

การดัดแปลงวิธีทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในนํ้านมด้วยวิธี Petrifilm

มัณฑุ อีอสงศ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สมชาย วงศ์สมุทร

บทคัดย่อ

การดัดแปลงวิธีทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในนํ้านมด้วยวิธี Petrifilm จากการใช้สารละลายเจือจาง 99 มิลลิลิตร มาเป็น 9 มิลลิลิตร เป็นการลดระยะเวลาของการเตรียมสารละลายและลดปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการปิเปตตัวอย่างนํ้านมแต่ละตัวอย่าง 11 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจางที่กำหนดโดยวิธี Petrifilm 99 มิลลิลิตร และอีก 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 9 มิลลิลิตร ผลการทดสอบได้ค่า Critical level (3 cfu/ml) และ coefficient of variation (0.4973%) R^2 (0.9974) intercept (0.049) Slope b (0.9847) และไม่มีนัยสำคัญของความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งแสดงว่า วิธีที่ดัดแปลงสามารถให้ผลถูกต้องเช่นเดียวกับวิธี Petrifilm

คำสำคัญ : การดัดแปลง วิธีทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด นํ้านม วิธี Petrifilm

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Modification of total aerobic plate count in milk by Petrifilm method

Monchu Oswong Kotchaphan Bowonchaiyarit Somchai Wongsamoot

Abstract

Modification of total aerobic plate count in milk by Petrifilm method was changed from 99 ml to 9 ml of diluent in order to reduce the time of media preparation and to decrease the amount of media. Milk samples were pipetted 11 ml into 99 ml diluent as recommended by Petrifilm method then 1 ml of the same milk samples was pipetted to 9 ml of diluent. The test results were critical level (3 cfu / ml) coefficient of variation (0.4973%), R^2 (0.9974), intercept (0.049), Slope b (0.9847) and no statistically significant with the Petrifilm method.

Keywords : Modification, total aerobic plate count , milk, Petrifilm method

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

การดัดแปลงวิธีทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยวิธี Petrifilm

มัณฑุ อีอสงศ์ กษพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สมชาย วงศ์สมุทร

บทนำ

Petrifilm aerobic count plate ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count) เจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น (Cold water soluble gelling agent) และสี triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ซึ่งอยู่ในสภาพออกซิไดซ์จะไม่มีสี (colorless) เมื่อเติมตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางหรือไม่เจือจาง 1 มิลลิลิตรลงไปแล้วกดให้ตัวอย่างแผ่กระจายในพื้นที่ 20 ตารางเซนติเมตร บ่มที่ 32 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมจะเจริญเนื่องจากเป็นสภาพรีดิวซ์ของ TTC และสามารถตรวจนับได้ เมื่อคำนวณจะทราบปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำนมต่อมิลลิลิตร สำหรับมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 ระบุให้พบได้ไม่เกิน 5×1000 cfu/ml

1. วัตถุประสงค์

ศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) การหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในน้ำนมด้วยวิธี Petrifilm

2. ขอบข่าย

เปรียบเทียบวิธีการเจือจางตัวอย่างน้ำนม 2 วิธี ได้แก่ วิธี Petrifilm และ In-house

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1. ลดระยะเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 3.2. ลดค่าใช้จ่ายในการซื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ
- 3.3. ลดค่าไฟฟ้าในการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ

4. วิธีการดำเนินงาน

4.1 การเตรียมเชื้อมาตรฐาน

1) ใช้ loop เชี่ยเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 จาก TSA plate ที่เป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยวๆ เชี่ยลงบน TSB tube จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2) ใช้ loop เชี่ยเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 จาก TSA plate ที่เป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยวๆ ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทดสอบ gram's stain ใช้ sterile

pipette ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก TSB ปริมาตร 1 ml ลงใน diluent 9 ml เจือจางจาก 10^{-1} จนถึง 10^{-9}

3) ใช้ sterile plate ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก diluent ที่ต้องการลงใน sterile plate เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน plate ผสมเข้ากับเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

4) เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ทำการนับจำนวนโคโลนี เมื่อทราบปริมาณเชื้อแล้ว ใช้ sterile pipette ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก TSB ปริมาตร 1 ml ลงใน diluent 9 ml เจือจางจนระดับ dilution ที่ต้องการ และเลือก dilution

5) นำเชื้อที่ทำ serial dilution นำมานับจำนวนโดยวิธี pour plate ควบคู่ไปด้วย เพื่อดูจำนวนเชื้อที่แท้จริงที่เติมลงในตัวอย่าง

4.2. การเตรียมตัวอย่างสำหรับ Method Validation

เตรียมน้ำนมจากตัวอย่างธรรมชาติ

4.3. วิธีการทดสอบ

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ได้ดัดแปลงวิธีการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปน้ำนมด้วยเทคนิค Petrifilm จากวิธีมาตรฐาน Official Method of Analysis of AOAC International. 2012.19th Method 986.33 ในส่วนของการเจือจาง(Dilution of sample) โดยปิเปตตัวอย่างน้ำนม 11 ml ใส่ใน diluents ที่ 1 ปริมาตร 99 ml ผสมตัวอย่างกับ diluent ด้วย Vortex mixer จากนั้นปิเปตตัวอย่างจาก diluent ที่ 1 ใส่ใน diluent ที่ 2 และจากที่ diluent 2 ไปยังที่ diluent 3 ใส่ diluent ต่อไปตามลำดับความเจือจางที่เหมาะสม ส่วนวิธี In-house ปิเปตตัวอย่างน้ำนม 1 ml ใส่ใน diluents ที่ 1 ปริมาตร 9 ml ผสมตัวอย่างกับ diluent ด้วย Vortex mixer จากนั้นปิเปตตัวอย่างจาก diluent ที่ 1 ใส่ใน diluent ที่ 2 และจาก diluent ที่ 2 ไปยัง diluent ที่ 3 ใส่ diluent ต่อไปตามลำดับความเจือจางที่เหมาะสม

4.4 การหาค่า Critical level (LC)

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ ทำตามข้อ 4 โดยเตรียมเชื้อให้มีระดับการปนเปื้อน 4 ระดับ ดังนี้

- ระดับที่ 1 3 cfu/ml ของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์
- ระดับที่ 2 10 cfu/ml ของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์
- ระดับที่ 3 30 cfu/ml ของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์
- ระดับที่ 4 100 cfu/ml ของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง (ในการทดสอบทำ 4 ระดับ ระดับละ 6 ซ้ำ) เตรียมตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (เช่น นมยูเอชที) โดยนำตัวอย่างใส่ขวดแก้วหรือหลอดแก้วปลอดเชื้อและเติมเชื้อที่เตรียมไว้ให้ได้สัดส่วน นม 9 ml : เชื้อ 1 ml เตรียมความเข้มข้นเชื้อตามต้องการ และนำตัวอย่างไปทดสอบตามวิธีของห้องปฏิบัติการ

4.5 สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

4.5.1 การหาค่า % Coefficient of variation (% CV)

4.5.2 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ Paired t- test

4.5.3 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis)

4.5.4 ค่า intercept y

4.5.6 Slope b

4.5.7 Residue standard deviation (STEYX)

4.5.8 กำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ coefficient of determination ($R^2 = RSQ$)

4.5.9 Residual plot

4.5.10 Line fit plot

5. ผลการทดลอง

5.1 การทดสอบหาค่า Critical level (LC) สำหรับการทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปด้วยเทคนิค Petrifilm เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง : *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
จากการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป ในตัวอย่างน้ำนม ให้ผลการทดสอบดังนี้

ระดับที่ 1 3 cfu/ml = 5/6 ครั้ง

ระดับที่ 2 10 cfu/ml = 6/6 ครั้ง

ระดับที่ 3 30 cfu/ml = 6/6 ครั้ง

ระดับที่ 4 100 cfu/ml = 6/6 ครั้ง

สรุปผลการทดสอบ จากการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปด้วยเทคนิค Petrifilm พบว่า การปนเปื้อนของเชื้อระดับที่ 1 สามารถตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป พบ 5 ครั้ง จากการทดสอบ 6 ครั้ง ที่ระดับที่ 2-4 ซึ่งมีการปนเปื้อน 10-100 cfu/ml สามารถตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป พบทั้ง 6 ครั้ง ของการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปด้วยเทคนิค Petrifilm ดังนั้น Critical level (LC) ของวิธี In-house method ที่ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงจาก Reference method : Official Method of Analysis of AOAC International. 2012.19th Method 986.33 เท่ากับ 3 cfu/ml

5.2 การคำนวณหา Coefficient of Variation การทดสอบด้วยวิธี Reference method (AOAC 2012) และ In-house method โดยทำการทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปด้วยเทคนิค Petrifilm ในตัวอย่างน้ำนมเป็นดังนี้

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปด้วยเทคนิค Petrifilm ในตัวอย่างน้ำนม

Sample	Reference (cfu/mL)	In-house (cfu/mL)	Log 10 Reference	Log 10 In-house	M_i	S_i
1	360,000	360,000	5.5563	5.5563	5.5563	0.0000
2	2,200,000	2,100,000	6.3424	6.3222	6.3323	0.0143
3	2,200,000	1,800,000	6.3424	6.2553	6.2988	0.0616
4	2,400,000	1,800,000	6.3802	6.2553	6.3177	0.0883
5	820,000	830,000	5.9138	5.9191	5.9164	0.0037
6	1,200,000	1,000,000	6.0792	6.0000	6.0396	0.0560
7	520,000	420,000	5.7160	5.6232	5.6696	0.0656
8	660,000	640,000	5.8195	5.8062	5.8129	0.0094
9	620,000	580,000	5.7924	5.7634	5.7779	0.0205
10	1,400,000	1,400,000	6.1461	6.1461	6.1461	0.0000
11	830,000	970,000	5.9191	5.9868	5.9529	0.0479
12	780,000	770,000	5.8921	5.8865	5.8893	0.0040
13	510,000	460,000	5.7076	5.6628	5.6852	0.0317
14	1,800,000	1,700,000	6.2553	6.2304	6.2429	0.0176
15	56,000	60,000	4.7482	4.7782	4.7632	0.0212
16	11,000	13,000	4.0414	4.1139	4.0777	0.0513
17	11,000	7,200	4.0414	3.8573	3.9494	0.1302
18	140,000	100,000	5.1461	5.0000	5.0731	0.1033
19	86,000	68,000	4.9345	4.8325	4.8835	0.0721
20	200,000	190,000	5.3010	5.2788	5.2899	0.0158
21	570	520	2.7559	2.7160	2.7359	0.0282
22	450	600	2.6532	2.7782	2.7157	0.0883
23	580	660	2.7634	2.8195	2.7915	0.0397
24	340	320	2.5315	2.5051	2.5183	0.0186
25	300	300	2.4771	2.4771	2.4771	0.0000

Sample	Reference (cfu/mL)	In-house (cfu/mL)	Log 10 Reference	Log 10 In-house	M _i	S _i
				MED(M _i)	5.6696	
					S _r	0.0282

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

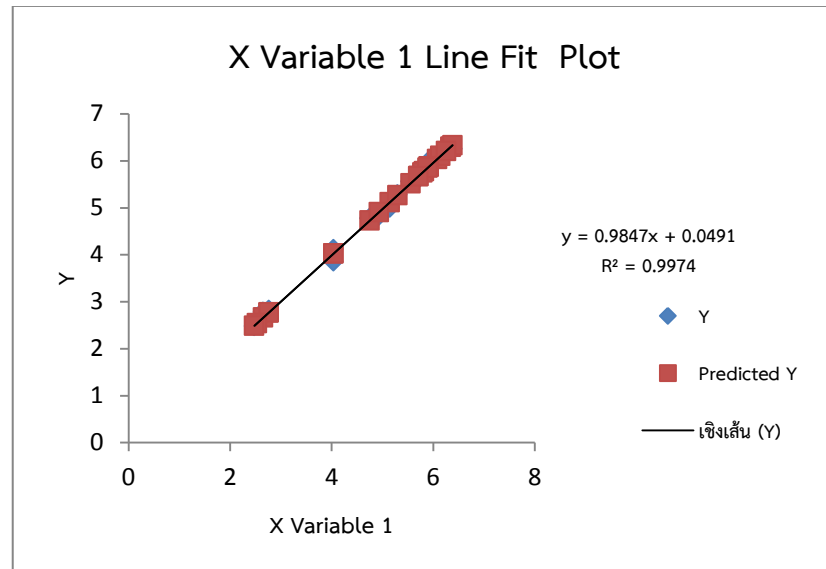
$$\text{แทนค่า} = \frac{0.0282 \times 100}{5.6696}$$

$$= 0.4973$$

จากผลการทดสอบพบว่าค่า Coefficient of Variation (CV %) จากการคำนวณเท่ากับ 0.4973 ผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งเกณฑ์กำหนดค่า Coefficient of Variation ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 เกณฑ์การยอมรับ Coefficient of Variation (% CV) $\leq 10\%$

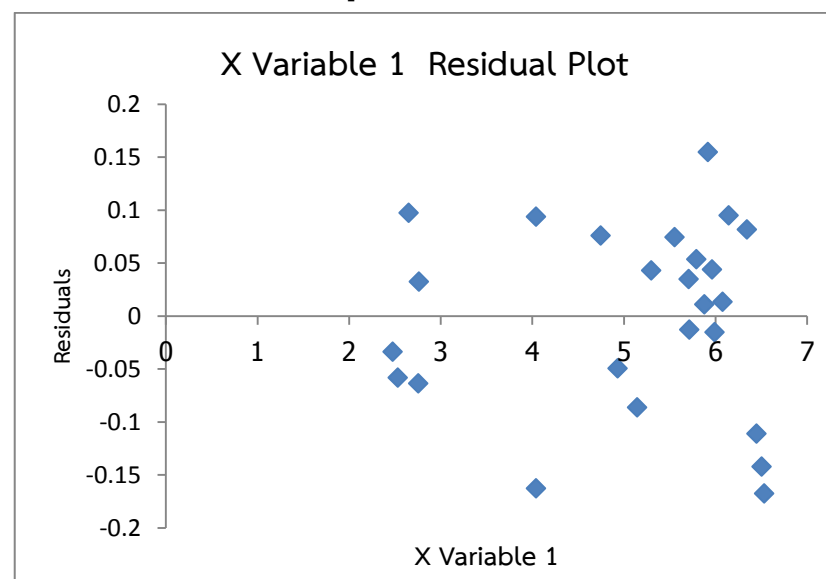
5.3 การประมวลผลทางสถิติ ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นถดถอยอย่างง่าย (Simple linear regression analysis) เปรียบเทียบความแตกต่างและความสัมพันธ์ระหว่างวิธี Reference method และ In-house method โดยเข้าสูตรการหา Regression การวิเคราะห์การทดสอบเชิงเส้นอย่างง่าย (Sample linear regression analysis) พบว่า ค่า Slope $b = 0.9847$ ค่า Intercept $y = 0.0490$ Residue standard deviation (STEYX) = 0.0694 กำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ Coefficient of determination ($R^2 = RSQ$) = 0.9974 Residual plot (กราฟแสดง linearity หรือ lack of fit) ค่าอยู่ในช่วง ± 0.2 แสดงว่า no lack of accuracy and linear , Line fit plots ได้กราฟเส้นตรง ซึ่งดูความสัมพันธ์จากสมการเส้นตรง พิจารณาจากค่า R square = 0.9974 ค่า Intercept $y = 0.0490$ และ Slope $b = 0.9847$ โดยเมื่อ a เข้าใกล้ 0 และ b เข้าใกล้ 1 กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวิธีนี้ใช้ทดสอบ accuracy เกณฑ์การยอมรับ

ภาพที่ 1 กราฟแสดง Line fit plot



จากตารางที่ 2,3 และภาพที่ 1 พบว่าค่า R square = 0.9974 , ค่า Intercept y = 0.0490 และ Slope b = 0.9847 โดยเมื่อ a เข้าใกล้ 0 และ b เข้าใกล้ 1 กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวิธีที่ใช้ทดสอบมี accuracy

ภาพที่ 2 กราฟแสดงการกระจายตัวของข้อมูล Residual plot



จากภาพที่ 2 พบว่า Residual plot (กราฟแสดง linearity หรือ lack-of fit) ค่าอยู่ในช่วง ± 0.2 แสดงว่า no lack of accuracy and linear

5.4 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ Paired t-test

การเปรียบเทียบค่า t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ degree of freedom = N -1 พบว่า t-stat (-1.9343) < t Critical two-tail (2.0686) แสดงว่า In-house method ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ Reference method เกณฑ์การยอมรับ การทดสอบทางสถิติโดยใช้ Paired t-test หาค่า t ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ degree of freedom = N-1 ถ้าค่า t จากตารางมากกว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณแสดงว่าผลการทดสอบทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Paired t-test

	Variable 1	Variable 2
Mean	4.958915	4.987495
Variance	1.873657	1.929114
Observations	24	24
Pearson Correlation	0.998729	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	23	
t Stat	-1.93439	
P(T<=t) one-tail	0.03273	
t Critical one-tail	1.713872	
P(T<=t) two-tail	0.06546	
t Critical two-tail	2.068658	

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบทั้งหมดพบว่าการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปด้วยเทคนิค Petrifilm ในตัวอย่างนั้นตาม Reference method และ In-house method เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วมีค่าทางสถิติไม่แตกต่างกัน ดังนั้นสรุปได้ว่า In-house method ที่ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงจาก Reference method : 1) AOAC Official Method 990.12, 2) AOAC Official Method 990.10, 3) J. AOAC Int.

73,242 (1990) สามารถนำมาใช้ทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในตัวอย่างนม ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมได้

7. ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ปริมาณเชื้อที่ต้องการไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนที่เพิ่มขึ้นให้รีบทำการทดสอบหลังการเตรียมเชื้อมาตรฐาน

8. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายไพโรจน์ อารังโสภา ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ เจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ช่วยดำเนินการในครั้งนี้นั้นจนแล้วเสร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

[1] Official Methods of Analysis of AOAC International.2016.20th Method 986.33.

[2] คู่มือการแปลผล 3M PetrifilmTM Aerobic Count Plate.

[3] ISO 16140:2016 – Protocol for the validation of alternative method – Part 2 Protocol for the validation of alternative (proprietary) method against a reference method