abst

ข้อมูลข่าวสาร วศ.

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ
กช
อว 4

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6ว

เรื่องที่ 2

การศึกษาปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อวัวสดบด

นายเกรียงไกร นาคะเกศ
ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 5

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

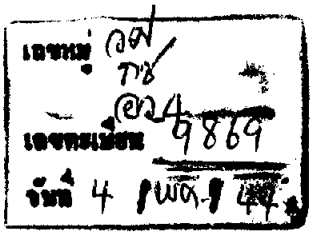
กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6ว

เรื่องที่ 2

การศึกษาปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อวัวสดบด



นายเกรียงไกร นาคะเกศ
ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 5

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลโดยวิธีเอ็มพีเอ็นในเนื้อวัวสดบดจำนวน 20 ตัวอย่างจากตลาดต่างๆในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จากผลการศึกษาตรวจพบโคลิฟอร์มในทุกตัวอย่างมีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมตั้งแต่ 23 ถึง มากกว่า 1 100 ส่วนอี.โคไลพบ 17 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 85 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยพบปริมาณอี.โคไลเอ็มพีเอ็นต่อกรัมตั้งแต่ 7.3 จนถึง มากกว่า 1 100 เนื้อวัวสดบดที่มีปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลน้อยที่สุด มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมเท่ากับ 23 และ น้อยกว่า 3 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่มีปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลมากที่สุด มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม มากกว่า 1 100

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	i
สารบาญตาราง	ii
สารบาญภาคผนวก	iii
1. คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
ระยะเวลาการดำเนินงาน	4
ประโยชน์ที่ได้รับ	4
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	5
3. ผลการทดลอง	12
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	15
5. สรุปผลการทดลอง	16
กิตติกรรมประกาศ	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	19

สารบาญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดที่มาของตัวอย่างเนื้อวัวสดบด	6
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในตัวอย่าง - เนื้อวัวสดบด	14
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์โคลิฟอร์มและอี.โคไลเบื้องต้น ใช้ลอริล ซัลเฟตบรอท อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง	25
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบยืนยันบักเตรีชนิดโคลิฟอร์มโดยใช้บริลเลียนท์ กรีนไบล์ ร้อยละ 2 อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง	26
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบยืนยันบักเตรีชนิดอี.โคไลโดยใช้อีซีมีเดียม อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบทางชีวเคมี	27

สารบาญภาคผนวก

	หน้า
ภาคผนวก 1	
1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม	19
2. สารเคมีและสารละลาย	23
ภาคผนวก 2	
ตารางเอ็มพีเอ็นต่อกรัม	24
ภาคผนวก 3	25

1. คำนำ

เนื้อวัวเป็นแหล่งโปรตีนที่คนนิยมนำมาปรุงอาหารหลายชนิด และมีจำหน่ายอยู่ในตลาดสดทั่วไป แต่ข้อกำหนดด้านความสะอาดของเนื้อวัวนั้นก็ยังไม่ปรากฏชัดเจน โดยเฉพาะเนื้อวัวสดบด ซึ่งนอกจากจะผ่านการชำแหละจากโรงฆ่าสัตว์แล้ว ยังต้องนำมาผ่านการบดอีกด้วย ถ้าหากไม่ควบคุมในด้านความสะอาดให้ดีพอ อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อที่เป็นอันตรายเข้าไปได้

ในปี พ.ศ. 2539 - 2540 ได้มีการระบาดของโรคหลายชนิดเกิดขึ้นกับวัวทั้งในและต่างประเทศ ในประเทศก็มีโรคแอนแทรกซ์ซึ่งระบาดในกรุงเทพมหานคร นอกจากนี้ก็พบบ้างในจังหวัดอื่นๆ ส่วนในต่างประเทศก็พบโรควัวบ้าระบาดในประเทศอังกฤษ จนมีการห้ามนำเข้าเนื้อวัวจากประเทศนี้ จากการระบาดดังได้กล่าวแล้วนั้น ทำให้มีผลกระทบต่อการจำหน่าย และบริโภคเนื้อวัวเป็นอย่างมาก การซื้อเนื้อวัวมาบริโภคจึงต้องระมัดระวังให้มากกว่าแต่ก่อน

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่บ่งชี้ถึงความสะอาดในเนื้อวัวสดบดก็เป็นอีกทางหนึ่งที่จะช่วยให้ผู้บริโภคได้ทราบถึงสุขลักษณะของเนื้อบดที่ขายตามตลาดทั่วๆไป โดยโคลิฟอร์มและอี.โคไลเป็นบักเตรีที่ใช้บอกถึงความสะอาดในการผลิตเนื้อวัวสดบดได้เป็นอย่างดี

โคลิฟอร์มบักเตรี

โคลิฟอร์มเป็นบักเตรีที่พบได้ทั่วไปในดิน อากาศ และตามแหล่งน้ำธรรมชาติ [2] นอกจากนี้ยังพบในลำไส้คน และสัตว์ โคลิฟอร์มมีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีกรัมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถย่อยน้ำตาลแล็กโทสให้เป็นกรด และแก๊ส [2,6,9] บักเตรีชนิดนี้ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี แต่ไม่สามารถทนอุณหภูมิเยือกแข็ง และรังสีอัลตราไวโอเลตในแสงแดด [2]

โคลิฟอร์มมีหลายจีนัส เช่น เอสเชอริเชีย (Escherichia) ซิโทรแบกเทอร์ (Citrobacter) เอ็นเทอโรแบกเทอร์ (Enterobacter) และเคล็บซิเอลล่า (Klebsiella) โคลิฟอร์มพอจำแนกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ [2] คือ ฟีคัลโคลิฟอร์ม และพวกที่ไม่ใช่ฟีคัลโคลิฟอร์ม

ฟีคัลโคลิฟอร์มเป็นบักเตรีที่ติดสีกรัม (Gram stain) มีรูปร่างเป็นท่อน สามารถย่อยน้ำตาลแล็กโทสให้เป็นกรด และแก๊สได้ที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส [2] โดยทั่วไปจะพบจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ในอุจจาระของคน และสัตว์ ฟีคัลโคลิฟอร์มที่สำคัญได้แก่ อี.โคไล บางสายพันธุ์ของจีนัส เอ็นเทอโรแบกเทอร์ และเคล็บซิเอลล่า ฟีคัลโคลิฟอร์มไม่ทนต่อความร้อน อุณหภูมิที่ใช้ในการหุงต้มทั่วไปสามารถทำลายจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ [2] สำหรับโคลิฟอร์มอื่นๆที่ไม่ใช่ฟีคัลโคลิฟอร์มจะไม่เจริญที่ 46 องศาเซลเซียส [2]

อี.โคไล

เอสเชอริเชีย โคไลหรืออี.โคไลเป็นบักเตรีชนิดหนึ่งซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1887 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Theodor Escherich โดยเขาสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากอุจจาระเด็ก [1,6] นับตั้งแต่นั้นมา อี.โคไลก็เป็นที่รู้จักดีมาจนถึงปัจจุบัน

อี.โคไลเป็นบักเตรีที่จัดอยู่ในกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยทั่วไปอี.โคไลจะอาศัยอยู่ในลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น [1] บักเตรีชนิดนี้เจริญได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส จนถึง 50 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการเจริญอยู่ในช่วงเป็นกลาง และอี.โคไลสามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.4 หากสภาพแวดล้อมเหมาะสม [1]

นอกจากนี้ อี.โคไลบางสายพันธุ์ยังก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารในคน และสัตว์ได้อีกด้วย [1,6] ปัจจุบันนี้แบ่งอี.โคไลเหล่านี้ออกเป็น 4 กลุ่มคือ enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) enteroinvasive *E.coli* (EIEC) enteropathogenic *E.coli* (EPEC) และ enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC) [1]

enterotoxigenic *E.coli* หรือ (ETEC) ก่อให้เกิดโรคภายใน 12 ถึง 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ อาการของโรคคล้ายอหิวาห์ตกโรค คือถ่ายอุจจาระเป็นน้ำแต่ไม่มีเลือดออก ไม่ปวดท้อง และไม่อาเจียน

enteroinvasive *E.coli* หรือ (EIEC) ก่อให้เกิดโรคบิดมีตัว อาการที่พบในคนไข้จะเป็นไข้ ปวดท้องอย่างรุนแรง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ อุจจาระมักมีมูกหรือเลือดปน และอาจพบเม็ดเลือดขาว

enteropathogenic *E.coli* หรือ (EPEC) ก่อให้เกิดโรคภายใน 12 ถึง 36 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ อาการของโรคคือ อาเจียน อุจจาระมีมูกแต่ไม่มีเลือดปน

enterohaemorrhagic *E.coli* หรือ (EHEC) บางครั้งเรียกว่า verotoxin-producing *E.coli* (VTEC) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ อี.โคไล โอ157:เอช7 อาการของโรคคล้ายอหิวาห์ตกโรคคืออุจาระเป็นน้ำ มีเลือดปน เป็นตะคริวที่ท้อง ระยะฟักตัวของบักเตรีชนิดนี้นาน 3 ถึง 8 วัน

การศึกษาโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์

การตรวจหาโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ประมงในประเทศไทยเมื่อปีพ.ศ. 2523 พบทั้งโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในลูกชิ้นปลา กุ้งแห้ง ปลาเค็ม และหอยแมลงภู่แห้ง แต่ไม่พบจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในปลาหมึกแห้ง [10] แสดงว่าการทำให้แห้งช่วยในการถนอมอาหารให้ปราศจากบักเตรีจำพวกโคลิฟอร์มได้

ในปีค.ศ. 1988 Mattila และ Frost ได้ศึกษาการเจริญของอี.โคไลบนผิวของเนื้อวัวและเนื้อไก่ พบว่าอี.โคไลจะเจริญบนผิวของเนื้อทั้งสองได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในทางตรงข้าม ถ้าเก็บเนื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อี.โคไลจะเจริญได้ช้ากว่า [5] แสดงว่าการเก็บเนื้อวัวหรือเนื้อไก่ไว้ในตู้เย็นจะชะลอการเจริญของอี.โคไลได้ดีกว่าเก็บที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าหากจะป้องกันการเจริญของบักเตรี ควรเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น ควรนำออกจากตู้เย็นต่อเมื่อจะนำมาปรุงอาหารเท่านั้น และไม่ควรนำเนื้อที่ปรุงหรือทำให้สุกแล้วมาปนกับเนื้อดิบ เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไปยังอาหารที่ทำให้สุกแล้ว

การศึกษาปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อวัวสดบด

การศึกษาทดลองนี้เป็นการศึกษาการปนเปื้อนของโคลิฟอร์ม และอี.โคไลโดยวิธีเอ็มพีเอ็นในเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามท้องตลาดในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล บักเตรีเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความสะอาดของเนื้อวัวสดบดตั้งแต่เริ่มต้นการผลิตไปจนถึงจำหน่ายให้กับผู้บริโภค หากพบการปนเปื้อนมากแสดงว่าการผลิตไม่ถูกสุขลักษณะ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณโคลิฟอร์ม และ อี.โคไลในเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามท้องตลาด
2. เพื่อศึกษาคุณภาพของเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามท้องตลาด ว่ามีการผลิตเป็นไปตามสุขลักษณะที่ดีหรือไม่

ระยะเวลาการดำเนินงาน

รวม 10 เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม 2539 - กรกฎาคม 2540

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. การศึกษาวิจัยนี้เป็นการเฝ้าระวังการผลิตเนื้อวัวสดบดว่า มีสุขลักษณะที่ดีหรือไม่
2. เป็นข้อมูลให้กับหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับสุขลักษณะของเนื้อวัวสดบด
3. เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ให้ปรุงอาหาร และบริโภคเนื้อวัวสดบดอย่างถูกวิธี

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

ตัวอย่างเนื้อวัวสดบดจากท้องตลาด และซุปเปอร์มาร์เก็ต ทั่วกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จำนวน 20 ตัวอย่าง อย่างน้อยตัวอย่างละ 200 กรัม นำตัวอย่างเก็บในกระติกน้ำแข็งที่ปิดสนิทซึ่งบรรจุน้ำแข็ง 1 กิโลกรัมต่อภาชนะ 1 ลูกบาศก์ฟุต แล้วนำไปที่ห้องปฏิบัติการ เมื่อถึงห้องปฏิบัติการแล้วนำไปวิเคราะห์ทันที หากยังไม่วิเคราะห์ นำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการวิเคราะห์นำตัวอย่างออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส มาไว้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 5 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 18 ชั่วโมง

รายละเอียดที่มาของตัวอย่างเนื้อวัวสดบดจากตลาดสด และซุปเปอร์มาร์เก็ตใน กรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดที่มาของตัวอย่างเนื้อวัวสดบด

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา	เดือนปีที่เก็บตัวอย่าง
1	โรบินสัน สาขาถนนรัชดาภิเษก	มกราคม 2540
2	ตลาดบางเขน	มกราคม 2540
3	โรบินสัน สาขาดอนเมือง	มกราคม 2540
4	เซ็นทรัล สาขารามอินทรา	มกราคม 2540
5	ซันนี่ส์ สาขาเสนานิคม	กุมภาพันธ์ 2540
6	เซ็นทรัล สาขาแฟชั่นไอส์แลนด์	กุมภาพันธ์ 2540
7	ตลาดนนทบุรี	มีนาคม 2540
8	ดีโป้ สาขารังสิต	มีนาคม 2540
9	คาร์ฟูร์ สาขาถนนสุขาภิบาล 3	มีนาคม 2540
10	เซ็นทรัล สาขาวังบูรพา	มีนาคม 2540
11	ตลาดวงเวียนใหญ่	มีนาคม 2540
12	โรบินสัน สาขาลาดหญ้า	มีนาคม 2540
13	เดอะมอลล์ สาขาบางกะปิ	มีนาคม 2540
14	โรบินสัน สาขาถนนศรีนครินทร์	มีนาคม 2540
15	สยามจัสโก้ สาขาถนนรัตนาธิเบศร์	เมษายน 2540
16	เซยู สาขาซอยโชคชัย 4	เมษายน 2540
17	เซ็นทรัล สาขาลาดพร้าว	พฤษภาคม 2540
18	ฟู้ดแลนด์ สาขาถนนเพชรบุรีตัดใหม่	พฤษภาคม 2540
19	อิมพีเรียล สาขาสำโรง	พฤษภาคม 2540
20	โรบินสัน สาขาบางแค	พฤษภาคม 2540

2. เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิ - 20 ± 1 องศาเซลเซียส

2.2 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) ควบคุมอุณหภูมิ ตั้งแต่ – 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส ในการศึกษานี้ใช้อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส

2.3 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (hot air oven) ควบคุมอุณหภูมิที่ 170 - 180 องศาเซลเซียส

2.4 หม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ควบคุมอุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส

2.5 เครื่องอังน้ำ (water bath) ควบคุมอุณหภูมิ ตั้งแต่ 25 ถึง 150 องศาเซลเซียส ในการศึกษานี้ใช้อุณหภูมิ 45.5 ± 0.05 องศาเซลเซียส

2.6 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

2.7 เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.01 กรัม

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 ลอริลซัลเฟตบรอท (lauryl sulfate broth) ของ Merck

3.2 บริลเลียนท์กรีนไบล์ ร้อยละ 2 (brilliant green bile 2 %) ของ Difco

3.3 อีซีมีเดียม (EC medium) ของ Difco

3.4 ลีวายน์ อี เอ็ม บี อะการ์ (Levine EMB agar) ของ Difco

3.5 เอ็มอาร์-วีพี มีเดียม (MR-VP medium) ของ Difco

3.6 ทริปโทน บรอท (tryptone broth) ของ Difco

3.7 โคเซอร์ ซิเตรท บรอท (Koser citrate broth) ของ Difco

3.8 เพลตเคานต์ อะการ์ (plate count agar) ของ Difco

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดอยู่ในภาคผนวก 1

4. สารเคมี และสารละลาย

4.1 โคแวกส์รีเอเจนท์

4.2 สารละลายสำหรับเจือจาง

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก 1

5. วิธีศึกษาทดลอง

5.1 การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ช้อนซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างเนื้อวัวสดบดโดยชั่งมา 25 กรัม ใส่ลงในสารละลายสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร เขย่าขึ้นลงอย่างรวดเร็ว 25 ครั้ง จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 ต่อ 10 ทำให้เจือจางต่อไปเรื่อยๆ โดยใช้สารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 ต่อ 100 และ 1 ต่อ 1 000 ตามลำดับ

5.2 วิธีวิเคราะห์โคลิฟอร์ม โดยวิธีเอ็มพีเอ็น [7]

1) ปิเปตสารละลายที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 10 , 1 ต่อ 100 และ 1 ต่อ 1 000 จำนวน 3 ความเข้มข้น ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อลอริล ซัลเฟตบรอท หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด

2) นำหลอดทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง สังเกตการสร้างแก๊สภายในหลอดดูแรห์ม หากพบแก๊สนำหลอดทดลองที่พบการสร้างแก๊สนั้นไปทดสอบยืนยันต่อไป

3) นำหลอดที่มีแก๊สมาเขย่าเบาๆ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อบริลเลียนท์กรีนไบล์ ร้อยละ 2

4) นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง สังเกตการสร้างแก๊สภายในหลอดดูแรห์ม ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่า เป็นโคลิฟอร์ม

5) คำนวณหาค่าเอ็มพีเอ็นจากจำนวนหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้น โดยใช้ตารางเอ็มพีเอ็น (ภาคผนวก 2)

5.3 วิธีวิเคราะห์อี.โคไล โดยวิธีเอ็มพีเอ็น [7]

1) นำหลอดที่มีแก๊สในอาหารเลี้ยงเชื้อลอริลซัลเฟตบรอทข้อ 5.2 1) มาเขย่าเบาๆ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีซีมีเดียม

2) อบเพาะเชื้อในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง สังเกตการสร้างแก๊สภายในหลอดดูแรห์ม

3) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้น ไปขีดเป็นเส้นๆ (streak) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลิวายน์ อี เอ็ม บี อะการ์ ในลักษณะที่จะให้โคโลนีแยกจากกัน

4) อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีซึ่งมีสีเข้มมีเหลือบโลหะ (metallic sheen)

5) เลือกโคโลนีในข้อ 4) มาอย่างน้อย 2 โคโลนี นำไปถ่ายลงในเพลตเคานต์อะการ์ สแลนท์ (plate count agar slant) อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

6) นำเชื้อที่เจริญบนสแลนท์จากข้อ 5) มาย้อมสีกรัม ดังนี้

— หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด

— เขี่ยเชื้อด้วยลวดเขี่ยเชื้อแตะลงบนหยดน้ำบนสไลด์ เขี่ยให้ทั่ว

— ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างเร็ว 2 ถึง 3 ครั้ง

— หยดสีกรัมคริสทอลไวโอเลต (Gram crystal violet) ลงบนเชื้อที่เขี่ยไว้ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา

— หยดกรัมไอโอดีน (Gram iodine) ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา

— ล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ประมาณ 15 ถึง 30 วินาที

– หยดกรัมซาฟรานิน (Gram safranin) ทิ้งไว้ 10 ถึง 30 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้ง

– นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

7) นำเชื้อที่รูปร่างเป็นท่อน ติดสีกรัมลบ ไม่สร้างสปอร์ มาทดสอบทางชีวเคมี ดังนี้

– เพาะเชื้อลงในทริปโทนบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทดสอบการเกิดอินโดลโดยการเติมโคแวกส์รีเอเจนท์ 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นในชั้นของแอลกอฮอล์ แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวก

– เพาะเชื้อในเอ็มอาร์วีพีมีเดียม อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเพื่อทดสอบอะเซทิลเมทิลคาร์มินอล โดยเติมสารแอลฟาเนฟทอลร้อยละ 5 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และครีเอทีน 2 - 3 เกล็ด เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นแสดงว่าปฏิกิริยาวีพีเป็นบวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสี แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นลบ

– นำอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์วีพีที่เหลือไปอบเพาะเชื้อต่ออีก 48 ชั่วโมง เพื่อทดสอบปฏิกิริยาเมทิลเรด โดยเติมสารละลายเมทิลเรดลงไป 5 หยด ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวก

– การทดสอบซิเตรท ทำโดยเพาะเชื้อในโคเซอร์ซิเตรทบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 96 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญเติบโตเป็นบวกหรือลบ โดยดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น บันทึกผลเป็นบวก

– การสร้างแก๊สจากแล็กโทส ทำโดยเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมีลอริลซัลเฟตบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สังเกตแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดูแรห์ม ถ้าสร้างแก๊ส บันทึกผลเป็นบวก

8) จากการทดลองข้อ 1) ถึง ข้อ 7) สรุปได้ว่าเป็น อี.โคไล ดังนี้

– สร้างแก๊สจากแล็กโทสที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใน 48 ชั่วโมง

– รูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีกรัมลบ ไม่สร้างสปอร์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

– ให้ปฏิกิริยาอินโดล เป็นบวกหรือลบ เมทิลเรดเป็นบวก วีพีเป็นลบ ซิเตรทเป็นลบ

9) คำนวณหาค่าเอ็มพีเอ็นจากจำนวนหลอดที่ให้ผลตามข้อ 8) โดยใช้ตารางเอ็มพีเอ็น (ภาคผนวก 2)

3. ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์โคลิฟอร์มและอี.โคไลโดยวิธีเอ็มพีเอ็นโดยใช้ลอริลซัลเฟตบรอท อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง (ตามตารางที่ 3) หลอดที่พบแก๊สอาจเป็นโคลิฟอร์มหรืออี.โคไล ดังนั้นต้องนำไปทดสอบยืนยันว่าเป็นชนิดใด

ผลการทดสอบยืนยันโคลิฟอร์มโดยใช้บริลเลียนท์กรีนไบล์ ร้อยละ 2 อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง ตามตารางที่ 4

ผลการทดสอบยืนยันอี.โคไลโดยใช้อีซีมีเดียม อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง ตามตารางที่ 5

จากการนำผลที่ได้จากตารางที่ 4 และ 5 ไปอ่านค่าในตารางภาคผนวก 2 จะได้ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมของโคลิฟอร์มและอี.โคไลตามตารางที่ 2 พบว่าโคลิฟอร์มในเนื้อวัวสดบดทุกตัวอย่าง โดยมีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมตั้งแต่ 23 ถึง มากกว่า 1 100 นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ตัวอย่างที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม มากกว่า 1 100 มีมากถึง 11 ตัวอย่างหรือคิดเป็นร้อยละ 55 ของตัวอย่างที่นำมาศึกษา

จากผลการทดลองยังพบว่า ปริมาณอี.โคไลในตัวอย่างเนื้อวัวสดบด มีเอ็มพีเอ็นต่อกรัม ตั้งแต่ น้อยกว่า 3 จนถึง มากกว่า 1 100 โดยตัวอย่างที่พบอี.โคไล ที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมน้อยกว่า 3 (ซึ่งถือว่าเป็นตัวอย่างที่ไม่พบอี.โคไล) มีอยู่ 3 ตัวอย่างหรือคิดเป็นร้อยละ 15 และตัวอย่างที่พบอี.โคไล ที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม มากกว่า 1 100 มีอยู่ร้อยละ 15 ของตัวอย่างทั้งหมดเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในแต่ละตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือหากพบปริมาณโคลิฟอร์มในเนื้อวัวสดบดมาก ก็ไม่ได้หมายความว่าจะพบปริมาณอี.โคไลมากด้วย ดังจะเห็นได้จากเนื้อวัวสดบดตัวอย่างที่ 5 และตัวอย่างที่ 8 อย่างไรก็ตามพบว่ามีเนื้อวัวสดบด 3 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 15 ของตัวอย่างทั้งหมดที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม ของทั้งโคลิฟอร์มและอี.โคไล มากกว่า 1 100

จากการศึกษาระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างเนื้อวัวสดบดพบว่า พบปริมาณโคลิฟอร์มที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมมากกว่า 1 100 ในตัวอย่างซึ่งเก็บทุกเดือน ตั้งแต่เดือน มกราคม

2540 จนถึง พฤษภาคม 2540 ส่วนปริมาณอี.โคไลที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม มากกว่า 1 100 พบในตัวอย่างที่เก็บในเดือน มกราคม และ มีนาคม 2540 เท่านั้น สำหรับเนื้อวัวสดบดที่มีค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมของทั้งโคลิฟอร์ม และอี.โคไล มากกว่า 1 100 พบในตัวอย่างที่เก็บเดือน มกราคม และ มีนาคม 2540 เช่นกัน สำหรับค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมของทั้งโคลิฟอร์ม และ อี.โคไลต่ำที่สุดในการทดลองครั้งนี้คือ 23 และ น้อยกว่า 3 ตามลำดับ พบในเนื้อวัวสดบดตัวอย่างที่ 4 ซึ่งเก็บในเดือน มกราคม 2540

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในตัวอย่างเนื้อวัวสดบด

ตัวอย่าง	โคลิฟอร์ม เอ็มพีเอ็น/กรัม	อี.โคไล เอ็มพีเอ็น/กรัม
1	93	21
2	93	7.3
3	> 1 100	> 1 100
4	23	< 3
5	> 1 100	< 3
6	460	9.1
7	> 1 100	290
8	> 1 100	< 3
9	> 1 100	160
10	150	75
11	> 1 100	7.3
12	93	23
13	> 1 100	> 1 100
14	> 1 100	> 1 100
15	> 1 100	53
16	> 1 100	42
17	210	15
18	460	93
19	> 1 100	42
20	53	15

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

เนื้อวัวสดบดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ พบโคลิฟอร์มในทุกตัวอย่างคิดเป็นเอ็มพีเอ็นต่อกรัมตั้งแต่ 23 จนถึง มากกว่า 1 100 และพบอี.โคไลในเนื้อวัวสดบดมากถึงร้อยละ 85 ของตัวอย่าง โดยพบโคลิฟอร์มปริมาณมากในเนื้อวัวสดบดหลายตัวอย่าง สำหรับอี.โคไลพบว่ามีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่างเดียวกัน มีสามตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 30 ของตัวอย่างทั้งหมด) ที่พบจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีปริมาณมาก

จากการศึกษาปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อวัวสดบดครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามตลาดมีโคลิฟอร์มและอี.โคไลปนเปื้อน โดยทั่วไปโคลิฟอร์มและอี.โคไลอาศัยอยู่ในลำไส้ของวัว หากชำแหละเนื้อวัวไม่ถูกสุขลักษณะจุลินทรีย์เหล่านี้จะปนเปื้อนลงไปในเนื้อวัว และหากอุณหภูมิระหว่างการขนส่ง การเก็บรักษาเหมาะแก่การเจริญสำหรับจุลินทรีย์เหล่านี้ โคลิฟอร์มและอี.โคไลจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้โคลิฟอร์มและอี.โคไลอาจปนเปื้อนได้จากร่างกายมนุษย์และเครื่องจักรที่ไม่สะอาดในการบดเนื้อวัว สาเหตุเหล่านี้ทำให้ตรวจพบโคลิฟอร์มและอี.โคไลได้ในเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามตลาด

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

5. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองหาปริมาณโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อวัวสดบด 20 ตัวอย่าง พบโคลิฟอร์มในทุกตัวอย่าง ส่วนอี.โคไลพบในตัวอย่างถึง 17 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 85 แสดงว่าเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามท้องตลาดส่วนใหญ่ปนเปื้อนด้วยโคลิฟอร์ม และอี.โคไล ซึ่งการปนเปื้อนนี้อาจมาจากโรงฆ่าสัตว์ หรือผู้ค้าที่นำมาจำหน่าย การที่พบอี.โคไลในหลายตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะที่ไม่ดี ตัวอย่างเนื้อวัวสดบดที่เก็บในช่วงเดือนมกราคม 2540 ถึง พฤษภาคม 2540 พบว่ามีการปนเปื้อนของบักเตรีทั้งสองชนิดในการเก็บตัวอย่างทุกๆเดือน ไม่ว่าจะเป็นเดือนที่มีอากาศร้อน หรืออากาศเย็น อย่างไรก็ดีผู้ผลิตสามารถควบคุมการปนเปื้อนของโคลิฟอร์ม และอี.โคไลในเนื้อวัวสดบดได้ดังนี้ [8]

- แยกเครื่องในวัวออกโดยระวังไม่ให้เครื่องในแตกระหว่างการชำแหละ
- ให้นำเนื้อวัวที่ชำแหละแล้วไปแช่แข็งหรือห้องเย็นทันทีหลังชำแหละ
- การหั่นหรือตัดเนื้อวัวให้เป็นชิ้นเล็กๆควรทำในห้องเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ติดมาเจริญเติบโตได้
- ควรดูแลโรงชำแหละให้สะอาดอยู่เสมอ ให้มีสุขลักษณะที่ดี
- ร้านค้าเนื้อที่นำเนื้อวัวสดมาบดก็ควรดูแลให้อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้บดมีความสะอาดถูกสุขลักษณะ หมั่นล้าง และทำความสะอาดบ่อยๆจะทำให้ได้เนื้อวัวสดบดที่มีการปนเปื้อนของโคลิฟอร์ม และอี.โคไลน้อยลง

การบริโภคเนื้อวัวสดบดต้องนำมาทำให้สุกก่อนรับประทาน โคลิฟอร์ม และอี.โคไลก็จะถูกทำลายไปด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ทนความร้อน หากจะบริโภคเนื้อวัวสดบดให้ปลอดภัยที่สุดควรนำมาต้ม หรือย่างให้เนื้อนั้นสุกทั่วถึงกัน ไม่ควรบริโภคเนื้อวัวสดบดดิบๆ หรือ สุกๆ ดิบๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คุณวรรณี สมพร หัวหน้ากลุ่มงาน จุลชีววิทยา ที่ช่วยให้คำปรึกษา และแนะนำ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกลุ่มงานจุลชีววิทยาที่สนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Adams, M. R. and Moss, M. O. **Food Microbiology**. Redwood Books Ltd., Wiltshire, 1995.

2. Banwart, G. J. **Basic Food Microbiology, second edition.** Van Nostrand Reinhold, New York, 1989.

3. Difco Manual Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10th ed. Difco Laboratories. Detroit Michigan, 1984.

4. E.Merck, Microbiology Manual, Darmstadt, 1996.

5. Mattila, T. and Frost, A. J. Colonization of beef and chicken muscle surfaces by *Escherichia coli*. **Food Microbiology.** 5, 1988: 219-230.

6. Mehlman, I. J. Coliforms, fecal coliforms, *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli*. In : **Compendium of Method for the Microbiological Examination of Foods, second edition**, ed., Speck , M. L., American Public Health Association, Washington, DC, 1984.

7. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, Virginia, 1995.

8. Tompkin, R. B. Indicator Organisms in meat and Poultry Products. **Food Technology.** 37, 6, 1983: 107-111.

9. พวงพร โชติกไกร **จุลชีววิทยาของอาหารและนม** ศรีเมืองการพิมพ์ กรุงเทพมหานคร 2525

10. มัทนา แสงจินดาวงศ์ การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ประมงบางชนิด **อาหาร** 12, 2, 2523: 157-168.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1.1 ลอริลซัลเฟตบรอท (lauryl sulfate broth) ของ Merck [4]

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส (tryptose)	20	กรัม
ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate)	2.75	กรัม
โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	2.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
แล็กโทส (lactose)	5	กรัม
โซเดียม ลอริล ซัลเฟต (sodium lauryl sulfate)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.8 $\pm$ 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดจับแก๊ส ดูแรห์ม (durham tube)คว่ำอยู่ในหลอด ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 บริลเลียนท์กรีนไบล์ ร้อยละ 2 (brilliant green bile 2 %) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน (peptone)	10	กรัม
ดีวัว (oxgall)	20	กรัม
แล็กโทส (lactose)	10	กรัม
บริลเลียนท์กรีน (brilliant green)	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดจับแก๊ส ดูแรห์ม (durham tube)คว่ำอยู่ในหลอด ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3 อีซีมีเดียม (EC medium) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส (tryptose)	20	กรัม
แล็กโทส (lactose)	5	กรัม
ไบล์ซอลต์หมายเลข 3 (bile salts No. 3)	1.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	4	กรัม
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (monopotassium phosphate)	1.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดจับแก๊ส ดูแรห์ม (durham tube)คว่ำอยู่ในหลอด ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 ลีวายน์ อี เอ็ม บี อะการ์ (Levine EMB agar) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน (peptone)	10	กรัม
แล็กโทส (lactose)	10	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	2	กรัม
อีโอซิน วาย (Eosin Y)	0.4	กรัม
เมทิลลีน บลู (methylene blue)	0.065	กรัม

วุ้น (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.5 เอ็มอาร์-วีพี มีเดียม (MR-VP medium) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

บัฟเฟอร์ เพปโทน (buffered peptone)	7	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	5	กรัม
เดกซโทรส (dextrose)	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.6 ทริปโทน บรอท (tryptone broth) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน (tryptone)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.7 โคเซอร์ซิเตรท บรอท (Koser citrate broth) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate)	0.2	กรัม
โซเดียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (sodium ammonium phosphate)	1.5	กรัม
โมโนเบสิกโพแทสเซียมฟอสเฟต (monobasic potassium phosphate)	1	กรัม
โซเดียมซิเตรท (sodium citrate)	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.7 $\pm$ 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.8 เพลตเคานต์ อะการ์ (plate count agar) ของ Difco [3]

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน (tryptone)	5	กรัม
ยีสต์เอกซ์แทรกต์ (yeast extract)	2.5	กรัม
เดกซโทรส (dextrose)	1	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0 $\pm$ 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. สารเคมีและสารละลาย

2.1 โคแวกส์รีเอเจนท์ (Kovac's reagent)

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimethy-aminobenzaldehyde) 5 กรัม ใน เอมิลแอลกอฮอล์ 75 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร จะได้โคแวกส์รีเอเจนท์ 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายสำหรับเจือจาง

เตรียมดังนี้

2.2.1 ละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) 34 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 1นอร์แมล ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.2.2 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เตรียมโดยใช้สารละลายที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.2.3 บรรจุสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในขวดและหลอดทดลองฝาเกลียว ปริมาตร 225 และ 9 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก 2

ตาราง เอ็มพีเอ็นต่อกรัม (AOAC 1995)

(ใช้ตัวอย่าง 0.1 0.01 และ 0.001 กรัม ความเข้มข้นละ 3 หลอด)

Positive Tubes				Positive Tubes				Positive Tubes				Positive Tubes			
0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12.	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ภาคผนวก 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์โคลิฟอร์มและอี.โคไลเบื้องต้น ใช้ลอริลซัลเฟตบรอท อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก		
	0.1 กรัม	0.01 กรัม	0.001 กรัม
1	3	2	0
2	3	2	0
3	3	3	3
4	3	0	0
5	3	3	3
6	3	3	1
7	3	3	3
8	3	3	3
9	3	3	3
10	3	3	1
11	3	3	3
12	3	3	3
13	3	3	3
14	3	3	3
15	3	3	3
16	3	3	3
17	3	3	3
18	3	3	3
19	3	3	3
20	3	3	3

หมายเหตุ ตารางนี้เป็นข้อมูลดิบการวิเคราะห์โคลิฟอร์มและอี.โคไลโดยวิธีเอ็มพีเอ็น หลังจากอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนำหลอดทดลองที่ให้ผลบวกไปทดสอบยืนยันว่าเป็นบักเตรีชนิดโคลิฟอร์ม และอี.โคไลหรือไม่ ผลการทดสอบยืนยันที่ได้แสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบยืนยันบักเตรีชนิดโคลิฟอร์มโดยใช้บริลเลียนท์กรีนไบล์ร้อยละ 2 อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก		
	0.1 กรัม	0.01 กรัม	0.001 กรัม
1	3	2	0
2	3	2	0
3	3	3	3
4	3	0	0
5	3	3	3
6	3	3	1
7	3	3	3
8	3	3	3
9	3	3	3
10	3	2	1
11	3	3	3
12	3	2	0
13	3	3	3
14	3	3	3
15	3	3	3
16	3	3	3
17	3	2	2
18	3	3	1
19	3	3	3
20	2	3	3

หมายเหตุ ตารางนี้เป็นข้อมูลดิบการทดสอบยืนยันบักเตรีชนิดโคลิฟอร์ม นำผลที่ได้อ่านค่าในตารางภาคผนวก 2 ค่าที่ได้เป็นเอ็มพีเอ็นบักเตรีชนิดโคลิฟอร์มต่อตัวอย่าง 1 กรัม ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบยืนยันบักเตรีชนิดอี.โคไลโดยใช้อีซีมีเดียม อบที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบทางชีวเคมี

ตัวอย่าง	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก		
	0.1 กรัม	0.01 กรัม	0.001 กรัม
1	2	2	0
2	1	1	0
3	3	3	3
4	0	0	0
5	0	0	0
6	2	0	0
7	3	2	3
8	0	0	0
9	3	1	3
10	3	1	1
11	1	1	0
12	3	0	0
13	3	3	3
14	3	3	3
15	2	3	3
16	2	2	3
17	2	1	0
18	3	2	0
19	2	2	3
20	1	2	1

หมายเหตุ ตารางนี้เป็นข้อมูลดิบการทดสอบยืนยันบักเตรีชนิดอี.โคไล นำผลที่ได้อ่านค่าในตารางภาคผนวก 2 ค่าที่ได้เป็นเอ็มพีเอ็นบักเตรีชนิดอี.โคไลต่อตัวอย่าง 1 กรัม ตามตารางที่ 2