ว กรมวิทย พ 2544 ; 43 (3) : 227 - 235

การเปรียบเทียบวิธี Petrifilm ™ และ Conventional Plate Count สำหรับการนับจำนวนเชื้อราและยีสต์

Comparison of Petrifilm ™ and Conventional Plate Count Methods for Enumeration Molds and Yeasts

อารุณี ศรพรหม
นิตยา แสงเศวตมณีงาม

กองอาหารส่งออก
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

Arunee Sornphrom
Nittaya Sangswaimaneegram

Division of Food for Export
Department of Medical Sciences
Tiwanon Road, Nonthaburi 11000

บทคัดย่อ จากการศึกษาเปรียบเทียบการนับจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งจำนวน 65 ตัวอย่าง โดยมีระดับของการปนเปื้อนเป็น 3 ระดับคือ ระดับต่ำ (<1,000 CFU / กรัม) ระดับกลาง (1,000 - < 10,000 CFU / กรัม) และระดับสูง (10,000 - < 100,000 CFU / กรัม) ด้วยวิธี Petrifilm™ และวิธี Conventional Plate Count พบว่า repeatability ของการนับจำนวนเชื้อรา, ยีสต์, เชื้อราและยีสต์ ด้วยวิธี Petrifilm ™ และวิธี Conventional Plate Count มีค่า 0.424, 0.238, 0.178 log units และ 0.339, 0.198, 0.158 log units ตามลำดับ เปรียบเทียบค่า repeatability ของทั้งสองวิธีด้วย F-Distribution (α= 0.05) พบว่าไม่แตกต่างกัน ดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรง (r_{XY}) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย y ($S_{y.x}$) ของการนับจำนวนเชื้อรา, ยีสต์, เชื้อราและยีสต์มีค่า 0.9892, 0.9962, 0.9959 และ 0.106, 0.078, 0.070 log units ตามลำดับ ค่า Coefficient of determination (r_{xy}^2) มีค่า 0.98 - 0.99 วิธี Petrifilm ™ จะเป็นทางเลือกที่สามารถใช้ในงานวิเคราะห์อีกวิธีหนึ่งสำหรับการนับจำนวนเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งเนื่องจากวิธีวิเคราะห์สะดวก รวดเร็ว ปลอดภัยจากการแพร่กระจายของ สปอร์เชื้อราและให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ

ABSTRACT The comparison of Petrifilm™ and Conventional Plate Count methods for enumerating molds and yeasts were studied on 65 dried seafood for export samples . Contaminated samples were three levels as following; low level (<1,000 CFU / g) medium level (1,000 - <10,000 CFU / g) and high level (10,000 - <100,000 CFU / g). Repeatabilty for molds, yeasts, molds and yeasts enumeration were 0.424, 0.238, 0.178 log units and 0.339, 0.198, 0.158 log units for the Petrifilm™ and the Conventional Plate Count respectively. The repeatability comparison of both methods with F-Distribution (α = 0.05) showed no different value result. The correlation coefficient (r_{XY}) were 0.9892, 0.9962, 0.9959 with residual standard deviation ($S_{y.x}$) of 0.106, 0.078, 0.070 log units for molds, yeasts, molds and yeasts enumeration respectively .The coefficient of determination (r_{xy}^2) were 0.98 - 0.99. The Petrifilm™ method can be used as the method of choice for enumerating molds and yeasts in dried seafood because the analytical technique is practical, low time consuming especially users are safe from fungi spores spread with valid results.

Key words : mold and yeasts, Petrifilm ™, conventional plate count

บทนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านจุลชีววิทยาทางอาหารได้รับการพัฒนาให้เจริญก้าวหน้ามีการคิดค้น rapid method ต่างๆรวมถึงการทำชุดทดสอบสำเร็จรูปเพื่อให้สามารถวิเคราะห์เชื้อโรคที่ปนเปื้อนมาในอาหารได้สะดวก รวดเร็วและถูกต้อง แม่นยำ ในขณะเดียวกันก็ได้มีการปรับปรุงดัดแปลงวิธีวิเคราะห์มาตรฐานเดิมให้ได้ผลเร็วขึ้นและลดขั้นตอนยุ่งยากลงให้มากที่สุด เช่นวิธี Petrifilm ™ ที่ใช้ในการหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารเป็นวิธีที่ได้จากการดัดแปลงวิธี Standard Plate Count โดย Petrifilm ประกอบด้วยแผ่นฟิล์ม 2 แผ่นประกบเข้าหากัน ส่วนหนึ่งทำหน้าที่เป็นฝาอีกส่วนหนึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเคลือบอยู่ทำหน้าที่เป็นตัวจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างลงไป 1 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อจะรวมตัวกับน้ำเป็นอาหารวุ้นที่มีความชื้นเหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหารตามวิธี Conventional ในปัจจุบันนี้มีการผลิตแผ่น Petrifilmหลายชนิดซึ่งแตกต่างกันเฉพาะอาหารที่เคลือบไว้บนแผ่นฟิล์มเพื่อให้เหมาะสมกับเชื้อที่ต้องการศึกษา เช่น Total bacterial count , เชื้อราและยีสต์, Coliforms, *E. coli*, และ *Staphylococcus aureus* ซึ่ง AOAC ได้รับรองให้ Petrifilm สำหรับเชื้อบางชนิดเป็นวิธีที่เลือกใช้ได้อีกวิธีหนึ่งนอกเหนือจากวิธี Conventional พร้อมทั้งแจ้งเงื่อนไขในการวิเคราะห์ไว้ด้วย

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างอาหาร วิธี Petrifilm™ ได้รับการรับรองระดับ First Action จาก AOAC (Knight *et al*, 1997) มีข้อดีคือลดขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เกิดความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์และทำให้การวินิจฉัยยีสต์ง่ายขึ้นเนื่องจากโคโลนีของยีสต์ที่ขึ้นบน Petrifilm จะมีสีเฉพาะซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อโรงงานผลิตอาหารเพื่อการส่งออกในการควบคุมคุณภาพความปลอดภัยด้านเชื้อราและยีสต์ของผลิตภัณฑ์ให้ตรงตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าและประกันคุณภาพสินค้าทั้งในระหว่างขั้นตอนการผลิตจนถึงการเก็บรักษา นอกจากนี้การหาปริมาณเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารแห้งมักประสบปัญหาในการวิเคราะห์ คือเชื้อราบางสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เมื่อนำมาอบเพาะเชื้อ 3-5 วันจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เส้นใยจะเจริญฟูลันออกมาภายนอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สปอร์ของเชื้อราฟุ้งกระจายไปในบรรยากาศเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานวิเคราะห์และสปอร์นี้อาจเข้าไปปนเปื้อนก่อความเสียหายในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่นๆได้ แต่ถ้าวิเคราะห์ด้วยวิธี Petrifilm™ จะลดปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ได้ เนื่องจากแผ่นฟิล์มสองแผ่นที่ประกบกันจะแนบสนิท ไม่มีช่องว่างเหมือนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปเป็นการช่วยจำกัดการแพร่กระจายของเส้นใยเชื้อราได้บางส่วน

คณะผู้วิจัยเล็งเห็นความสำคัญนี้จึงทำการทดสอบเปรียบเทียบวิธี Petrifilm ™ กับวิธี Conventional เพื่อเก็บรวมรวมข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์และประเมินความถูกต้อง แม่นยำของวิธี Petrifilm™ ว่าเป็นที่ยอมรับได้หรือไม่ในการนำมาใช้หาปริมาณเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารทะเลแห้งที่ผลิตเพื่อการส่งออกได้แก่ ปลาแห้ง, ปลาปรุงรสแห้ง, ปลาหมึกแห้ง, กุ้งแห้ง ฯลฯ ซึ่งส่งมาตรวจวิเคราะห์เพื่อขอใบรับรองคุณภาพ (Health certification) ที่กองอาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 65 ตัวอย่าง

เครื่องมือและอุปกรณ์

จัดเตรียมเครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ตามวิธีวิเคราะห์ที่ระบุใน FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th Edition, 1992,AOAC International, Arlington,VA 22201-3301 USA สำหรับเชื้อราและยีสต์

การทดลอง

1. วิธี Petrifilm™

เป็นวิธีที่บริษัท 3 M (3M Company, St.Paul, MN) เป็นผู้พัฒนาขึ้นโดยดัดแปลงมาจากวิธี Standard plate count เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อราและยีสต์และเป็นวิธีแบบอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (ready-made medium system) ตัวแผ่นฟิล์มรูปวงกลมขนาด 30 ตารางเซนติเมตรถูกเคลือบด้วยอาหาร Modified Sabouraud agar ที่เติม 3% dextrose และวุ้นที่รวมตัวได้กับน้ำเย็น (cold-soluble gelling agent) ส่วนบนแผ่นฝาปิดเคลือบด้วยสารปฏิชีวนะ Chlortetracycline และ Chloramphenicol ซึ่งจะแพร่กระจายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้มีการเติมสี (dye) เพื่อเป็น indicator โดยสีนี้จะมีความไวต่อเอ็นไซม์ phosphatase ที่พบในเชื้อรา ยีสต์ และผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภท เกิดเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินขึ้นทำให้การนับจำนวนง่ายขึ้น ควรนับโคโลนีที่อยู่ในช่วง 15-150 โคโลนีต่อชุดฟิล์มเท่านั้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อราและยีสต์จะแตกต่างกันดังต่อไปนี้ (3M Health Care)

ยีสต์	เชื้อรา
โคโลนีขนาดเล็ก	โคโลนีขนาดใหญ่
มีขอบโคโลนีที่ชัดเจน	ขอบโคโลนีจะกระจายออก เนื่องจากเส้นใย
สี pink-tan จนถึงสี blue-green	มีได้หลายสีเนื่องจากเชื้อรา สามารถสร้าง pigment ได้เองด้วย
โคโลนีอาจนูนเป็น 3 มิติ	โคโลนีแบนเรียบ
ปกติจะไม่มีจุดโฟกัสหรือจุดเข้มตรงกลางโคโลนี (dark center)	ปกติจะมีจุดโฟกัสตรงกลางโคโลนี

2. วิธี Standard Plate Count (Conventional method)

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ปรับให้ได้ค่า pH 3.5 ด้วย 10 % Tartaric acid (AOAC International, 1992)

ขั้นตอนของการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เติม phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร

2. เตรียม serial ten-fold dilution ดังนี้ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

3. ปิเปตสารละลายแต่ละdilution 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อของทั้ง 2 วิธีโดยทำ duplicate

4. อบเพาะเชื้อที่ 25°C, 3-5 วัน

5. นับจำนวนโคโลนีโดยเลือกจานที่มีเชื้อประมาณ 15-150 โคโลนี

6. เขี่ยเชื้อที่สงสัยไปตรวจสอบยืนยันด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. คำนวณจำนวนโคโลนีต่อกรัมของอาหารโดยหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วย dilution factor

การวิเคราะห์ด้านสถิติ

ค่าจำนวนโคโลนี ของเชื้อราและยีสต์ต่อกรัมของอาหาร (CFU/ g) ที่นำมาวิเคราะห์ทางสถิติเป็นค่า $\log_{10}$ ของ CFU/g

ค่า repeatability (r)

เพื่อประเมินความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีวิเคราะห์ โดยค่า r เป็นช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (95 % reliability interval) สำหรับความแตกต่างระหว่าง 2 ซ้ำ (duplicate)

ค่า r $= 2^*\sqrt{2}\ ^* S_r$

$= 2.83\ ^* S_r$

ค่า S_r, repeatability standard deviation

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็นการวัดความคลาดเคลื่อนระหว่าง 2 ซ้ำมีค่า

S_r = รากที่สองของ $\frac{\sum d^2}{2n}$

n = จำนวนตัวอย่างอาหาร

d = ผลต่างของจำนวนนับระหว่างสองซ้ำ

(ISO 5725 :1994)

การตรวจสอบ

ค่า repeatability (r) ของวิธี Petrifilm™ (alternative method) และวิธี Conventional (reference method) จะนำมาเปรียบเทียบกันได้จากการคำนวณค่า

$F = (S_{r\ ;\ alt} / S_{r\ ;\ ref})^2$

F-table = ค่าแสดงความน่าจะเป็นเมื่อ

$S_{r\ ;\ alt} = S_{r\ ;\ ref}$ (probability, p (F))

n = จำนวนตัวอย่าง

ค่า F-table แสดงในตาราง 5 % (Roman Type) และ 1 % (Bold Face Type) Points for The Distribution of F ตัวอย่างเช่น เมื่อ n=12 ค่า $F_{\alpha = 0.05\ ;\ 12\ ;12} = 2.69$

ถ้าค่า F (หรือ 1/F) จากการคำนวณ > $F_{\alpha = 0.05\ ;\ n\ ;\ n}$ จากตาราง แสดงว่าค่า repeatability (r) ของทั้งสองวิธีที่เปรียบเทียบกันนั้นมีความแตกต่างกัน (ISO 5725 :1994, part 2)

รีเกรชชันเส้นตรง (Linear Regression)

$X = \log_{10}$ CFU/g (ค่าเฉลี่ย) ของวิธี Petrifilm™

$Y = \log_{10}$ CFU/g (ค่าเฉลี่ย) ของวิธี Conventional

สมการเส้นตรง $y = a + bx$

b = สัมประสิทธิ์รีเกรชชัน

a = ค่าจุดตัดแกน y เมื่อ x = 0

ค่า $S_{y.x}$ (residual standard deviation) = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย Y ที่ได้จากการวิเคราะห์จริงและค่าเฉลี่ย Y ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้เส้นรีเกรชชัน

เมื่อ $S_{y.x}$ มีค่า < 0.2 log units แสดงว่าวิธีทางจุลชีววิทยาที่ทำการเปรียบเทียบนี้ยอมรับได้(Vlaemynck G.M.,1994)

สหสัมพันธ์เส้นตรง (Linear Correlation)

ดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรงอย่างง่าย (Correlation coefficient , r_{xy}) = ค่าที่แสดงอัตราตัวแปร 2 ตัวผันแปรอย่างเกี่ยวข้องกันหรืออัตราของความใกล้ชิด อย่างไรก็ตามกรณีที่จะใช้ความผันแปรในลักษณะหนึ่ง (X) เพื่อใช้อธิบายความผันแปรในอีกลักษณะหนึ่ง (Y) โดยหลักการจะไม่อธิบายโดยการใช้ค่า r โดยตรง แต่จะอธิบายโดยใช้ค่า Coefficient of determination (r_{xy}^2) ตัวอย่างเช่น ถ้าหากค่า r ระหว่าง X กับ Y เท่ากับ 0.7 เพราะฉะนั้น $r^2 = 0.49$ ในกรณีนี้อาจจะสรุปได้ว่าประมาณ 49 % ของความผันแปรใน X (หรือ Y) จะสามารถอธิบายได้โดยความผันแปรใน Y(หรือ X)

(จันทลักขณา จ., 2523)

ผล

ผลการนับจำนวนเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งจำนวน 65 ตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1

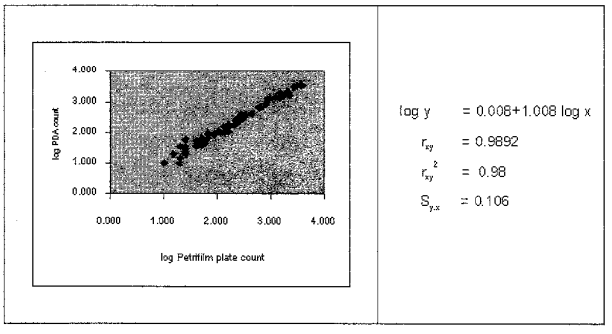
ตารางที่ 1 แสดงค่า log ของจำนวนโคโลนีต่อกรัมของอาหารแบบ duplicate (sub1, sub2) จากการหาปริมาณเชื้อราและยีสต์โดยการใช้ PDA agar และ Petrifilm

ตย.ที่	Conventional (log CFU/g)		Petrifilm (log CFU/g)		ตย.ที่	Conventional (log CFU/g)		Petrifilm (log CFU/g)	
	เชื้อรา	ยีสต์	เชื้อรา	ยีสต์		เชื้อรา	ยีสต์	เชื้อรา	ยีสต์
1	1.00, 1.48	4.08, 3.98	1.00, 1.30	4.10, 4.03	34	2.18, 2.32	4.03, 4.00	2.11, 2.30	4.00, 3.97
2	1.00, 1.48	3.36, 3.45	1.00, 1.30	3.34, 3.49	35	2.23, 2.30	1.70, 1.78	2.38, 2.28	1.78, 1.60
3	1.00, 1.30	2.62, 2.70	1.48, 1.00	2.72, 2.79	36	2.28, 2.20	3.93, 3.95	2.34, 2.26	3.99, 3.96
4	1.00, 1.00	3.93, 3.85	1.00, 1.48	3.90, 3.85	37	2.30, 2.41	4.00, 4.03	2.32, 2.40	4.09, 4.12
5	1.00, 1.30	2.53, 2.46	1.00, 1.48	2.61, 2.57	38	2.41, 2.38	3.86, 3.91	2.43, 2.36	3.91, 3.93
6	1.00, 1.00	3.60, 3.68	1.00, 1.00	3.69, 3.58	39	2.40, 2.49	3.74, 3.83	2.34, 2.38	3.72, 3.76
7	1.30, 1.30	2.46, 2.54	1.60, 1.00	2.52, 2.59	40	2.41, 2.51	2.60, 2.54	2.49, 2.43	2.61, 2.58
8	1.30, 1.70	4.40, 4.32	1.00, 1.48	4.38, 4.30	41	2.45, 2.40	1.60, 1.70	2.26, 2.41	1.48, 1.78
9	1.30, 1.48	1.90, 1.85	1.30, 1.48	1.90, 2.11	42	2.49, 2.54	4.07, 4.09	2.45, 2.52	4.11, 4.10
10	1.48, 1.60	1.30, 1.00	1.00, 1.60	1.48, 1.00	43	2.57, 2.59	3.95, 4.00	2.49, 2.36	3.92, 3.87
11	1.48, 1.90	4.12, 4.00	1.70, 1.70	4.10, 4.04	44	2.54, 2.52	3.96, 3.95	2.48, 2.41	3.97, 4.01
12	1.48, 1.70	4.18, 4.30	1.60, 1.60	4.28, 4.40	45	2.56, 2.58	3.45, 3.41	2.49, 2.54	3.57, 3.52
13	1.48, 1.48	2.85, 2.76	1.48, 1.30	2.77, 2.69	46	2.56, 2.66	4.14, 4.05	2.60, 2.66	4.04, 4.11
14	1.60, 1.48	2.41, 2.26	1.70, 1.48	2.46, 2.54	47	2.79, 2.85	4.74, 4.59	2.72, 2.81	4.62, 4.69
15	1.60, 1.70	3.53, 3.45	1.48, 1.70	3.48, 3.41	48	2.86, 2.79	2.04, 2.18	2.77, 2.83	2.28, 2.36
16	1.70, 1.85	2.54, 2.52	1.48, 1.30	2.56, 2.65	49	2.95, 3.20	3.28, 3.36	2.90, 2.97	3.20, 3.32
17	1.70, 1.78	2.08, 2.23	1.48, 1.70	2.11, 2.28	50	2.95, 3.11	3.32, 3.38	2.85, 3.00	3.40, 3.58
18	1.70, 1.95	3.34, 3.43	1.70, 1.90	3.52, 3.59	51	2.97, 2.90	2.26, 2.18	2.93, 2.86	2.30, 2.43
19	1.70, 1.48	4.75, 4.74	1.60, 1.78	4.71, 4.66	52	3.08, 3.20	3.52, 3.41	3.15, 3.18	3.48, 3.30
20	1.78, 1.78	2.75, 2.76	1.85, 1.60	2.51, 2.61	53	3.11, 3.30	3.63, 3.56	3.28, 3.18	3.65, 3.60
21	1.78, 1.48	4.56, 4.68	1.85, 1.70	4.59, 4.67	54	3.11, 3.15	4.59, 4.63	2.90, 3.04	4.68, 4.61
22	1.90, 2.00	3.32, 3.28	1.85, 2.00	3.54, 3.46	55	3.15, 3.18	4.05, 3.98	3.00, 3.15	4.00, 3.97
23	1.90, 2.15	3.54, 3.49	1.90, 2.11	3.62, 3.76	56	3.20, 3.28	3.98, 3.95	3.36, 3.32	4.06, 4.00
24	1.90, 2.08	2.93, 2.99	2.15, 1.95	2.96, 3.01	57	3.20, 3.26	3.81, 3.90	3.23, 3.26	3.86, 3.91
25	1.95, 1.70	1.78, 1.78	1.85, 1.48	1.85, 1.70	58	3.23, 3.34	3.84, 3.73	3.20, 3.32	3.86, 3.81
26	1.95, 2.00	3.67, 3.70	1.70, 1.90	3.72, 3.81	59	3.26, 3.32	3.51, 3.59	3.11, 3.23	3.61, 3.65
27	1.95, 2.15	1.48, 1.85	2.23, 2.08	1.70, 1.95	60	3.28, 3.18	3.89, 3.83	3.23, 3.15	3.92, 3.86
28	2.00, 2.04	3.91, 4.01	2.08, 2.18	3.97, 4.07	61	3.30, 3.26	3.95, 3.91	3.11, 3.20	3.86, 3.84
29	2.04, 2.11	2.18, 2.32	2.08, 2.20	2.36, 2.45	62	3.41, 3.32	3.65, 3.57	3.26, 3.36	3.69, 3.61
30	2.04, 2.11	2.81, 2.75	2.28, 2.08	2.73, 2.68	63	3.48, 3.51	3.28, 3.36	3.38, 3.46	3.30, 3.46
31	2.08, 2.00	3.28, 3.36	2.15, 2.23	3.46, 3.32	64	3.49, 3.60	4.70, 4.75	3.54, 3.59	4.71, 4.77
32	2.15, 2.26	2.34, 2.26	2.04, 2.18	2.43, 2.36	65	3.53, 3.56	4.95, 5.00	3.49, 3.46	4.86, 4.99
33	2.18, 2.23	3.32, 3.38	2.08, 2.20	3.40, 3.49					

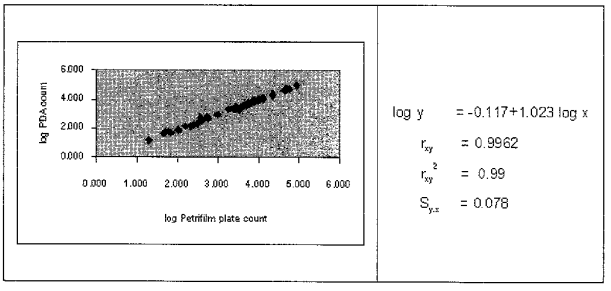
การเปรียบเทียบของทั้งสองวิธีด้วยรีเกรชชันเส้นตรงและสหสัมพันธ์เส้นตรงโดยแกน Xเป็นวิธี Petrifilm ™ : แกน Y เป็นวิธี Conventional ได้ผลดังนี้

การนับจำนวนเชื้อราได้	สมการเส้นตรง log y	= 0.008+1.008 log x
	ค่าดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรงอย่างง่าย (r_{xy})	= 0.9892
	ค่า Coefficient of determination (r_{xy}^2)	= 0.98
	ค่า residual standard deviation ($S_{y.x}$)	= 0.106
การนับจำนวนยีสต์ได้	สมการเส้นตรง log y	=- 0.117+1.023 logx
	ค่าดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรงอย่างง่าย (r_{xy})	= 0.9962
	ค่า Coefficient of determination (r_{xy}^2)	= 0.99
	ค่า residual standard deviation ($S_{y.x}$)	= 0.078
การนับจำนวนเชื้อราและยีสต์ได้	สมการเส้นตรง log y	= -0.043+1.006 logx
	ค่าดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรงอย่างง่าย (r_{xy})	= 0.9959
	ค่า Coefficient of determination (r_{xy}^2)	= 0.99
	ค่า residual standard deviation ($S_{y.x}$)	= 0.070

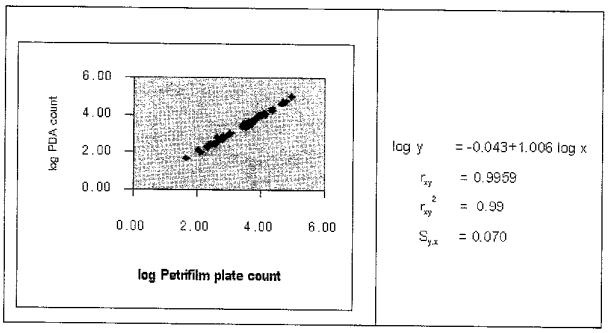
แสดงใน รูปที่ 1, รูปที่ 2, รูปที่ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log PDA count และ log Petrifilm plate countในการนับจำนวนเชื้อรา



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log PDA count และ log Petrifilm plate countในการนับจำนวนยีสต์



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log PDA count และ log Petrifilm plate count ในการนับจำนวนเชื้อราและยีสต์

การประเมินความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีวิเคราะห์โดยคำนวณหาค่า repeatability และตรวจสอบค่า repeatabilityของทั้งสองวิธีที่ได้ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ด้วยค่าF จัดทำตามลำดับชั้นของการปนเปื้อนเชื้อราและยีสต์ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า Standard deviation for repeatability (Sr) ,repeatability (r) ,F ที่คำนวณได้ และ F ในตาราง ของวิธี Conventional และวิธี Petrifilm ™ ตามลำดับชั้นของการปนเปื้อนเชื้อราและยีสต์

ชนิดของเชื้อ	จำนวนตัวอย่าง	วิธี Conventional (log units)		วิธี Petrifilm ™ (log units)		F- Distribution (α=0.05)		
		Sr	r	Sr	r	F $(Sr_{alt}/Sr_{ref})^2$	1/F	F-table
เชื้อรา								
X< 100	24	0.171	0.484	0.224	0.634	1.72	0.58	1.98
100 ≤ X< 1,0005	25	0.071	0.202	0.084	0.238	1.40	0.71	1.96-1.92
1,000 ≤ X< 10,000	16	0.073	0.224	0.068	0.192	0.74	1.35	2.33
ทั้งหมด	65	0.120	0.339	0.150	0.424	1.56	0.64	1.54-1.49
ยีสต์								
X< 1,000	21	0.096	0.270	0.119	0.337	1.57	0.64	2.09-2.06
1,000 ≤ X< 10,000	29	0.050	0.142	0.066	0.186	1.74	0.58	1.90-1.85
10,000 ≤ X< 100,000	16	0.060	0.169	0.060	0.141	0.69	1.45	2.43-2.39
ทั้งหมด	65	0.070	0.198	0.084	0.238	1.44	0.69	1.54-1.49
เชื้อราและยีสต์								
X< 1,000	19	0.065	0.185	0.079	0.223	1.48	0.68	2.21-2.15
1,000 ≤ X< 10,000	29	0.049	0.139	0.059	0.167	1.45	0.69	1.90-1.85
10,000 ≤ X< 100,000	17	0.056	0.157	0.047	0.132	0.70	1.43	2.29-2.23
ทั้งหมด	65	0.056	0.158	0.063	0.178	1.27	0.79	1.54-1.49

และการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของทั้งสองวิธีในหัวข้อต่างๆ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบวิธี Petrifilm ™ และวิธี Conventional

หัวข้อ	วิธี Petrifilm ™	วิธี Conventional
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ		
การเตรียม	-	✓
การทำให้ปราศจากเชื้อ	-	✓
การ pour plate	-	✓
การทำให้ปราศจากเชื้อหลังจากวิเคราะห์เสร็จ	✓	✓
2. การบ่มเชื้อ		
เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	3-5 วัน	3-5 วัน
เนื้อที่ในตู้บ่มเชื้อ (incubator)	ประหยัดเนื้อที่เพราะมีขนาดเล็กและเบากว่า	เปลืองเนื้อที่มากกว่า
3. การตรวจวินิจฉัยยีสต์	ง่ายกว่าเพราะโคโลนีมีสีเฉพาะ(blue-green)	ยากกว่าเพราะต้องเขี่ยเชื้อไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
4. ราคาอาหารเลี้ยงเชื้อต่อหน่วย	ประมาณ 40 บาท/แผ่น	ประมาณ 6 บาท/plate
5. การแพร่กระจายของสปอร์เชื้อรา (สายพันธุ์ที่เจริญได้รวดเร็ว)	ลดการแพร่กระจายได้	แพร่กระจายออกสู่บรรยากาศ

วิจารณ์

การเปรียบเทียบวิธี Conventional และ Petrifilm™ ใช้ตัวอย่างอาหารทะเลแห้งเพราะเป็นอาหารหลักที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์เชื้อราและยีสต์เพื่อการส่งออกและมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อเหล่านี้อยู่แล้วตามธรรมชาติโดยเฉพาะตัวอย่างที่มีการปรุงรส โคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนแผ่น Petrifilm ส่วนมากจะมีสี pink-tan จนถึง blue-green แต่บางครั้งก็พบโคโลนีสีส้ม, ขาวหรือครีม ในกรณีนี้จึงจำเป็นต้องเขี่ยเชื้อมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจยืนยัน (Beuchat L.R. *et al*, 1990) สำหรับเชื้อราบางสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเมื่อใช้วิธี Petrifilm™ เส้นใยจะถูกจำกัดให้เจริญอยู่ในแผ่นฟิล์มในขณะที่วิธี Conventionalจะมีเส้นใยเจริญฟูล้นออกมานอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การนำแผ่นฟิล์มไปบ่มเลี้ยงเชื้อจะประหยัดเนื้อที่โดยนำแผ่นฟิล์มซ้อนกันได้ประมาณ 20 แผ่น การเปรียบเทียบทางสถิติของทั้งสองวิธีด้วยรีเกรชชันเส้นตรงและสหสัมพันธ์เส้นตรงโดยแกน X เป็นวิธี Petrifilm™, แกนY เป็นวิธี Conventional จากสมการเส้นตรงที่ได้พบว่าวิธี Conventionalนับจำนวนเชื้อราได้มากกว่าวิธี Petrifilm™ และนับจำนวนยีสต์, เชื้อราและยีสต์ได้น้อยกว่าวิธี Petrifilm™ จำนวนที่นับได้จากสองวิธีจะมีความผันแปรต่อกันในลักษณะที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในทิศทางเดียวกัน เช่นวิธี Conventional ค่าที่นับได้เพิ่มขึ้น ค่าของวิธี Petrifilm™ ก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ค่าดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรงเท่ากับ 0.9892, 0.9962, 0.9959 และค่า coefficient of determination เท่ากับ 0.98, 0.99, 0.99 log units สำหรับการนับจำนวนเชื้อรา, ยีสต์, เชื้อราและยีสต์ตามลำดับ แสดงว่าความผันแปรของทั้งสองวิธีดังที่กล่าวมาแล้วมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันโดยคิดเป็นอัตราความใกล้ชิดสูงถึง 98-99 % ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของY ($S_{Y.X}$) มีค่า 0.106, 0.078, 0.070 log units สำหรับการนับจำนวนเชื้อรา, ยีสต์, เชื้อราและยีสต์ตามลำดับ ซึ่ง

น้อยกว่า 0.2 log unitsแสดงว่าจำนวนที่นับได้จากสองวิธีนี้เป็นที่ยอมรับได้ว่าไม่แตกต่างกัน

สำหรับการหาค่า repeatability พบว่าวิธี Petrifilm ™ ในการนับจำนวนเชื้อรา, ยีสต์, เชื้อราและยีสต์มีค่า r มากกว่าวิธี Conventional ยกเว้นลำดับชั้นการปนเปื้อนเชื้อราที่1,000 $\leq$ X < 10,000 และลำดับชั้นการปนเปื้อนยีสต์, เชื้อราและยีสต์ที่10,000 $\leq$ X < 100,000 มีค่าน้อยกว่า เมื่อทำการตรวจสอบค่า repeatability ของทั้งสองวิธีนี้ในทุกลำดับชั้นด้วยค่า F-Distribution พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้นที่ลำดับชั้นการปนเปื้อนเชื้อราของตัวอย่างทั้งหมด (65 ตัวอย่าง) พบว่า F ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า F-table ดังนั้นค่า r ในลำดับชั้นนี้มีความแตกต่างกัน แต่ถ้าพิจารณาจากค่าFที่มากกว่ากันเล็กน้อย, ค่า 1/F มีค่าน้อยกว่า F-table ทำให้สรุปได้ว่าความเที่ยงตรง (precision)ของทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติทั้งหมดที่ได้ทำคือการหาค่า repeatability, ค่าดรรชนีสหสัมพันธ์เส้นตรง, ค่า coefficient of determination และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของY ($S_{Y.X}$) พบว่าวิธี Petrifilm™ ให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำในระดับที่ยอมรับได้

สรุป

จากผลการศึกษาพบว่าการนับจำนวนเชื้อรา, ยีสต์, เชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งด้วยวิธี Petrifilm™ เป็นวิธีที่เลือกใช้ได้อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งมีข้อดีคือสะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลาและแรงงาน ปลอดภัยจากการแพร่กระจายของสปอร์เชื้อรา และมีผลที่ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ แต่มีข้อเสียคือราคาแพงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Conventional โดยไม่คิดค่าใช้จ่ายด้านเครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งพิจารณาผลงานวิจัยในการทำ Collaborative Study ของบริษัท 3 M ที่ได้รับการรับรองระดับ First Action ของ AOAC แล้ววิธี Petrifilm™ นี้ควรจะเป็นวิธีที่ยอมรับได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญศรี รอดมา ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต ที่ปรึกษาโครงการวิจัยเป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และคุณปิยนาถ ลีวิวัฒน์ ผู้อำนวยการกองอาหารส่งออกที่ให้การสนับสนุนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จันทลักขณา จ. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, 2523:71-95

AOAC International. FDA Bacteriology Analytical Manual 7 th Edition Arlington, VA 22201-3301 USA , 1992 : 227-234

Beuchat L.R., Nail B.V., Brackett R .E. and Fox T.L.. Evaluation of a Culture Film (Petrifilm™ YM) Method for Enumerating Yeasts and Molds in Selected Dairy and High-Acid Foods. J Food Protection 1990;53(10) :864,869-874

ISO 5725 : 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results :
Parts 1. General principles and definition.
Parts 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
Parts 3. Use in practice of accuracy values

Knight *et al.*Comparision of the Petrifilm Dry Rehydrate Film and Conventional Culture Methods for Enumeration of Yeasts and Molds in Foods: Collaborative Study. J. AOAC International 1997;80(4) :806-823

3M Health Care. Interpretation Guide Petrifilm ™ Yeast and Mold Count Plate

Vlaemynck G.M.. Comparison of Petrifilm™ and Plate count Methods for Enumerating Molds and Yeasts in Cheese and Yogurt. J. Food Protection 1994; 57(10) : 913-914