บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

1. อุตสาหกรรมกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเป็นการเพาะเลี้ยงที่ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงเทคนิคในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ พ.ศ. 2517 เมื่อกรมประมง โดยสถานีประมงทะเลจังหวัดภูเก็ตสามารถเพาะพันธุ์กุลาดำได้สำเร็จเป็นแห่งแรกในประเทศ (มารุต มัสยวานิช, 2537)

การพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะแรกเป็นไปอย่างยากลำบาก และค่อนข้างล่าช้า เนื่องจากคนไทยไม่นิยมบริโภคกุ้งกุลาดำ และยังไม่เป็นที่รู้จักของตลาดต่างประเทศทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งในช่วงแรกไม่ขยายตัว จนกระทั่ง พ.ศ. 2530 ซึ่งเป็นยุคทองของการเลี้ยงกุ้งจึงได้มีการลงทุนดำเนินการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากความต้องการจากตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งญี่ปุ่นมีความต้องการกุ้งกุลาดำมาก ทำให้ได้ราคาดี คุ้มค่าแก่การลงทุน

2. การแปรรูปเพื่อการส่งออก

เนื่องจากประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง จึงทำให้ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกกุ้งกุลาดำรายใหญ่ของโลก ในปี พ.ศ. 2539 ปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำคิดเป็นมูลค่า 43,404.5 ล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2540) (ตารางที่ 1) โดยมีรูปแบบการผลิตดังนี้

2.1 ประเภทกุ้งสดแช่แข็งเพื่อการส่งออก

กุ้งแช่แข็งที่ส่งไปจำหน่ายยัง ต่างประเทศมีรูปแบบการส่งออก 2 แบบ

1. Block Frozen เป็นการแช่แข็งรวมกันหลายชั้นในกล่องเดียวกันเป็นก้อน
2. Individual Quick Frozen (IQF) เป็นการแช่แข็งแบบเป็นตัวๆ

2.2 รูปแบบการแปรรูป

รูปแบบการแปรรูปสำหรับกุ้งแช่แข็งในปัจจุบัน แบ่งเป็นลักษณะดังนี้

1. Whole or Head on Shell on (H/O S/O)
   หมายถึง กุ้งทั้งตัวไม่เด็ดหัว ไม่แกะเปลือก
2. Headless Shell on (H/L S/O)
   หมายถึง กุ้งเด็ดหัว ไม่แกะเปลือก
3. Peeled and Deveined (P/D)
   หมายถึง กุ้งเด็ดหัว แกะเปลือก ไม่ไว้หาง ผ่าหลังเอาไส้ออก
4. Peeled Undeveined (PUD)
   หมายถึง กุ้งเด็ดหัว แกะเปลือก ไม่ไว้หาง ไม่ผ่าหลัง
5. Peeled and Deveined Tail on (P/D Tail on)
   หมายถึง กุ้งเด็ดหัว แกะเปลือก ไว้หาง ผ่าหลังเอาไส้ออก
6. Peeled and Undeveined Tail on (PUD Tail on)
   หมายถึง กุ้งเด็ดหัว แกะเปลือก ไว้หาง
7. Pieces or Broken
   หมายถึง เนื้อกุ้งเป็นชิ้นๆ
8. Peeled Cooked Shrimp (Sushi)
   หมายถึง กุ้งเด็ดหัว แกะเปลือก ไว้หาง ต้มสุก
9. Breaded Shrimp
   หมายถึง กุ้งชุบแป้งขนมปัง
10. Fritter Shrimp
    หมายถึง กุ้งชุบแป้งทอด
11. Skewer Shrimp
    หมายถึง กุ้งเสียบไม้
12. Boiled Shrimp (Cooked)
    หมายถึง กุ้งต้ม
13. Stretched Shrimp (Nobashi)
    หมายถึง กุ้งยืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สถานการณ์ทางการตลาด (มารุต มัสยวานิช, 2537)

สถานการณ์ทางการตลาดของกุ้งกุลาดำในอดีตการส่งออกต้องพึ่งพาอาศัยกุ้งทะเลเป็นส่วนใหญ่ และตลาดหลักเป็นญี่ปุ่น โดยเทคนิคการผลิตส่วนใหญ่ได้รับการถ่ายทอดจากผู้ซื้อ ต่อมาประเทศไทยเริ่มมีปัญหาความเสื่อมโทรมของทรัพยากรในอ่าวไทย จึงเริ่มหันมาให้ความสำคัญกับการเพาะเลี้ยงมากขึ้น จากนั้นการตลาดของกุ้งกุลาดำก็เริ่มมีบทบาทมากขึ้น จากการที่ประเทศไทยประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง ขณะเดียวกันก็เริ่มมีการปรับยุทธวิธีทางด้านการตลาด โดยมีการเผยแพร่ความสำเร็จในเรื่องการเพาะเลี้ยงและการส่งออก ส่งผลให้การตลาดเริ่มมีการขยายตัว และมีตลาดหลักรองรับมากขึ้น ได้แก่ (ตารางที่ 2)

1.ญี่ปุ่น เป็นตลาดหลักที่มีอำนาจซื้ออย่างสม่ำเสมอและมีแนวโน้มขยายตัวสูงขึ้นทุกปี เป็นตลาดใหญ่ที่มีการบริโภคมากที่สุดในโลก จากสาเหตุที่ต้นทุนการผลิตของญี่ปุ่นที่สูงขึ้น ขาดแคลนแรงงาน ขณะที่พฤติกรรมผู้บริโภคก็แปรเปลี่ยนไป มีการหันมานิยมสินค้าที่บริโภคได้สะดวก ญี่ปุ่นจึงหันมาใช้ประเทศไทยเป็นฐานในการผลิตเพิ่มมากขึ้น

2. สหรัฐอเมริกา ตลาดสหรัฐอเมริกามีการขยายตัวอย่างรวดเร็วและคาดว่าจะยังคงขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากประเทศจีน ซึ่งเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ ประสบปัญหาการเสียหายจากการเพาะเลี้ยง ทำให้สหรัฐอเมริกาต้องหันมานำเข้าจากไทยทดแทน

3. สหภาพยุโรป ยังคงเป็นตลาดเล็กสำหรับกุ้งแช่แข็ง เนื่องจากพฤติกรรมของผู้บริโภค ยังมีความเคยชินกับกุ้งน้ำเย็นสีแดงตัวเล็ก (*Pandalas spp.*) อีกประการหนึ่ง เนื่องจากราคาขายยังไม่จูงใจเท่ากับตลาดหลัก เช่น ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา ขณะเดียวกันถึงแม้สหภาพยุโรปจะมีการรวมตัว และประกาศใช้ระเบียบกฎเกณฑ์การนำเข้าเดียวกัน แต่ข้อปลีกย่อยซึ่งแต่ละประเทศยังคงสงวนสิทธิที่จะใช้ควบคู่ไปด้วย เป็นเหตุให้เกิดปัญหากับผู้ส่งออก

4. ตลาดในเอเชีย

4.1 สาธารณประชาชนจีน

เดิมจีนเป็นผู้ส่งออกกุ้งขาว (white shrimp) รายใหญ่ที่ส่งเข้าสหรัฐอเมริกา ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 จีนประสบกับปัญหาการเกิดโรคระบาดในการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ผลผลิตของจีนลดลง ประกอบกับจีนเริ่มเปิดประเทศมากขึ้น และเศรษฐกิจเริ่มดีขึ้น ประชากรมีอำนาจซื้อเพิ่มมากขึ้น จึงมีการนำเข้ากุ้งจากประเทศไทย

ตารางที่ 1 สินค้าออกสำคัญ 10 อันดับแรกของไทย

มูลค่า
หน่วย : ล้านบาท

รายการ	2535	2536	2537	2538	2539
1. เครื่องคอมพิวเตอร์ อุปกรณ์และส่วนประกอบ	57,728.1	65,271.0	94,590.2	131,241.9	167,673.9
2. เสื้อผ้าสำเร็จรูป	86,773.9	89,594.1	100,679.3	102,019.3	79,875.4
3. ยางพารา	28,924.7	29,183.1	41,824.0	61,260.7	63,373.0
4. แผงวงจรไฟฟ้า	28,622.3	35,550.0	45,310.8	58,181.8	58,538.6
5. อัญมณีและเครื่องประดับ	39,266.4	43,495.0	47,088.7	52,498.6	54,272.9
6. ข้าว	36,213.8	32,958.6	39,187.3	48,626.8	50,734.8
7. กุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง	31,708.6	37,843.5	49,155.6	50,302.0	43,404.5
8. เครื่องรับวิทยุโทรทัศน์และส่วนประกอบ	20,352.0	22,205.7	28,031.9	31,589.2	34,626.8
9. อาหารทะเลกระป๋อง	24,424.6	25,659.8	31,995.8	33,294.8	34,244.3
10. รองเท้าและชิ้นส่วน	25,642.3	27,941.9	39,261.0	53,778.1	33,544.1

ที่มา : ศูนย์สถิติการพาณิชย์ กรมศุลกากร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ตลาดส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง 10 ประเทศแรกของไทย

มูลค่า
หน่วย : ล้านบาท

รายการ	2535	2536	2537	2538	2539
1. ญี่ปุ่น	14,538.9	16,388.5	18,207.4	16,594.6	12,514.0
2. สหรัฐอเมริกา	9,006.5	11,840.6	15,813.2	13,540.9	12,092.6
3. จีน	.2	55.4	827.2	1,810.2	3,557.2
4. สิงคโปร์	1,382.8	1,652.9	2,234.5	2,912.3	3,129.5
5. ไต้หวัน	301.7	1,412.8	2,086.0	2,266.0	1,957.5
6. ฮ่องกง	828.9	886.7	2,015.5	2,391.8	1,930.6
7. ฝรั่งเศส	864.6	939.8	1,322.4	1,620.0	1,542.5
8. ออสเตรเลีย	509.7	625.8	1,302.3	1,277.9	1,193.9
9. แคนาดา	918.7	1,184.1	1,530.9	1,089.4	1,080.2
10. เกาหลีใต้	1.4	29.8	304.1	573.6	1,037.9

ที่มา : ศูนย์สถิติการพาณิชย์ กรมศุลกากร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 เกาหลี นับเป็นตลาดใหม่ ซึ่งเพิ่งเปิดให้มีการนำเข้าต้นปี พ.ศ. 2537

4.3 ไต้หวัน เดิมไต้หวันเป็นผู้นำในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แต่เนื่องจากการเกิดปัญหาเรื่องโรคระบาดและพื้นที่เพาะเลี้ยงที่มีจำนวนจำกัด จึงต้องหันมานำเข้าจากไทยทดแทน

4. แนวโน้มในอนาคต

การตลาดของกุ้งแช่แข็งในประเทศไทยเองก็มีแนวโน้มที่แจ่มใส นอกจากนี้โอกาสที่จะขยายไปในตลาดเดิมๆ และตลาดใหม่ น่าจะยังมีโอกาส รวมทั้งตลาดยุโรปตะวันออกน่าจะมีลู่ทางแจ่มใสอีกตลาดหนึ่ง

แม้ว่าประเทศไทยจะเริ่มทำการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและประสบผลสำเร็จ ผลผลิตจากกุ้งกุลาดำสามารถทำรายได้ให้กับประเทศ โดยเป็นสินค้าที่มีมูลค่าการส่งออกในอันดับ 7 จาก 10 อันดับแรก (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2540) (ตารางที่ 1) ขณะเดียวกัน ก็มีคู่แข่งขัน ซึ่งมีศักยภาพด้านการเพาะเลี้ยงเหมือนกับไทย เช่น เม็กซิโก เวียดนาม อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น นอกจากนั้นแต่ละประเทศผู้นำเข้าได้มีระเบียบ กฎเกณฑ์ เพื่อที่จะรักษาและปกป้องอุตสาหกรรมภายในประเทศรวมถึงคุ้มครองผู้บริโภคไม่ให้ถูกละเมิดโดยผู้ผลิตสินค้า ดังนั้นการส่งออกกุ้งกุลาดำไปจำหน่ายยังต่างประเทศ สิ่งสำคัญที่ผู้ส่งออกต้องคำนึงถึงคือ คุณภาพของสินค้า ความสด สะอาด ปราศจากสารพิษ และการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ รวมทั้งสามารถจัดส่งลูกค้าได้ทันต่อความต้องการ

หลักเกณฑ์การกำหนดและข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาของอาหาร (อัจฉรา พุ่มฉัตร, 2535)

เกณฑ์กำหนดคุณภาพอาหารเป็นแนวทางที่ใช้ในการประเมินคุณภาพมาตรฐานและความปลอดภัยของอาหารมีหลายรูปแบบ ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการนำมาใช้ เกณฑ์กำหนดคุณภาพอาหารที่มีการใช้มากได้แก่ เกณฑ์กำหนดคุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา เกณฑ์กำหนดคุณภาพในการผลิต เกณฑ์กำหนดคุณภาพอาหารทางเคมี และเกณฑ์กำหนดคุณภาพอาหารทางกายภาพ

การกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารมีวัตถุประสงค์หลัก 3 ประการ

1. เพื่อป้องกันอันตรายต่อสุขภาพอนามัยผู้บริโภค
2. เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ของผู้ผลิตสินค้าอาหาร
3. เพื่อใช้เป็นเกณฑ์วัดคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารในการค้า ซึ่งจะก่อให้เกิดความเป็นธรรมระหว่างผู้ซื้อ และผู้ขาย

ค่ากำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารมี4ลักษณะ ดังนี้ (อัจฉรา พุ่มฉัตร, 2535)

Microbiological standard เป็นข้อกำหนดซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกฎหมาย โดยระบุปริมาณสูงสุดของจุลินทรีย์รวม หรือจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ที่ตรวจสอบได้โดยวิธีตามที่กำหนด ข้อกำหนดนี้ใช้เป็นกฎระเบียบสำหรับหน่วยงานที่มีอำนาจหน้าที่รับผิดชอบตามกฎหมายในการควบคุมการผลิตอาหาร บรรจุ เก็บรักษา ขนส่ง จำหน่ายหรือนำเข้าสินค้า

Microbiological criterion เป็นค่ากำหนดทางจุลชีววิทยา ซึ่งกำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากผลิตภัณฑ์นั้นๆ ที่ผลิตอย่างถูกต้องตามสุขลักษณะการผลิตอาหาร ซึ่งข้อมูลนั้นหาได้จากวิธีวิเคราะห์ตามที่กำหนด ค่านี้มักใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินคุณภาพของผลิตภัณฑ์

Microbiological limit เป็นค่ากำหนดทางจุลชีววิทยา ซึ่งกำหนดขึ้นโดยองค์กรใดๆ เพื่อใช้ในขอบเขตของตน โดยไม่มีผลบังคับทางกฎหมาย

Microbiological specification เป็นค่าปริมาณสูงสุดของจุลินทรีย์รวม หรือ จุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งตรวจสอบได้โดยวิธีตามที่กำหนด มักใช้เป็นเกณฑ์ในการรับซื้ออาหารที่องค์กรใดองค์กรหนึ่ง

การกำหนดคุณภาพมาตรฐานอาหารมีหลายระดับเช่น มาตรฐานของโรงงานผู้ผลิตอาหาร มาตรฐานของผู้รับซื้อผลิตภัณฑ์ อาหารมาตรฐานที่กำหนดโดยคณะกรรมาธิการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) และมาตรฐานตามกฎหมายซึ่งรัฐบาลของแต่ละประเทศใช้เป็นแนวทางการควบคุมอาหารเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค

มาตรฐานอาหารซึ่งรัฐบาลของแต่ละประเทศใช้เป็นข้อบังคับตามกฎหมายนั้น มีเป้าหมายเดียวกันแต่อาจแตกต่างกันในส่วนของผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีการผลิต การบริโภค และความพร้อมในการตรวจสอบควบคุมดูแล

สิ่งที่ต้องคำนึงในการกำหนดข้อกำหนดหรือมาตรฐานทางจุลชีววิทยาในลักษณะที่มีผลบังคับตามกฎหมายนั้น ได้แก่

1.ไม่ควรกำหนดมาตรฐานเดียวให้ครอบคลุมอาหารหลายชนิดและหลายกรรมวิธีผลิต ทั้งนี้เพราะอาหารแต่ละชนิดจะประกอบด้วยวัตถุดิบที่แตกต่างกัน สภาพทางจุลชีววิทยาจึงแตกต่างกัน นอกจากนี้กรรมวิธีการผลิตก็มีผลต่อจุลินทรีย์ในลักษณะที่แตกต่างกัน จึงไม่สามารถควบคุมค่ากำหนดทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารที่ต่างชนิดและต่างกรรมวิธีการผลิตให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันได้

2. ต้องมีข้อมูลที่ใช้พิจารณาบนพื้นฐานของการศึกษาจากสภาพความเป็นจริง โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อ

2.1 ประกอบการตัดสินใจเกี่ยวกับสภาพการผลิตว่าถูกต้องตามสุขลักษณะที่ดี

2.2 ลดอันตรายที่ผู้บริโภคจะได้รับจากอาหาร

2.3 ใช้วัด หรือประมาณอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารนั้นๆ

3. ค่าที่กำหนดต้องมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติในเชิงอุตสาหกรรมและการค้า

4. ข้อกำหนดต้องสอดคล้องกับกรรมวิธีการผลิต การบรรจุ เก็บรักษา ขนส่ง และจัดจำหน่าย

5. ข้อกำหนดต้องไม่ก่อให้เกิดปัญหาในทางปฏิบัติเกี่ยวกับการตรวจสอบวัดผล เช่นค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบไม่สูงเกินไป สามารถตรวจสอบได้ในเวลาอันรวดเร็ว

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร (Christian, 1989)

การที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในอาหารทั่วไปนั้นไม่ได้เป็นสิ่งที่แสดงว่า อาหารนั้นต้องเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคหรือด้อยคุณภาพเสมอไป แต่เป็นธรรมชาติของอาหาร เนื่องจากจุลินทรีย์มีอยู่ในสภาวะแวดล้อม เว้นแต่กรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกรรมวิธีการปลอดจุลินทรีย์แล้ว

อาหารที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคมักเป็นอาหารที่ผลิตขึ้นโดยไม่ถูกสุขลักษณะการผลิต อันเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคทางเดินอาหารและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ

ได้แก่ ยีสต์ รา แบคทีเรีย แต่ละกลุ่มมีอยู่มากมายหลายชนิด ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ กัน ได้แก่ ในอากาศ น้ำ พื้นดิน อาหาร คน สัตว์ เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้ในปริมาณความเข้มข้นหนึ่ง จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ แต่ถ้าปริมาณของจุลินทรีย์มากจนเกินขีดจำกัดและปนเปื้อนในอาหาร ก็อาจก่อให้เกิดโทษหรือเกิดโรคในคนและสัตว์ได้

จุลินทรีย์ที่พบในอาหาร (Foodborne microorganisms) แบ่งออกได้ตามความสำคัญของอาหารและผู้บริโภคดังนี้ (Christian, 1989)

1. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์และเป็นที่ต้องการในการผลิตอาหาร (Desirable microorganisms) ได้แก่จุลินทรีย์ซึ่งมีโอกาสปะปนอยู่ในอาหารโดยธรรมชาติหรือตั้งใจใส่ลงไป และจุลินทรีย์นั้นสามารถใช้สารอาหารต่างๆได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดปฏิกิริยาเคมีและชีวเคมีของสารอาหาร ได้ผลิตผลพวก แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ ก๊าซ กรดอะมิโน เป็นต้น ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภทขึ้น และผลผลิตเหล่านี้ยังสามารถลดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการในอาหารนั้นได้อีกด้วยเช่น การผลิตไส้กรอก เหล้า เบียร์ ไวน์ นมเปรี้ยว เนย ขนมปัง แหนม น้ำส้มสายชู ผงชูรส เป็นต้น ตัวอย่างจุลินทรีย์ประเภทนี้ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มแลคติค เช่น *Streptococcus lactis, Lactobacillus bulgaricus* แบคทีเรียในกลุ่มอะซิติค เช่น *Acetobacter aceti* ยีสต์ *Saccharomyces cereviceae* และเชื้อรา *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย (Spoilage microorganisms) ได้แก่จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร และใช้สารอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนมากขึ้น และให้ผลผลิตเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ประเภทแรก แต่ทำให้สภาพของอาหาร เช่น กลิ่น รส สี เปลี่ยนแปลงเป็นที่ไม่พอใจแก่ผู้บริโภค ที่เราเรียกว่า อาหารเน่าเสีย จุลินทรีย์พวกนี้แม้จะบ่งชี้ว่าไม่ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ (Non-pathogenic microorganisms หรือ non- pathogens) แต่ถ้าบริโภคในปริมาณมากเข้าไปก็อาจทำให้เกิดความผิดปกติในระบบย่อยอาหารได้ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc spp.* ในน้ำตาล, *Saccharomyces spp.* ในน้ำผลไม้ เป็นต้น

3. จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (Pathogenic microorganisms หรือ pathogens) สามารถแบ่งลักษณะการเกิดปัญหาจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ 2 ลักษณะ คือ

3.1 สาเหตุจากตัวจุลินทรีย์เอง (Infection, invasiveness) เกิดจากการบริโภค

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Salmonella, Shigella* เมื่อบริโภคเข้าไปจุลินทรีย์เหล่านี้จะแทรกตัวเข้าไปในผนังลำไส้ (intestinal mucosa) แล้วจะแบ่งตัวเจริญ ณ บริเวณนั้นและมีปฏิกิริยาเกิดเป็นอาการต่างๆ อีกลักษณะหนึ่งของการเกิด infection คือ บริโภคจุลินทรีย์ เช่น *Clostridium perfringens, Vibrio cholerae* เมื่อเข้าสู่ลำไส้จะเจริญและสร้างสารพิษ enterotoxins ทำให้เกิดเป็นพิษต่อร่างกาย

3.2 สาเหตุจากสารพิษที่จุลินทรีย์ผลิดออกมา (Intoxication) เกิดจากการบริโภคสารพิษ (toxin) ที่จุลินทรีย์สร้างไว้ในอาหาร เช่น botulinum toxin, mycotoxin เป็นต้น หรือสารพิษที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติซึ่งพบในพืชและสัตว์บางชนิด เช่น สารพิษในเห็ดบางชนิด, สารพิษจากหอยและปลาทะเลบางชนิด เป็นต้น

4. จุลินทรีย์ที่เป็นดรรชนีทางสุขาภิบาลทางอาหาร (Indicator microorganisms) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสิ่งบ่งชี้คุณภาพความปลอดภัยของอาหาร กล่าวคือการที่อาหารมีจุลินทรีย์กลุ่มนี้ปนเปื้อนแสดงถึง อาหารนั้นผ่านสภาวะที่อาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดโรคต่อผู้บริโภคได้ หรือมีการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค หรือทำให้อาหารเน่าเสีย หมดอายุการใช้บริโภค (Christian, 1989) จุลินทรีย์ที่เป็นดรรชนีทางสุขาภิบาลทางอาหาร มีหลายประเภท เช่น

4.1 Aerobic mesophilic plate count หรือ Total plate count (TPC) แสดงปริมาณของ spoilage organisms ถ้า TPC มีปริมาณสูงก็จะมีผลต่ออายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารด้วย อย่างไรก็ดีการใช้ TPCเป็นตัวกำหนดคุณภาพความปลอดภัยของอาหารมีข้อจำกัดคือ

4.1.1 การพบในปริมาณสูงในอาหารประเภทหมักดอง ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดที่ต้องการหรือไม่

4.1.2 ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านความร้อนแล้ว หรือทำแห้ง หรือผ่านกรรมวิธีแช่แข็งอาจจะพบในปริมาณน้อย ซึ่งไม่ได้แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ดี

4.1.3 สำหรับอาหารแช่เย็น แช่แข็ง อาจเป็นตัวชี้วัดไม่เหมาะสมนักสำหรับด้านคุณภาพอาหาร เนื่องจาก mesophiles จะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C

4.2 Enterococci อาหารที่มีการปนเปื้อน Enterococci มาก แสดงว่ามีการผลิดไม่ถูกสุขลักษณะ หรืออยู่ในสภาวะที่ทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ยังอาจใช้แสดงสุขลักษณะของโรงงานผลิตได้ด้วย เนื่องจาก Enterococci สามารถทนต่อการขาดน้ำ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ดี ทนต่อน้ำยาซักล้าง น้ำยาฆ่าเชื้อได้ค่อนข้างสูง และสามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ดี จึงมักใช้เป็นตัวแสดงสุขลักษณะของโรงงานผลิดอาหารแช่แข็ง ได้แก่ *Streptococcus faecalis* , *Streptococcus faecium* เป็นต้น

4.3 Staphylococci การพบ Coagulase positive staphylococci แสดงว่ามีการปนเปื้อนจาก มือ แผล จมูกของผู้สัมผัสอาหารนั้น หากพบว่าปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวสูงในผลิตภัณฑ์ ผู้ควบคุมคุณภาพการผลิตจะต้องตรวจสอบสุขลักษณะการปฏิบัติงานของผู้สัมผัสอาหารในทุกขั้นตอน เพื่อหาสาเหตุและปรับปรุงแก้ไข อย่างไรก็ตีแบคทีเรียชนิดนี้อาจปนเปื้อนมาจากภาชนะที่ไม่สะอาด จึงควรตรวจสอบภาชนะที่สัมผัสอาหารด้วย

4.4 *Salmonella* การพบ *Salmonella* ในอาหาร แสดงว่ามีการปนเปื้อนจากคนและสัตว์

4.5 Yeast และ moulds การพบ yeast และ moulds ในอาหาร และการเก็บรักษาอาหารนั้นไม่ถูกต้อง จะทำให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นทำให้อาหารเน่าเสียเนื่องจากYeastได้และเสี่ยงต่อการเกิดสารพิษจากเชื้อรา

4.6 Enterobacteriaceae หรือ Coliforms การพบ Coliforms ในปริมาณสูงแสดงว่า

4.6.1 การให้ความร้อนอาจไม่เพียงพอ หรือมีการปนเปื้อนจากวัตถุดิบ อุปกรณ์ภาชนะที่สกปรก หรือจากผู้สัมผัสอาหารภายหลังการให้ความร้อน

4.6.2 มีการเจริญของจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากซึ่งอาจรวมทั้งชนิดที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคในแบบ infection และ intoxication ด้วย

4.7 *Escherichia coli* การพบ *E. coli* ในอาหารแสดงว่า อาหารนั้นอาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระ ทำให้อาหารนั้นมีโอกาสที่จะมีเชื้อโรคทางเดินอาหารปะปนอยู่ด้วย

Coliforms และ *Escherichia coli*

Coliforms

เป็นแบคทีเรียอยู่ในสกุล *Enterobacteriaceae* มีเซลล์ขนาดเล็ก รูปร่างเป็นแท่งตรง ติดสีแกรมลบพบทั้ง aerobic และ facultative anaerobe เจริญได้ง่ายพบในลำไส้สัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสให้กรดและแก๊ส ที่ 35-37 °C ภายใน 48 ชั่วโมง (APHA , 1984) แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ส่วนใหญ่ได้แก่ แบคทีเรียในยีนัส *Escherichia coli* ซึ่งมีแหล่งอาศัยปกติในท่อทางเดินอาหารของคนและสัตว์ และ แบคทีเรียในยีนัส *Enterobacter* , *Klebsiella* ซึ่งมีแหล่งอาศัยปกติในดินและอาจปนเปื้อนมากับพืชผักต่างๆ

***Escherichia coli* (*E. coli*)**

E. coli พบครั้งแรกโดย นายแพทย์ชาวเยอรมัน Dr. Theodor Escherich ในปี ค.ศ. 1885 เดิมรู้จักกันในชื่อ *Bacterium coli commune* (Escherich, 1885) , *Bacillus coli* (Migura, 1895) , *Bacterium coli* (Lehmann and Neumann, 1896) (Bergey's ,1974)

E. coli เป็นแบคทีเรียในสกุล *Enterobacteriaceae* และจัดอยู่ในกลุ่ม enteric bacteria เช่นเดียวกับ *Salmonella* *E. coli* โดยทั่วไปเป็น normal flora ที่พบอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ จึงทำให้ตรวจพบได้เป็นปริมาณมากในอุจจาระ จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบความสะอาดของน้ำได้ ปริมาณของ *E. coli* ในลำไส้มีประโยชน์ในการควบคุมประชากรของแบคทีเรียในลำไส้ได้ อย่างไรก็ตามนอกจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็น normal flora แล้ว ยังมีสายพันธุ์ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดท้องร่วง และบางสายพันธุ์ยังก่อให้เกิดผลร้ายต่อระบบไตได้

การจำแนกสายพันธุ์ของ *E. coli* อาศัยแอนติเจน O , K และ H ซึ่งเป็นการจัดแบ่งแบบ serotypes โดยอาศัยแอนติเจนเหล่านี้ในการแยกสายพันธุ์ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคได้ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแง่ความรุนแรงและอาการของโรค การแพร่ระบาดของแบคทีเรีย และความแตกต่างของแอนติเจน O และ H *E. coli* ทั้ง 4 กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคมีดังนี้

1. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็น *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในเด็กแรกเกิด เด็กขาดอาหาร และโรคในผู้ใหญ่เรียกว่า Traveller's diarrhea หรือ "turista" ซึ่งเกิดกับนักท่องเที่ยวขณะที่สายพันธุ์นี้ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนท้องถิ่น เนื่องจากมีภูมิต้านทาน (Rowe, et al. 1979) ETEC สร้าง enterotoxin 2 ชนิด คือ heat labile (LT) และ heat stable (ST) ETEC บางสายพันธุ์สร้าง toxin ชนิดใดชนิดหนึ่ง บางสายพันธุ์สร้าง toxin ทั้ง 2 ชนิด toxin ที่พบได้มากคือ LTh, STIa และ STIb (Doyle and Padhye, 1989)

2. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นแบคทีเรียที่คล้าย *Shigella* ตรงที่บุกรุกและเพิ่มจำนวนใน epithelial cell ของลำไส้ใหญ่ ทำให้เซลล์ตาย และยังบุกรุกเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้เนื้อเยื่อในบริเวณนั้นตายด้วย (Dupont , et al. 1971) นอกจากนี้ EIEC ยังมีแอนติเจน O คล้าย *Shigella* ด้วย EIEC มักเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ผู้ได้รับแบคทีเรียชนิดนี้จะมีอาการท้องร่วงมีเลือดและเมือกปะปน และมีอาการปวดท้องมาก

3. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง (Watery diarrhea) ในเด็กแรกเกิด แบคทีเรียนี้จะทำลาย microvilli ของลำไส้เล็กโดยไม่บุกรุกเซลล์แต่เกาะติดกับเซลล์ในลำไส้เล็ก อย่างไรก็ตามมีรายงานจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า EPEC อาจบุกรุกเซลล์ได้ (Wood, et al. 1986)

4. Enterohaemorhagic *E. coli* (EHEC) พบเพียงสายพันธุ์เดียวคือสายพันธุ์ O157:H7 เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง ถ่ายเป็นเลือด และมีอาการด่อไตทำให้ไตวายได้ (Riley, et al. 1983)

ในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจเกี่ยวกับสภาพการผลิตว่า ถูกต้องตามสุขลักษณะที่ดี มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและปราศจากเชื้อโรคทางเดินอาหารนั้น ซึ่งโดยปกติแล้วการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคโดยตรงนั้นทำได้ยากและสิ้นเปลือง ดังนั้นจึงนิยมตรวจหาจุลินทรีย์บางชนิดที่เมื่อพบอยู่ในอาหารแล้วจะเป็นดัชนีบ่งถึงความเป็นไปได้ที่อาหารอาจได้รับการปนเปื้อนจากเชื้อโรค จุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นดัชนีในเรื่องนี้ได้ดีควรมีคุณสมบัติเป็นพวกที่มีแหล่งอาศัยปกติ (natural flora) อยู่ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ในปริมาณมากในอุจจาระ เป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ดี และสามารถตรวจวิเคราะห์และยืนยันผลได้แน่นอนด้วยวิธีง่ายๆและไม่สิ้นเปลือง ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนั้นมีอยู่หลายกลุ่มด้วยกันและได้มีผู้ใช้กำหนดเป็นดัชนีบ่งถึงการปนเปื้อนทั้งทางตรงและทางอ้อมจากอุจจาระ (index of faecal comtamination) เช่น Coliforms, Faecal Coliforms, *E. coli*, Enterobacteriaceae ทั้งแฟมมิลี่ และ Enterococci ซึ่งการกำหนดจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเป็นดัชนีนั้นขึ้นอยู่กับข้อกำหนดของแต่ละมาตรฐานอาหาร และประเทศต่างๆ จะแตกต่างกันออกไป แต่ส่วนใหญ่แล้วนิยมใช้ *E. coli* เป็นดัชนีการปนเปื้อนของเชื้อโรคในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจาก *E. coli* มีคุณสมบัติที่จำเพาะแตกต่างที่สามารถทดสอบได้อย่างง่ายคือ *E. coli* สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส ให้กรดและแก๊สที่อุณหภูมิ 44-45.5 ^{o}C ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง

ประวัติความเป็นมาของ Conventional Methods และ Rapid Methods ทางจุลชีววิทยา

Conventional Methods ทางจุลชีววิทยาได้มีการพัฒนามาตั้งแต่ช่วงกลางถึงปลายปี ค.ศ. 1880 โดยพัฒนาต่อเนื่องจากสมัย Louis Pasteur และ Robert Koch ซึ่งในปัจจุบันก็ยังมีการใช้ Conventional Method กันอย่างกว้างขวางในงานที่ทำเป็นประจำ (routine)

วิธีวิเคราะห์ใดจะจัดเป็น Conventional Methods ได้จะต้องได้รับการศึกษา และผ่านการทดสอบจนได้รับการยอมรับจากทั่วโลก Conventional Methods ส่วนใหญ่เริ่มมีการพัฒนามาจากประเทศที่มีการพัฒนาแล้ว (Fung,1993)

ปัจจุบัน Conventional Methods ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางมีหลายวิธี ได้แก่

- Association of Official Analysis Chemists (AOAC)
- American Public Health Association (APHA)
- Bacteriological Analytical Manual (FDA)
- U.S. Department of Agriculture (US DA)
- International Dairy Federation (IDF)
- International Organization for Standardization (ISO)
- World Health Organization (WHO)

Rapid Methods ประกอบด้วยงานวิจัยทางจุลชีววิทยาประยุกต์หลายๆแขนง รวมถึงหลักการทางจุลชีววิทยา เคมี ชีวเคมี ชีวฟิสิกส์ ภูมิคุ้มกันวิทยา และ น้ำเหลืองวิทยา เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการจำแนก แจงนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างจาก คลีนิควิทยา อาหาร อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อม การศึกษาด้านนี้เป็นไปอย่างกว้างขวางและรวดเร็ว โดยมีนักวิจัยให้ความสนใจมากในช่วง 10 ปีหลังนี้ นักจุลชีววิทยาทางการแพทย์ได้เริ่มเข้าไปเกี่ยวข้องกับ Rapid Methods ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1980 เริ่มพบว่ามีการใช้ชุดทดสอบ (test kit) ด้านจุลชีววิทยาและ ภูมิคุ้มกันวิทยา ในงานด้านการแพทย์ ส่วนนักจุลชีววิทยาทางอาหารยังคงล้าหลังเมื่อเทียบกับนักจุลชีววิทยาทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามปัจจุบัน จุลชีววิทยาทางอาหารได้มีการพัฒนาขึ้นมากในทุกๆประเทศ เพื่อที่จะสามารถมีชุดทดสอบ (test kit) ที่เหมาะสมและคิดค้น Rapid Methods เพื่อให้การวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหารได้รวดเร็วยิ่งขึ้น คาดว่าการศึกษาวิจัยด้านนี้ยังคงขยายตัวอย่างต่อเนื่อง อันเนื่องมาจากเทคโนโลยีที่ทันสมัยและ

คอมพิวเตอร์ซึ่งจะทำให้เทคโนโลยีทางจุลชีววิทยาอาหารก้าวหน้า สะดวก และมีความรวดเร็วกว่าเดิมมาก ในยุคที่เริ่มมีการพัฒนาด้านแบคทีเรียวิทยา (Bacteriology) และจุลชีววิทยานั้น นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาประสิทธิภาพของวิธีปฏิบัติการทางแบคทีเรียวิทยาเสมอมา จะเห็นว่าตำราหรือคู่มือปฏิบัติการทางแบคทีเรียวิทยาในสมัยอดีต มีการเปลี่ยนแปลงไปมาก ทำให้สามารถศึกษาจุลินทรีย์ได้จำนวนมากขึ้น นอกจากนี้อุปกรณ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอดแก้ว จานเพาะจุลินทรีย์ และวิธีการเพาะจุลินทรีย์ก็แตกต่างไปจากเดิมมาก

อย่างไรก็ตาม ก่อนที่จะทำการศึกษาวิธีที่ใช้แนวคิดใหม่ๆต่อไปนักจุลชีววิทยาอาหารควรมีความรู้ ความคุ้นเคยต่อเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาตามวิธีมาตรฐาน (Conventional Methods) เช่น เทคนิคปลอดจุลินทรีย์ (Aseptic techniques) การแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (Pure culture isolation) การเพาะจุลินทรีย์ (Standard plate count method) และเทคนิคอื่นๆทางจุลชีววิทยา (ประเวทย์ และ ฆรณี ดุ้ยเด็มวงศ์, 2537)

การพัฒนาวิธีการแจงนับ Coliforms และ *E. coli*

Conventional Methods

1. Most Probable Number (MPN)

เป็นการแจงนับ Coliforms และ *E. coli* โดยอาศัยค่าสถิติที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับตารางมาตรฐาน มีระดับความเชื่อมั่น 95 % (Oblinger and Koburger, 1984)

2. Triplicate tube technique

พัฒนามาจาก MPN เป็นการแจงนับแบบ semi quantitative procedures กล่าวคือ จะรายงานผลในรูปแบบ พบ หรือ ไม่พบในตัวอย่างอาหาร 1 กรัม โดยการปิเปตตัวอย่างอาหารในปริมาณพอเหมาะลงในหลอดอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (selective medium) 3 หลอด เลียนแบบ MPN ผลบวกจากการทดลองอย่างน้อย 2 ใน 3หลอดที่ได้รับการยืนยันผลบวกแล้วจึงจะถือว่าการทดสอบนั้นเป็นบวก (Eyles and Daver, 1989)

3. Pour plate count

เป็นการแจงนับ Coliforms และ *E. coli* ด้วยอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็งแล้วนับจำนวนโคโลนีที่ได้ต่อตัวอย่างอาหาร 1 กรัม ซึ่งให้ค่าแน่นอนกว่า MPN ที่เกิดจากการประมาณ

ค่าอันเป็นข้อจำกัดของ MPN วิธี pour plate count มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ปริมาณสารละลายตัวอย่างไม่น้อยกว่า 1 มิลลิลิตรที่ 10% โซโมจีเนต ดังนั้นค่าต่ำสุดที่จะแจงนับได้คือ 10 CFU/g (Hartman, et al. 1986) โดยต้นแบบการพัฒนาเทคนิค pour plate count เริ่มในปี ค.ศ. 1966 โดย Hefferman และ Cabelli โดยใช้ MacConkey agar ต่อมาในปี ค.ศ. 1977 Varga และคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการแจงนับ Coliforms ด้วย MacConkey agar กับวิธี 5-tube MPN (APHA) และรายงานว่า วิธี pour plate count ให้ค่าการแจงนับต่ำกว่า 5-tube MPN (APHA) ประมาณ 10 % (Varga and Early, 1977)

โดยปกติการแจงนับ Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีมาตรฐานต้องใช้เวลานาน ประมาณ 7-10 วันและยุ่งยาก ดังนั้นจึงได้มีผู้คิดค้นพัฒนาวิธีการแจงนับให้รวดเร็วขึ้นดังนี้

Rapid Methods

1. Anderson Baird-Parker direct plate method for *E. coli* (ABP) (Anderson,1975)

สามารถแจงนับ *E. coli* ในอาหารได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยอาศัยหลักการที่ว่า *E. coli* สามารถเจริญ และสร้าง Indole ที่ 44-45.5°C วิธีการคือปิเปตปริมาณสารละลายตัวอย่างอาหาร 0.5 - 1 มิลลิลิตรลงบน cellulose acetate membrane filter ซึ่งวางอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็ง tryptone bile agar plate บ่มที่ 44-45.5°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นย้าย cellulose acetate membrane ลงบนจานเพาะจุลินทรีย์ที่มีสารละลาย Kovacs' (Indole reagent) ทิ้งไว้ 5 นาที แจงนับจำนวนโคโลนีของ *E. coli* ซึ่งสามารถสร้าง Indole และทำให้โคโลนีเป็นสีชมพู

2. Hydrophobic grid membrane filter (HGMG) technique (QA Labs., Toronto)

HGMG ได้พัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถแจงนับได้ทั้ง Coliforms และ *E. coli* คล้ายกับ ABP นอกจากนี้ HGMG ยังสามารถแจงนับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ด้วย (Entis,1986) HGMG เป็นแผ่นเมมเบรนรูปสี่เหลี่ยมซึ่งภายในแบ่งเป็นตารางรูปสี่เหลี่ยมจตุรัส ประกอบด้วยวัสดุที่เป็นสารไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยแผ่นเมมเบรนจะแบ่งออกเป็นช่องทั้งหมด 1600 ช่อง (compartments) เพื่อทำหน้าที่เป็นช่องแบ่งไม่ให้เซลล์อื่นๆเจริญเข้ามาทับถมกัน ทำให้สามารถนับเป็นโคโลนีเดี่ยวๆได้ในแต่ละช่อง วิธีการคือ กรองตัวอย่างอาหารผ่านเมมเบรน HGMG จุลินทรีย์จะถูกดักไว้ใน compartments จากนั้นนำแผ่น HGMG วางบน selective agar บ่มในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา อ่านผลจากเครื่อง ISO-GRID Line Counter

3. Impedance techniques (Firstenberg-Eden, 1986)

เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยการควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์เพื่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารและวัตถุดิบได้หลายชนิด ในเวลาอันรวดเร็ว เช่น การหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) การประมาณจำนวนของยีสต์ รา โคลิฟอร์ม และแบคทีเรียแลคติค โดยอาศัยหลักการการนำไฟฟ้าของของเหลว (Conductance) ด้วยการวัดความต้านทานการไหลของกระแสสลับที่วิ่งผ่านตัวกลาง (Impedance) ได้แก่ อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ทดสอบ ตัวอย่างอาหาร ซึ่งค่า Impedance จะคงที่ตลอดเวลาจนกระทั่งจำนวนจุลินทรีย์ถึงประมาณ 10^6-10^7เซลล์/มิลลิลิตร ณ จุดนี้ค่า Impedance จะเปลี่ยนไป เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของความสม่ำเสมอของอิออน (ionic consistency) ของอาหารหรือตัวกลาง

4. Membrane filtration method (MF) (Anonymous, 1987)

สามารถแจงนับจุลินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้ง Coliforms, Faecal Coliforms และ *E. coli* แต่มีข้อจำกัดคือ วิธีนี้ใช้ได้เฉพาะกับตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลวเท่านั้น และจะได้ผลดีก็ต่อเมื่อตัวอย่างอาหารนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยเกินกว่าจะนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้ตัวอย่างอาหารในปริมาณมากเช่น 10, 25, 50 หรือ 100 มิลลิลิตร โดยกรองตัวอย่างอาหารผ่านแผ่น membraneที่มีขนาดช่องที่ของเหลวผ่าน (pore size) ขนาด 0.45 - 0.50 ไมครอน จุลินทรีย์ที่มีเซลล์ขนาดใหญ่กว่าช่องของ membrane จะติดอยู่บนแผ่น membrane ส่วนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์จะสามารถซึมผ่านได้ ดังนั้นเมื่อนำแผ่น membrane ที่มีเซลล์จุลินทรีย์ติดอยู่วางบนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แข็งที่จำเพาะ จุลินทรีย์นั้นจะสามารถเจริญเป็นโคโลนีให้ตรวจนับได้

5. Fluorocult^{R} LMX Broth (Merck, Germany)

เป็นอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของอาหารดังนี้คือ ทริปโตส, แลคโตส, โซเดียม คลอไรด์ และสารละลายของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญทั้ง Coliforms และ *E. coli* เป็นอย่างดี นอกจากนั้นยังมีลอริลซัลเฟต 0.01% (น้ำหนัก/กรัม) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

Coliforms และ *E. coli* สร้าง β-D-galactosidase ได้ในภาวะที่มี 1-Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นสารเหนี่ยวนำ β-D-galactosidase ที่สร้างขึ้นจะย่อย X-GAL ทำให้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอมฟ้าของ bromchloroindigo (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นผลบวกแสดงให้ทราบว่า ในตัวอย่างมี Coliforms หรือ *E. coli* ในขณะเดียวกัน

แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ยังคงเจริญต่อไป *E. coli* สามารถสังเคราะห์ β-D-glucuronidase ที่ใช้ย่อยสลาย 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) ให้ได้สารเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (รูปที่ 2) นอกจากนั้น *E. coli* ยังสามารถย่อยสลาย ทริปโตแฟน ในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ได้เป็น อินโดล (Indole) ซึ่งเมื่อ อินโดลนี้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Kovacs' จะได้สีชมพูแดงบนผิวอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ เรียกผลการทดลองที่ได้ว่าเป็นบวก แสดงว่ามี *E. coli* เจริญอยู่ในอาหารนั้น

6. Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (3M , USA)

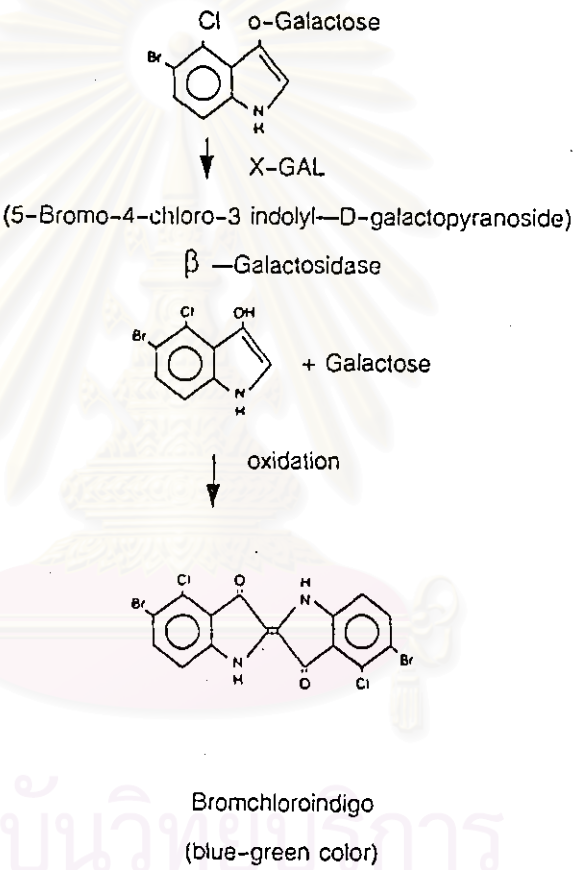
เป็นชุดสำเร็จรูปเพื่อการตรวจหาและแจงนับ Coliforms และ *E. coli* ประกอบด้วยแผ่นฟิล์มรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 ซม^2 สองแผ่นประกบกัน แผ่นล่างมีอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ violet red bile (VRB) ดรึงอยู่ทำหน้าที่เสมือนจานเพาะจุลินทรีย์บรรจุอยู่ แผ่นบนทำหน้าที่เสมือนฝาปิดซึ่งมี guar gum cold water gelling agent และสี tetrazolium indicator dye เคลือบอยู่ สี tetrazolium นี้จะทำให้โคโลนีของ Coliforms มีสีแดงสด ง่ายต่อการนับจำนวน Coliforms จะสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส เกิดเป็นกรดและแก๊ส แก๊สที่เกิดขึ้นจะถูกดักไว้ในฟิล์มรอบๆ โคโลนีซึ่งมีสีแดง จึงสามารถแยก Coliforms ออกจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ภายในฟิล์มยังมี 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG) เป็นองค์ประกอบจะทำให้สามารถจำแนก Coliforms ออกจาก *E. coli* ทั้งนี้เพราะ *E. coli* จะสร้าง glucuronidase ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยสลาย BCIG ทำให้เกิดตะกอนสีฟ้ารอบๆโคโลนี ทำให้โคโลนีของ *E. coli* มีสีน้ำเงิน จึงสามารถจำแนก Coliforms ออกจาก *E. coli* ได้ (รูปที่ 3)

7. Chromocult® Coliform Agar (Merck, Germany)

เป็นอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของ เปปโตน, โซเดียมไพรูเวท, ซอร์บิทอลและ สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เหมาะกับการเจริญของทั้ง Coliforms และ *E. coli* เป็นอย่างดี และยังมี tergitol 7 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด โดยไม่มีผลต่อ Coliforms นอกจากนั้นยังมีองค์ประกอบของซับสเตรท 2 ชนิดคือ salmon-GAL และ X-glucuronide

Coliforms ที่สร้าง β-D-galactosidase จะย่อยสลายซับสเตรท salmon-GAL ได้สารสีส้มแกมแดง ส่วน *E. coli* สร้าง β-D-glucuronidase เมื่อย่อยสลายซับสเตรท X-glucuronide จะได้สารสีน้ำเงินม่วง (รูปที่ 3)

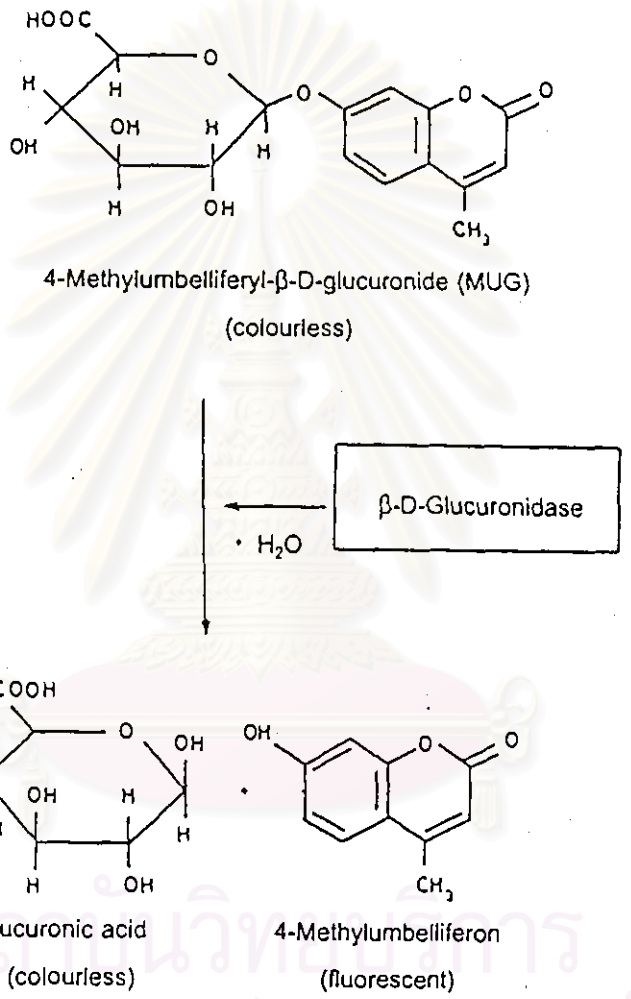
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Bromchloroindigo
(blue-green color)

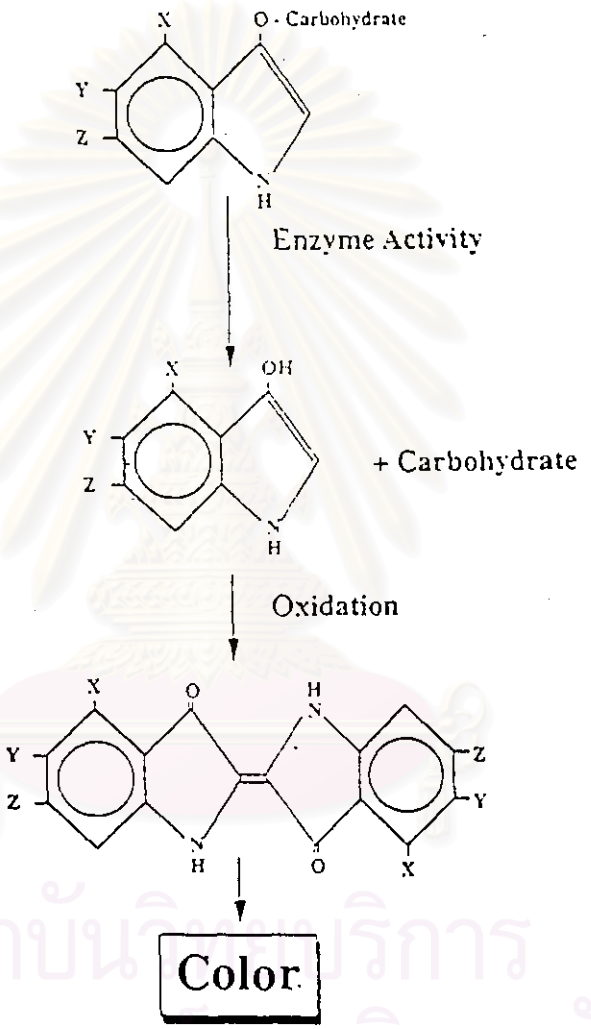
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แผนภาพแสดงการย่อยสลาย X-Gal ของ Coliforms โดย β-D-Galactosidase
ที่มา : Fluorocult^{R} LMX Broth (Merck, Germany)



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการย่อยสลาย MUG ของ *E. coli* โดย β-D-Glucuronidase
ที่มา : Fluorocult® LMX Broth (Merck, Germany)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการย่อยสลายของซับสเตรทที่ก่อให้เกิดสารมีสี (Chromogenic Substrates)

ที่มา : Chromogenic Substrates (Merck, Germany)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซับสเตรทและเอนไซม์ของสารเรืองแสง (Fluorogenic) และสารมีสี (chromogenic) ที่นิยมใช้ในการแจงนับ Total Coliforms และ *E. coli* (Manafi and Kneifel, 1991)

β-D-galactosidase

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	(X-GAL)
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	(ONPG)
6-Bromo-2-naphthyl-β-D-galactopyranoside	(BNGA)
4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside	(MUGA)
Salmon-GAL	

β-D-glucuronidase

4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide	(MUG)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide	(XGLU , BCIG)
p-Nitrophenyl-β-D-glucuronide	(PNPG)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย