abst

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

วศ
กช
อว 39

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาพัฒนาวิธีตาปริมาณ *Escherichia coli* ในอาหาร

นางสาววรรณี สมพร
ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7ว

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ข้อมูล ... กรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูล ... ราชการ พ.ศ. 2540

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาพัฒนาวิธีตาปริมาณ *Escherichia coli* ในอาหาร

นางสาววรรณี สมพร

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7ว

วท
เลขหมู่ 578
ส239
เลขทะเบียน 10506
5 กพ 45

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

การศึกษาพัฒนาวิธีหาปริมาณ *Escherichia coli* ในอาหาร

บทคัดย่อ

การศึกษาพัฒนาวิธีหาปริมาณ *Escherichia coli* ทำโดยตรวจสอบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone ซึ่งเกิดจากการไฮโดรไลส์ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) โดยเอนไซม์ β-glucuronidase จาก *E. coli* และการสร้างอินโดล ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* ในอาหารพร้อมบริโภคและการใช้เชื้ออ้างอิง โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MUG และ tryptophan คือ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth ใช้วิธี 3 tube MPN technique ทดลองที่สองอุณหภูมิ คือที่ 35°ซ และ 45.5°ซ เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน (standard conventional method : AOAC 1995) ซึ่งใช้ lauryl sulfate tryptose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ และการทดสอบยืนยัน

ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของวิธีวิเคราะห์ที่ศึกษา พบว่า กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ กับ lauryl sulfate tryptose broth (ตามวิธีมาตรฐาน) มีค่า correlation coefficient 0.812 ค่าความชัน 0.863 และค่าจุดตัดบนแกน Y 0.188 เป็นค่าที่ใกล้เคียงที่สุดกับ line of equality ซึ่งเป็นค่าที่เทียบเท่าของวิธีวิเคราะห์

ผลการเปรียบเทียบวิธีหาปริมาณ *E. coli* พบว่า การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24-48 ชั่วโมง ให้ผลใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน โดยมี sensitivity ร้อยละ 95.2 specificity ร้อยละ 98.7 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5°ซ มี sensitivity ร้อยละ 80.9 specificity ร้อยละ 97.5 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ มี sensitivity ร้อยละ 90.5 และ 85.7 ตามลำดับ มี specificity เท่ากัน คือ เท่ากับร้อยละ 98.7 เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth ประหยัดกว่าการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานถึงร้อยละ 55.5

การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth จึงใช้แทนวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณ *E. coli* เป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งปกติใช้เวลา 7-9 วัน เหลือเพียง 1-2 วัน ให้ผลใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ทดสอบ

สารบาญ

	หน้า
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	5
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	6
ผลการทดลอง	15
วิจารณ์ผล	18
สรุปผลการทดลอง	21
ประโยชน์ที่ได้รับ	22
คำขอบคุณ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก ก	
สารบาญตาราง	ii
ภาคผนวก ข	
สารบาญรูปภาพ	iii
ภาคผนวก ค	
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	v
ภาคผนวก ง	
วิธีเตรียมสารละลาย	vi

ภาคผนวก ก
สารบาญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมของตัวอย่าง	29
ตารางที่ 2	ผลการทดสอบ *E. coli* ใน fluorocult lauryl tryptose broth	30
ตารางที่ 3	ผลการทดสอบ *E. coli* ใน fluorocult LMX broth	31
ตารางที่ 4	เปรียบเทียบผลการทดสอบ *E. coli* ใน fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	32
ตารางที่ 5	เปรียบเทียบผลการทดสอบ *E. coli* ใน fluorocult LMX broth (FLMX) และ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	33
ตารางที่ 6	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบจากการทดสอบ *E. coli* โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ fluorocult LMX broth (FLMX) และ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	34
ตารางที่ 7	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ปริมาณ *E. coli* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆเทียบกับวิธีมาตรฐาน	35
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบระยะเวลา จำนวนเครื่องแก้ว และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ *E. coli* ต่อตัวอย่าง	36

ภาคผนวก ข
สารบาญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	การเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone ใน fluorocult lauryl tryptose broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม	37
รูปที่ 2	การทดสอบอินโดลใน fluorocult lauryl tryptose broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม	38
รูปที่ 3	การเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone ใน fluorocult LMX broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม	39
รูปที่ 4	การทดสอบอินโดลใน fluorocult LMX broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม	40
รูปที่ 5	ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult lauryl tryptose broth ที่ 35°ซ [FLT (35°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	41
รูปที่ 6	ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult lauryl tryptose broth ที่ 45.5°ซ [FLT (45.5°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	42
รูปที่ 7	ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult LMX broth ที่ 35°ซ [FLMX (35°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	43
รูปที่ 8	ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult LMX broth ที่ 45.5°ซ [FLMX (45.5°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST)	44

หน้า

รูปที่ 9 เปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ในการ วิเคราะห์ *E. coli* โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ fluorocult LMX broth 45

ภาคผนวก ค
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

	หน้า
1. Escherichia coli broth (EC broth)	46
2. Fluorocult lauryl tryptose broth (FLT)	46
3. Fluorocult LMX broth (FLMX)	47
4. Koser citrate broth	48
5. Lauryl sulfate tryptose broth (LST)	48
6. Levine EMB agar	49
7. MR-VP broth	49
8. Nutrient broth	50
9. Plate count agar	50
10. Tryptophane broth	51

ภาคผนวก ง
วิธีเตรียมสารละลาย

หน้า

1. Butterfield's buffered phosphate diluent 52

2. Gram stain reagent 52

3. Kovacs reagent 53

4. Methyl red indicator 53

5. Voges-Proskauer (VP) reagent 53

คำนำ

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่บ่งชี้ถึงสุขลักษณะในการผลิต การตรวจพบ *E. coli* ในอาหารแสดงถึงความบกพร่องเกี่ยวกับสุขลักษณะในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ *E. coli* ยังทำให้เกิดการระบาดของโรค เช่น โลหิตเป็นพิษ การอักเสบของระบบทางเดินปัสสาวะ ในการตรวจสอบ *E. coli* อาจใช้วิธีเพาะเชื้อในอาหารแข็งบนจานเพาะเชื้อ หรือวิธีเพาะเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้วิธีเอ็มพีเอ็น (MPN =most probable number) ในการตรวจสอบต้องผ่านขั้นตอนการทดสอบยืนยันหลายขั้นตอน ซึ่งตามปกติจะใช้เวลา 7-9 วัน จึงจะสามารถสรุปได้ว่าตรวจพบ *E. coli* จึงได้มีการวิจัยเพื่อหาวิธีที่สามารถตรวจสอบ *E. coli* ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น การทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นวิธีหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษาทดลองกันมาก เอนไซม์จาก *E. coli* ที่ใช้ในการทดสอบมีหลายชนิด เช่น β-glucuronidase[23] galactosidase[29] glutamate dehydrogenase[25] เป็นต้น

เอนไซม์ β-glucuronidase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและมีผู้ทำการศึกษาวิจัยกันมาก Kilian และ Bulow ได้ศึกษาเอนไซม์นี้ใน Enterobacteriaceae พบว่า *E. coli* มีเอนไซม์นี้ร้อยละ 97 [13] มี *E. coli* เป็นส่วนน้อยที่ไม่พบ β-glucuronidase รวมทั้ง *E. coli* 0157:H7 [4] แบคทีเรีย species อื่นใน genus *Escherichia* จะไม่พบ β-glucuronidase [9] ส่วนแบคทีเรียอื่นใน Enterobacteriaceae ที่พบ β-glucuronidase ได้แก่ *Shigella*, *Salmonella*[10] และ *Yersinia*[26] แต่แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถสร้างอินโดลจึงแยกออกจาก *E. coli* ได้ สำหรับแบคทีเรียชนิดติดสีกรัมบวกที่ตรวจพบ β-glucuronidase เช่น *Staphylococcus*[16] *Streptococcus*[27] แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ *E. coli* มี lauryl sulfate ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดติดสีกรัมบวก

การทดสอบปฏิกิริยาของ β-glucuronidase ใน *E.coli* สามารถทดสอบได้ โดยการเติมซับสเตรท (substrate) ซึ่งเมื่อไฮโดรไลส์โดย β-glucuronidase เกิดสารซึ่งเรืองแสงหรือมีสี ตรวจสอบสารเรืองแสงโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 360-366 นาโนเมตร[11] หรือวัดคอนดัคแทนซ์ (conductance)[21] ส่วนสารที่มีสีตรวจสอบโดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริค[1][22] ซับสเตรทที่นิยมใช้กันมากได้แก่

p-nitrophenyl-β-D-glucuronide ซึ่งจะให้ *p*-nitrophenyl มีสีเหลือง(13)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide และ indoxyl - β-D-glucuronide ให้สาร indoxyl หรือ halogenated indoxyl ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์เป็นสารสีคราม (indigo) ทำให้ *E. coli* ซึ่งมีเอนไซม์ β-glucuronidase มีโคโลนีสีน้ำเงินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอะการ์ (12)

4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) เมื่อไฮโดรไลส์จะให้ 4-methylumbelliferone ซึ่งเป็นสารเรืองแสง(11)

MUG เป็นซับสเตรทซึ่งให้ผลชัดเจน ใช้ได้กับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่เป็นของเหลวหรือชนิดเติมอะการ์ จึงมีผู้ทำการศึกษาวิจัยการใช้ MUG ในการวิเคราะห์และตรวจสอบ *E. coli* กันมาก ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้

4-methylumbelliferyl-β-D glucuronide (MUG)
ไม่มีสี

<—— β-D glucuronidase

V

glucuronic acid + 4-methylumbelliferone
ไม่มีสี สารเรืองแสง

การใช้ MUG เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบ *E. coli* ได้เริ่มทดลองโดย Feng และ Hartman โดยการเติม MUG ลงใน lauryl sulfate tryptose broth (LST) เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีเอ็มพีเอ็น พบว่าหลอดทดลองที่ให้แก๊สและเรืองแสงใน LST-MUG หลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปทดสอบยืนยันใน EC broth ที่ 45°ซ เป็นฟีคัลโคลิฟอร์มร้อยละ 91(10) หลังจากนั้นมีการทดลองใช้ MUG เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆเพื่อตรวจสอบ *E. coli* ในอาหาร(17)(24) น้ำ(5) สิ่งแวดล้อม(8) และตัวอย่างจากผู้ป่วย (6)(7)(28)

Poelma และคณะ ได้วิเคราะห์หาปริมาณ *E. coli* ในอาหารที่มีความชื้นสูง คือ ไส้กรอกหมูดิบ ไก่งวงบด และเนื้อบด โดยใช้ LST-MUG เปรียบเทียบกับ LST พบว่า mean log เอ็มพีเอ็น ในการใช้ MUG ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากวิธีมาตรฐาน (standard conventional method)[24] Moberg ได้ทดลองใช้ LST-MUG ในการวิเคราะห์ *E.coli* ในอาหาร เปรียบเทียบกับการใช้ LST พบว่า การใช้ LST-MUG มี false positive rate ร้อยละ 1.4 ในขณะที่ LST มี false positive rate ร้อยละ 2.7[16] Moberg และคณะ ได้วิเคราะห์ *E. coli* ในอาหารแช่เย็นและอาหารแช่แข็ง พบว่า การใช้ LST-MUG อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24 ชั่วโมง ตรวจพบหลอดที่เกิดการเรืองแสงร้อยละ 83-95 แต่ถ้าอบเพาะเชื้อเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง พบหลอดที่เกิดการเรืองแสงร้อยละ 96-100[17]

การตรวจสอบ *E. coli* ในอาหารทะเล Alvarez ได้วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทะเล ซึ่งมีปลาสดและสัตว์น้ำที่มีเปลือก เช่น หอย กุ้ง ปู พบว่า การใช้ LST-MUG ในการวิเคราะห์ *E. coli* ให้ผลเทียบเท่ากับการใช้ violet red bile-MUG agar และ M-Endo-MUG broth[2] Motes และ Peeler ได้ทดลองใช้ LST-MUG ในการตรวจสอบ *E. coli* ในหอยนางรมและน้ำทะเล พบว่า ในหอยนางรมมี false positive สูง หลังจากทดสอบยืนยันโดยวิธี IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer และ citrate) พบ *E. coli* ร้อยละ 77 ในหอยนางรม และร้อยละ 95 ในน้ำทะเล[19]

เพ็ญศรีและคณะ ได้ศึกษาการตรวจสอบยืนยัน *E. coli* ในอาหารทะเลดิบและไก่สดแช่แข็ง ใช้ fluorocult *E. coli* detect agar และ fluorocult brila broth พบว่า การใช้ fluorocult brila broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°ซ ให้แทนวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานได้ โดยมีค่า sensitivity ร้อยละ 90.91 และ specificity ร้อยละ 90.67[30]

จากข้อมูลที่ได้ศึกษามา พบว่า ในการตรวจสอบ *E. coli* โดยอาศัยปฏิกิริยาของ β-glucuronidase ผลการตรวจสอบขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรีย สภาพของเซลล์ ชนิดของตัวอย่าง ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้ ผู้วิจัยส่วนใหญ่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโดยเติม MUG ลงใน LST หรือ EC broth ตรวจสอบการเรืองแสง แล้วจึงนำไปทดสอบยืนยันปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไป ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลองมักเป็นอาหารดิบ จึงขาดข้อมูลเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทดสอบใน

อาหารพร้อมบริโภค ซึ่งเป็นอาหารผ่านกรรมวิธี ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียอยู่ในสภาพถูกทำลาย ซึ่งจะแตกต่างกับอาหารดิบ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาทดลองวิธีหาปริมาณ *E. coli* ในอาหารพร้อมบริโภค โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม MUG และ trytophan ตรวจสอบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone และการสร้างอินโดล ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการใช้เอนไซม์ β-glucuronidase และการสร้างอินโดล ในการทดสอบ *E. coli* และโคลิฟอร์ม

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth ในการทดสอบ *E. coli* ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณ *E. coli* ในอาหารพร้อมบริโภค ด้วยวิธีตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-glucuronidase และการสร้างอินโดล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในงานประจำ เพื่อประเมินวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง และประหยัด

เป้าหมายของการศึกษาทดลอง

การศึกษาทดลองนี้มีเป้าหมายจะศึกษาพัฒนาวิธีการหาปริมาณ *E. coli* ในอาหารพร้อมบริโภค ซึ่งมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณมาก โดยใช้การปรับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการวินิจฉัยเชื้อ และอุณหภูมิอบเพาะเชื้อ เพื่อให้ได้วิธีการที่รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำ

ประโยชน์ที่ได้รับ

ใช้สำหรับเป็นข้อมูลในการพิจารณาร่างมาตรฐานต่างๆ เช่น มาตรฐานขององค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (The International Organization for Standardization) และใช้เป็นวิธีปฏิบัติสำหรับการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli*

ระยะเวลาดำเนินการ

กรกฎาคม 2538 - มิถุนายน 2539

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งอัด สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 121+1°ซ
2. ตู้อบ สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 170-175°ซ
3. ตู้อบเพาะเชื้อ สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 35+1°ซ
4. อ่างน้ำ สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 45.5+ 0.2°ซ
5. เครื่องชั่ง สามารถอ่านค่าได้ละเอียด 0.1 กรัม
6. เครื่องตีป่น
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง สามารถวัดความเป็นกรด-ด่างได้ละเอียด +0.1 ที่อุณหภูมิ 25°ซ
8. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สเปกโตนิค 20 (Spectrophotometer, Spectonic 20) บริษัท Bausch & Lomb
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง
10. หลอดอัลตราไวโอเลต (UV lamp) บริษัทMerck ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
11. กล้องจุลทรรศน์
12. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ของกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

อาหารเลี้ยงเชื้อสารละลายและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Escherichia coli broth (EC broth) (บริษัท Difco)
2. Fluorocult lauryl tryptose broth (FLT)(บริษัท Merck)
   มี lauryl sulfate tryptose broth + MUG + trytophan
3. Fluorocult LMX broth (FLMX)(บริษัท Merck)
   มี lauryl sulfate tryptose broth + MUG + X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) + trytophan
4. Koser citrate broth (บริษัท Difco)
5. Lauryl sulfate tryptose broth (LST)(บริษัท Merck)
6. Levine EMB agar (บริษัท Difco)
7. MR-VP broth (บริษัท Difco)
8. Nutrient broth (บริษัท Difco)
9. Plate count agar (บริษัท Difco)
10. Tryptophane broth

สารละลาย

1. Butterfield's buffered phosphate diluent
2. Gram stain reagent
3. Kovacs reagent
4. McFarland standard (บริษัท Api)
5. Methyl red indicator
6. Voges-Proskauer (VP) reagent

สารเคมี

1. Creatine (บริษัท Merck)

เชื้ออ้างอิง

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Aerobacter aerogenes* 1 แยกได้จากตัวอย่างน้ำ
3. *A. aerogenes* 2 แยกได้จากตัวอย่างเครื่องดื่ม

ตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลองเป็นอาหารที่จำหน่ายในกรมวิทยาศาสตร์บริการ ร้านค้าในตลาด และห้างสรรพสินค้า ประเภทของอาหารที่ใช้ เป็นอาหารที่มักตรวจพบ *E. coli* คือ น้ำผลไม้สด ไอศกรีม นมพาสเจอไรส์ น้ำแข็ง และน้ำ ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่าง จะเก็บในสภาพที่จัดจำหน่าย และทำการวิเคราะห์ภายในวันที่เก็บตัวอย่าง

วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1

ศึกษาการใช้เอนไซม์ β-glucuronidase และการสร้างอินโดลจาก trytophan ในการทดสอบ *E. coli* และโคลิฟอร์ม

1.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้ออ้างอิงทั้งสามชนิดมาแยกเพาะเชื้อใน nutrient broth โดยใช้เชื้อ 1 ลูปต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อบริสุทธิ์ 3 หลอด นำมาเตรียมเชื้อผสมโดยใช้ปิเปตดูดเชื้อแต่ละหลอดมา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมาเติมลงในหลอดทดลองซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วเขย่าให้เข้ากันจะได้เชื้อผสม

1.2 การทดสอบ

1.2.1 นำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดและเชื้อผสมไปเพาะใน fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อแต่ละชนิด 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ ขณะเดียวกันนำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ไม่เติมเชื้อ ไปอบเพาะเชื้อด้วย เพื่อเป็นหลอดเปรียบเทียบ

1.2.2 เมื่ออบเพาะเชื้อครบ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone และการเกิดแก๊สใน fluorocult lauryl tryptose broth การเรืองแสงและการเกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-D-galactosidase ใน fluorocult LMX broth[15] การตรวจสอบการเรืองแสงใช้หลอดอัลตราไวโอเลต โดยให้แสงอัลตราไวโอเลตส่องผ่านตรงด้านข้างของหลอดทดลอง และให้หลอดอัลตราไวโอเลตอยู่ห่างหลอดทดลอง 5-10 เซนติเมตร การตรวจสอบต้องทำในที่มืด[1]

1.2.3 หลังอบเพาะเชื้อครบ 48 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดล โดยหยด Kovacs reagent 0.2-0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นในชั้นแอลกอฮอล์ แสดงว่าเกิดการสร้างอินโดล

การทดลองที่ 2

ศึกษาเปรียบเทียบการใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth ในการทดสอบ *E. coli* ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยดำเนินการ ดังนี้

2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อ *E. coli* ให้มีความเข้มข้น 10-10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยถ่ายเชื้อ *E. coli* ลงใน plate count agar slant อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเชื้อลงใน nutrient broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24 ชั่วโมง นำไปหาปริมาณเชื้อด้วยการเทียบความขุ่นกับ McFarland standard โดยนำเชื้อไปล้างด้วยน้ำกลั่นซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปั่นให้เชื้อตกตะกอน เทน้ำใสข้างบนทิ้ง ล้างเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นซึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเชื้อที่นำมาล้าง นำไปเทียบความขุ่นกับ McFarland standard โดยวัด optical density ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำไปเจือจางให้มีความเข้มข้น 10-10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

2.2 การทดสอบ

2.2.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายของเชื้อ *E. coli* ที่เตรียมไว้(ข้อ 2.1) จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงใน fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth ความเข้มข้นละ 4 หลอดต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ ความเข้มข้นละ 2 หลอด และที่อุณหภูมิ 45.5°ซ ความเข้มข้นละ 2 หลอด เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง

2.2.2 ตรวจสอบการเรืองแสง โดยใช้หลอดอัลตราไวโอเลต ในขณะเดียวกันตรวจสอบการเกิดแก๊สใน fluorocult lauryl tryptose broth และเกิดสีเขียวแกมน้ำเงินใน fluorocult LMX broth

2.2.3 หลังอบเพาะเชื้อครบ 48 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดล โดยหยด Kovacs reagent 0.2-0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด อ่านผลอินโดล

การทดลองที่ 3

ศึกษาวิธีหาปริมาณ *E. coli* ในตัวอย่างอาหาร 50 ตัวอย่าง โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth เปรียบเทียบกับการใช้ lauryl sulfate tryptose broth ตามวิธีมาตรฐาน ดังนี้

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เป็นของเหลว

เขย่าตัวอย่างขึ้นลงช่วงระยะ 30 เซนติเมตร 25 ครั้ง ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม เติมลงใน Butterfield's buffered phosphate 90 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายเจือจาง 1:10 ทำให้เจือจางต่อไปเรื่อยๆ จนถึง 1:10000 โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงใน Butterfield's buffered phosphate 90 ลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับการเจือจางแต่ละครั้ง

ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ลงในโถแก้วบนเครื่องตีป่น เติม Butterfield's buffered phosphate 450 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตีป่นที่ความเร็วรอบต่ำ 2 นาที จะได้สารละลายเจือจาง 1:10 ทำให้เจือจางต่อไปเรื่อยๆเช่นเดียวกับตัวอย่างที่เป็นของเหลว

3.2 การวิเคราะห์

3.2.1 การวิเคราะห์โดยใช้ lauryl sulfate tryptose broth[20]

ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วตามข้อ 3.1 จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงใน lauryl sulfate tryptose broth ความเข้มข้นละ 3 หลอด นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 48±2 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิดแก๊สหลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง นำหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นไปถ่ายเชื้อลงใน EC broth อบเพาะเชื้อในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 45.5°ซ 48±2 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิดแก๊สหลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง นำหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นไปขีดเป็นเส้น (streak)

บน Levine EMB agar อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24±2 ชั่วโมง เลือกโคโลนีซึ่งมีลักษณะเฉพาะอย่างน้อยจานเพาะเชื้อละ 2 โคโลนี นำไปเพาะเชื้อใน platc count agar slant อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 18-24 ชั่วโมง นำไปทดสอบปฏิกิริยา ดังนี้

3.2.1.1 การทดสอบปฏิกิริยา IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer และ citrate)

3.2.1.1.1 การทดสอบ indole

เพาะเชื้อลงใน tryptophane broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24 ±2 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดล โดยหยด Kovacs reagent 0.2-0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้นในชั้นแอลกอฮอล์ แสดงว่าเกิดการสร้างอินโดล การทดสอบอินโดลเป็นบวก ถ้ามีสีเหลืองในชั้นแอลกอฮอล์ แสดงว่าการทดสอบอินโดลเป็นลบ

3.2.1.1.2 การทดสอบ methyl red และ Voges-Proskauer

เพาะเชื้อลงใน MR-VP medium อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 48±2 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงในหลอดทดลองทดสอบ Voges-Proskauer โดยเติม alcoholic α-naphthol solution จำนวน 0.6 ลูกบาศก์เซนติเมตร potassium hydroxide solution จำนวน 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ creatine เล็กน้อย เขย่า วางทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง การทดสอบ Voges-Proskauer เป็นบวก เมื่อมีสีชมพู (eosin pink) เกิดขึ้น และเป็นลบถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี

ส่วน MR-VP medium ที่เหลือ นำไปอบเพาะเชื้ออีก 48 ชั่วโมง ทดสอบปฏิกิริยา methyl red โดยเติม methyl red indicator 5 หยด การทดสอบเป็นบวก เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้น และเป็นลบเมื่อมีสีเหลือง

3.2.1.1.3 การทดสอบ citrate

เพาะเชื้อลงใน Koser citrate broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 96 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญเติบโต บันทึกผลเป็นบวกเมื่อมีการเจริญของเชื้อ และเป็นลบเมื่อไม่มีการเจริญของเชื้อ

3.2.1.2 เพาะเชื้อลงใน lauryl sulfate tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 48±2 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิดแก๊ส

3.2.1.3 นำเชื้อจาก plate count agar slant หลังอบเพาะเชื้อ 18 ชั่วโมง ไปย้อมสีด้วยวิธีกรัม ดังนี้

- หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด
- ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่จะย้อม นำไปกระจายในหยดน้ำกลั่นบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อทำให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์
- หยด ammonium oxalate-crystal violet ลงไป 1 หยด ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำ
- หยด Lugol's solution ลงไป 1 หยด ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำ
- ล้างสีออกใช้ acetone alcohol โดยเอียงสไลด์ หยด acetone alcohol ให้ไหลผ่านสไลด์ 15-30 วินาที สังเกตดูสีของ crystal violet ที่ถูกชะล้างออกมา พอเริ่มไม่มีสีม่วงหยุดล้าง ล้างด้วยน้ำ
- หยด safranin ลงไป 1 หยด ทิ้งไว้ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง
- ตรวจดูรูปร่าง ลักษณะ และการติดสีของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

คำนวณค่าเอ็มพีเอ็นของ *E.coli* จากเชื้อซึ่งติดสีกรัมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ไม่มีสปอร์ ทำให้เกิดแก๊สจาก lactose และให้ผลทดสอบปฏิกิริยา IMViC เป็น ++-- หรือ -+-- โดยเทียบค่าจากตารางที่ 1

3.2.2 การวิเคราะห์โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth

ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วตามข้อ 3.1 จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงใน fluorocult lauryl tryptose broth ความเข้มข้นละ 6 หลอด นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 48±2 ชั่วโมง ความเข้มข้นละ 3 หลอด นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5°ซ 48±2 ชั่วโมง ความเข้มข้นละ 3 หลอด ตรวจดูการเรืองแสงโดยใช้หลอดอัลตราไวโอเลต หลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดที่เกิดการเรืองแสงไปประมาณ 9 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปทดสอบอินโดล โดยเติม Kovacs reagent หลอดที่เกิดการเรืองแสงและการสร้างอินโดลถือว่าเป็น *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้ ประสงค์จะศึกษาเปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของวิธีวิเคราะห์ จึงได้นำตัวอย่างที่พบว่าเป็น *E. coli* ไปทดสอบยืนยันเพื่อหาว่าเป็น false positive หรือไม่ โดยถ่ายเชื้อลงใน EC broth แล้วดำเนินการทดสอบต่อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ส่วนหลอดที่ไม่พบการเรืองแสง ถ้ามีการเจริญ

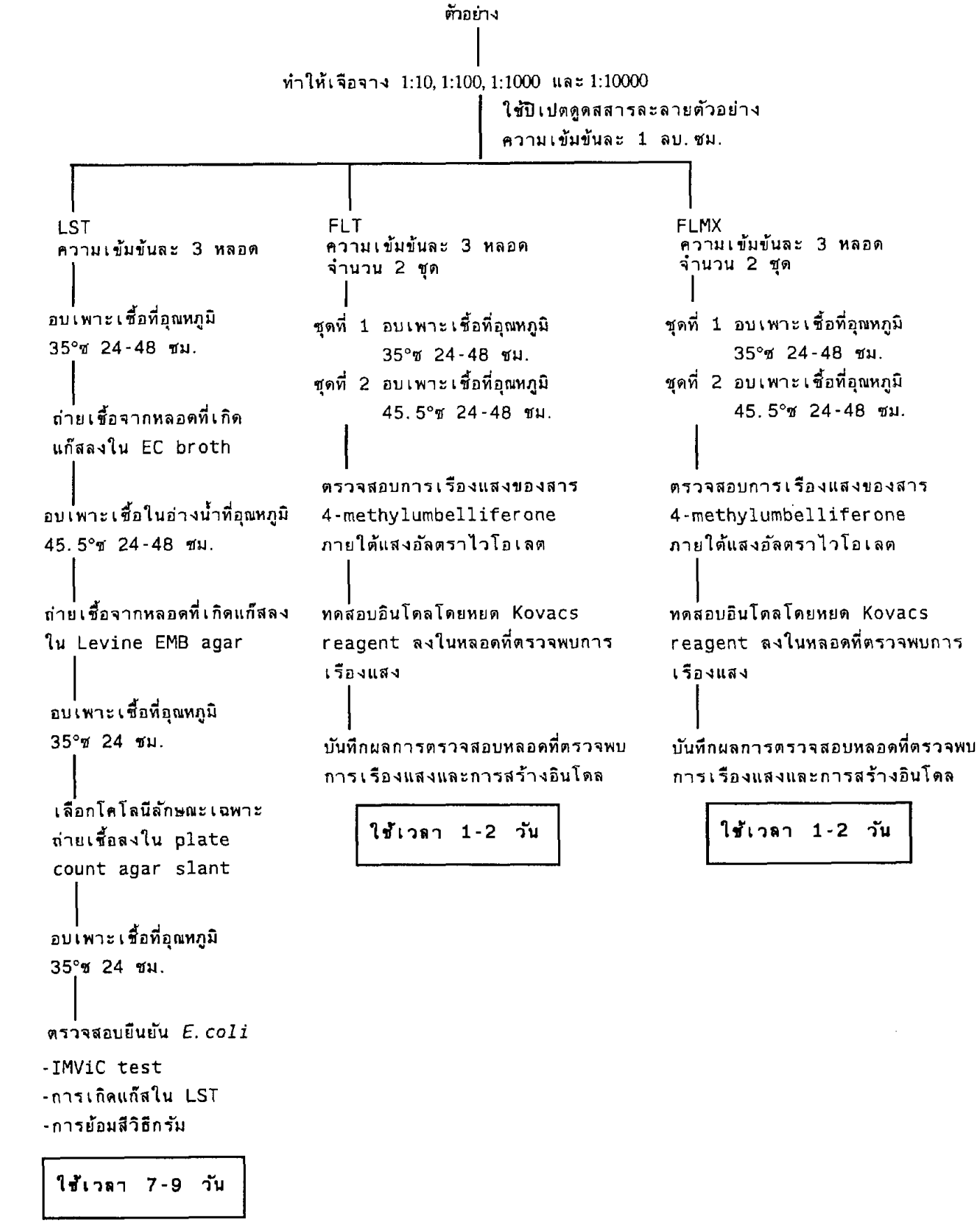
เติบโตของเชื้อ ซึ่งสังเกตได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือมีแก๊สเกิดขึ้น คัดเลือกมาตัวอย่างละ 3 หลอด นำไปถ่ายเชื้อลงใน EC broth และดำเนินการทดสอบต่อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เพื่อตรวจสอบการเกิด false negative

ในขณะที่นำ fluorocult lauryl tryptose broth ที่เติมสารละลายตัวอย่างไปอบเพาะเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเชื้อ *E.coli* และ *A. aerogenes* เพื่อใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบการเรืองแสงที่เป็นผลบวกและผลลบ (positive และ negative control)

3.2.3 การวิเคราะห์โดยใช้ fluorocult LMX broth

ดำเนินการทดสอบต่อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 แต่ใช้ fluorocult LMX broth แทน fluorocult lauryl tryptose broth

แผนภูมิการวิเคราะห์ มีดังนี้



แผนภูมิ การทดสอบ E.coli โดยใช้ lauryl sulfate tryptose broth (LST), fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ fluorocult LMX broth (FLT)

ผลการทดลอง

1. ศึกษาการใช้เอนไซม์ β-glucuronidase และการสร้างอินโดล ในการทดสอบ *E. coli* และโคลิฟอร์ม โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสม

fluorocult lauryl tryptose broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* หรือเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *A. aerogenes* 1 และ *A. aerogenes* 2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียจำพวกโคลิฟอร์ม ตรวจพบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone และเกิดแก๊สหลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง การสร้างอินโดล พบใน *E. coli* และเชื้อผสม ส่วน *A. aerogenes* 1 และ *A. aerogenes* 2 ตรวจไม่พบการเรืองแสงแม้จะอบเพาะเชื้อถึง 48 ชั่วโมง และไม่พบการสร้างอินโดล (รูปที่ 1-2)

fluorocult LMX broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* หรือเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *A. aerogenes* 1 และ *A. aerogenes* 2 ตรวจพบการเรืองแสงและเกิดสีเขียวแกมน้ำเงินหลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง การสร้างอินโดลพบใน *E. coli* และเชื้อผสม ส่วน *A. aerogenes* 1 และ *A. aerogenes* 2 ตรวจไม่พบการเรืองแสงแม้จะอบเพาะเชื้อถึง 48 ชั่วโมง และไม่พบการสร้างอินโดล (รูปที่ 3-4)

2. การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth ในการทดสอบ *E. coli* ความเข้มข้น $10-10^8$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

fluorocult lauryl tryptose broth เมื่ออบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24 ชั่วโมง เกิดแก๊สและการเรืองแสงทุกระดับความเข้มข้น สำหรับการอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5°ซ 24ชั่วโมง เกิดแก๊สเฉพาะหลอดที่มีความเข้มข้น 10^4-10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนหลอดที่มีความเข้มข้น $10-10^3$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จะเกิดแก๊สหลังอบเพาะเชื้อ 48 ชั่วโมง แต่การเรืองแสงเกิดขึ้นหลังอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง ทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 2) การเรืองแสงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆไม่แตกต่างกันมากนัก พบการสร้างอินโดลทุกระดับความเข้มข้นทั้งอุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ

fluorocult LMX broth เมื่ออบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซและ 45.5°ซ 24 ชั่วโมง เกิดสีเขียวแกมน้ำเงินและการเรืองแสงทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 3) การเรืองแสงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆไม่แตกต่างกันมาก พบการสร้างอินโดลทุกระดับความเข้มข้นทั้งอุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ

ศิริราชพยาบาลสตรีบริการ

3. การศึกษาวิธีหาปริมาณ *E. coli* ในอาหาร โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ และ lauryl sulfate tryptose broth แสดงตามตารางที่ 4-5 และจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบ ดังตารางที่ 6 เมื่อนำผลที่ได้ไปหาค่า sensitivity และ specificity(18)(30) จากสูตร

$$\text{sensitivity ร้อยละ} = \frac{A}{A + B} \times 100$$

$$\text{specificity ร้อยละ} = \frac{D}{C + D} \times 100$$

sensitivity หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละของตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลบวก

specificity หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละของตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลลบ

A หมายถึง ตัวอย่างที่มี *E. coli* และให้ผลบวก
(true positive *E. coli*)

B หมายถึง ตัวอย่างที่มี *E. coli* และให้ผลลบ
(false negative *E. coli*)

C หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่มี *E. coli* และให้ผลบวก
(false positive *E. coli*)

D หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่มี *E. coli* และให้ผลลบ
(true negative *E. coli*)

ค่า sensitivity และ specificity ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ แสดงตามรูปที่ 9 จะเห็นได้ว่า fluorocult lauryl tryptose broth (35°ซ) มี sensitivity สูงสุด คือร้อยละ 95.2 รองลงไป คือfluorocult LMX broth (35°ซ) มีsensitivity ร้อยละ 90.5 ส่วน specificity มีค่าใกล้เคียงกัน คืออยู่ระหว่าง ร้อยละ 97.5 ถึง 98.7 ซึ่งนับว่าค่อนข้างสูง

ความสัมพันธ์ของปริมาณ *E. coli* (log 10เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) เมื่อใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth เปรียบเทียบกับ lauryl sulfate tryptose broth แสดงในรูปที่ 5-8 และตารางที่ 7

เปรียบเทียบระยะเวลา จำนวนเครื่องแก้ว และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ *E. coli* ต่อตัวอย่าง ดังตารางที่ 8

วิจารณ์ผล

การทดสอบ *E. coli* ด้วยวิธีตรวจการเรืองแสง *E. coli* และเชื้อผสมของ *E. coli* กับโคลิฟอร์มชนิดอื่น สามารถผลิต β-glucuronidase เพียงพอที่จะไปย่อย 4-methylumbelliferyl -β-D glucuronide ทำให้เกิดสาร 4-methylumbelliferone ในปริมาณมากพอที่สามารถตรวจสอบการเรืองแสงได้ ส่วนโคลิฟอร์มไม่พบการเรืองแสง เป็นการยืนยันว่าโคลิฟอร์มไม่ผลิตเอนไซม์ β-glucuronidase การสร้างอินโดล พบเฉพาะใน *E. coli* และเชื้อผสมที่มี *E. coli* อยู่ ฉะนั้นถ้าตัวอย่างอาหารมีเชื้ออื่นผสมอยู่กับ *E. coli* ไม่สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ β-glucuronidase ของ *E. coli* จึงไม่เป็นปัญหาในการตรวจสอบการเรืองแสง

การศึกษาการใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth ในการทดสอบ *E. coli* ตรวจพบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone ภายหลังอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ 24 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ $10-10^8$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และพบการสร้างอินโดลทุกระดับความเข้มข้นทั้งอุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ

การหาปริมาณ *E. coli* ในอาหารพร้อมบริโภค โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเรืองแสงเพิ่มขึ้นจากการอบเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moberg และคณะ[17] โดยพบการเรืองแสงเพิ่มขึ้น 2 และ 3 ตัวอย่าง เมื่อใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ ตามลำดับ ส่วน fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ พบการเรืองแสงเพิ่มขึ้นชนิดละ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เกิดการเรืองแสงหลังอบเพาะเชื้อ 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบยืนยันด้วยปฏิกิริยา IMViC ปรากฏว่าเป็น *E.coli* ทุกตัวอย่าง ฉะนั้นในการวิเคราะห์ ถ้าไม่พบการเรืองแสงภายใน 24 ชั่วโมง ควรอบเพาะเชื้อเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเรืองแสงและการสร้างอินโดล เป็นการเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าเป็น *E. coli*

การตรวจสอบปฏิกิริยาเอนไซม์ β-glucuronidase สามารถตรวจสอบ *E. coli* ที่ไม่ให้แก๊ส เมื่อเพาะเชื้อในอาหารที่มี lactose แต่มีเอนไซม์ β-glucuronidase แต่จากการศึกษานี้ไม่พบ *E. coli* ดังกล่าว

เมื่อนำปริมาณ *E. coli* มาหาความสัมพันธ์ของวิธีวิเคราะห์ที่ศึกษาทดลองแต่ละวิธี เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน แสดงในรูปที่ 5-8 และตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง fluorocult lauryl tryptose broth ที่ 35°ซ กับ lauryl sulfate tryptose broth ใกล้เคียงกันมากกับความสัมพันธ์ระหว่าง fluorocult LMX broth ที่ 35°ซ กับ lauryl sulfate tryptose broth โดยมี correlation coefficient 0.812 และ 0.828 ค่าความชัน 0.863 และ 1.139 และค่าจุดตัดบนแกน Y 0.188 และ -0.224 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงค่าความชันของกราฟทั้งสอง มีความเบี่ยงเบนจาก 1 ใกล้เคียงกัน ส่วนจุดตัดบนแกน Y เมื่อใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ มีการเบี่ยงเบนจาก 0 น้อยกว่า fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง fluorocult lauryl tryptose broth ที่ 45.5°ซ กับ lauryl sulfate tryptose broth และ fluorocult LMX broth ที่ 45.5°ซ กับ lauryl sulfate tryptose broth มีค่า correlation coefficient 0.631 และ 0.743 ตามลำดับ ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่ดีเท่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ค่าแรก กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง fluorocult lauryl tryptose broth ที่ 35°ซ กับ lauryl sulfate tryptose broth จึงมีค่าที่ใกล้เคียงกับ line of equality (ค่าความชันเท่ากับ 1 และค่าจุดตัดบนแกน Y เท่ากับ 0) ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงถึงเทียบเท่าของวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ *E.coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ตามตารางที่ 4-6 และรูปที่ 7 พบว่าการใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24-48 ชั่วโมง ให้ผลใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน โดย มี sensitivity ร้อยละ 95.2 specificity ร้อยละ 98.7 ให้ผล false positive ร้อยละ 2 และ false negative ร้อยละ 2 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5°ซ มี sensitivity ร้อยละ 80.9 specificity ร้อยละ 97.5 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ มี sensitivity ร้อยละ 90.5 และ 85.7 ตามลำดับ มี specificity เท่ากัน คือ เท่ากับร้อยละ 98.7 การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth นอกจากจะลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ทดสอบแล้วยังประหยัดกว่าวิธีมาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบจากจำนวนเครื่องแก้ว และค่าสารเคมี ตามตารางที่ 8

การใช้ MUG ในการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* มีสิ่งที่จะต้องคำนึงถึง คือ มีเครื่องแก้วบางชนิดมี cerium oxide ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต หลอดทดลองที่นำมาใช้ ต้องตรวจสอบการเรืองแสงก่อนนำไปใช้ ถ้าพบปัญหานี้เกิดขึ้น แก้ไขได้โดยต้มหลอดทดลองในสารละลาย sodium nitrate ร้อยละ 50[3] แต่ในการศึกษาทดลอง ได้ใช้หลอดทดลองของไพเรกซ์ (pyrex) ไม่พบการเรืองแสงของหลอดทดลองที่ใช้ การใช้ MUG ยังมีข้อจำกัดอีกประการหนึ่ง คือ มีอาหารทะเลบางชนิด เช่น หอยนางรม มีเอนไซม์ β-glucuronidase ในเซลล์ จึงทำให้เกิด false positive ได้เมื่อเติมMUG ลงใน LST ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการเติม MUG ลงใน EC broth หลังจากเพาะเชื้อลงใน LST broth แล้ว จึงถ่ายเชื้อลงใน EC-MUG broth ทำให้เอนไซม์ในเซลล์เจือจางลง จึงลดการเกิด false positive[14] ดังนั้นการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* ด้วยวิธีตรวจสอบเอนไซม์ β-glucuronidase จึงต้องพิจารณาข้อจำกัดดังกล่าวด้วย

ในการใช้หลอดอัลตราไวโอเลต มีข้อควรระวัง คือ ควรใช้หลอดซึ่งมีกำลังไฟไม่เกิน 6 วัตต์ จึงจะไม่เป็นอันตรายสำหรับผู้ปฏิบัติงาน ถ้าใช้หลอดอัลตราไวโอเลตซึ่งมีกำลังไฟเกิน 6 วัตต์ ต้องสวมแว่นตาชนิดป้องกันแสงอัลตราไวโอเลต

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการใช้เอนไซม์ β-glucuronidase และการสร้างอินโดล ในการทดสอบ *E. coli* และโคลิฟอร์ม ตรวจพบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ β-glucuronidase และพบการสร้างอินโดล เฉพาะใน *E. coli* และเชื้อผสมซึ่งมี *E. coli* อยู่

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 45.5°ซ ในการทดสอบ *E. coli* ระดับความเข้มข้น $10-10^8$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจพบการเรืองแสงและการสร้างอินโดลทุกระดับความเข้มข้น

การศึกษาวิธีหาปริมาณ *E.coli* ในอาหารพร้อมบริโภค ด้วยวิธีตรวจสอบการเรืองแสงของสาร 4-methylumbelliferone และการสร้างอินโดล โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth และ fluorocult LMX broth เปรียบเทียบกับการใช้ lauryl sulfate tryptose broth ตามวิธีมาตรฐาน เมื่อนำปริมาณ *E. coli* (ค่า log 10เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) มาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีวิเคราะห์ พบว่า fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ มีความสัมพันธ์ที่ดีที่สุดกับการใช้ lauryl sulfate tryptose broth โดยมี correlation coefficient 0.812 ค่าความชัน 0.863 และค่าจุดตัดบนแกน Y 0.188 กราฟที่ได้ใกล้เคียงกับ line of equality ซึ่งเป็นค่าที่เทียบเท่าของวิธีวิเคราะห์

นอกจากนี้การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ ยังมี sensitivity ในการวิเคราะห์สูงกว่าวิธีอื่น คือมี sensitivity ร้อยละ 95.2 การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ 24-48 ชั่วโมง จึงใช้แทนวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* ในอาหาร ซึ่งตามปกติต้องใช้เวลา 7-9 วัน วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ลดขั้นตอนต่างๆในการทดสอบ ประหยัดพลังงาน และค่าใช้จ่าย และให้ผลใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน

ประโยชน์ที่ได้รับ

จากการศึกษาทดลองนี้ พบว่า การใช้ fluorocult lauryl tryptose broth อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-glucuronidase และการสร้างอินโดล เป็นวิธีที่ใช้แทนวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* ซึ่งปกติต้องใช้เวลา 7-9 วัน ทำให้ลดระยะเวลาลงเหลือเพียง 1-2 วัน เป็นวิธีที่โรงงานต่างๆ เช่น โรงงานผลิตนม โรงงานผลิตไอศกรีม ฯลฯ สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ได้ โดยที่เป็นวิธีซึ่งรวดเร็วและประหยัด จึงเป็นประโยชน์มากในการใช้วิเคราะห์ เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนของ *E. coli* ในอาหาร ด้วยวงเงินที่เท่ากัน สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เพิ่มขึ้นมากกว่าหนึ่งเท่า

ผลจากการศึกษาทดลอง ใช้สำหรับเป็นข้อมูลในการพิจารณาร่างมาตรฐานต่างๆ เช่น มาตรฐานขององค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (The International Organization for Standardization) และใช้เป็นวิธีปฏิบัติสำหรับการวิเคราะห์ทดสอบ *E. coli* ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานจุลชีววิทยา และเผยแพร่ให้แก่โรงงานอุตสาหกรรม สำหรับใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทดสอบ เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนออกจำหน่าย ทำให้ได้ผลวิเคราะห์รวดเร็ว ถ้ามีตรวจพบ *E. coli* สามารถแก้ไขได้ทันท่วงที ผู้บริโภคได้รับความปลอดภัยยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนและการเสนอแนะทางวิชาการจาก นางนันทนา แก้วอุบล นักวิทยาศาสตร์ 9 ชช. กรมวิทยาศาสตร์บริการ และการตรวจแก้ไขรายงานจาก นางสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

(1) Adam,MR., et al. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β-glucuronidase activity. **Applied and Environmental Microbiology.** July, 1990, vol.56, no.7, p.2021-2024.

(2) Alvarez,RJ. Use of fluorgenic assays for enumeration of *Escherichia coli* from selected seafoods. **Journal of Food science.** July-August, 1984, vol.49, no.4, p.1186-1187,1232.

(3) Andrew,WH., Wilson,CR. and Poelma,PL. Glucuronidase assy in a rapid MPN determination for recovery of *Escherichia coli* from selected foods. **Association Official Analytical Chemists Journal.** January-February, 1987, vol.70, no.1, p.31-34.

(4) Doyle,MP. and Schoeni,JT. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology.** October, 1984, vol.48, no.4, p.855-856.

(5) Edberg,SC., Allen,MJ.and Smith,DB. The National Collaboratory Study. National field evaluation of a definded substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water : comparison with the standard multiple-tube fermentation method. **Applied and Environmental Microbiology.** June, 1988, vol.54, no.6, p.1595-1601.

(6) Edberg,SC. and Kontnick,CM. Comparison of β-glucuronidase-based sustrate systems for identification of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology.** 1986, vol.24, p.368-371.

(7) Edberg,SC. and Trepeta,RW. Rapid and economical identification and antimicrobial susceptibility test methodology for urinary tract pathogens. **Journal of Clinical Microbiology.** 1983, vol.18, p.1287-1291.

(8) Eugene,WR., Martin,JA. and Stephen,CE. Efficacy of β-glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the definded-substrate technology. **Applied and Environmental Microbiology.** May, 1990, vol.56, no.5, p.1203-1205.

(9) Eugene,WR., et al. Assay for β-glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking-water analysis. **Applied and Environmental Microbiology.** February, 1991, vol.57, no.2, p.592-593.

(10) Feng,PCS. and Hartman,PA. Fluorgenic assay for immediate confirmation of *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology.** June, 1982, vol.43, no.6, p.1320-1329.

(11) **Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual.** 7th ed., Arlington, VA, : AOAC International, 1992, Chapter4, *Escherichia coli* and coliform bacteria, p.27-51.

(12) Frampton,EW., Restaino,L. and Blaszko,N. Evaluation of the β-glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) in a 24-hour direct plating mothod for *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection.** May, 1988, vol.51, no.5, p.402-404.

(13) Killian,M. and Bulow,P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae.I. Detection of bacterial glucuronidases. **Acta Pathogica et Microbiologica Scandinavica.** 1976, vol.84, p.245-251.

(14) Koburger,JA. and Miller,ML. Evaluation of a fluorgenic MPN procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. **Journal of Food Protection.** March, 1985, vol.48, no.3, p.244-245.

(15) Manafi,M., Kneifel,W. and Bascon,S. Fluorgenic and chromogenic substrate used in bacterial diagnosis. **Microbiological Review.** 1989, vol.55, p.335-348.

(16) Moberg,LJ. Fluorgenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in foods. **Applied and Environmental Microbiology.** December, 1985, vol.50, no.6, p.1383-1387.

(17) Moberg,LJ., Wagner,MK. and Kellen,LA. Fluorgenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and frozen foods. **Association Official Analytical Chemists Journal.** May/June, 1988, vol.71, no.3, p.589-602.

(18) Mori,T., et al. Rapid identification of *Escherichia coli* from urine by using fluorocult media. **Acta Microbiologica Hungarica.** 1991, vol.38, no.3-4, p.273-281.

(19) Motes,ML.Jr. and Peeler,JT. Field evaluation of the MUG assay for enumerating *Escherichia coli* in seawater and oysters from southeastern United States. **Journal of Food Protection.** April, 1991, vol.48, p.246-248.

(20) **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 16th ed., Arlington, Virginia : AOAC International, 1995. Chapter17, Microbiological methods, p.4-5.

(21) Patel,PD. **Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology.** 1st ed. Glasgow : Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman & Hall, 1994. Section5, Automated electrical techniques in microbiological analysis. p.147-148.

(22) Perez,JL., Berrocal,CI.and Berrocal,L. Evaluation of a commercial β-glucuronidase test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**. December, 1986, vol.61, no.6, p.541-545.

(23) Peterson,EH., et al. Comparison of AOAC method and fluorgenic (MUG) assay for enumerating *Escherichia coli* in foods. **Journal of Food science**. March-April, 1987, vol.52, no.2, p.409-410.

(24) Poelma,PL., Wilson,CR. and Andrew,WH. Rapid fluorgenic enumeration of *Escherichia coli* in selected, naturally contaminated high moisture foods. **Association Official Analytical Chemists Journal**. November/December, 1987, vol.70, no.6, p.991-993.

(25) Rice,EW., et al. Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. December, 1993, vol.59, no.12, p.4347-4349.

(26) Robinson,BJ. Evaluation of a fluorgenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**. August, 1984, vol.48, no.2, p.285-288.

(27) Rod,TO., Haug,RH. and Midtvedt,T. β-glucuronidase in the *streptococci* groups B and D. **Acta Pathologica et Microbiology Scandinavica**.(Section B), 1974, vol.82, p.533-536.

(28) Trepeta RW. and Edberg,SC. Methylumbelliferyl-β-D-glucuronidase-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. 1984, vol.19, p.172-174.

(29) Warren,LS., Benoit,RE. and Jesse,JA. Rapid enumeration of fecal coliforms in water by a colorimetric β-galactosidase assay. **Applied and Environmental Microbiology**. January, 1978, vol.35, p.136-141.

(30) เพ็ญศรี รอดมา และศศิธร ฐิติเพชรกุล. การตรวจสอบยืนยัน *Escherichia coli* ในอาหารแช่แข็ง โดยวิธี Fluorocult และ Standard Conventional Method. **วารสารกระทรวงสาธารณสุข**. พฤษภาคม,2536, ปีที่12, ฉบับที่5, หน้า60-74.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมของตัวอย่าง

(ใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ความเข้มข้นละ 3 หลอด)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม	0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม	0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม	0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม
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

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ *E. coli* ใน fluorocult lauryl tryptose broth

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เซลล์/ซม^3	แก๊ส				การเรืองแสง			
	อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ		อบเพาะเชื้อที่ 45.5°ซ		อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ		อบเพาะเชื้อที่ 45.5°ซ	
	24 ชม	48 ชม	24 ชม	48 ชม	24 ชม	48 ชม	24 ชม	48 ชม
10^8	+	+	+	+	+	+	+	+
10^7	+	+	+	+	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+	+	+	+	+
10^5	+	+	+	+	+	+	+	+
10^4	+	+	+	+	+	+	+	+
10^3	+	+	−	+	+	+	+	+
10^2	+	+	−	+	+	+	+	+
10	+	+	−	+	+	+	+	+

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ *E. coli* ใน fluorocult LMX broth

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เซลล์/ซม^3	สีเขียวแกมน้ำเงิน				การเรืองแสง			
	อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ		อบเพาะเชื้อที่ 45.5°ซ		อบเพาะเชื้อที่ 35°ซ		อบเพาะเชื้อที่ 45.5°ซ	
	24 ชม	48 ชม	24 ชม	48 ชม	24 ชม	48 ชม	24 ชม	48 ชม
10^8	+	+	+	+	+	+	+	+
10^7	+	+	+	+	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+	+	+	+	+
10^5	+	+	+	+	+	+	+	+
10^4	+	+	+	+	+	+	+	+
10^3	+	+	+	+	+	+	+	+
10^2	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการทดสอบ *E. coli* โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ lauryl sulfate tryptose broth (LST)

ประเภทตัวอย่าง	จำนวนที่ตรวจสอบ	จำนวนตัวอย่าง														
		LST (35 °ซ) ตามวิธีมาตรฐาน					FLT (35 °ซ)					FLT (45.5 °ซ)				
		แก๊ส(1)	EC(2)	IMViC(3)	false positive	false negative	แก๊ส(4)	เรืองแสง &อินโดล	IMViC(3)	false positive	false negative	แก๊ส(5)	เรืองแสง(3) &อินโดล	IMViC	false positive	false negative
ไอศกรีม	10	9	8	4	4	-	9	5	5	1	-	4	4*	4*	1	1
น้ำผลไม้สด	10	9	7	6	1	-	9	5	5	-	1	6	5	5	-	1
นมพาสเจอไรส์	10	5	5	5	-	-	5	5	5	-	-	4	4	4	-	1
น้ำแข็ง	10	6	5	4	1	-	6	4	4	-	-	5	5	5	1	-
น้ำ	10	5	4	2	2	-	5	2	2	-	-	2	1	1	-	1
รวม	50	34	29	21	8	0	34	21	21	1	1	21	19	19	2	4
ร้อยละ	100	68	58	42	16	0	68	42	42	2	2	42	38	38	4	2

* เป็นตัวอย่างที่พบ *E. coli* 1 ตัวอย่างซึ่งเป็นคนละตัวอย่างกับที่ตรวจพบใน LST

(1) เกิดแก๊สใน LST broth; (2) เกิดแก๊สใน EC broth; (3) ปฏิกิริยา IMViC เป็น *E. coli* ; (4) เกิดแก๊สใน FLT 35 °ซ; (5) เกิดแก๊สใน FLT 45.5 °ซ

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลการทดสอบ *E. coli* โดยใช้ fluorocult LMX broth (FLMX) และ lauryl sulfate tryptose broth (LST)

ประเภทตัวอย่าง	จำนวนที่ตรวจสอบ	จำนวนตัวอย่าง														
		LST (35 °ซ) ตามวิธีมาตรฐาน					FLMX (35 °ซ)					FLMX (45.5 °ซ)				
		แก๊ส(1)	EC(2)	IMViC(3)	false positive	false negative	สีเขียวแกมน้ำเงิน	เรืองแสง &สีเขียวแกมน้ำเงิน	IMViC(3)	false positive	false negative	สีเขียวแกมน้ำเงิน	เรืองแสง &สีเขียวแกมน้ำเงิน	IMViC(3)	false positive	false negative
ไอศกรีม	10	9	8	4	4	-	9	5	5	1	-	8	4*	4*	1	1
น้ำผลไม้สด	10	9	7	6	1	-	9	6	6	-	-	8	6	6	-	-
นมพาสเจอไรส์	10	5	5	5	-	-	5	5	5	-	-	5	4	4	-	1
น้ำแข็ง	10	6	5	4	1	-	6	4	3	-	1	4	3	3	-	1
น้ำ	10	5	4	2	2	-	5	2	1	-	1	2	2	2	-	-
รวม	50	34	29	21	8	0	34	22	20	1	2	27	19	19	1	3
ร้อยละ	100	68	58	42	16	0	68	44	40	2	4	54	38	38	2	6

* เป็นตัวอย่างที่พบ *E. coli* 1 ตัวอย่างซึ่งเป็นคนละตัวอย่างกับที่ตรวจพบใน LST

(1) เกิดแก๊สใน LST broth; (2) เกิดแก๊สใน EC broth; (3) ปฏิกิริยา IMViC เป็น *E. coli*

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบจากการทดสอบ *E. coli* โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ fluorocult LMX broth (FLMX) และ lauryl sulfate tryptose broth (LST)

	จำนวนตัวอย่าง	FLT(35°ซ)		FLT(45.5°ซ)		FLMX(35°ซ)		FLMX(45.5°ซ)	
		ผลบวก (A)	ผลลบ (B)	ผลบวก (A)	ผลลบ (B)	ผลบวก (A)	ผลลบ (B)	ผลบวก (A)	ผลลบ (B)
LST ผลบวก	21	20	1	17	4	19	2	18	3
		ผลบวก (C)	ผลลบ (D)	ผลบวก (C)	ผลลบ (D)	ผลบวก (C)	ผลลบ (D)	ผลบวก (C)	ผลลบ (D)
LST ผลลบ	29	1	28	2	27	1	28	1	28

A หมายถึง ตัวอย่างที่มี *E. coli* และให้ผลบวก (true positive *E.coli*)

B หมายถึง ตัวอย่างที่มี *E. coli* และให้ผลลบ (false negative *E.coli*)

C หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่มี *E. coli* และให้ผลบวก (false positive *E.coli*)

D หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่มี *E. coli* และให้ผลลบ (true negative *E.coli*)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณ *E. coli* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ เทียบกับวิธีมาตรฐาน

รายการ	FLT (35 °ซ) และ LST	FLT (45.5 °ซ) และ LST	FLMX (35 °ซ) และ LST	FLMX (45.5 °ซ) และ LST
ความชัน	0.863	0.876	1.139	0.802
จุดตัดบนแกน Y	0.188	0.239	-0.224	0.345
Correlation coefficient	0.812	0.631	0.828	0.743

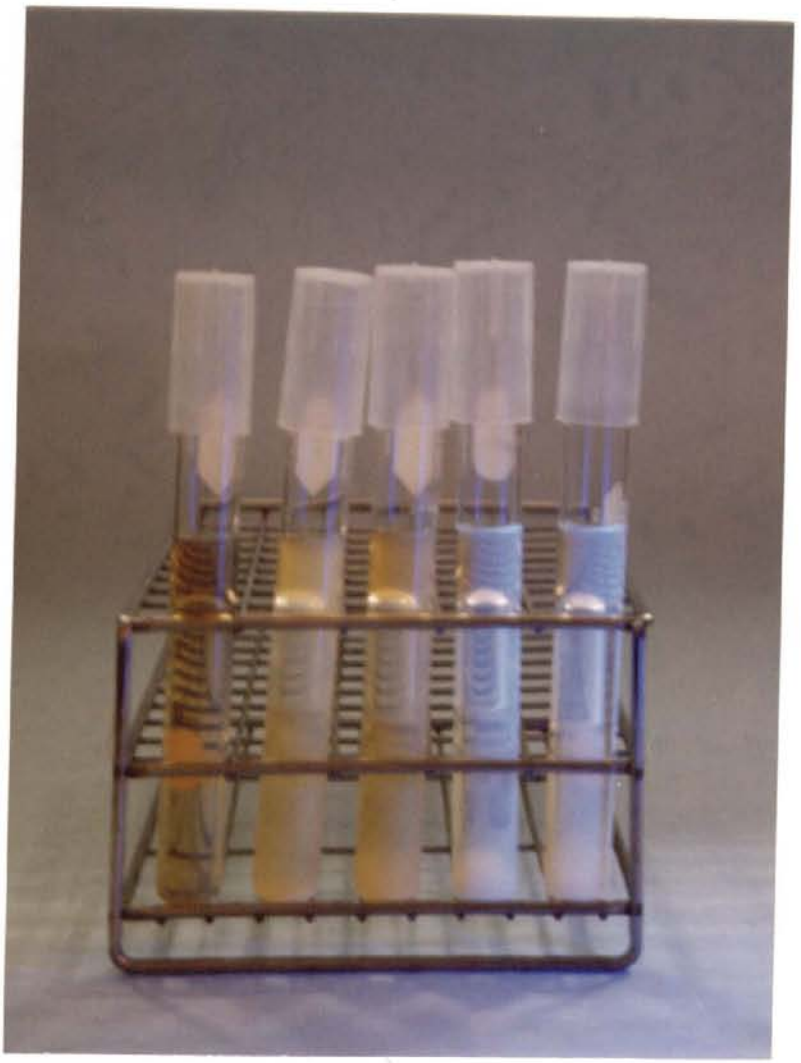
Correlation coefficient เป็นค่าที่บอกความสัมพันธ์ระหว่างวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี ซึ่งเมื่อค่า correlation coefficient มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่า วิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างมาก

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบระยะเวลา จำนวนเครื่องแก้ว และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ *E. coli* ต่อตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์	ระยะเวลา วัน	จำนวนเครื่องแก้ว ชิ้น	ค่าสารเคมี โดยประมาณ บาท
fluorocult lauryl tryptose broth	1-2	18	20
fluorocult LMX broth	1-2	18	17
วิธีมาตรฐาน (standard conventional method)	7-9	90	45

หมายเหตุ: ราคาที่เปรียบเทียบเป็นราคาที่จัดซื้อ พ. ศ. 2538

ภาคผนวก ข



1 2 3 4 5

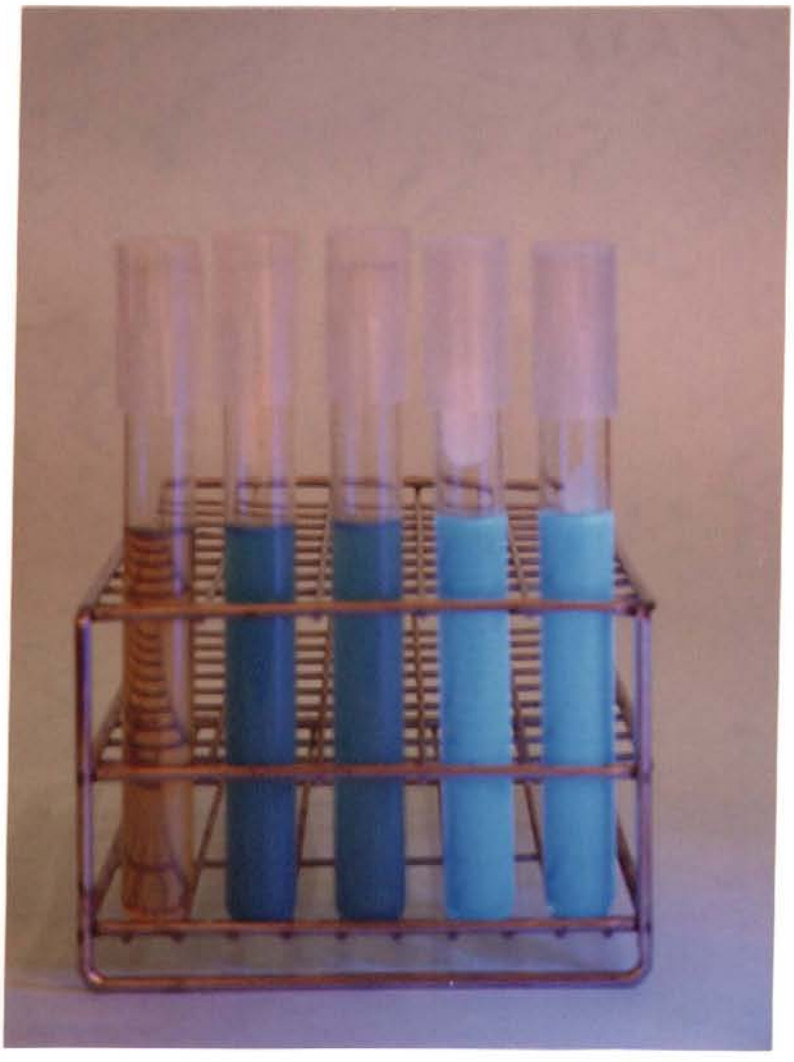
รูปที่ 1 การเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone ใน fluorocult lauryl tryptose broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม

1. หลอดเปรียบเทียบ
2. *A. aerogenes* 1
3. *A. aerogenes* 2
4. *E. coli*
5. *E. coli* + *A. aerogenes* 1 + *A. aerogenes* 2

1 2 3 4 5

รูปที่ 2 การทดสอบอินโดลใน fluorocult lauryl tryptose broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม

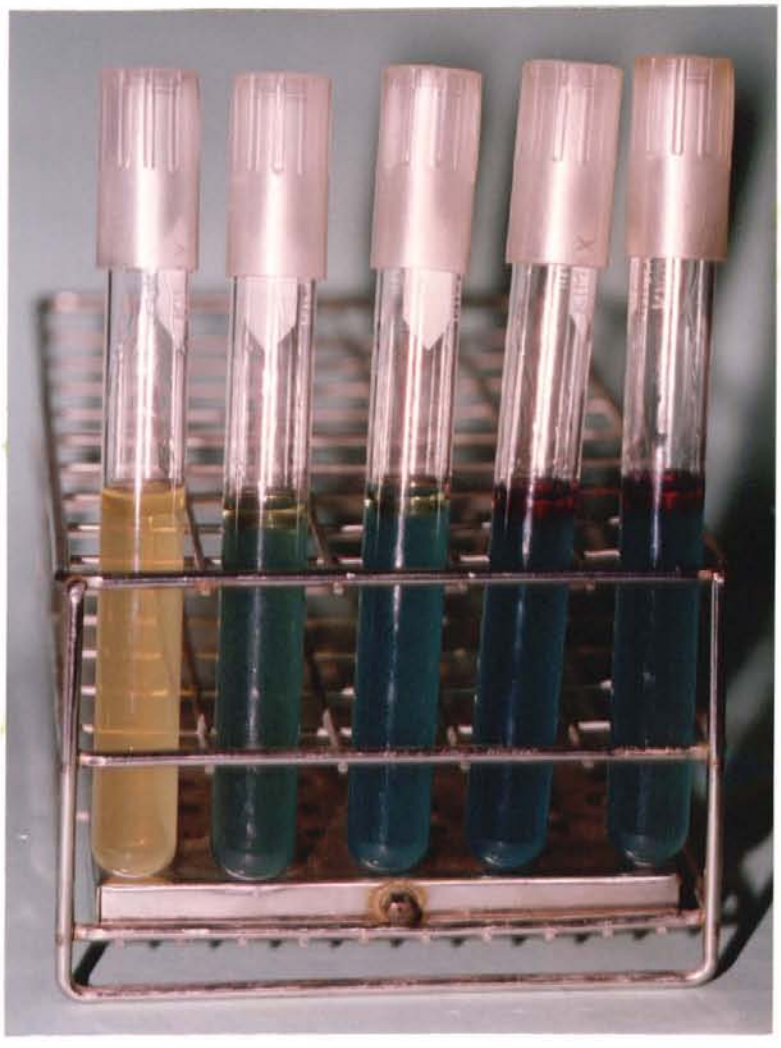
1. หลอดเปรียบเทียบ
2. *A. aerogenes* 1
3. *A. aerogenes* 2
4. *E. coli*
5. *E. coli* + *A. aerogenes* 1 + *A. aerogenes* 2



1 2 3 4 5

รูปที่ 3 การเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone ใน fluorocult LMX broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม

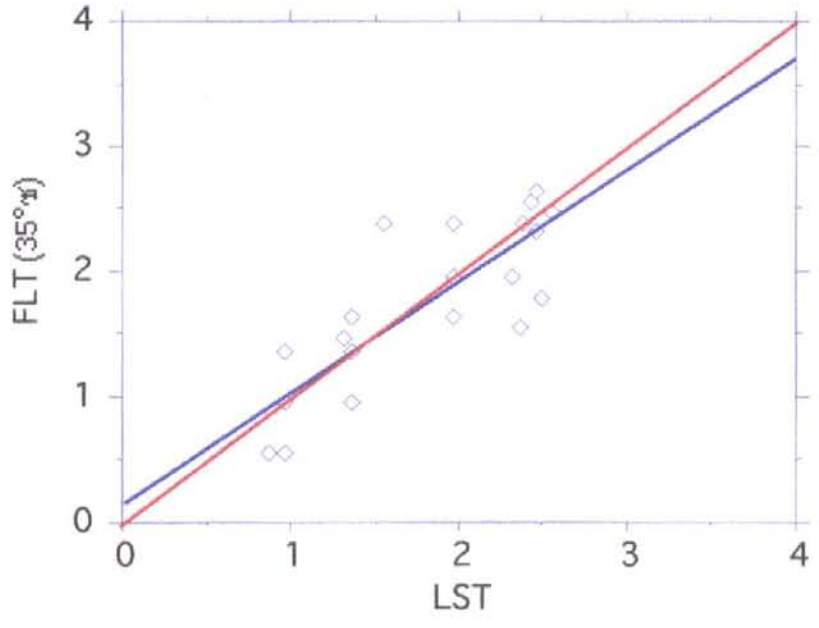
1. หลอดเปรียบเทียบ
2. *A. aerogenes* 1
3. *A. aerogenes* 2
4. *E. coli*
5. *E. coli* + *A. aerogenes* 1 + *A. aerogenes* 2



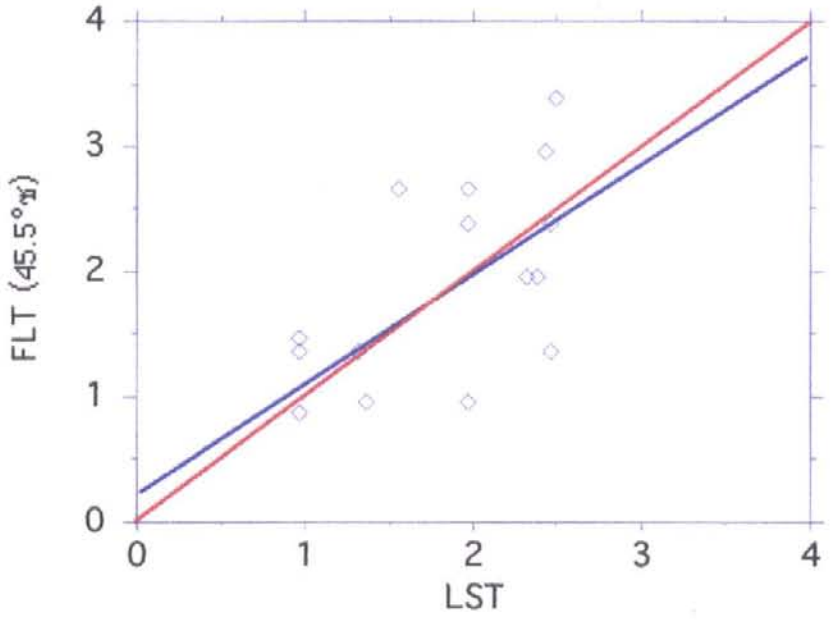
1 2 3 4 5

รูปที่ 4 การทดสอบอินโดลใน fluorocult LMX broth เมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* และโคลิฟอร์ม

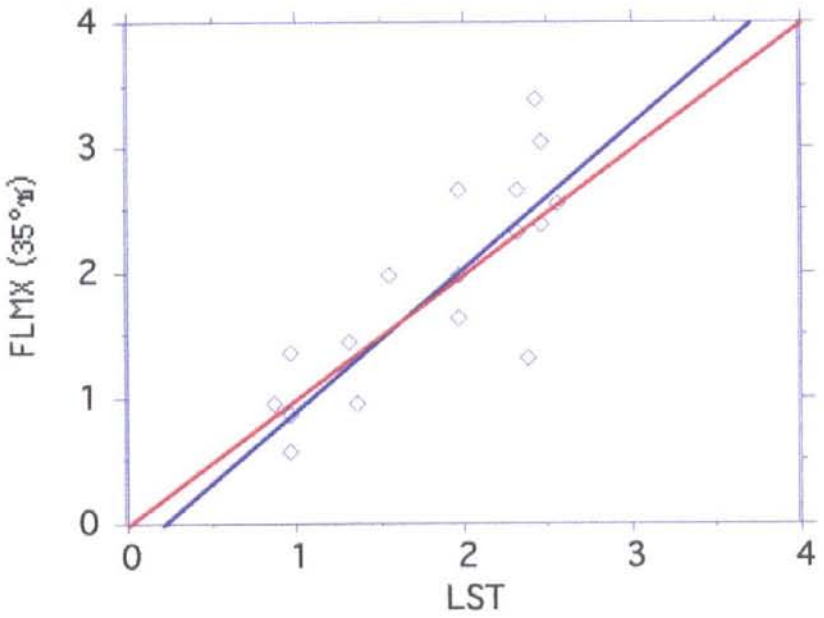
1. หลอดเปรียบเทียบ
2. *A. aerogenes* 1
3. *A. aerogenes* 2
4. *E. coli*
5. *E. coli* + *A. aerogenes* 1 + *A. aerogenes* 2



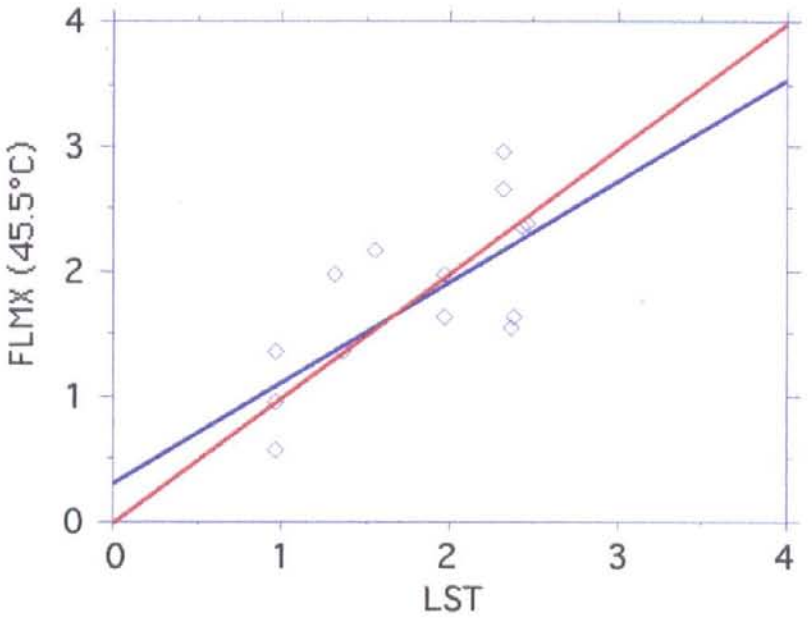
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult lauryl sulfate tryptose broth ที่ 35°ซ [FLT (35°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST) แสดงโดย —— เปรียบเทียบกับ line of equality ——



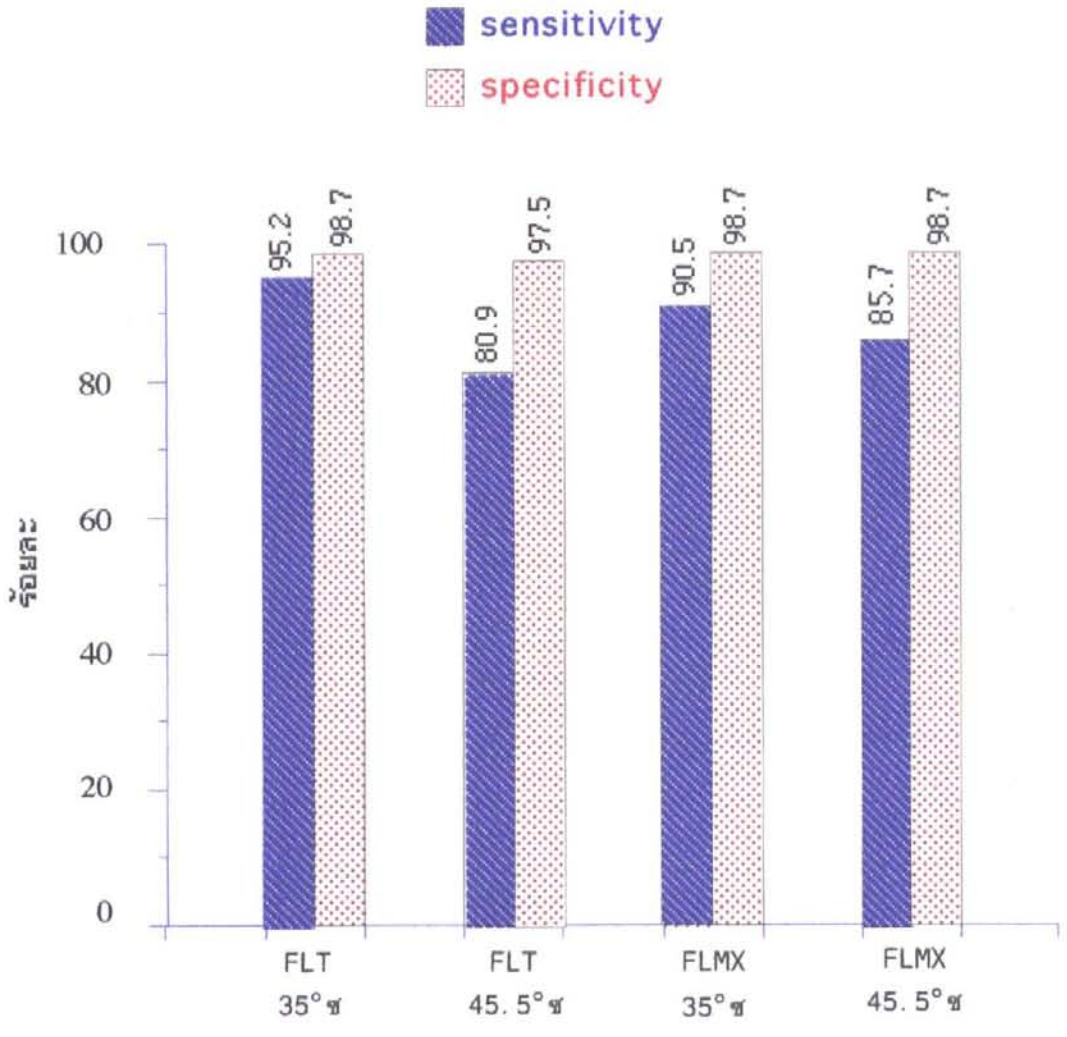
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult lauryl sulfate tryptose broth ที่ 45.5°ซ [FLT (45.5°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST) แสดงโดย —— เปรียบเทียบกับ line of equality ——



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult LMX broth ที่ 35°ซ [FLMX (35°ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST) แสดงโดย —เปรียบเทียบกับ line of equality —



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ของ log 10 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม *E. coli* ใน fluorocult LMX broth ที่ 45.5° ซ [FLMX (45.5° ซ)] กับ lauryl sulfate tryptose broth (LST) แสดงโดย —— เปรียบเทียบกับ line of equality ——



รูปที่ 9 เปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ในการวิเคราะห์ *E. coli* โดยใช้ fluorocult lauryl tryptose broth (FLT) และ fluorocult LMX broth (FLMX)

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Escherichia coli broth (EC broth)

ส่วนประกอบ

Tryptose	20.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Bile salt No.3	1.5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	4.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดดูแรห์มขนาด 10x75 มิลลิเมตร คว่ำอยู่ภายใน โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.9+0.2

2. Fluorocult lauryl tryptose broth (FLT)

ส่วนประกอบ

Tryptose	20.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.75	กรัม
L-tryptophan	1.0	กรัม
4-Methylumbelliferyl-β-D glucuronide	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดดูแรห์มขนาด 10x75 มิลลิเมตร คว่ำอยู่ภายใน โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.8+0.1

3. Fluorocult LMX broth (FLMX)

ส่วนประกอบ

Tryptose	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sorbitol	1.0	กรัม
Tryptophan	1.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.7	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-GAL)	0.08	กรัม
4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide	0.05	กรัม
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์-เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดดูแรห์มขนาด 10x75 มิลลิเมตร คว่ำอยู่ภายใน โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.8+0.1

4. Koser citrate broth

ส่วนประกอบ

Sodium ammonium phosphate	1.5	กรัม
Monobasic potassium phosphate	1.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Sodium citrate	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.7+0.2

5. Lauryl sulfate trytose broth (LST)

ส่วนประกอบ

Tryptose	20.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.75	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดดูแรห์มขนาด 10x75 มิลลิเมตร คว่ำอยู่ภายใน โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.8+0.1

6. Levine EMB agar

ส่วนประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดเติมลงในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองหรือขวดแก้ว ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.1+0.2

7. MR-VP broth

ส่วนประกอบ

Proteose peptone	7.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้ไฟอ่อนๆและคนเป็นครั้งคราว กรองด้วยกระดาษกรอง ทำให้เย็นลง แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 12-15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.9+0.2

8. Nutrient broth

ส่วนประกอบ

Beef extrate	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.8+0.2

9. Plate count agar

ส่วนประกอบ

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งหมดเติมลงในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เมื่อนำออกจากหม้อนึ่งอัดแล้ว นำมาวางเอียงเป็นสแลน ทิ้งไว้ให้เย็น ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.0+0.1

10. Tryptophane broth

ส่วนประกอบ

Tryptone	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีเตรียม

ละลาย tryptone ในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16x125 มิลลิเมตร หลอดละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.9+0.2

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง
วิธีเตรียมสารละลาย

1. Butterfield's buffered phosphate diluent

1.1 Stock solution

ละลาย potassium dihydrogen phosphate 34.0 กรัม ในน้ำกลั่น 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.2 โดยใช้ sodium hydroxide ความเข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร เก็บไว้ในตู้เย็น

1.2 Diluent

เจือจาง stock solution 1.25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร แบ่งใส่ขวดแก้ว ปริมาตร 90 และ 450 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

2. Gram stain reagent

2.1 Ammonium oxalate-crystal violet (Hucker's)

ละลาย crystal violet 2 กรัม ใน ethyl alcohol ร้อยละ 95 จำนวน 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ละลาย ammonium oxalate monohydrate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง

2.2 Lugol's solution

บด iodine 1 กรัม potassium iodide 2 กรัม ค่อยๆเติมน้ำกลั่น และบดต่อไปจน iodine และ potassium iodide ละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 ลูกบาศก์เดซิเมตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

2.3 Acetone alcohol

ผสม ethyl alcohol ร้อยละ 95 โดยปริมาตร และ acetone ในอัตราส่วน 1:1

2.4 Safranin

ละลาย safranin 0.25 กรัม ใน ethyl alcohol ร้อยละ 95 โดยปริมาตร จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. Kovacs reagent

ละลาย *p*-dimethylaminobenzaldehyde 5 กรัม ใน amyl alcohol 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ค่อยๆเติม hydrochloric acid เข้มข้น จำนวน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. Methyl red indicator

ละลาย methyl red 0.1 กรัม ใน ethyl alcohol ร้อยละ 95 โดยปริมาตร จำนวน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5. Voges-Proskauer reagent

5.1 Alcoholic α-naphthol solution

ละลาย α-naphthol 5 กรัม ใน absolute alcohol 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.2 Potassium hydroxide solution

ละลาย potassium hydroxide 40 กรัม ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร