

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนม

มัญชุ อือสวงษ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ กรรณิกา คุณสมบัติ หทัยชนก วงษ์สมบุญ

บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการได้ทำการดัดแปลงจาก วิธี APHA Thermoturic Count ในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่าง (Dilution of sample) วิธีดังกล่าวระบุให้ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำนม ในอัตราส่วนตัวอย่างน้ำนม 11 ml ใน diluents ปริมาตร 99 ml โดยห้องปฏิบัติการได้ปรับเป็นปิเปตตัวอย่างน้ำนม 1 ml ใส่ใน diluents ปริมาตร 9 ml ทำการประเมินผลเปรียบเทียบระหว่างสองวิธีโดยใช้ ANOVA และ paired t-test พบว่าผลการทดสอบได้ค่า Critical level (3 cfu/ml) และ coefficient of variation (0.4973%) R^2 (0.9974) intercept (0.0490) Slope b (0.9847) และไม่มีนัยสำคัญของความแตกต่างทางสถิติซึ่งแสดงว่าวิธีที่ดัดแปลงสามารถให้ผลถูกต้องเช่นเดียวกัน

คำสำคัญ : การตรวจสอบความใช้ได้, เชื้อจุลินทรีย์ทนร้อน, น้ำนม

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation of Laboratory pasteurization count in milk

Monchu Oswong Kotchapphan Bowonchaiyarit
Kannilka Kunsombut Hathaichanok Wongsomboon

Abstract

The laboratory was modified APHA Thermoturic Count method in the step of sample dilution. The assessment was based on change volume of a sample dilution. Reference method recommended 11 ml of each milk sample to 99 ml diluent and In-house laboratory method used 1 ml of the milk sample to 9 ml of diluent. The comparison between the two methods was carried out using ANOVA and paired t-test. Critical level (3 cfu/ml) and coefficient of variation (0.4973%), R² (0.9974), intercept (0.0490) Slope b (0.9847) have been shown that results from In-house method were equivalent to APHA Thermoturic Count method without statistical significantly differences.

Keywords: Method validation, Laboratory pasteurization count, milk

Milk and Milk Products Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนม

มัณฑุ อธิสงฆ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ กรรณิกา คุณสมบัติ หทัยชนก วงษ์สมบุญ

บทนำ

Laboratory pasteurization count เป็นการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมดิบที่อาจอยู่รอดได้ภายหลังผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ โดยมากมักไม่ก่อโรค แต่ทำให้น้ำนมเกิดการเน่าเสีย หากสามารถอยู่รอดตลอดกระบวนการผลิต วิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมดิบนั้น ดำเนินการตาม American Public Health Association Standard methods for the examination of dairy products 17th edition, APHA Thermoturic Count [6] ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ได้มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการเจือจางสารละลาย จากน้ำนม 11 ml ต่อสารละลายเจือจาง 99 ml เป็นนม 1 ml ต่อสารละลายเจือจาง 9 ml จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อให้ทราบว่าวิธีการที่ดัดแปลงนั้นสามารถใช้ทดแทนวิธีอ้างอิงได้ โดย มกษ. 6003:2553[4] กำหนดให้เชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมจะต้องมีอยู่ไม่เกิน 1,000 cfu/ml

1. วัตถุประสงค์

ศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนม

2. ขอบข่าย

เปรียบเทียบวิธีการเจือจางตัวอย่างน้ำนม 2 วิธี ได้แก่ วิธี APHA Thermoturic Count และวิธี In-house

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ลดปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง

4. วิธีการดำเนินงาน

4.1. การเตรียมเชื้อมาตรฐาน

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 บน Tryptic Soy agar บ่มที่อุณหภูมิ $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 16-18 ชั่วโมง เลือกร Single colony ลงใน peptone salt solution ปริมาตร 2 ml ภายในบรรจุ glass beads ย้ายลงใน slant agar ปริมาตร 200 ml ใน roux flask กลิ้ง glass beads ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 5 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้าง

spore เก็บ spore โดยใช้ glass beads และ Salt Peptone Solution ปริมาตร 50 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ นาน 30 นาที ทิ้งส่วนใส ทำซ้ำสองรอบ นำ Suspension ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 ± 2 °C นาน 30 นาที จะได้ Spore suspension สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

ทำการเจือจาง Spore suspension ตั้งแต่ $1:10^1$ ถึง $1:10^9$ และทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค pour plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง เพื่อเลือกปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในตัวอย่าง spike

4.2. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนมที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เป็นตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติ โดยเก็บจากศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบที่ส่งตรวจเป็นประจำกับทางห้องปฏิบัติการ

4.3. วิธีทดสอบ

ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมใช้วิธีวิเคราะห์ตาม American Public Health Association 2004 (APHA Thermoturc Count)[1] โดยทำการปิเปตตัวอย่างน้ำนม 7 ml ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 62.8 ± 0.5 °C นาน 30 นาที ในอ่างน้ำร้อน เมื่อครบเวลาให้นำไปแช่เย็น หรือแช่น้ำแข็งทันที ให้อุณหภูมิตัวอย่างลดลงอยู่ที่ 10 °C หรือต่ำกว่า ทำการเจือจางตัวอย่าง (10-fold dilution) ปิเปตน้ำนม 1 ml ลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และปิเปตตัวอย่างน้ำนมเจือจาง 1 ml จากลำดับความเจือจางที่ 1:10, 1:100, 1:1000 ทำการทดสอบด้วยเทคนิค pour plate แล้วบ่มอุณหภูมิ 32 ± 1 °C นาน 48 ± 3 ชั่วโมง

4.4. การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

ดำเนินการตาม APHA Thermoturc Count โดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อในช่วง 25-250 โคโลนี

4.5. การหา Critical Level (LC)

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ให้มีการปนเปื้อน 3 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 1 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ให้มีปริมาณเชื้อ 10 cfu/ml

ระดับที่ 2 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ให้มีปริมาณเชื้อ 30 cfu/ml

ระดับที่ 3 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ให้มีปริมาณเชื้อ 100 cfu/ml

ระดับที่ 4 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ให้มีปริมาณเชื้อ 300 cfu/ml

ในการทดสอบ 4 ระดับ ทุกระดับทำการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ

4.6. สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

การศึกษานี้จะทำการหาค่า %Coefficient of variation (%CV), การทดสอบ Pair t-test และการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis)

5. ผลการทดลอง

5.1. ค่า Critical level (LC)

ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ใส่ลงในตัวอย่างน้ำนม 4 ระดับแล้วทำการทดสอบหาจำนวนจุลินทรีย์ที่ร้อน ให้ผลการทดสอบดังนี้

ตาราง 1 แสดงผลทดสอบระดับการ spike และปริมาณเชื้อ

ระดับ	ปริมาณเชื้อ	ผลทดสอบ (ครั้ง)
1	10 cfu/ml	6/6
2	30 cfu/ml	6/6
3	100 cfu/ml	6/6
4	300 cfu/ml	6/6

การปนเปื้อนของเชื้อทุกระดับสามารถตรวจหาจากผลทดสอบซ้ำในการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ที่ร้อน ค่า Critical level เท่ากับ 10 cfu/ml

5.2. Coefficient of Variation

เมื่อทำการค่า Coefficient of Variation (%CV) ระหว่างวิธี Reference Method และ In-house Method จะมีค่า %CV ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 0.4734 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ $\%CV \leq 10$ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำนมเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน APHA และวิธี In-house

Sample	Reference (cfu/ml)	In-house (cfu/ml)	Log ₁₀ Reference	Log ₁₀ In-house	Mi	Si
1	30	30	1.4771	1.4771	1.4771	0.0000
2	30	30	1.4771	1.4771	1.4771	0.0000
3	30	30	1.4771	1.4771	1.4771	0.0000
4	30	30	1.4771	1.4771	1.4771	0.0000
5	30	30	1.4771	1.4771	1.4771	0.0000
6	40	40	1.6021	1.6021	1.6021	0.0000

Sample	Reference (cfu/ml)	In-house (cfu/ml)	Log ₁₀ Reference	Log ₁₀ In-house	Mi	Si
7	80	80	1.9031	1.9031	1.9031	0.0000
8	110	100	2.0414	2.0000	2.0207	0.0293
9	280	310	2.4472	2.4914	2.4693	0.0313
10	340	360	2.5315	2.5563	2.5439	0.0176
11	460	480	2.6628	2.6812	2.6720	0.0131
12	650	720	2.8129	2.8573	2.8351	0.0314
13	790	840	2.8976	2.9243	2.9110	0.0188
14	1,000	960	3.0000	2.9823	2.9911	0.0125
15	1,200	1,100	3.0792	3.0414	3.0603	0.0267
16	1,300	1,300	3.1139	3.1139	3.1139	0.0000
17	1,400	1,300	3.1461	3.1139	3.1300	0.0228
18	1,600	1,600	3.2041	3.2041	3.2041	0.0000
19	1,600	1,600	3.2041	3.2041	3.2041	0.0000
20	1,600	1,700	3.2041	3.2304	3.2173	0.0186
21	1,700	1,700	3.2304	3.2304	3.2304	0.0000
22	2,100	2,000	3.3222	3.3010	3.3116	0.0150
23	2,800	2,500	3.4472	3.3979	3.4225	0.0348
24	2,600	2,600	3.4150	3.4150	3.4150	0.0000
25	2,900	2,800	3.4624	3.4472	3.4548	0.0108
26	4,300	4,700	3.6335	3.6721	3.6528	0.0273
27	4,800	5,000	3.6812	3.6990	3.6901	0.0125
28	5,100	5,700	3.7076	3.7559	3.7317	0.0342
29	5,600	5,200	3.7482	3.7160	3.7321	0.0228
30	5,800	5,300	3.7634	3.7243	3.7439	0.0277
31	5,200	5,800	3.7160	3.7634	3.7397	0.0335
32	6,800	6,600	3.8325	3.8195	3.8260	0.0092
33	6,600	6,200	3.8195	3.7924	3.8060	0.0192
34	8,200	7,800	3.9138	3.8921	3.9030	0.0154
35	11,000	10,000	4.0414	4.0000	4.0207	0.0293
36	19,000	18,000	4.2788	4.2553	4.2670	0.0166

Sample	Reference (cfu/ml)	In-house (cfu/ml)	Log ₁₀ Reference	Log ₁₀ In-house	Mi	Si
37	20,000	20,000	4.3010	4.3010	4.3010	0.0000
38	24,000	22,000	4.3802	4.3424	4.3613	0.0267
				(MED)Mi	3.2107	
					Sr	0.0152

$$\text{สูตร} \quad \%CV = \frac{S_r \times 100}{MED (Mi)}$$

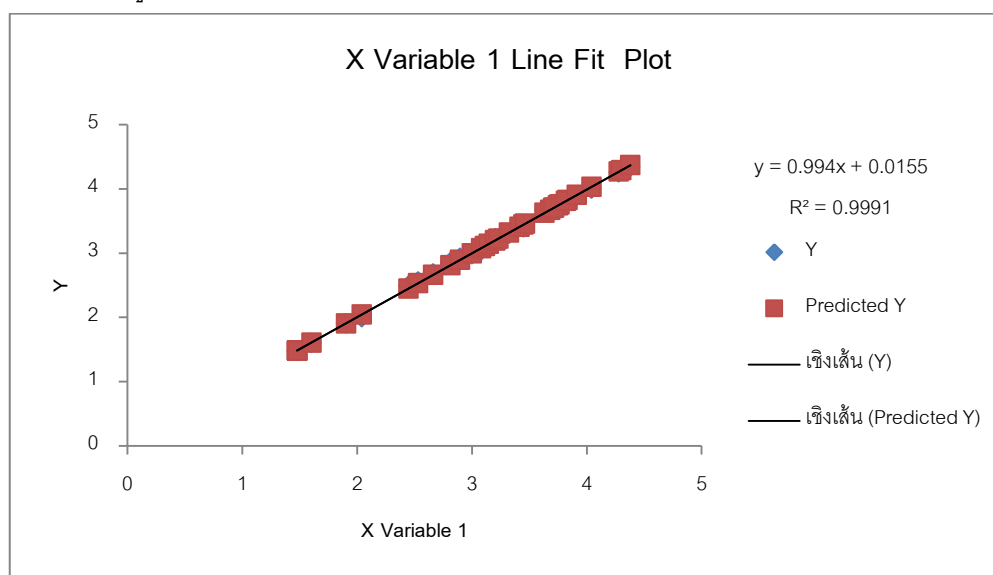
$$\text{แทนค่า} \quad = \frac{0.0152 \times 100}{3.2107}$$

$$= 0.4734$$

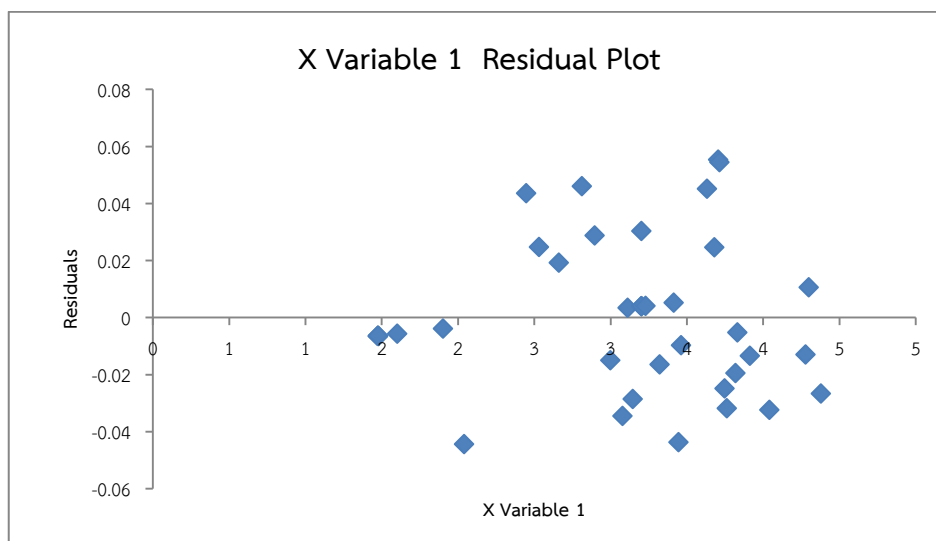
โดยเกณฑ์การยอมรับ Coefficient of Variation (%CV) ≤10%

5.3. การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis)

เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างวิธี Reference method และ In-house method พบว่า $R^2=0.9990$ Intercept Y= 0.0154 และ Slope b = 0.9939 แสดงว่าวิธีที่ใช้ทดสอบมีความเที่ยง(รูป 1)เมื่อทำ Residual Plot ซึ่งแสดง Linearity หรือ lack-of fit มีค่าอยู่ในช่วง ± 0.06 (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 กราฟแสดง Line lift plot



รูปที่ 2 กราฟแสดงการกระจายตัวของข้อมูล Residual Plot

5.4. Paired t-test

ทำการเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Paired t-test พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า t-stat (0.6748) น้อยกว่า t-critical two tail (2.0686) แสดงว่า In-house method ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างจาก Reference method (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ Paired t-test

	Variable 1	Variable 2
Mean	3.0933223	3.0902526
Variance	0.7267246	0.7181161
Observations	37	37
Pearson Correlation	0.9994878	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	36	
t Stat	0.6748242	
P(T<=t) one-tail	0.2520493	
t Critical one-tail	1.6882977	
P(T<=t) two-tail	0.5040986	
t Critical two-tail	2.028094	

6. สรุปผลการทดลอง

การหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ร้อนในตัวอย่างน้ำนมตาม Reference method และ In-house method ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงจาก American Public Health (APHA) 2004, Standard Method for the examination of dairy products 17th edition จึงสามารถนำมาใช้ทดสอบหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ร้อนในตัวอย่างน้ำนมในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมได้

7. ข้อเสนอแนะ

การเตรียมตัวอย่างน้ำนมในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 62.8 ± 0.5 °C ตัวอย่างควรมีอุณหภูมิถึงจุดที่ต้องการภายใน 5 นาที

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทดลองนี้

9. เอกสารอ้างอิง

- [1] Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. 20th Method 986.33.
- [2] ISO. 2003. ISO 16140-2: 2016. Microbiology of the food chain – Method validation- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva. Switzerland
- [3] ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. 9 pp. www.iso.org.
- [4] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553. กรุงเทพมหานคร.
- [5] APHA (2005) Standard methods for the examination of Dairy and dairy product, 17th ed. American Public Health Association, Washington, DC