็งแรงขึ้นได้ ทำให้ได้ปริมาณมากขึ้นโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อนั้นๆ ก่อนแล้วจึงนำมาวิเคราะห์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ แต่ต้องมีการควบคุมไม่ให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อขึ้น และจากการทดลองนี้พบว่าวิธีการดัดแปลงที่ 3 ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มได้ใกล้เคียงกับวิธีดัดแปลงที่ 4 แต่ขนาดของโคโลนีอาจเล็กกว่า และไม่ชัดเจนเท่ากับวิธีดัดแปลงที่ 4 แต่มีแนวโน้มจะนำมาตรวจหาโคลิฟอร์มได้ ซึ่งถ้าสามารถยืนยันได้ว่ามีความถูกต้องเทียบเท่ากับวิธีการมาตรฐานญี่ปุ่นและวิธีดัดแปลงที่ 4 จึงควรที่จะมีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการดัดแปลงที่ 3 ต่อไป

บรรณานุกรม

- นिरชา วงษ์จินดา. 2540. การใช้รังสีกำจัดเชื้อ *Escherichia coli* O157 : H7 ในกุ้งต้มแช่เยือกแข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2540. สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 9 น.
- นिरชา วงษ์จินดา ธิดาพร นิธิไพโรจิตร และ สมชาติ รุ่งจิระธนานนท์. 2539. การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในกุ้งแช่เยือกแข็งโดยวิธี *Standard Conventional Method, MSRV* และวิธี *ELISA*. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539, วันที่ 18-20 กันยายน 2539 ณ ห้องประชุมอานนท์และสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. กรมประมง, กรุงเทพฯ. น.688-700.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 4 .กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุษกร อุดรภิชชาติ. 2545. *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. ภาควิชาชีววิทยา . คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- บริษัท บีโอเมริเออร์ (ประเทศไทย) จำกัด. 2545 . คู่มือการใช้ API 20 E. กรุงเทพฯ.
- มันทนา แสงจินดาวงษ์. 2538. *จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง*. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรารุณี ครุสง. 2538 . *จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร*. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- วิไล รัสาดทอง. 2546. *เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 3 ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร, คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพฯ. 500 น.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. *จุลชีววิทยาในอาหาร*. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุทธิลักษณ์ ขวัญไทรรัตน์. 2550. *โภชนาการของเชื้อจุลินทรีย์*. [Online]. Available : <http://web.nkc.kku.ac.th/ksutth/317211/Microbial%20Nutrition.ppt>. 22 September 2007.
- อรัญ หันพงษ์กิตติกุล. 2518. *การศึกษาด้านจุลชีววิทยาของกุ้งระหว่างกรรมวิธีการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ahmed, E.Y. and Vijay, K.J. 2002. *Microbial stress Adaptation and Food safety* . CRC Press LLC. pp. 44 : 81-85.
- AOAC ,2002 . *AOAC International Methods Committee guidelines for Method Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Method of Analysis*. USA.

- Bang W., Drake M.A., and Jaykus L.A. 2007. Recovery and Detection of *Vibrio vulnificus* during cold storage. *Food Microbiology*. 24: 664-670 .
- Barker, C. and Park, S.F. 2001. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1594-1600.
- Blodgett , R. 2006 . Most Probable Number from Serial Dilutions [Online] . Available : <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>. 22 September 2007.
- Bryan, P.J., Steffan, R.J., DePaola, A., Foster, J.W. and Bej, A. K .1999. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Curr. Microbiol.* 38:168-175.
- Bunning, V.K., Crawford, R.g. Tierney , J.T. and Peeler, J.T. 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3216-3219.
- Busta, F.F. and Jezeski, J.J. 1963. Effect of sodium chloride concentration in an agar medium on growth of heat-shocked *Staphylococcus aureus* . *Appl. Microbiol.* 11: 404-407.
- Calcott, P.H. and Macleod ,T. 1981. Sensitivity of DNA repair deficient mutants of *Escherichia coli* to freezing and thawing, *FEM Microbiol. Lett.* 12: 117-120.
- Chris,B., Paul, N. and Anthony, P.W. 2005. *Food Microbiology and Laboratory Practice*,Blackwell Science Publishing .pp. 179-186.
- Clark, C.W. and Ordal, Z.J. 1969. Thermal injury and recovery of *Salmonella* Typhimurium and its effect on enumeration procedures. *Appl. Microbiol.* 18 : 332-336.
- DPALM MEDIC, University of Texas - Houston Medical School .1995. Enterobacteriaceae . [Online] .Available : <http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001500.htm>. 22 June 2007.
- Erickson, M.g. and Hung, Y.C. 1997. *Quality in Frozen Food*. Chapman&Hall.Washington D.C.
- Farber, J.M. and Brown, B. E. .1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1584-1587.
- Feng, P. ,Weagant, S. D., and grant, M.A. 2002 . Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. BAM ,Bacteriological analytical Manual[Online]. Available : <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html> 22 September 2007.
- Goldstein, J., Pollittand, M.S. and Inouye, M. 1990. Major cold shock proteins of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:283-287.

- Guentzel, M. N. 2007. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus [Online]. Available : <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch026.htm>. 22 June 2007
- Hazel, J.R. and Williams, E.E. 1990. The role of alterations in membrane liquid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physiological environment. *Prog. Liquid Res.* 29:167-227.
- Hernandez, P. and Beuchat L.R. 1995. Evaluation of diluent and media for enumerating *Zygosaccharomyces rouxii* in blueberry syrup. *International J. Food Microbiol.* 25 : 11-18 .
- Hitchener, B.J. and Egan, A.F. 1977. Outer membrane damage to sublethally heated *Escherichia coli*. *Canadian. J. Microbiol.* 23 : 311-318.
- Hurst, A ., Hughes, A., Beare-Rogers, J.L. and Collins-Thompson, D.L. 1973. Physiological studies on the recovery of salt tolerance by *Staphylococcus aureus* after sublethal heating. *J. Bacteriol.* 116: 901-907.
- Iandolo, J.J. and Ordal, Z.J. 1966. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 91:134-142.
- ISO. 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs Protocol for the validation of alternative methods*. ISO 16140: 2003(E). 1st ed. Switzerland.
- Janet , E.L.C., Curtis, R. and Rosamund, M.B. 2003. *Handbook of culture media for Food Microbiology, Process in industrial microbiology* Vol.37, Elsevier science B.V., London. pp.25-48.
- JETRO. 2006. Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents . Japan.
- Jorgensen, F., Hansen, T.B. and Knochel, S. 1999. Heat-shock induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* 13-249 is dependent on growth phase, pH and lactic acid. *Food Microbiol.* 16:185-194
- Joseph, P.C. and Gary K.B. 1990. Improved Membrane Filtration Method Incorporating Catalase and Sodium Pyruvate for Detection of Chlorine-Stressed Coliform Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 3558-3564 .
- Juneja, V.K., Novak J.S., Eblen, B.S. and McClane, B.A. 2001. Heat resistance of *Clostridium perfringens* vegetative cells as affected by prior heat shock. *J. Food Safety,* 21:127-139.

- Kelly, A.F., Park, S.F. Bovill, R. and Mackey, B.M. 2001. Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence of the absence of a phenotypic stationary-phase response. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2248-2254.
- Knobloch, J.K.M., Bartscht, K. A. Sabottke, H. Rohde, H.H. Feucht and Mack, D. 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, and activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* 183:2624-2633.
- Koga, T., Sakamoto F. Yamoto, A. and Takumi, K. 1999. Acid adaptation induces crossprotection against some environmental stresses in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. gen. Appl. Microbiol.* 45:155-161.
- Koning-Ward, T.F. and Robins-Browne, R.M. 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 63:3790-3795.
- Leyer, g.J. and Johnson, E.A. 1997. Acid adaptation sensitizes *Salmonella typhimurium* to hypochlorous acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:461-467.
- Leyer, g.J. , Wang, L.L. and Johnson, E.A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3752-3755.
- Lou, Y. and Yousef, A.E. 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *L. monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1252-1255.
- Mackey, B.M. 1983. Changes in antibiotic sensitivity and cell surface hydrophobicity in *Escherichia coli* injured by heating, freezing, drying or gamma radiation. *FEM Microbiol. Lett.* 20:395-399.
- Merrell, D.S. and Camilli, A. 1999. The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Molec. Microbiol.* 34:836-849.
- Merrell, D.S., Butler, S.M., Qadri, F., Dolganov, N.A., Alam, A., Cohen, M.B., Calderwood, S.B., Schoolnik, g.K. and Camilli, A. 2002. Host- induced epidemic spread of the cholera bacterium . *Nature.* 417: 642-645
- Mian, M.A., Fleet, g.H. and Hocking, A.D. 1997 Effect of diluent type on viability of yeasts enumerated from food or pure culture. *International J. Food Microbio.* 35 : 103-107.
- Novak, J.S., Tunick, M.H. and Juneja, V.K. 2001. Heat treatment adaptations in *Clostridium perfringens* vegetative cells. *J. Food Protect.* 64: 527-1534.

- Ray, B., Janssen, D.W., and Busta F.F. 1972. Characterization of the Repair of Injury Induced by Freezing *Salmonella anatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 23 : 803-809
- Ray, B., and Speck, M.L. 1973. Enumeration of *Escherichia coli* in Frozen Samples After Recovery from Injury. *Appl. Environ. Microbiol.* 25 : 499-503 .
- Ray, B., and Speck M.L. 1972. Repair of Injured *Escherichia coli* as Influenced by Recovery Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 24 : 258-263.
- Sato, M. and Takahashi, H . 1970. Cold shock of bacteria : IV. Involvement of DNA ligase reaction in recovery of *Escherichia coli* from cold shock. *J gen. appl. Microbiol.* 16: 270-290.
- Scheusner , D.L., Busta, F.F. and Speck, M.L. 1971. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents . *Appl. Microbiol.* 21: 46-49.
- Shebuski, J.R., Vilhelmsson, O. and Miller, K.J. 2000. Effects of growth at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Protect.* 63: 1277-1289.
- Sheridan, J.J., Duffy ,g. Buchanan, R.L., McDowell D.A. and Blair, I.S. 1994. The use of selective and non selective enrichment broths for the isolation of *Listeria* species from meat. *Food Microbiology.* 11 : 439-446.
- Suh. S.J., Silo-Suh, L., Woods, D.E., Hassett, D.J., West, S.E.H. and Ohman, D.E. 1999. Effect of rpoS mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181:3890-3897.
- Tomlins, R. I. and Ordal , Z. J. 1971. Precursor ribosomal ribonucleic acid and ribosome accumulation in vivo during the recovery of *Salmonella typhimurium* from thermal injury. *J. Bacteriol.* 107:134-142.
- Traci, P.A. and Duncan , C. L. 1974. Cold shock lethality and injury in *Clostridium perfringens* . *Appl Microbiol.* 28 : 815-821.
- Warseck, M., Ray, B., and Speck M.L. 1973. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 26 : 919-924 .
- Wilde, S., Jorgensen, F., Rowbury. R., and Humphrey, T. 2000. growth of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* PT4 in media containing glucose results in enhanced RpoS-independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air drying on surfaces. *Food Microbiol.* 8:659-686.

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์เชื้อโคลิฟอร์ม โดยวิธี MPN Method (Feng et al.,2002)

1. เตรียมตัวอย่าง โดยตัดตัวอย่างทดสอบ 25 ± 0.1 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. เติม Butterfield's phosphate buffered dilution water 225 มิลลิลิตรลงในถุงตัวอย่างนำไปตีให้เข้ากัน โดยใช้ stomacher เป็นเวลา 2 นาที
3. ทำการเจือจาง โดยการปิเปตจากตัวอย่างจากข้อ 2. มา 1 มิลลิลิตร ลงใน 9 มิลลิลิตร ของ Butterfield's phosphate buffered dilution water จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ทำการเจือต่อจนได้ความเจือจางที่ระดับ 10^{-3} ในแต่ละความเจือจาง เขย่าหลอดทดลองที่ทำการเจือจางแล้วด้วยเครื่อง Vortex mixer
4. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST broth) ซึ่งมีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ ความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด เขย่าให้เข้ากันระวังไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ในหลอดดักแก๊ส
5. นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
6. คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊ส นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN 3:3:3 ค่าที่อ่านได้คือค่า presumptive Coliforms มีหน่วยเป็น MPN /กรัม. ตัวอย่าง กรณีที่ไม่เกิดแก๊สให้นำไปบ่มต่อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปอ่านค่าจากตาราง MPN 3:3:3 ค่าที่อ่านได้คือค่า presumptive Coliforms มีหน่วยเป็น MPN /กรัม ตัวอย่าง
7. ใช้ Loop ถ่ายเชื้อจากหลอด Lauryl Sulfate Tryptose broth ที่ให้ผลบวก (เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส) ลงใน Brilliant Green Bile broth (BGLB) ซึ่งมีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ หลอดละ 1 Loop
8. นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง
9. คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊ส อ่านค่า จากตาราง MPN 3:3:3 ค่าที่อ่านได้คือค่า Total Coliforms มีหน่วยเป็น MPN/กรัม ตัวอย่าง

ตารางที่ ก.1 ค่า MPN ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ของเชื้อ Coliforms วิธี 3 : 3 : 3 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Positive tubes			MPN/ กรัม	Conf.lim.		Positive tubes			MPN/ กรัม	Conf.lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		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
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

ที่มา : Blodgett (2006)

ภาคผนวก ข

วิธีการจำแนกชนิดและสายพันธุ์เชื้อโดยใช้ API 20 E (บริษัท บีโอเมรียอร์ จำกัด, 2545)

1. สารเคมีและอุปกรณ์ในชุดทดสอบ API 20 E

1.1.Strip API 20 E

1.2 กล่องสำหรับบ่มเชื้อ จำนวน 25 ชุด

1.3 แผ่นบันทึกผล

1.4 Clip seal จำนวน 1 อัน

1.5 Reagent Kit ประกอบด้วย

1.5.1 TDA reagent

1.5.2 JAMES reagent

1.5.3 VP1 reagent

1.5.4 VP2 reagent

1.5.5 NIT1 reagent

1.5.6 NIT2 reagent

1.5.7 OX reagent

1.5.8 Zn reagent

1.6 Oxidase test reagent

1.7 ไม้จิ้มฟัน Steriled

1.8 กระดาษกรอง

1.9 Dropper

1.10 Soft ware APILAB Plus สำหรับประมวลผลการวิเคราะห์

2. ขั้นตอนการทดสอบ

2.1 การเตรียม Strip

2.1.1 ทิ้ง Strip ของ API 20 E และ API Listeria ในกรณีที่เก็บ Strip ไว้ในตู้เย็นให้นำออกมาทิ้งไว้ข้างนอก เพื่อให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อน

2.1.2 เตรียมกล่องสำหรับ Incubate โดยเติมน้ำกลั่น ปริมาตร ประมาณ 5 มิลลิลิตร. ลงในหลุมทุกหลุมของกล่อง Incubate เพื่อเพิ่มความชื้นในการบ่มเชื้อ

2.1.3 บันทึก Sample No. หรือ reference No. ของเชื้อ ตรงบริเวณพลาสติกที่ยื่นออกมา (ไม่ควรบันทึกไว้ที่ฝากล่องเพราะอาจเกิดการสับสนได้)

2.1.4 นำแถบ Strip API วางในกล่อง incubate (ที่เติมน้ำกลั่นไว้แล้ว)

2.1.5 ทดสอบ Oxidase test ของเชื้อ โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกับโคโลนีของเชื้อที่ต้องการ

2.2 การเตรียม Strip ทำตามขั้นตอนดังนี้

2.2.1 หยคน้ำกลั่น 1 หยดลงบนกระดาษกรอง เพื่อให้กระดาษมีความชื้น

2.2.2 ใช้แท่งแก้วหรือไม้ Steriled เชี่ยโคโลนีของเชื้อมาป้ายลงบนกระดาษกรอง

2.2.3 หยด Oxidase reagent ลงไปบนกระดาษกรองที่มีเชื้ออยู่ 1 หยด ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายในเวลา 1-2 นาที แสดงว่า Oxidase test เป็น บวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ให้ลงผลเป็นลบ

2.3 การเตรียม Inoculum

2.3.1 การเตรียม Inoculum ใช้ Loop เชี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบที่อยู่ในรูปของ single colony บน Non-selective media จำนวน 1 colony ใส่ใน 5 มิลลิลิตร ของ Steriled 0.85% Normal saline solution (NaCl) แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer

2.4 ขั้นตอนการทดสอบ API 20 E

2.4.1 ใช้ Dropper หรือ Psipette คูด suspension ของเชื้อเติมลงในหลุมของ Strip ดังนี้

2.4.2 การทดสอบ ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA เติม suspension ของเชื้อ แค่ขอบหลุม

2.4.3 การทดสอบ CIT, VP และ GEL เติม suspension ของเชื้อ

2.4.4 การทดสอบ ADH, LDC, ODC, H₂S และ URE เติมแค่ขอบหลุมและให้หยด Mineral oil ลงไปให้เต็มหลุมเพื่อให้เชื้อมีสภาวะ Anaerobe

2.4.5 ปิดฝากล่องสำหรับ incubate แล้วนำไปบ่ม ที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.5 ขั้นตอนการอ่านผลการทดสอบ API 20 E อ่านผลดังนี้

2.5.1 การทดสอบ ONPG ทดสอบปฏิกิริยา beta- galactosidase ผลบวกเป็นสีเหลือง หรือสีเหลืองอ่อน ผลลบใสไม่มีสี

2.5.2 การทดสอบ ADH ทดสอบปฏิกิริยา Arginine - dihydrolase ผลบวกเป็นสีแดง / สีส้ม หากเป็นสีส้มหลัง 24 ชั่วโมงถือว่าเป็นลบ ผลลบเป็นสีเหลือง

2.5.3 การทดสอบ LCD ทดสอบปฏิกิริยา Lysine – Decarboxylase ผลบวกเป็น สีส้ม ผลลบเป็นสีเหลือง

2.5.4 การทดสอบ ODC ทดสอบปฏิกิริยา Ornithine decarboxylas ผลบวกเป็นสีแดง / สีส้ม หากเป็นสีส้มหลัง 24 ชั่วโมงถือว่าเป็นลบ ผลลบเป็นสีเหลือง

2.5.5 การทดสอบ CIT ทดสอบปฏิกิริยา Citrate utilization ผลบวกเป็น สีน้ำเงิน/ สีน้ำเงินเขียว ผลลบเป็นสีเขียวอ่อน / สีเหลือง

2.5.6 การทดสอบ H₂S ทดสอบปฏิกิริยา H₂S production ผลบวกเป็นเป็นตะกอนสีดำ หรือเป็นเส้น ๆ ผลลบเป็น ไม่มีสี / สีเทาอ่อน

2.5.7 การทดสอบ URE ทดสอบปฏิกิริยา Urease ผลบวกเป็นสีแดง / สีส้ม ผลลบเป็น สี เหลือง

2.5.8 การทดสอบ TDA ทดสอบปฏิกิริยา Tryptophane deaminase หลังหยด TDA ทันที ผลบวกเป็น สีน้ำตาลเข้ม ผลลบเป็นสีเหลือง

2.5.9 การทดสอบ IND ทดสอบปฏิกิริยา Indole production หลังหยด JAMES ทันที หรือ หลังหยด IND 2 นาที ผลบวกเป็นเป็นวงแหวนสีแดง ผลลบเป็นสีเหลือง

2.5.10 การทดสอบ VP ทดสอบปฏิกิริยา acetoin product หลังหยด VP1 + VP2 ทิ้งไว้ เป็น เวลา 10 นาที ผลบวกเป็นสีชมพู / สีแดง ผลลบเป็น ไม่มีสี

2.5.11 การทดสอบ GEL ทดสอบปฏิกิริยา gelatinase ผลบวกเป็น เกิดการแพร่กระจาย ของรงควัตถุสีดำ ผลลบเป็น ไม่มีการแพร่กระจายของรงควัตถุสีดำ

2.5.12 การทดสอบ GLU ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.13 การทดสอบ MAN ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.14 การทดสอบ INO ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.15 การทดสอบ SOR ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.16 การทดสอบ SAC ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.17 การทดสอบ MEL ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.18 การทดสอบ AMY ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.19 การทดสอบ ARA ทดสอบปฏิกิริยา fermentation / Oxidation ผลบวกเป็น สีเหลือง ผลลบเป็นสีน้ำตาล / สีน้ำตาลเขียว

2.5.20 การทดสอบ OX ทดสอบปฏิกิริยา Cytochrome - oxidase หลังหยด Ox 1-2 นาที ผลบวกเป็นสีม่วง ผลลบเป็นไม่มีสี

ตารางที่ ก.1 (ต่อ)

รหัส ตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์	รายละเอียดตัวอย่าง	ปริมาณ โคลิฟอร์ม Log ₁₀ CFU/กรัม
A57	วิธีคัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.60
A58	วิธีคัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.48
A59	วิธีคัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.60
A60	วิธีคัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.48
A61	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.23
A62	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.26
A63	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.20
A64	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.20
A65	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.18
A66	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.20
A67	วิธีคัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.23
A68	วิธีคัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.28
A69	วิธีคัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.26
A70	วิธีคัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>E. coli</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.28

ตารางที่ ก.1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์	รายละเอียดตัวอย่าง	ปริมาณ โคลิฟอร์ม Log ₁₀ CFU/กรัม
B36	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.70
B37	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.70
B38	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.60
B39	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.30
B40	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.48
B41	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.60
B42	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.60
B43	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.60
B44	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.48
B45	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.48
B46	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.60
B47	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.48
B48	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.70
B49	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.48

ตารางที่ ก.1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์	รายละเอียดตัวอย่าง	ปริมาณ โคลิฟอร์ม Log ₁₀ CFU/กรัม
B50	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.60
B51	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.48
B52	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.70
B53	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.48
B54	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.60
B55	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.60
B56	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	1.78
B57	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.60
B58	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	1.48
B59	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.60
B60	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 2 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	1.70
B61	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.18
B62	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.26
B63	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งต้มแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.23

ตารางที่ ก.1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์	รายละเอียดตัวอย่าง	ปริมาณ โคลิฟอร์ม Log ₁₀ CFU/กรัม
B64	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.23
B65	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.23
B66	วิธีมาตรฐานญี่ปุ่น	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.20
B67	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.24
B68	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.23
B69	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.30
B70	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.23
B71	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.26
B72	วิธีดัดแปลงที่ 1	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.28
B73	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.18
B74	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.20
B75	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.20
B76	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.23
B77	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งดัมแช่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.18

ตารางที่ ค.1 (ต่อ)

รหัส ตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์	รายละเอียดตัวอย่าง	ปริมาณ โคลิฟอร์ม Log ₁₀ CFU/กรัม
B78	วิธีดัดแปลงที่ 2	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.23
B79	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.28
B80	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.28
B81	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.33
B82	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.30
B83	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.30
B84	วิธีดัดแปลงที่ 3	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.32
B85	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/g ครั้งที่ 1	3.36
B86	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 1	3.34
B87	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.32
B88	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 2	3.30
B89	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.30
B90	วิธีดัดแปลงที่ 4	ตัวอย่างกึ่งคัมแซ่เยือกแข็งที่มีการเติมเชื้อ <i>Ent. cloacae</i> 4 Log ₁₀ CFU/กรัม ครั้งที่ 3	3.32

ตารางที่ ค.2 ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$ ในกึ่งดัมแช่แข็ง หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานญี่ปุ่น

สภาวะการทดลอง	ปริมาณเชื้อ $\text{Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$	อัตราการตาย (%)
การสร้างปริมาณการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้น	$4.19^a \pm 0.02$	-
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 7 วัน	$4.01^a \pm 0.06$	4.3
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 14 วัน	$3.98^a \pm 0.02$	5.2
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 21 วัน	$3.71^b \pm 0.08$	11.4
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 28 วัน	$3.42^b \pm 0.21$	18.5
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 35 วัน	$2.97^b \pm 0.06$	29.2
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 42 วัน	$2.59^b \pm 0.16$	38.2
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 50 วัน	$2.03^b \pm 0.07$	51.7

ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค.3 ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$ ในกึ่งดัมแช่แข็งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็งที่เวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงที่ 4

สภาวะการทดลอง	ปริมาณเชื้อ $\text{Log}_{10} \text{ CFU/กรัม}$	อัตราการตาย (%)
การสร้างปริมาณการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้นก่อนเก็บรักษา	$4.28^a \pm 0.04$	-
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 7 วัน	$4.14^a \pm 0.05$	3.4
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 14 วัน	$4.06^a \pm 0.06$	5.0
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 21 วัน	$3.91^b \pm 0.04$	8.6
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 28 วัน	$3.54^b \pm 0.14$	17.2
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 35 วัน	$3.20^b \pm 0.11$	25.3
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 42 วัน	$2.82^b \pm 0.14$	34.2
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 50 วัน	$2.28^b \pm 0.16$	46.6

ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ภาคผนวก ง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียม Tryptic soy agar (TSA)

1.1 สูตรและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

	ปริมาณ / ลิตร	
Trypticase peptone	15	กรัม
Phytone peptone	5	กรัม
NaCl	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

1.2 ลักษณะ เป็นผงสีขาว

1.3 ขั้นตอนการเตรียม

1.3.1 ชั่ง Tryptic soy agar 40 กรัม ให้ชั่ง NaCl 15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร

1.3.2 คนให้ละลายเข้ากันและนำไปต้มโดยความร้อนจาก Microwave ช่วยในการละลาย

ให้เดือดนาน 1 นาที

1.3.3 สำหรับที่จะนำไปเตรียมเป็นงานเพาะเชื้อเทใส่ Laboratory bottle

1.3.4 ออบฆ่าเชื้อโดยนำเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3.5 นำมาวัด pH และปรับ pH โดยทำให้ Final pH อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2

1.3.6 กรณีเตรียมเป็นงานเพาะเชื้อ นำ TSA และ / หรือ Saline TSA ใน Laboratory bottle มาทดลองงานเพาะเชื้อ 15-18 มิลลิลิตร

1.3.7 นำไปตากให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

1.3.8 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วเป็นอาหารวุ้นสีขาวใส

1.3.9 การเก็บ กรณีเตรียมใส่งานเพาะเชื้อเก็บใส่ถุงพลาสติก ปิดปากสนิท ทั้งที่เตรียมเป็น

2. Butterfield's phosphate - Buffered Dilution water

2.1 สูตรและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

(Stock solution) ของสารละลายที่เตรียมแล้ว

	ปริมาณ / ลิตร	
KH_2PO_4	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

2.2 ลักษณะ KH_2PO_4 เป็นผงสีขาว

2.3 ขั้นตอนการเตรียม

2.3.1 การเตรียม (Stock solution)

2.3.1.1 ชั่งส่วนประกอบตามข้อ 2.1 คือ KH_2PO_4 34 กรัม

2.3.1.2 ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ Final pH อยู่ในช่วง 7.2 ± 0.2 ด้วย 1 N NaOH

2.3.1.3 นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วย Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

2.3.1.4 นำมาเทใส่ Laboratory bottle แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2.3.1.5 ลักษณะของ reagent ที่เตรียมได้เป็นสารละลายใส

2.3.2 การเตรียม Dilution blank (working solution)

2.3.2.1 ใช้ปิเปตขนาด 2 มิลลิลิตร ปิเปต stock solution ของ Butterfield's phosphate - buffered Dilution water มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

2.3.2.2 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ Final pH อยู่ในช่วง 7.2 ± 0.2

2.3.2.3 นำมาเทใส่ Laboratory bottle แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. Lactose broth (LB)

3.1 สูตรส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

	ปริมาณ / ลิตร
Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Lactose	5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

3.2 ลักษณะ เป็นผงสีเบจ (สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน)

3.3 ขั้นตอนการเตรียม

3.3.1 ชั่ง Lactose broth (LB) 13 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร.

3.3.2 ทำให้ละลายโดยการคนให้ละลาย และปรับ pH ให้ได้ ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl ให้ได้ Final pH 6.9 ± 0.2

3.3.3 ใช้ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร หรือ dispenser ปิเปต LB มา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.4 นำไปอบฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3.3.5 ปรับ pH ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl ให้ได้ Final pH 6.9 ± 0.2

3.3.6 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว เป็นสารละลายสีเหลืองใส

4. Peptone Salt Solution (0.1 % Peptone water + 0.85 % NaCl)

4.1 สูตรส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

	ปริมาณ / ลิตร	
Peptone from Casein	1.0	กรัม
Sodium chloride	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

4.2 ลักษณะ เป็นสารละลายสีน้ำ

4.3 ขั้นตอนการเตรียม

4.3.1 ชั่งส่วนประกอบตามด้วยข้อ 4.1 ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากันดี

4.3.2 นำไปให้ความร้อนด้วย microwave นาน ประมาณ 3 นาที แล้วเทลงใน

Laboratory bottle

4.3.3 นำไปวัด pH และปรับ pH โดยให้ Final pH เท่ากับ 7.0 ± 0.2

4.3.4 นำไปฆ่าเชื้อ ด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.3.5 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว เป็นสารละลายใส สีขาว

5. Nutrient agar (NA)

5.1 สูตรและส่วนประกอบของ

	ปริมาณ / ลิตร	
peptone form meat	5	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Agar - Agar	12	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5.2 ลักษณะ เป็นผงสีเหลืองปนน้ำตาล

5.3 ขั้นตอนการเตรียม

5.3.1 ชั่ง Nutrient agar 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร สำหรับการ

5.3.2 คนให้ละลายเข้ากัน นำไปปรับ pH ด้วย 1 M NaOH และนำไปละลายด้วย

Microwave ประมาณ 3 นาที

5.3.3 เทใส่ใน Laboratory bottle แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5.3.4 นำไปอุ่นใน water bath ให้อุณหภูมิ 45 -50 องศาเซลเซียส

5.3.5 เทลงในจานเพาะเชื้อ 12 -15 มิลลิลิตร นำไปวางทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เป็นเวลาอย่างน้อย 2

5.3.6 นำไปวัด pH โดยให้ Final pH เท่ากับ 7.0 ± 0.2

5.3.7 ลักษณะ เป็นอาหารวุ้นสีขาวใส

5.3.8 การเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้องโดยใส่ในถุงพลาสติกที่ปิดปากสนิท ไม่เกิน 2 สัปดาห์

6. Tryptic soy broth (TSB)

6.1 สูตรและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

	ปริมาณ / ลิตร	
Trypticase peptone	17	กรัม
Phytone peptone	3	กรัม
NaCl	20	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
glucose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

6.2 ลักษณะ เป็นผงสีครีมอ่อน

6.3 ขั้นตอนการเตรียม

6.3.1 ชั่ง Tryptic soy broth 30 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และใช้ความร้อนช่วยในการละลายโดยนำไปต้มโดยใช้ microwave ประมาณ 5 นาที

6.3.2 ใช้ ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปต TSB มา 10 มิลลิลิตร ลงใน Test tube with screw cap ขนาด 16 x 125 mm นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.3.3 วัด pH โดยที่ให้ Final pH เท่ากับ 7.3 ± 0.2

6.3.4 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว เป็นสารละลายสีเหลืองใส

7. Desoxycholate Lactose agar (DCLA)

7.1 สูตรส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

	ปริมาณ / ลิตร	
Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sodium desoxycholate	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Ferric Ammonium citrate	1.0	กรัม
Sodium Citrate	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Neutral Red	0.03	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

7.2 ลักษณะ เป็นผงสีชมพูส้ม

7.3 ขั้นตอนการเตรียม

7.3.1 ชั่ง DCLA 45 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน

7.3.2 นำไปให้ความร้อนโดยใช้ Microwave ให้เดือดนาน 1 นาที

7.3.3 ใส่ใน Laboratory bottle แล้วนำไปวางใน water bath

7.3.4 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว เป็นอาหารวุ้นสีแดงส้ม

8. Brilliant green 2% Bile broth (BGLB)

8.1 สูตรส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

	ปริมาณ / ลิตร	
Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
OX bile ,dried	20	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

8.2 ลักษณะ เป็นผงสีเขียว

8.3 ขั้นตอนการเตรียม

8.3.1 ชั่ง BGLB 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

8.3.2 ทำให้ละลาย โดยการคน

8.3.3 ปรับ pH โดยให้ Final pH เท่ากับ 7.2 ± 0.2

8.3.4 ปิเปต BGLB ที่ละลายแล้วด้วย ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร โดยปิเปตมา 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาด 16x150 mm ซึ่งมีหลอด durham tube ค้ำอยู่

8.3.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8.3.6 หลังจากฆ่าเชื้อวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัด pH โดยให้ Final pH เท่ากับ 7.2 ± 0.2

8.3.7 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว เป็นสารละลายใส สีเขียว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว อภินิหาร ศรีอ่อนนวล
วัน เดือน ปีเกิด	2 พฤศจิกายน 2521 ที่ประจวบคีรีขันธ์
ที่อยู่	59/535 หมู่บ้านสินทวี ถ.พระราม 2 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทร. 0-2840-2225
ประวัติการศึกษา	2544 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี 2551 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ความชำนาญเฉพาะด้าน	1.) ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 2.) ระบบคุณภาพต่างๆ เกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารใน อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ประมงแช่เยือกแข็ง
ประสบการณ์ทำงาน	
พ.ศ. 2544-2550	ตำแหน่งหัวหน้าแผนกห้องปฏิบัติการบริษัท คิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้งส์ จำกัด - ผู้จัดการวิชาการตามระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025
พ.ศ. 2550- ปัจจุบัน	ตำแหน่งหัวหน้าแผนกอาวุโส แผนกห้องปฏิบัติการบริษัท คิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้งส์ จำกัด - ผู้จัดการคุณภาพตามระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 - ผู้ช่วยผู้จัดการสิ่งแวดล้อมตามระบบ ISO 14001 - ผู้ตรวจติดตามคุณภาพภายใน - สมาชิก Food Safety Team