

เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อการเจนนับ Total Coliforms และ *Escherichia coli*
ในกึ่งกลาดำแช่แข็ง

นาง ศศิธร สุวรรณสนธิชัย



สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-921-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17848775

COMPARISON OF CONVENTIONAL METHOD AND RAPID METHODS FOR THE
ENUMERATION OF TOTAL COLIFORMS AND *Escherichia coli* IN FROZEN BLACK
TIGER SHRIMP

Mrs. Sasithorn Suwansonthichai

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-638-921-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์

เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อการเจนนับ Total Coliforms และ *Escherichia coli* ในกึ่งกลูตาต้าแซ็ง

โดย

นาง ศศิธร สุวรรณสนธิชัย

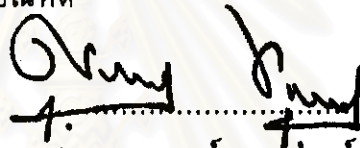
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

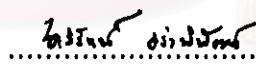
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

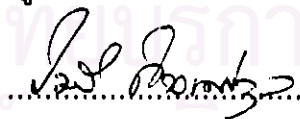
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

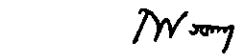

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุเทพ ธนियวัน ชูติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนियวัน)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)


.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)


.....กรรมการ
(นาง เพ็ญศรี รอดมา)

ศศิธร สุวรรณสนธิชัย : เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อการแจงนับ Total Coliforms และ Escherichia coli ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง (COMPARISON OF CONVENTIONAL METHOD AND RAPID METHODS FOR THE ENUMERATION OF TOTAL COLIFORMS AND Escherichia coli IN FROZEN BLACK TIGER SHRIMP) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ศิริวัฒน์ เรืองพิพัฒน์, 110 หน้า. ISBN 974-638-921-1.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็ว 3 วิธี ได้แก่ Fluorocult^R LMX Broth (LMX) PetrifilmTM E. coli Count Plates (PEC) และ Chromocult^R Coliform Agar (CCA) เพื่อการแจงนับ Total Coliforms และ Escherichia coli ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง และนำผลการวิจัยมาประเมินการใช้วิธีรวดเร็ว

การแจงนับ Total Coliforms และ E. coli ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งทั้งจากที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยธรรมชาติ 18 ตัวอย่างและจากที่ทำการปนเปื้อน Coliforms และ E. coli ใน 3 ระดับ (10^1 , 10^2 , 10^3 CFU/g) จำนวน 174 ตัวอย่าง พบว่าค่าการแจงนับ Total Coliforms ที่ระดับการปนเปื้อน < 10 CFU/g LMX=MPN > CCA=PEC และค่าการแจงนับ E. coli LMX=MPN=CCA=PEC ความไวในการแจงนับ Total Coliforms และ E. coli LMX=MPN > CCA=PEC ความจำเพาะในการแจงนับ Total Coliforms และ E. coli LMX=MPN=CCA=PEC การเกิดผลบวกเท็จจากการทดสอบยืนยัน Coliforms LMX > MPN=CCA=PEC การเกิดผลบวกเท็จจากการทดสอบยืนยัน E. coli MPN=LMX > PEC=CCA เวลาที่ใช้ MPN > LMX=PEC=CCA ค่าใช้จ่าย MPN > PEC > CCA=LMX แรงงานที่ใช้ MPN > LMX=CCA > PEC ความสะดวก PEC > CCA=LMX > MPN ความสอดคล้องของวิธีรวดเร็วทั้ง 3 วิธีคือ LMX PEC และ CCA เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานในการแจงนับ Total Coliforms เท่ากับ 94.2%, 79.2%, 83.2% ตามลำดับ ขณะที่ในการแจงนับ E. coli เท่ากับ 99.2%, 95.8%, 83.2% ตามลำดับ

วิธีรวดเร็ว Fluorocult^R LMX Broth (LMX) หรือ PetrifilmTM E. coli Count Plates (PEC) หรือ Chromocult^R Coliform Agar (CCA) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการทดแทนวิธีมาตรฐานในการแจงนับ Total Coliforms และ E. coli ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง อย่างไรก็ตามการจะเลือกใช้วิธีหนึ่งวิธีใดขึ้นอยู่กับเป้าหมายของการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการในการประเมินข้อดีข้อจำกัดและปัญหาซึ่งขึ้นกับสถานการณ์แวดล้อมของแต่ละห้องปฏิบัติการอันจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อผู้ผลิต..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....-.....

** C826579 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEY WORD: Total Coliforms/Escherichia coli/CONVENTIONAL METHOD/RAPID METHODS/BLACK TIGER SHRIMP

SASITHORN SUWANSONTHICHAJ: COMPARISON OF CONVENTIONAL METHOD AND RAPID METHODS FOR THE ENUMERATION OF TOTAL COLIFORMS AND Escherichia coli IN FROZEN BLACK TIGER SHRIMP. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D. 110 pp. ISBN 974-638-921-1

The purposes of this study are to compare the conventional to the rapid methods including the Fluorocult^R LMX Broth (LMX), PetrifilmTM E. coli Count Plates (PEC), and Chromocult^R Coliform Agar (CCA) for the enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli in frozen black tiger shrimp in order to evaluate the one of these methods.

The enumeration of Total Coliforms and E. coli from 18 samples of regular frozen black tiger shrimp and 174 samples of Coliforms plus E. coli contaminated at three different levels (10^1 , 10^2 , 10^3 CFU/g) revealed that at the level of <10 CFU/g the Total Coliforms enumeration from LMX=MPN> CCA=PEC and the E. coli LMX=MPN=CCA=PEC. The rapid tests showed the following parameters: sensitivity; LMX=MPN> CCA=PEC, specificity; LMX=MPN=CCA=PEC, false positives for Coliforms; LMX > MPN=CCA=PEC, false positives for E. coli; MPN=LMX > PEC=CCA, duration; MPN > LMX=PEC=CCA, expenses; MPN > PEC > CCA=LMX, labor; MPN > LMX=CCA > PEC, convenience; PEC > CCA=LMX > MPN. Agreement (%) to the conventional method; Total Coliforms; LMX (94.2%), PEC (79.2%), CCA (83.2%); E. coli; LMX (99.2%), PEC (95.8%), CCA (83.2%) were observed.

In conclusion, the rapid methods Fluorocult^R LMX Broth (LMX), PetrifilmTM E. coli Count Plates (PEC) and Chromocult^R Coliform Agar (CCA) are considered as alternatives to the conventional method for the enumeration of Total Coliforms and E. coli in frozen black tiger shrimp. Selecting the suitable method, for the most benefit, however depends on the test and the limitation of the laboratory involved.

ภาควิชา..... จลชีววิทยา.....

สาขาวิชา..... จลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ปีการศึกษา..... 2540.....

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้คำแนะนำ ในระหว่างการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุเทพ ธานีวัน อ. ดร. รมณี สงวนดีกุล และ คุณเพ็ญศรี รอดมา ผู้เชี่ยวชาญพิเศษ ๑ ด้านสุขลักษณะการผลิต ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการ ในการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรชิตวิรุฬ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการศึกษานี้

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่อุปกรณ์ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยทางจุลชีววิทยา กองอาหารส่งออก รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บริษัท เมอร์ค จำกัด และ บริษัท 3M จำกัด ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้ออาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณอรุรัตน์ วุฒิกรภักดิ์ และ คุณอัชฌา สัจจะपालะ ที่กรุณาช่วยคำปรึกษาในระหว่างการลาศึกษา อีกทั้งให้คำแนะนำในขณะศึกษาด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ๆ ที่ได้ให้กำลังใจ สนับสนุนตลอดมา และ ขอขอบคุณ คุณกิตติเดช สุวรรณสนธิชัย ที่สนับสนุน แนะนำ ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดจนคอยช่วยเหลือขณะทำวิทยานิพนธ์อย่างดียิ่งมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	3
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	25
4. ผลการทดลอง.....	51
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	68
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	76
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	96
ภาคผนวก ค.....	98
ภาคผนวก ง.....	107
ประวัติผู้เขียน.....	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สีน้าออกสำคัญ 10 อันดับแรกของไทย.....	6
2 ตลาดส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง 10 ประเทศแรกของไทย.....	7
3 เปรียบเทียบปริมาณการเจงนั้บ Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำ แช่แข็งที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนและตัวอย่างที่ได้รับการปนเปื้อน <i>E. coli</i> ATCC25922 ในระดับ 10^2 CFU/g.....	55
4 เปรียบเทียบปริมาณการเจงนั้บ Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำ แช่แข็งที่ได้รับการปนเปื้อน Coliforms และ <i>E. coli</i> ในระดับ $10^1, 10^2, 10^3$ CFU/g.....	56
5 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้องของวิธี LMX และวิธี MPN ในการ เจงนั้บ Total Coliforms ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ.....	57
6 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้องของวิธี PEC และวิธี MPN ในการ เจงนั้บ Total Coliforms ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ.....	58
7 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้องของวิธี CCA และวิธี MPN ในการ เจงนั้บ Total Coliforms ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ.....	59
8 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้องของวิธี LMX และวิธี MPN ในการ เจงนั้บ <i>E. coli</i> ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ.....	60
9 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้องของวิธี PEC และวิธี MPN ในการ เจงนั้บ <i>E. coli</i> ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ.....	61
10 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้องของวิธี CCA และวิธี MPN ในการ เจงนั้บ <i>E. coli</i> ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ.....	62
11 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะของวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการเจงนั้บ Total Coliforms ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง.....	63
12 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะของวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการเจงนั้บ <i>E. coli</i> ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง.....	64
13 เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน Coliforms ที่ให้ผลการทดสอบบวกจากวิธีมาตรฐาน และวิธีรวดเร็ว.....	65
14 เปรียบเทียบการตรวจสอบยืนยัน <i>E. coli</i> ที่ให้ผลการทดสอบบวกจากวิธีมาตรฐานและ วิธีรวดเร็ว.....	65

สารบัญญัตินำ (ต่อ)

15	เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการเจนนับ Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ในกึ่งกลาดำ แช่แข็ง.....	66
16	เปรียบเทียบคุณสมบัติของวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วในการเจนนับ Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ในกึ่งกลาดำแช่แข็ง.....	67
17	เปรียบเทียบคุณสมบัติ ข้อดี ข้อจำกัด ข้อเสนอแนะ ของวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็ว ในการเจนนับ Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ในกึ่งกลาดำแช่แข็ง.....	77



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แผนภาพแสดงการย่อยสลาย X-Gal ของ Coliforms โดย β -D- Galactosidase.....	21
2 แผนภาพแสดงการย่อยสลาย MUG ของ <i>E. coli</i> โดย β -D- Glucuronidase.....	22
3 แผนภาพแสดงการย่อยสลายของซบสเตรทที่ก่อให้เกิดสารมีสี.....	23
4 แผนภูมิการเตรียมจุลินทรีย์เพื่อปนเปื้อนในกึ่งกลาดำแช่แข็ง.....	28
5 แผนภูมิการเก็บและการเตรียมกึ่งกลาดำแช่แข็ง.....	30
6 การสุ่มตัวอย่างกึ่งกลาดำแช่แข็ง.....	31
7 แผนภูมิการเจือจาง Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ด้วยวิธีมาตรฐาน.....	35
8 แผนภูมิการเจือจาง Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ด้วยวิธีรวดเร็ว.....	37
9 การเรืองแสงของ <i>E. coli</i> ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร..	38
10 ผลบวกของการทดสอบอินโดลของ <i>E. coli</i> ใน Fluorocult ^R LMX Broth.....	39
11 ขั้นตอนการเจือจาง Total Coliforms และ <i>E. coli</i> ด้วย Petrifilm TM <i>E. coli</i> Count Plates.....	42
12 ลักษณะโคโลนีของ Coliforms และ <i>E. coli</i> บน Chromocult ^R Coliform Agar.....	48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

MPN = Most Probable Number

LMX = Fluorocult[®] LMX Broth

PEC = Petrifilm[™] *E. coli* Count Plates

CCA = Chromocult[®] Coliform Agar

CFU/g = Colony Forming Unit / gram

°C = องศาเซลเซียส



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย