

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา
Coliform Bacteria และ *Escherichia coli*
ด้วยวิธี International Standards Organization
และ Lactose Peptone Broth ในตัวอย่างน้ำใช้จากฟาร์มสัตว์
Comparison of the International Standards Organization
Reference Method and Lactose Peptone Broth for the
Detection of Coliform Bacteria and *Escherichia coli* in
Water from the Animal Farms

สุกัญญา ทองรัตนสกุล*, ศรีสมัย วิริยารัมพะ, นงเยาว์ ดอนสมไพร,

สุวรรณา ทิพยรักษ์, จุรีย์ ปานกำเหนิด, สาหร่าย พูลเพิ่ม

และชัยเทพ พูลเขตต์

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Sukanya Thongratsakul*, Srisamai Viriyarampa, Nongyao Donsomphai,

Suwanna Tipayarak, Churee Pankamhoed, Sarai Poolperm

and Chaithep Poolkhet

Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,

Kamphaeng Sean Campus, Kamphaeng Sean, Nakhon Pathom, 73140

บทคัดย่อ

ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิด coliform bacteria และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ในน้ำเพื่อใช้ในการอุปโภคและบริโภคภายในฟาร์มสัตว์นับเป็นปัญหาหนึ่งที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์และเกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกร การตรวจสอบคุณภาพน้ำให้ได้ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำใช้ในฟาร์มจึงเป็นสิ่งสำคัญ เกษตรกรจำเป็นต้องส่งตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการเป็นประจำสม่ำเสมอและรอผลการตรวจอย่างน้อย 4-6 วันจึงจะทราบผล ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงทำการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด lactose peptone broth (LPB) กับวิธีการตรวจตามมาตรฐาน ของ International

Standards Organization (ISO) Reference 9308-2 ซึ่งได้แก่วิธี most probable number (MPN) เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ coliform และ *E. coli* จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB กับตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจทั้งสิ้นจำนวน 201 ตัวอย่าง ผลการศึกษาที่ได้พบว่าประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ต่อเชื้อ coliform bacteria มีค่าความไวและค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 87.74 และ 88.42 ตามลำดับ และสำหรับการตรวจหาเชื้อ *E. coli* พบว่ามีค่าความไวและค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 95.59 และ 87.22 ตามลำดับ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ระดับ 0.5 CFU/ 100 ml (ร้อยละ 60) ในระดับ 1 CFU/100 ml (ร้อยละ 70) และระดับ 1.5-2.5 CFU/100 ml (ร้อยละ 100) ซึ่งเป็นผลดีต่อการเฝ้าระวังในการปรับปรุงคุณภาพน้ำให้มีประสิทธิภาพก่อนนำน้ำไปใช้ประโยชน์ เกษตรกรสามารถตรวจได้ด้วยตนเอง เนื่องจากง่ายต่อการใช้งาน ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อ coliform และ *E. coli* ทำให้ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ภายใน 24-48 ชั่วโมง

คำสำคัญ : most probable number; lactose peptone broth; coliform bacteria; *Escherichia coli*

Abstract

The problem of bacterial contamination of Coliform bacteria and *Escherichia coli* (*E. coli*) in water used for consumption in farm animals is the one of the major problems affecting to the health of livestock and causes economic losses of farmers. Therefore monitoring of water quality in livestock is important. Consequently, determination of water quality in laboratory could be done routinely but it took time at least 4-6 days for final report. In this study, the efficacy of the lactose peptone broth (LPB) based on the standard protocol of International Standards Organization (ISO) Reference 9308-2 was compared with that most probable number (MPN) method for microbiological quality of water. The totally of water samples for examination were 201 samples. The studies have found that the performance of the LPB to detect coliform bacteria with the sensitivity and the specificity were 87.74 and 88.42 % respectively. The detection of *E. coli* was found in the sensitivity and the specificity were 95.59 and 87.22 %, respectively. Furthermore, LPB can be detected the *E. coli* at level of 0.5 CFU/100 ml at 60 %. The level of 1 CFU/100 ml can be detected at 70 % and the level of 1.5-2.5 CFU/100 ml can be detected at 100 %. This is effective for surveillance and importance for improve the water quality in livestock. Moreover, the LPB can reduce the turnaround time of Coliform and *E. coli* detection within 24-48 hours and easy to perform.

Keywords: most probable number; lactose peptone broth; coliform bacteria; *Escherichia coli*

1. บทนำ

ปัจจุบันระบบการผลิตปศุสัตว์ในประเทศไทยมีการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง เกษตรกรจึงพยายามควบคุมปัจจัยที่มีผลกระทบต่อระบบการผลิต ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการผลิตสัตว์คือคุณภาพน้ำที่ใช้ในฟาร์ม ซึ่งสาเหตุที่ทำให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมอาจเกิดจากการปนเปื้อนของ coliform bacteria และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงกับสุขภาพสัตว์และเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพของน้ำที่ใช้ โดย coliform bacteria และ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (Gram negative rod) อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งสามารถพบเชื้อได้เป็นปกติในลำไส้ของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และพบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ ด้วยเหตุนี้ *E. coli* จึงมีความสำคัญและใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะของฟาร์ม การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลภายในฟาร์มจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเลี้ยงสัตว์ [1]

สำหรับมาตรฐานน้ำที่ใช้ในปศุสัตว์นั้นจะต้องตรวจไม่พบ *E. coli* [2] ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องส่งน้ำที่ใช้ในฟาร์มมาตรวจสอบคุณภาพตามห้องปฏิบัติการเป็นประจำ โดยใช้วิธีตามมาตรฐานของ ISO reference method (9308-2) หรือวิธี most probable number (MPN) [3] ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้น (presumptive test) ถึงโอกาสในการพบเชื้อกลุ่ม coliform bacteria โดยปกติแบคทีเรียกลุ่มนี้จะหมักน้ำตาลแลคโตสและทำให้เกิดสภาพเป็นกรด [1,4] สำหรับขั้นตอนการตรวจด้วยวิธี MPN ที่ใช้เป็นมาตรฐานต้องบ่มตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด lauryl sulfate tryptose (LST) broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊สและทดสอบต่อด้วย อาหารชนิด brilliant green lactose bile (BGLB) อีก 24-48 ชั่วโมง

คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊สนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารชนิด EC broth บ่มที่ 44 ± 0.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเกิดแก๊สขึ้นจะบ่งบอกว่าเป็นเชื้อกลุ่ม fecal coliform หลังจากนั้นเพื่อยืนยัน *E. coli* [3] จำเป็นต้องนำเชื้อที่ได้ไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด eosin-methylene blue (EMB) agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 °C เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนีเฉพาะที่บ่งบอกว่าเป็น *E. coli* ซึ่งใช้เวลารวมทั้งสิ้นประมาณ 4-6 วัน [5] หากเป็นฟาร์มที่อยู่ห่างไกลอาจไม่สะดวกในการเดินทางและเสียเวลาในการส่งตัวอย่าง ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด lactose peptone broth (LPB) กับวิธีมาตรฐาน ISO และเพื่อพัฒนาชุดทดสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB สำหรับตรวจหา coliform bacteria และ *E. coli* ที่ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อ และเพื่อให้เกษตรกรสามารถตรวจสอบได้สะดวกยิ่งขึ้น สามารถตรวจได้เองในภาคสนาม โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีและการเกิดแก๊สโดยวางที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

ได้แก่ (1) lauryl sulfate tryptose (LST) broth (2) brilliant green Lactose bile (BGLB) broth (3) EC broth (4) eosin-methylene blue (EMB) agar (5) lactose peptone broth (LPB) และ (6) Kovacs' reagent

2.2 ตัวอย่างและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำที่ใช้ในฟาร์มสัตว์ที่ส่งตรวจกับหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ต้องการตรวจหา coliform bacteria และ *E. coli*

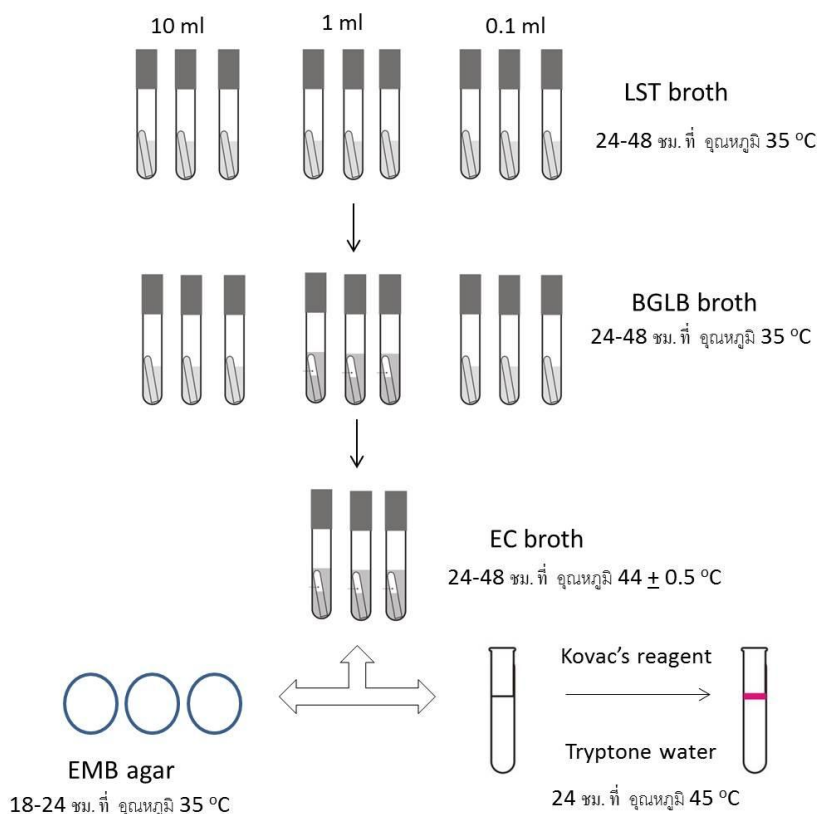
ตามมาตรฐานน้ำใช้ในฟาร์ม ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนสิงหาคม 2556 โดยทำการตรวจเปรียบเทียบระหว่างวิธี MPN และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB จำนวนทั้งสิ้น 201 ตัวอย่าง

2.3 วิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงคุณภาพเพื่อเปรียบเทียบในการตรวจสอบ coliform bacteria และ *E. coli* ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB โดยเปรียบเทียบกับวิธี most probable number (MPN) ตามมาตรฐานของ ISO 9308-2, 1990, Water quality. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 2: Most probable number method. International Organization for Standardization (ISO) [3]

2.3.1 วิธี most probable number

(MPN) นำตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจหา coliform bacteria และ *E. coli* ปริมาตร 10 ml (double strength) 1 และ 0.1 ml (single strength) ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth และมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) บรรจุอยู่ภายใน ความเข้มข้นละ 3 หลอด รวมเป็น 9 หลอด จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกหลอดที่มีแก๊สจาก LST broth หลังจากบ่มเขื่อนาน 24-48 ชั่วโมง แต่ละของเหลวมาใส่ใน BGLB broth นำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่เกิดแก๊ส นำผลที่ได้ไปอ่านผลตามตาราง MPN เพื่อหาปริมาณ coliform bacteria (รูปที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการตรวจหา coliform bacteria และ *E. coli* ด้วยวิธี MPN [3]



รูปที่ 2 ลักษณะแก๊สในหลอดดักแก๊สด้วยวิธี MPN method

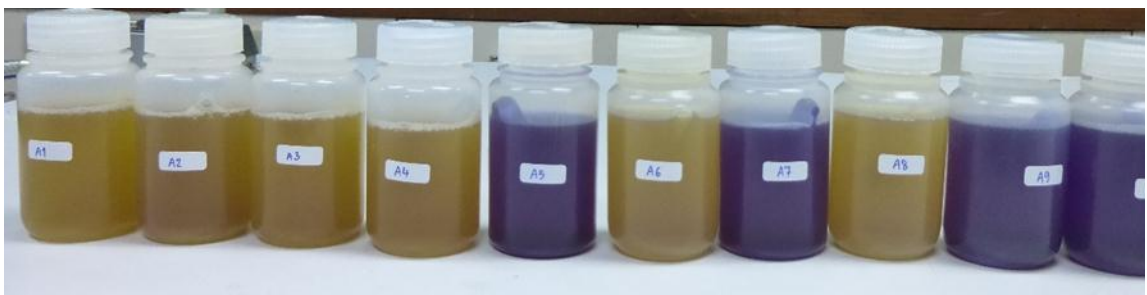
ในการยืนยันผล *E. coli* คัดเลือกหลอดที่มีแก๊สจาก BGLB broth หลังจากบ่มเชื้อนาน 24-48 ชั่วโมง และของเหลวมาใส่ใน EC broth นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 44 ± 0.5 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นและของเหลวจากหลอด EC broth ที่เกิดแก๊สมา streak บน EMB agar ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone water ขนาด 10 ml นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 44 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลลักษณะของ *E. coli* ที่ได้จะมีลักษณะสีเขียวเข้มมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) จาก EMB agar และหยดสารละลาย Kovacs' reagent ใน tryptone water สังเกตการเกิดวงแหวนสีแดงเพื่อยืนยัน *E. coli*

2.3.2 วิธีการตรวจด้วยชุดทดสอบอาหาร

เลี้ยงเชื้อชนิด lactose peptone broth (LPB) อาหารเลี้ยงเชื้อ lactose peptone broth (LPB) มีส่วนประกอบ ได้แก่ pancreatic digest of casein, soy peptone, lactose, sodium chloride โดยมี indicator คือ bromocresol purple ปริมาณ 3.5 g บรรจุในขวด polypropylene bottle (PP) ขนาด 100 ml หลอดดักแก๊ส (Durham tube) ดังรูปที่ 3 จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบปริมาณ 100 ml โดยไม่ต้องทำการเจือจางมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดแก๊สและการเปลี่ยนแปลงสีของตัวอย่างน้ำที่นำมาตรวจ และยืนยันผล *E. coli* ด้วยสารละลาย Kovacs' reagent (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ก่อนใส่ตัวอย่างน้ำภายในมีหลอดดักแก๊ส



รูปที่ 4 ชุดทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ที่มีการใส่ตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจ ผลการทดลองให้สีเหลืองร่วมกับการเกิดแก๊สแสดงการให้ผลบวก หากเกิดสีม่วงแสดงการให้ผลลบ

2.3.3 การหาค่า detection limit ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด lactose peptone broth (LPB) ด้วยเชื้ออ้างอิง *E. coli* ATCC 25922 ทำการเตรียมตัวอย่างเชื้ออ้างอิง *E. coli* ATCC 25922 ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 CFU/100 ml โดยการเตรียม *E. coli* อ้างอิงให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นนำเชื้ออ้างอิง *E. coli* ATCC 25922 ที่ทราบความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 CFU/100 ml มาทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB โดยทำที่ความเข้มข้นละ 10 ข้ำ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ติดตามผลโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีและการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สของและบันทึกผล

2.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล คำนวณหาความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ของชุดทดสอบเปรียบ เทียบกับวิธีมาตรฐาน ISO 9308-2 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Win Episcope 2 ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 %

3. ผลการวิจัย

3.1 การหาความไวและความจำเพาะในการตรวจหา coliform bacteria ด้วย lactose peptone broth

จากตัวอย่างน้ำจากฟาร์มสัตว์ที่นำมาส่งตรวจยังหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวนทั้งสิ้น 201 ตัวอย่าง พบว่าการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ให้ผลสอดคล้องกับวิธีของ ISO 9308-2 โดยที่ให้ผลบวกต่อ coliform bacteria จำนวน 93 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46 และให้ผลลบจำนวน 84 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 41.8 ตามลำดับ แต่ให้ผลที่แตกต่างกับวิธี ISO โดยวิธี ISO ให้

ผลบวกในขณะที่ยาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ให้ผลลบ (ผลลบเทียม) จำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.47 ตัวอย่าง และวิธี ISO ให้ผลลบในขณะที่ยาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ให้ผลบวก (ผลบวกเทียม) จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.48 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ต่อ coliform bacteria ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 % เป็นร้อยละ 87.74, 88.42, 89.42 และ 86.60 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ coliform bacteria ด้วยวิธี ISO 9308-2, 1990 และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB

LPB	ISO 9308-2		
	positive	negative	total
positive	93	11	104
negative	13	84	97
total	106	95	201

3.2 การหาความไวและความจำเพาะในการตรวจหา *E. coli* ด้วย lactose peptone broth จากการทดสอบการตรวจหา *E. coli* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB พบว่าการทดสอบด้วย LPB ให้ผลสอดคล้องกับ ISO 9308-2 โดยที่ให้ผลบวกกับ *E. coli* จำนวน 65 ตัวอย่าง และให้ผลลบ จำนวน 116 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32.34 และ 57.72 ตามลำดับ แต่ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยวิธี ISO ให้ผลบวกในขณะที่ยาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ให้ผลลบ จำนวน 3 ตัวอย่าง และวิธี ISO ให้ผลลบในขณะที่ยาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ให้ผลบวก จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.5 และ 8.46 ตามลำดับ โดยมีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบของ

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ต่อ *E. coli* ที่ช่วงความเข้มข้น 95 % เป็นร้อยละ 95.59, 87.22, 79.27 และ 97.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบการตรวจ *E. coli* ด้วยวิธี ISO และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB

LPB	ISO 9308-2		
	positive	negative	total
positive	65	17	82
negative	3	116	119
total	68	113	201

3.3 Detection limit ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด lactose peptone broth (LPB) ผลการทดสอบหาค่า detection limit ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ในการตรวจ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 CFU/100 ml ทำการทดสอบจำนวน 10 ข้าง ในแต่ละความเข้มข้น โดยเกณฑ์การตัดสินให้ได้ผลบวกสังเกตจาก 2 ลักษณะ คือ เกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลืองและการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 0.5 CFU/100 ml ร้อยละ 60 (6/10) ที่ความเข้มข้น 1 CFU/100 ml พบร้อยละ 70 (7/10) ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 และ 2.5 CFU/100 ml พบว่าให้ผลได้ถึงร้อยละ 100 (10/10) โดยพบการเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ 24-48 ชั่วโมง หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาตรวจยืนยัน *E. coli* ด้วยสารละลาย Kovacs' reagent ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกพบว่าให้ผลบวกโดยเกิดวงแหวนสีแดงทุกตัวอย่าง

4. วิจารณ์และสรุป

ผลการทดลองที่ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ในชุดทดสอบจะตัดสินจากการบ่มเพาะเชื้อ

ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง โดยพิจารณาจาก 2 ลักษณะ คือ การเปลี่ยนสีของ bromocresal purple ที่ใช้เป็น indicator จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส เนื่องจาก coliform bacteria เมื่อมีการเจริญเติบโตจะมีการใช้อาหารจำพวกน้ำตาลแลคโตสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LPB ทำให้เกิดความเป็นกรดเพิ่มขึ้น จึงเปลี่ยนสีของ bromocresal purple จากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง [6] และนอกจากจะสร้างกรดแล้ว เชื้อยังสร้างแก๊สโดยสังเกตจากแก๊สในหลอดดักแก๊ส ดังนั้นในกรณีที่เกิดลักษณะเพียงหนึ่งลักษณะ เช่น เกิดการเปลี่ยนสีของ indicator แต่ไม่เกิดแก๊สในการทดลองนี้สามารถพบได้บางครั้ง จะไม่สามารถนับว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ coliform bacteria เมื่อตรวจด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ในชุดทดสอบ และสำหรับการตรวจยืนยัน *E. coli* ทำการทดสอบ indole test โดยการหยดสาร Kovacs' reagent ถ้าเกิดวงแหวนสีแดงขึ้นแสดงว่าให้ผลบวกต่อ *E. coli* (รูปที่ 5) ข้อดีของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB คือ ใช้เวลาในการยืนยันผล *E. coli* ได้เร็วกว่าวิธี ISO ที่จำเป็นต้องทำการยืนยันโดยการเพาะเชื้อลงบน EMB agar และต้องใช้เวลารวมทั้งสิ้น 4-6 วันในการยืนยันผลต่อ *E. coli* เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB แบคทีเรีย *E. coli* จะสามารถใช้ tryptophan ที่มีอยู่ในอาหารผลิตเป็นสาร indole ที่สามารถตรวจสอบได้โดยการหยดสาร Kovacs' reagent เพื่อยืนยันผลได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง ทำให้ทราบผลได้อย่างรวดเร็วมากกว่าวิธีตามมาตรฐานการตรวจ *E. coli* ของวิธี ISO 9308-2 สำหรับผลการทดลองของ LPB ที่ไม่สอดคล้องกับวิธี ISO 9308-2 ในเรื่องผลบวกเทียมและผลลบเทียมอาจเกิดเนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างน้ำที่นำมาใช้ในการตรวจเริ่มต้นไม่เท่ากัน โดยวิธี ISO 9308-2 ใช้ปริมาตรน้ำเริ่มต้นเท่ากับ 10, 1 และ 0.1 ml เพื่อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ในขณะที่การทดลองของชุดทดสอบ LPB ใช้

ปริมาตรน้ำเริ่มต้นเท่ากับ 100 ml ทำให้อาจพบผลบวกเทียมได้ นอกจากนี้มีรายงานการให้ผลบวกจากการทดสอบ indole test ในเชื้อกลุ่ม coliforms ชนิดอื่นนอกเหนือจาก *E. coli* เช่น *Klebsiella* spp. [7] ในกรณีของการเกิดผลบวกเทียมอาจเกิดเนื่องจากวิธี MPN เป็นการทำการหลายซ้ำในขณะที่ชุดทดสอบ LPB เป็นการทดสอบเพียงหนึ่งครั้งต่อตัวอย่างจึงอาจทำให้เกิดผลบวกเทียมได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้พัฒนาเพื่อลดการผลบวกเทียมและผลลบเทียมต่อไป



รูปที่ 5 การเกิดวงแหวนสีแดงจากปฏิกิริยา indole test ต่อ *E. coli*

นอกจากนั้นผลการทดสอบค่า detection limit ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB ซึ่งสามารถตรวจพบ *E. coli* ได้ตั้งแต่ที่ระดับ 0.5 และ 1.0 CFU/100 ml ถึงร้อยละ 60 และ 70 ตามลำดับ และระดับ 1.5 CFU/100 ml เป็นต้นไป สามารถตรวจได้ถึงร้อยละ 100 โดยค่ามาตรฐานน้ำใช้ในฟาร์มปศุสัตว์ จะต้องตรวจพบ coliform bacteria ได้ไม่เกิน 2.2 MPN/100 cm³ และต้องตรวจไม่พบ *E. coli* [8] ซึ่งในกรณีนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้ในระดับที่น้อยมาก อันจะเป็นผลดีต่อการเฝ้าระวังให้กับเกษตรกรในการปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ไม่มีประสิทธิภาพก่อนที่จะนำน้ำไปใช้ทั้งเพื่อการบริโภคและอุปโภคภายในฟาร์มสัตว์

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าบางครั้งเกิดลักษณะเพียงหนึ่งลักษณะ เช่น เกิดการเปลี่ยนสีของ indicator แต่ไม่เกิดแก๊ส หรือเกิดแก๊สขึ้นแต่สีของ indicator เปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน เป็นต้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม non coliform bacteria [1] ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงการลดโอกาสที่แบคทีเรียชนิดอื่นทำให้เกิดลักษณะที่ให้ผลบวกเทียม อย่างไรก็ตาม การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LPB เพื่อการตรวจหา coliform bacteria และ *E. coli* มีข้อดีหลายประการ คือ ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อ และเพื่อให้เกษตรกรสามารถตรวจสอบได้สะดวกยิ่งขึ้น สามารถตรวจได้เองในภาคสนาม เนื่องจากใช้ง่าย อุปกรณ์ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังพบว่าชุดทดสอบนี้มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบค่อนข้างสูง ซึ่งควรได้พัฒนาต่อไปในรูปของชุดทดสอบเพื่อการค้าในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roubin, M.R. and Laurent, P., 2002, Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches, J. Microbiol. Methods 49: 31-54.
- [2] กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, มาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสุกรของประเทศไทย พ.ศ. 2542, แหล่งที่มา : <http://www.dld.go.th/>

- certify/th/images/stories/BLSC/standard%20farm/law/s_f_1/9Pig.PDF, 25 กันยายน 2556.
- [3] World Health Organization (WHO), Drinking water quality: Annex 5 Multiple-tube method for thermotolerant (faecal) coliforms, แหล่งที่มา : http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/2edvol3i.pdf, 25 กันยายน 2556.
- [4] Pitkanen, T., Paakkari, P., Miettinen, I.T., Heinonen-Tanski, H., Paulin, L. and Hanninen, M.L., 2007, Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water, J. Microbiol. Methods 68: 522-529.
- [5] Dogan, H.B., Cakir, I., Baspinar, E. and Halkman, A.K., 2002, Comparison of LST + MUG broth technique and conventional method for the enumeration of *Escherichia coli* in foods, Lett. Appl. Microbiol. 34: 274-278.
- [6] Leclercq, A., Wanegue, C. and Baylac, P., 2002, Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods, Appl. Environ. Microbiol. 68: 1631-1638.
- [7] Liu, Y., Mee, B.J. and Mulgrave, L., 1997, Identification of clinical isolates of indole-positive *Klebsiella* spp., including *Klebsiella planticola*, and a genetic and molecular analysis of their beta-lactamases, J. Clin. Microbiol. 35: 2365-2369.
- [8] กรมควบคุมมลพิษ, มาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อการบริโภค, แหล่งที่มา : http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water01.html#s3, 25 กันยายน 2556.