วิธีตรวจสอบนมดิบทางจุลชีววิทยา

ปรีชา ธรรมนิยม

ในปัจจุบันนี้มีวิธีการหลายๆ วิธีสำหรับนักจุลชีววิทยาที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของนมดิบที่พบว่าใช้อยู่เป็นประจำคือการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ในที่นี้จะแบ่งวิธีหาจำนวนแบคทีเรียในนมดิบออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 2 กลุ่ม คือวิธีตรง (direct) กับวิธีอ้อม (indirect) วิธีตรงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวัดความสามารถในการแบ่งตัวและสร้างโคโลนี หรือเป็นการนับเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เข้าช่วย ส่วนวิธีอ้อมเป็นการวัดส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ หรือวัดการเปลี่ยนแปลงของสารในกระบวนการสร้างและสลายภายในเซลล์ในช่วงการเจริญเติบโต

1. วิธีตรง

1.1 การนับจำนวนโคโลนี ได้แก่

- **Plate colony count method (Standard plate count method)**

วิธีนี้ใช้หาปริมาณแบคทีเรียโดยเจือจางตัวอย่าง 10 เท่าหลายๆ ความเข้มข้นแล้วนำสารละลายเจือจางแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากวุ้นที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้แข็งตัวในจานเพาะเชื้อ แบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกตรึงไว้ในวุ้น แล้วจึงอบเพาะเชื้อ 2-3 วันที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่จะแบ่งตัวและสร้างโคโลนี ซึ่งมองเห็นด้วยตาเปล่า แล้วจึงนำจานเพาะเชื้อที่มี 30-300 โคโลนี มานับจำนวนและคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

ข้อเสียของวิธี plate colony count คือถ้ามีเซลล์ 2 เซลล์หรือมากกว่าอยู่ติดกันจะสร้างโคโลนีเพียง 1 โคโลนี แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิที่อบเพาะเชื้อได้และบางชนิดก็ถูกทำลายด้วยความร้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไม่สามารถแบ่งตัวได้ และข้อเสียอีกอย่างที่สำคัญคือวิธีนี้ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน 2-3 วัน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีอ้างอิง (reference method) สำหรับการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของนม สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการใช้วิธี plate colony count คือวิธีนี้เป็นการหาค่าประมาณของค่าจริง และมีข้อผิดพลาดได้ ข้อผิดพลาดส่วนใหญ่มาจากการสุ่มตัวอย่าง ซึ่งค่านี้จะลดลงเมื่อปริมาณแบคทีเรียมากขึ้น

- **Plate loop method**

วิธีนี้ไม่ต้องทำการเจือจางตัวอย่าง จึงทำให้ประหยัดเวลาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำเจือจางตัวอย่างวิธีการคือใช้เครื่องอุปกรณ์ที่มี loop อยู่ 2 ขนาด ซึ่งเมื่อจุ่มลงในตัวอย่างจะได้ปริมาตร 0.01 และ 0.001 มิลลิลิตร เมื่อปล่อยตัวอย่างลงในจานเพาะเชื้อแล้ว จึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงไป ผสมให้เข้ากัน เครื่องมือนี้สามารถทำการวิเคราะห์ได้ถึง 300 ตัวอย่างที่ความเจือจาง 1 : 100 และ 1 : 1000 ในเวลา 1 ชั่วโมง เทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้หาจำนวนแบคทีเรียระหว่าง 3,000-300,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เครื่องมือที่ใช้วิธี plate loop method ที่ขายอยู่ในขณะนี้มีชื่อทางการค้าว่า Petrifoss ของประเทศเดนมาร์ก นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการกลางของประเทศยุโรป ผู้ผลิตอ้างว่าความสัมพันธ์ระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก Petrifoss กับวิธีอ้างอิงสูงถึง 0.99

- **Spiral plate method**

วิธีนี้เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ไม่ต้องทำการเจือจางตัวอย่าง เพียงแต่ปรับอัตราการไหลของตัวจ่ายตัวอย่าง วิธีนี้ใช้จานเพาะเชื้อเพียงจานเดียวในขณะที่วิธี plate colony count ต้องใช้ 2-3 จานเพาะเชื้อ แขนของตัวจ่ายตัวอย่างจะปล่อยตัวอย่างลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวอยู่แล้ว โดยจะเริ่มปล่อยตัวอย่างจากจุดศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อออกไปสู่ขอบจาน โดยที่ปริมาตรของตัวอย่างที่ปล่อยจะค่อยๆ ลดลงจนถึงความเข้มข้นที่ 1 : 10000 ขณะที่ปล่อยตัวอย่างนี้จานเพาะเชื้อจะหมุนไปด้วย หลังจากการอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเกิดโคโลนีบนจานเพาะเชื้อโดยมีโคโลนีหนาแน่นตรงจุดศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อและค่อยๆ ลดลงเมื่อเข้าใกล้ขอบจาน การนับจำนวนแบคทีเรียใช้ counting grid ซึ่งใช้ความสัมพันธ์ของพื้นที่ของจานเพาะเชื้อกับปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้เพื่อที่จะเปลี่ยนค่าที่นับได้ออกมาเป็นจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ส่วนการนับแบบอัตโนมัติสามารถทำได้ในเวลาไม่กี่วินาทีโดยการใช้ laser colony counter หรือ image analyser การใช้ spiral plater ควบคู่ไปกับ laser colony counter ใช้หาจำนวนแบคทีเรียได้ในช่วง 500-300,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาเพียง 1 ใน 3 ของเวลาที่ใช้โดยวิธี plate colony count วิธีนี้ได้มีการเปรียบเทียบกับวิธี plate colony count พบว่าได้ผลใกล้เคียงกัน ผลการเปรียบเทียบของนักวิจัยกลุ่มหนึ่งซึ่งใช้ตัวอย่างนมหลายๆ ตัวอย่างและผู้วิเคราะห์หลายคนพบว่าค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธี spiral plate มีค่าเท่ากับ 0.109 ในขณะที่ค่าที่ได้จากวิธี plate colony count เท่ากับ 0.110 สรุปได้ว่าวิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่าวิธี plate colony count คือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและจาน

เพาะเชื้อน้อยกว่า ไม่ต้องใช้ปิเปตต์และวิเคราะห์ได้ถึง 50-60 จานเพาะเชื้อต่อชั่วโมง

- **Agar droplet method**

วิธีนี้เป็นการย่อวิธี plate colony count สามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้ ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ วิธี Colworth droplet technique ที่ใช้ในการนับจำนวนแบคทีเรียในอาหารใช้จานเพาะเชื้อเพียงจานเดียว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นเป็นสารละลายสำหรับเจือจางจึงทำให้ประหยัดวัสดุที่ใช้ ในการวิเคราะห์จะหยดวุ้นลงบนจานเพาะเชื้อ วุ้น 1 หยด จะมีปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างจะเจือจางตัวอย่างที่ 3 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นจะหยดวุ้น 5 หยดถือเป็นการทำซ้ำ 5 ครั้ง ใช้เวลาเพียง 45 วินาทีในการเตรียมตัวอย่างลงจานเพาะเชื้อ ทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากเป็น 3 เท่าของวิธี plate colony count ในการวิเคราะห์นมจะอบเพาะเชื้อ 48 ชั่วโมง ได้ผลใกล้เคียงกับวิธี plate colony count

- **Hydrophobic grid membrane filter (HGMF)**

วิธีนี้เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียบนแผ่นกรอง (membrane filter) ทำโดยการกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองแล้วนำไปวางบนแผ่นที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเพาะเชื้อ 1-3 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนี วิธีนี้ไม่นับว่าเป็นวิธีที่รวดเร็ว แต่ใช้สำหรับหาจำนวนโคลิฟอร์มในนมดิบและนมพาสเจอไรส์ ข้อดีของวิธีนี้คือลดขั้นตอนการทำตัวอย่างให้เจือจาง จึงเป็นการลดเวลาในการวิเคราะห์และผลวิเคราะห์ที่ได้ดีกว่าวิธีกรองปกติ (conventional filter) แผ่น HGMF นี้ เป็นแผ่นกรองปกติที่เป็นตารางสี่เหลี่ยมแต่เคลือบด้วยสารที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไข (wax) ทำให้แบ่งแผ่นกรองได้เป็นช่องเล็กๆ 2,000-4,000 ช่อง ขึ้นอยู่กับขนาดของแผ่น จำนวนแบคทีเรียที่นับได้ต่อแผ่นกรองแผ่นหนึ่งอยู่ในช่วง 10 ถึง 90,000 เซลล์โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ซึ่งการนับนี้สามารถใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่ให้ความเชื่อถือสูงได้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 24 ชั่วโมง

1.2 การนับเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่

- **Breed smear**

วิธีนี้เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียในนมโดยกล้องจุลทรรศน์ ขั้นแรกคือเตรียมตัวอย่างนมบนแผ่นสไลด์เกลี่ยให้เป็นฟิล์มบางๆ ย้อมสีด้วยเมทิลีน บลู (methylene blue) แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ยังคงใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีข้อดีคือใช้เวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง สามารถจำแนกรูปร่างของแบคทีเรียระหว่างการตรวจสอบได้ ส่วนข้อเสียคือใช้ตัวอย่างน้อยเกินไปเพียงแค่ 0.01 มิลลิลิตร ทำให้ผลที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน การย้อมสีไม่ติดแบคทีเรียบางชนิด การกระจายของเซลล์ในแผ่นฟิล์มบนสไลด์ไม่สม่ำเสมอ และผู้วิเคราะห์เกิดอาการล้าของสายตาเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์นานๆ วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในสหรัฐอเมริกา

- **Direct epifluorescent filter technique (DEFT)**

วิธีนี้เป็นวิธีแบบรวดเร็วที่ใช้ในการนับจำนวนแบคทีเรียในนมดิบ โดยการใช้แผ่นกรอง (membrane filter) การย้อมแบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) แล้วใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ เอ็พพิฟลูออเรสเซนซ์ (epifluorescence) ขั้นตอนแรกต้องนำนมมาย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ somatic cells และไขมันแยกตัวออก แล้วจึงกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรอง 0.6 ไมครอน แบคทีเรียจะติดอยู่กับแผ่นกรองเมื่อนำมาย้อมด้วย อะคริดีน ออเรนจ์ (acridine orange) แบคทีเรียจะเรืองแสงเป็นสีส้มแดงซึ่งสามารถนับจำนวนได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเอ็พพิฟลูออเรสเซนซ์ วิธี DEFT นี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 25 นาที ราคาไม่แพง ให้ผลใกล้เคียงกับวิธี plate colony count โดยมีค่าความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีเท่ากับ 0.9 เหมาะสำหรับวิเคราะห์นมดิบที่มีจำนวนแบคทีเรีย 6×10^3 ถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ข้อเสียของวิธีนี้คือผู้วิเคราะห์จะเกิดอาการเมื่อยล้าสายตาในการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ก็สามารถขจัดปัญหานี้ได้โดยใช้ semi-automated counting system ซึ่งใช้ image analyser ทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถนับแผ่น DEFT ได้ถึง 50 แผ่นในเวลา 1 ชั่วโมง ปัจจุบันนี้มีผู้ผลิตเครื่องมือประเภทนี้ออกมาขายเป็นระบบอัตโนมัติแบบสมบูรณ์ตั้งแต่การกรองตัวอย่าง การย้อม การล้าง การทำให้แห้งและการนับ เป็นของประเทศฝรั่งเศส นับว่าให้ผลที่รวดเร็ว โดยผู้วิเคราะห์คนหนึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ถึง 96 ตัวอย่างในเวลา 1 ชั่วโมง และให้ผลการวิเคราะห์ภายในเวลา 30 นาที

- **แบคโตสแกน (Bactoscan)**

เครื่องแบคโตสแกนนี้ประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ ขั้นตอนแรกต้องทำให้ somatic cells ตกตะกอนแยกออกจากไขมันและเคซีน (casein) แล้วจึงแยกส่วนที่เป็นแบคทีเรียออกมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) เพื่อแยกโปรตีนที่ยังหลงเหลืออยู่แล้วจึงย้อมแบคทีเรียและนับจำนวนโดยนำตัวอย่างมาทำให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิวหน้าของแผ่น โรตารี ดิสก์ (rotary disc) ของเครื่องแบคโตสแกน แล้วจึงนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ติดกับเครื่องแบคโตสแกน วิธีนี้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี plate colony count ให้ค่าความสัมพันธ์สูงถึง 0.8-0.9 เครื่องมือนี้สามารถวิเคราะห์ได้ 80 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

2. วิธีอ้อม

2.1 ปฏิกิริยารีดักชั่นของสี (Dye-reduction technique)

สีที่นิยมใช้กับวิธีนี้มีอยู่ 2 ชนิดคือ เมทิลีน บลู (methylene blue) และ รีซาซูริน (resazurin) ใช้ในการประมาณค่าจำนวนแบคทีเรียในนม ขั้นตอนการทดสอบคือนำนมดิบมาเติมลงไปในสารละลายมาตรฐานของเมททิลีน บลู หรือ รีซาซูริน ในกรณีของเมททิลีน บลู เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ขึ้นจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นขาว และในกรณีของรีซาซูริน จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินอมเทาเป็นชมพู เวลาที่ใช้สำหรับปฏิกิริยารีดักชั่น ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนผกผันกับจำนวนแบคทีเรียในนม วิธีทดสอบรีซาซูรินที่ใช้เวลาในการทดสอบนาน 10 นาที นิยมใช้กันในอังกฤษและเวลล์ เพื่อจัดระดับของนมเมื่อมาถึงโรงงาน วิธีนี้นับว่าเป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้เครื่องมือน้อย ส่วนวิธีทดสอบเมททิลีน บลู ก็เป็นวิธีที่ดีอีกวิธีหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี plate colony count ได้ค่าความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีสูงถึง 0.9

2.2 วิธีทางไฟฟ้า (Electrical method)

วิธีนี้ใช้หลักการวัดค่าความต้านทานการไหลของกระแสไฟฟ้าสลับ (impedance) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียจริญเติบโตจะเกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โมเลกุลที่ซับซ้อนและไม่มีประจุ เช่น คาร์โบไฮเดรทหรือไขมันจะถูกย่อยสลายเป็นโมเลกุลที่เล็กกว่าและมีประจุ เช่น กรดแลกติกและกรดอะซิติก โมเลกุลที่มีประจุ เช่น โปรตีนและโพลีเพพไทด์ถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นแอมโมเนียและไบคาร์บอเนตในที่สุด เมื่อแบคทีเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จะก่อให้เกิดโมเลกุลที่มีประจุเป็นจำนวนมาก ทำให้ค่าความต้านทานการไหลของกระแสไฟฟ้าสลับลดลงความต้านทานการไหลของกระแสไฟฟ้าสลับนี้สามารถใช้วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทางอ้อม วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วสามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีแบคทีเรียมากถึง 10^5 ถึง 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 3-5 ชั่วโมงและ 10^4 ถึง 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในเวลา 5-7 ชั่วโมง

2.3 ไพรูเวท (Pyruvate)

ไพรูเวท (pyruvate) เป็นสารที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย การหาปริมาณไพรูเวทในนมเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของนม วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก ทำเป็นระบบอัตโนมัติได้ ความสัมพันธ์ของปริมาณไพรูเวทในนมกับจำนวนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษานม การหาปริมาณไพรูเวทของนมอาจใช้ได้กับนมที่มีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ

2.4 เรดิโอเมตทริ (Radiometry)

วิธีนี้มีหลักการคือ การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถวัดได้โดยการวัด $^{14}CO_2$ ที่ถูกปล่อยออกมาจากสารอาหารที่ได้มีการ label ด้วยกัมมันตรังสี (radioactive) ในกระบวนการเมตาบอลิซึม วิธีนี้ใช้เวลา 2-24 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่าง เวลาที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณของ $^{14}CO_2$ เป็นสัดส่วนกลับกับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่าง วิธีนี้ใช้ตรวจสอบคุณภาพของนมดิบ โดยใช้เวลา 10 ชั่วโมงในการตรวจสอบแบคทีเรีย 1.9×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามวิธีนี้ให้ค่าขอบเขตความเชื่อมั่น (confidence limit) กว้างมาก ในการตรวจสอบแบคทีเรียในช่วง 2×10^4 ถึง 1.6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีนี้ไม่เหมาะในทางปฏิบัติ เพราะแบคทีเรียในนมต่างชนิดกันมีอัตราการเจริญเติบโตต่างกันหรือ somatic cells อาจย่อยสลายสารอาหารที่ได้มีการ label ด้วยกัมมันตรังสี

ในวงการอุตสาหกรรมนมได้มีการใช้วิธีดั้งเดิม (conventional method) ในการวิเคราะห์คุณภาพของนมและผลิตภัณฑ์นมมาเป็นเวลานานแล้ว เทคโนโลยีปัจจุบันนี้ได้พัฒนาไปมาก ทำให้มีการนำเอาวิธีวิเคราะห์อย่างรวดเร็วมาใช้ตามที่กล่าวมาข้างต้น ข้อดีของวิธีรวดเร็วนี้คือบางวิธีให้ผลการวิเคราะห์น้อยกว่า 1 ชั่วโมง ทำให้การแก้ไขข้อบกพร่องเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว วิธีเหล่านี้บางวิธีอาจต้องมีการปรับเพื่อให้ใช้วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่นๆ ได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้วิเคราะห์ได้ครบวงจรในโรงงาน คือ นมดิบ นมในระหว่างกระบวนการผลิต และนมที่ผลิตเสร็จแล้ว อุตสาหกรรมนมเริ่มนำเอาวิธีวิเคราะห์อย่างรวดเร็วมาใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ ทำให้คุณภาพของนมดิบดีขึ้น กระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตแล้วดีขึ้น ซึ่งทำให้การสูญเสียทางเศรษฐกิจลดลงในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

Jay, J.M., **Modern food microbiology.** 4th ed. New York : Chapman & Hall, 1992. p.97-121.

Pettipher, G.L. Modern laboratory practice 2 : microbiological analyses. In R.K. Robinson, ed. **Modern dairy technology : advances in milk products.** vol.2 London : Elsevier Applied Science, 1993. p.417-454.

Sharpe, A.N. Development and evaluation of membrane filtration techniques in microbial analysis. In P.D. Patel, ed. **Rapid analysis techniques in food microbiology.** London : Blackie Academic & Professional, 1994. p.29-60.