

การทวนสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) และ Reasoner's 2A (R2A) agar สำหรับการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง

ปิยมาศ แจ่มศรี และขวัญมิตร รุ่งจัก

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง ด้วยวิธี pour plate ตามวิธีอ้างอิงของมาตรฐานสากล กำหนดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ไว้หลายชนิด ทั้งชนิดที่มีสารอาหารมาก เช่น plate count agar (PCA) และที่มีสารอาหารน้อย เช่น Reasoner's 2A (R2A) agar โดยมีข้อแนะนำว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่มีสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์น้อยแต่มีสารพื้นฟูเซลล์ขาดเจ็บจะให้จำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมากกว่าแต่ไม่มีสารพื้นฟูเซลล์ขาดเจ็บ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ R2A agar โดยเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำและน้ำแข็งที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด โดยใช้ตัวอย่างน้ำและน้ำแข็งที่ส่งตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2557 จำนวน 360 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างน้ำ 4 ชนิด ได้แก่ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท 60 ตัวอย่าง น้ำดื่ม 60 ตัวอย่าง น้ำใช้ 60 ตัวอย่าง น้ำผ่านเครื่องกรอง 120 ตัวอย่าง และน้ำแข็ง 60 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เปรียบเทียบกับ R2A agar แล้วบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อจำแนกผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป็น 3 ระดับคือ 1 - 1,000 CFU/มิลลิลิตร 1,001 - 100,000 CFU/มิลลิลิตร และมากกว่า 100,000 CFU/มิลลิลิตร พบตัวอย่างน้ำทุกชนิดทุกระดับการปนเปื้อนมีจำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยที่คำนวณได้จาก R2A agar มากกว่าค่าเฉลี่ยจาก PCA อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบการกระจายของผลวิเคราะห์ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยสัมประสิทธิ์การแปรผัน (Coefficient of variation) พบว่าผลการนับจำนวนโคโลนีจาก R2A agar มีการกระจายของข้อมูลน้อยกว่าข้อมูลของ PCA ส่วนตัวอย่างน้ำแข็งให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่คำนวณได้จาก R2A agar ที่ระดับการปนเปื้อนมากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร มากกว่าค่าเฉลี่ยจาก PCA อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันน้อยกว่า แต่ที่ระดับการปนเปื้อน 1 ถึง 1,000 CFU/มิลลิลิตร พบค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้จาก PCA อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันใกล้เคียงกัน แสดงว่า R2A agar มีผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ดีกว่าในตัวอย่างทุกชนิด ยกเว้นในน้ำแข็งที่ระดับการปนเปื้อน 1 ถึง 1,000 CFU/มิลลิลิตร จากการทวนสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า R2A agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็งด้วยวิธี pour plate เมื่อทำการบ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงได้

Accepted for publication, 7 December 2017

บทนำ

Heterotrophic plate count (HPC) คือวิธีการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Heterotrophs ในน้ำ หรือเป็นวิธีที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ Standard plate count (SPC) จุลินทรีย์ในกลุ่ม Heterotrophs รวมถึงแบคทีเรีย ยีสต์ และรา อาศัยสารอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) เป็นอาหารในการเจริญเติบโต การตรวจนับจำนวน จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียในน้ำเป็นวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยามาเป็นเวลานาน สามารถใช้เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ประสิทธิภาพ ของกระบวนการจัดการน้ำบริโภค เช่นการผลิตน้ำประปา และอาจบ่งชี้ความปลอดภัยของน้ำถ้าพบปริมาณสูง และ ถ้ามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลายชนิด อาจมีความเสี่ยงของเชื้อก่อโรคปะปนอยู่ด้วย ในหลายประเทศมีการกำหนดจำนวน จุลินทรีย์ทั้งหมดไว้ในมาตรฐานน้ำบริโภค ใช้เป็นข้อบังคับทางกฎหมายหรือเป็นข้อแนะนำด้านสุขลักษณะความสะอาด ของน้ำ⁽¹⁾ วิธีการตรวจหาปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำมีหลายวิธีที่นิยมกันมาก คือ วิธี pour plate ทดสอบ โดยปิเปตตัวอย่างน้ำที่ระดับความเจือจางที่ต้องการลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ขึ้นแข็งตัว จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีและคำนวณผล แต่เดิมเอกสารอ้างอิงสำหรับการ ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำด้วยวิธี pour plate ระบุให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ต่อมาได้มีการนำเสนออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ คือ Reasoner's 2A (R2A) agar และมีข้อแนะนำว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มาก แต่ไม่มีสารฟีนฟูเซลล์บาดเจ็บ เช่น PCA จะให้จำนวนโคโลนี บนจานเพาะเชื้อมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อยกว่า แต่มีสารฟีนฟูเซลล์บาดเจ็บ เช่น R2A agar และสามารถใช้ได้ทั้งวิธี pour plate, spread plate และ membrane filter⁽²⁾ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์น้ำของ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหน่วยงานภาครัฐที่ให้บริการ ตรวจวิเคราะห์ต้องใช้วิธีมาตรฐานที่ทันสมัย และเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ทุกรายการทดสอบ รวมทั้งการตรวจ นับจำนวนจุลินทรีย์ และจากคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agar เรื่องการให้จำนวนจุลินทรีย์ที่มากกว่า จึงได้ทำ การศึกษาเพื่อทวนสอบ (verification) อาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agar สำหรับปรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำนวน จุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำและน้ำแข็ง และการควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โดยใช้ตัวอย่าง น้ำและน้ำแข็งที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการ สคอ. ด้วยวิธี pour plate ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับ PCA agar

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

น้ำและน้ำแข็งที่ได้รับจากผู้ส่งภาครัฐ และเอกชน (ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึงกันยายน พ.ศ. 2557) รวมทั้ง น้ำผ่านเครื่องกรองในห้องปฏิบัติการรวม 360 ตัวอย่าง แบ่งเป็นน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท จำนวน 60 ตัวอย่าง น้ำดื่ม เช่น น้ำดื่มผ่านเครื่องกรองน้ำ น้ำดื่มจากสำนักงาน เป็นต้น จำนวน 60 ตัวอย่าง น้ำใช้ในการผลิตอาหารและ น้ำ จำนวน 60 ตัวอย่าง น้ำผ่านเครื่องกรอง จำนวน 120 ตัวอย่าง และน้ำแข็ง จำนวน 60 ตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องปั่นทำลายเชื้อ เครื่องชั่ง เครื่องนับโคโลนี ตะเกียงบุนเสน ตู้บ่มเพาะเชื้อ ตู้บ่มร้อน เครื่องผสมสารละลาย เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ เครื่องแก้วหรือพลาสติก และวัสดุที่จำเป็นอื่น ๆ เช่น สำลี ซ้อนตักสาร เป็นต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ plate count agar (PCA) และ R2A agar ที่มีสูตรตามเอกสารอ้างอิง⁽²⁾

สารเคมี ได้แก่ 70% เอทานอล และสารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ butterfield's phosphate buffered-dilution water (PBS)

การตรวจวิเคราะห์

ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้น (ไม่เจือจาง) และตัวอย่างที่เจือจางด้วย PBS ที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1,000 เพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ได้ที่ระดับการปนเปื้อน 3 ระดับ คือ 1 - 1,000, 1,001 - 100,000 และมากกว่า 100,000 CFU/มิลลิลิตร ระดับละ 1 มิลลิลิตร ปิเปตใส่ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 4 จานเพาะเชื้อ เทอาหาร PCA และ R2A agar 12 - 15 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อชนิดละ 2 จานเพาะเชื้อต่อระดับความเจือจาง ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแห้งตัว แล้วพลิกจานเพาะเชื้ออีกด้านหนึ่งขึ้น บ่มเพาะเชื้อที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 3 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ คำนวณและรายงานผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็น CFU/มิลลิลิตร อ้างอิงวิธีการทดสอบจำนวนจุลินทรีย์จาก Standard Method for the Examination of Water and Wastewater⁽²⁾

การควบคุมคุณภาพ

ตรวจสอบความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายสำหรับเจือจาง และอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ จานเพาะเชื้อ และปิเปต ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ และวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำทุก 10% ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ หรือถ้ามีตัวอย่างน้อยกว่า 10 ตัวอย่างต่อวัน ให้วิเคราะห์ซ้ำ 1 ตัวอย่างทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

แบ่งระดับการปนเปื้อนของจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชนิดตัวอย่างออกเป็น 3 ระดับ คือ 1 - 1,000, 1,001 - 100,000 และมากกว่า 100,000 CFU/มิลลิลิตร แปลงค่าจาก CFU เป็น $\log_{10}$ CFU ใช้พารามิเตอร์ทางสถิติในการคำนวณ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (average) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (%CV)⁽³⁾ เปรียบเทียบการกระจายข้อมูลตั้งแต่สองชุดขึ้นไป และใช้สถิติทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย one-tail Paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$; t-test)⁽⁴⁾

ผล

ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็งจำนวน 360 ตัวอย่าง ด้วยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ PCA และ R2A agar ซึ่งแบ่งระดับการปนเปื้อน 3 ระดับ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก R2A agar ทุกระดับการปนเปื้อนมีค่าเฉลี่ยมากกว่าค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้จาก PCA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; t-test) และการกระจายของข้อมูลผลการทดสอบจาก R2A agar มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (%CV) น้อยกว่าข้อมูลที่ได้จาก PCA ในทุกระดับการปนเปื้อน ดังแสดงในตารางที่ 1

เมื่อแบ่งตามประเภท คือตัวอย่างน้ำ จำนวน 300 ตัวอย่าง และน้ำแข็ง 60 ตัวอย่าง พบตัวอย่างน้ำมีค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก R2A agar ทุกระดับการปนเปื้อนมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก PCA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; t-test) และมีการกระจายของข้อมูลผลการทดสอบน้อยกว่าข้อมูลที่ได้จาก PCA ส่วนตัวอย่างน้ำแข็งให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่คำนวณได้จาก R2A agar ที่ระดับการปนเปื้อนมากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร มากกว่าค่าเฉลี่ยจาก PCA อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน

น้อยกว่า แต่ที่ระดับการปนเปื้อน 1 ถึง 1,000 CFU/มิลลิลิตร พบค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้จาก PCA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างน้ำและน้ำแข็งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agar และ PCA แบ่งตามระดับการปนเปื้อน 3 ระดับ

ชนิดและจำนวนตัวอย่าง	ค่าสถิติ	ระดับการปนเปื้อน					
		1-1,000 CFU/มิลลิลิตร		1,001-100,000 CFU/มิลลิลิตร		>100,000 CFU/มิลลิลิตร	
		PCA	R2A	PCA	R2A	PCA	R2A
น้ำ 300 ตัวอย่าง	n	177		102		21	
	range	1-800	1-1,000	230-130,000	1,080-96,000	12,000-1,800,000	120,000-2,100,000
	แปลงผลเป็น $\log_{10}$ CFU/ml						
	range	0-2.90	0-3	2.36-5.11	3.03-4.98	4.08-6.26	5.08-6.32
	Mean	1.39	1.55	3.80	4.07	5.18	5.52
	SD ¹	0.79	0.77	0.66	0.58	0.65	0.43
	%CV ²	56.48	49.51	17.44	14.23	12.49	7.80
	t-test	$p < 0.05$, $P = 6.9 \times 10^{-11}$		$p < 0.05$, $P = 5.5 \times 10^{-12}$		$p < 0.05$, $P = 7.1 \times 10^{-4}$	
น้ำแข็ง 60 ตัวอย่าง	n	14		36		10	
	range	1-960	1-44	900-64,000	1,100-95,000	26,000-1,200,000	190,000-1,200,000
	แปลงผลเป็น $\log_{10}$ CFU/ml						
	range	0-2.98	0-2.87	2.95-4.81	3.04-4.98	4.41-6.08	5.28-6.08
	Mean	1.61	1.62	3.63	3.76	5.35	5.75
	SD	0.93	0.95	0.54	0.54	0.63	0.31
	%CV	57.85	58.74	14.88	14.35	11.81	5.39
	t-test	$p > 0.05$, $P = 0.44$		$P < 0.05$, $P = 0.003$		$p < 0.05$, $P = 0.01$	
รวมทั้งหมด 360 ตัวอย่าง	n	191		138		31	
	range	1-960	1-1,000	230-130,000	1,080-96,000	12,000-1,800,000	120,000-2,100,000
	แปลงผลเป็น $\log_{10}$ CFU/ml						
	range	0-2.98	0-3	2.36-5.11	3.03-4.98	4.08-6.26	5.08-6.32
	Mean	1.41	1.55	3.75	3.99	5.23	5.59
	SD ¹	0.80	0.78	0.63	0.58	0.64	0.41
	%CV ²	56.60	50.12	16.91	14.62	12.17	7.24
	t-test	$p < 0.05$, $P = 1.3 \times 10^{-10}$		$p < 0.05$, $P = 1.6 \times 10^{-13}$		$p < 0.05$, $P = 3.2 \times 10^{-5}$	

¹SD หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

²%CV หมายถึง ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (%coefficient of variation)

เมื่อแบ่งตัวอย่างน้ำเป็น 4 ชนิด คือ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ($n = 60$) น้ำดื่ม เช่น น้ำดื่มผ่านเครื่องกรองน้ำ น้ำดื่มจากสำนักงาน เป็นต้น ($n = 60$) น้ำใช้ในการผลิตอาหารและน้ำ ($n = 60$) และน้ำผ่านเครื่องกรอง ($n = 120$) พบตัวอย่างน้ำทุกชนิด ทุกระดับการปนเปื้อนมีจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก R2A agar เฉลี่ยมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก PCA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการกระจายของข้อมูลผลการทดสอบจาก R2A agar มีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันน้อยกว่าข้อมูลที่ได้จาก PCA

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจำแนกตามประเภทของตัวอย่างน้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agar และ PCA แบ่งตามระดับการปนเปื้อน 3 ระดับ

ชนิดและจำนวนตัวอย่าง	ค่าสถิติ	ระดับการปนเปื้อน					
		1-1,000 CFU/มิลลิลิตร		1,001-100,000 CFU/มิลลิลิตร		>100,000 CFU/มิลลิลิตร	
		PCA	R2A	PCA	R2A	PCA	R2A
น้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท 60 ตัวอย่าง	n	10		41		9	
	range	3-750	6-690	520-110,000	1,200-96,000	12,000-1,700,000	120,000-1,900,000
	แปลงผลเป็น Log ₁₀ CFU/ml						
	range	0.48-2.84	0.78-2.84	2.72-5.04	3.08-4.98	4.08-6.23	5.08-6.28
	Mean	1.85	1.98	3.92	4.18	5.06	5.32
	SD ¹	0.69	0.63	0.65	0.59	0.56	0.38
	%CV ²	37.32	31.72	16.54	14.16	10.96	7.18
	t-test	p<0.05, P=0.04		P<0.05, P=7.3x10 ⁻⁶		p<0.05, P=0.03	
น้ำดื่ม 60 ตัวอย่าง	n	26		33		1	
	range	1-600	2-980	390-42,000	1,200-83,000	190,000	210,000
	แปลงผลเป็น Log ₁₀ CFU/ml						
	range	0-2.78	0.30-2.99	2.59-4.62	3.08-4.92		
	Mean	1.78	1.97	3.70	3.99		
	SD	0.84	0.78	0.55	0.51		
	%CV	47.21	39.72	14.84	12.83		
	t-test	P<0.05, P=0.004		P<0.05, P=8.8x10 ⁻⁶			
น้ำใช้ในการผลิตอาหารและน้ำ 60 ตัวอย่าง	n	24		25		11	
	range	1-600	1-1,000	250-130,000	1,220-95,000	12,000-1,800,000	120,000-2,100,000
	แปลงผลเป็น Log ₁₀ CFU/ml						
	range	0-2.78	0-3	2.40-5.11	3.09-4.98	4.08-6.26	5.08-6.32
	Mean	1.38	1.57	3.82	4.08	5.26	5.70
	SD	0.81	0.78	0.77	0.61	0.75	0.42
	%CV	59.06	49.68	20.22	14.98	14.34	7.42
	t-test	P<0.05, P=0.007		P<0.05, P=0.002		p<0.05, P=0.01	
น้ำผ่านเครื่องกรอง 120 ตัวอย่าง	n	117		3			
	range	1-800	1-1,000	230-2,400	1,080-3,200		
	แปลงผลเป็น Log ₁₀ CFU/ml						
	range	0-2.90	0-3	2.36-3.38	3.03-3.51		
	Mean	1.26	1.41	2.98	3.32		
	SD ¹	0.75	0.73	0.54	0.25		
	%CV ²	59.68	51.87	18.25	7.55		
	t-test	P<0.05, P=3.1x10 ⁻⁷		P>0.05, P=0.25			

¹SD หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

²%CV หมายถึง ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (%coefficient of variation)

วิจารณ์

โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่มีสารอาหารมากเพื่อตรวจหาจุลินทรีย์ในน้ำและน้ำแข็ง ด้วยคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว (fast-growth microorganism) เจริญก่อกำเนิดจุลินทรีย์ที่เจริญได้ช้า (slow-growth microorganism) หรือที่บาดเจ็บ (injure) หรือเครียด (stressed) ทำให้เจริญช้า ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว ผลตรวจวิเคราะห์จึงตรวจไม่พบ หรือตรวจพบในจำนวนน้อยกว่าความเป็นจริง⁽⁵⁾ เมื่อนำผลวิเคราะห์ไปตัดสินจึงพบว่าผลดังกล่าวผ่านเกณฑ์กำหนด น้ำและน้ำแข็งเหล่านั้นจะถูกนำไปใช้งานหรือบริโภคทันที แต่ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมจุลินทรีย์ดังกล่าวก็จะสามารถฟื้นตัวได้อย่างรวดเร็ว และเพิ่มจำนวนในระยะเวลาต่อมา หากเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ ผู้บริโภคจะเกิดการเจ็บป่วย หรือเกิดความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ที่ใช้น้ำและน้ำแข็งในการผลิต ดังนั้นการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมและฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บจึงเป็นสิ่งที่ห้องปฏิบัติการควรนำมาพิจารณาเพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องที่สุด

R2A agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Reasoner และ Geldreich ใช้สำหรับนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำที่ใช้ผ่านกระบวนการ (treated potable water) R2A agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อย และเมื่อนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่ำระยะเวลานาน สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เครียด บาดเจ็บ และทนคลอรีน (chlorine tolerant) เพราะใน R2A agar มี soluble starch เป็นส่วนประกอบในการช่วยฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บ และ sodium pyruvate ช่วยฟื้นฟูเซลล์ที่เครียด⁽⁶⁻¹⁰⁾ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมาก เช่น PCA จะสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้เร็ว ซึ่งจะเจริญก่อกำเนิดแบคทีเรียที่เครียด หรือเจริญได้ช้าที่สามารถพบได้ในน้ำที่ผ่านกระบวนการ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ผลการทดสอบในตัวอย่างน้ำโดยใช้ R2A agar มีค่าเฉลี่ยมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก PCA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; t-test) สอดคล้องกับผลศึกษาของ Salvatore Massa และคณะ⁽¹¹⁾ ที่เปรียบเทียบ PCA และ R2A agar ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำแร่ธรรมชาติที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธี pour plate ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก R2A agar มีค่าสูงกว่าค่าจาก PCA และผลศึกษาของ Klaas van der Linde และคณะ⁽¹²⁾ ที่เปรียบเทียบ Tryptic soy agar (TSA) และ R2A agar ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำที่ใช้ในการฟอกไต ที่ได้จากระบบ RO ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ด้วยวิธี spread plate ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณได้จาก R2A agar มีค่าสูงกว่าค่าจาก TSA

ในขณะที่ผลการทดสอบตัวอย่างน้ำแข็ง R2A agar ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ที่ต่ำกว่าหรือไม่แตกต่างจาก PCA เมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพราะที่อุณหภูมิแช่แข็งเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย หรือบาดเจ็บ หรือเจริญช้าลงทำให้จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อให้มากขึ้น^(5,13) แต่อย่างไรก็ตามสามารถใช้ R2A agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ตามที่ United States Food and Drug Administration กำหนดไว้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวัง หรืออาจบ่มในระยะเวลาที่มากขึ้นตามที่ American Public Health Association แนะนำ ซึ่งจากข้อมูลในค่าต่าง ๆ ที่ศึกษาใน R2A agar ที่มีมากกว่า PCA จึงถือว่า R2A agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถนำมาใช้แทน PCA ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำและน้ำแข็งได้

สรุป

จากการทวนสอบ (Verification) อาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agar โดยเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สำหรับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำและน้ำแข็ง ด้วยวิธี pour plate บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง โดยมีน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำดื่ม น้ำใช้ในการผลิตอาหารและน้ำ น้ำผ่านเครื่องกรอง และน้ำแข็ง เป็นตัวแทนกลุ่มตัวอย่างน้ำและน้ำแข็ง ผลการทดสอบสามารถยืนยันได้ว่า R2A agar ให้ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ตามที่ระบุในเอกสารอ้างอิง ดังนั้นห้องปฏิบัติการสามารถนำ R2A agar ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์เพื่อเฝ้าระวังคุณภาพน้ำและน้ำแข็ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางลดาพรณ แสงคล้าย ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหารที่กรมสนับสนุนและให้คำปรึกษาด้านวิชาการและสถิติ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายน้ำและเครื่องดื่ม สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการตรวจวิเคราะห์ จนคณะผู้วิจัยสามารถดำเนินโครงการจนลุล่วงและสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Robertson W, Brooks T. The role of HPC in managing the treatment and distribution of drinking water. In: Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A, editor. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health. London: IWA publishing; 2003. p. 237-243.
2. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS. Standard method for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012.
3. กัลยา วานิชย์บัญชา. บรรณาธิการ. หลักสถิติ. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สามลดา; 2557. หน้า 72-73.
4. ปรีดาภรณ์ กาญจนสำราญวงศ์. การทดสอบสมมติฐาน. ใน : กิตินันท์ พลสวัสดิ์. บรรณาธิการ. Excel statistic analysis. นนทบุรี : บริษัท ไอทีซี พรีเมียร์ จำกัด; 2556. หน้า 122-128.
5. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ. บรรณาธิการ. ความปลอดภัยอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัท ตีรณสาร จำกัด; 2552. หน้า 366-392.
6. Neogen. R2A agar (7390). [Online]. 2516 [cited 2015 Jul 16]; [3 screens]. Available from: URL: http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7390_pi.pdf
7. Condalab. R2A agar (European pharmacopoeia). [Online]. [cited 2015 Jul 16]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.condalab.com/pdf/1071.pdf>
8. Himedialabs. R2A agar, modified M1743. [Online]. 2515 [cited 2015 Jul 16]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.himedialabs.com/TD/M1743.pdf>
9. Becton, Dickinson and Company. R2A agar. [Online]. [cited 2015 Jul 16]; [3 screens]. Available from: URL: http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/257336.pdf
10. Massa S, Caruso M, Trovati F, Tosques M. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. World J Microbiol Biotechnol 1998; 14: 727-730.

11. van der Linde K, Lim BT, Rondeel JM, Antonissen LP, de Jong GM. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Trasplant* 1999; 14: 2433-7.
 12. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2552. หน้า 497.
-

Verification of Plate Count Agar (PCA) and Reasoner's 2A (R2A) Agar for Enumeration of Heterotrophic Bacteria in Water and Ice

Piyamas Jamsri and Khwunmit Roojug

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Pour plate technique is well-recognized as a standard method for enumerating heterotrophic bacteria in water and ice. Either high-nutrient medium such as plate count agar (PCA) or low-nutrient medium such as Reasoner's 2A (R2A) agar can be used for this standard method. It has been recommended that the low-nutrient medium containing essential substances for recovering injured cells will increase bacterial counts as compared to the high-nutrient medium without any essential substances. This study was aimed to verify the culture medium by comparing the number of heterotrophic bacteria in water and ice grown on PCA and R2A agar. A total of 360 samples of water and ice received at Bureau of Quality and Safety of Food during 2012 - 2014 were divided into 4 types of waters including 60 samples of bottled drinking water, 60 samples of drinking water, 60 samples of potable water, 120 filtrated water samples and 60 samples of ice. All samples were tested by pour plate method using PCA and R2A agar. After incubation at 35°Celsius (°C) for 48 hours, growing colonies on culture plates were counted and categorized into 3 levels: 1-1,000 CFU/ml, 1,001-100,000 CFU/ml and more than 100,000 CFU/ml. The results showed that the mean values of bacterial counts of all types of water samples calculating from the R2A agar were significantly higher than those from the PCA agar ($P < 0.05$) at all 3 levels. Comparing the distribution of test results from both media by coefficient of variation (CV), it was found that the R2A agar showed lower CV results than the PCA agar. For ice samples, the mean values and CV results of bacterial counts at the levels greater than 1,000 CFU/ml on the R2A agar were significantly higher and lower than those of the PCA agar ($P < 0.05$), respectively. On the contrary, the mean value and CV

result of bacterial counts, at the level of 1 – 1,000 CFU/ml, obtained from the R2A agar were not significantly different from the PCA agar. Taken together, it can be concluded that, for higher productivity, the R2A agar could be used for determining heterotrophic bacteria in water and ice by pour plate technique at 35°C for 48 hours.

Keywords: Verification, PCA and R2A agar, heterotrophic plate count, water and ice