



คู่มือการปฏิบัติงาน

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารสัตว์น้ำ

สำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

โดย

กลุ่มวิจัยและพัฒนาการตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์น้ำ

กองวิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ

ภารกิจห้องปฏิบัติการกองวิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ

อาหารสัตว์น้ำเป็นปัจจัยการผลิตหลักในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ กรมประมงจึงให้ความสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อให้ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำมีคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมถึงควบคุมคุณภาพของอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการทางโภชนาการของสัตว์น้ำ โดยการดูแล ควบคุม ให้ผู้ประกอบการปฏิบัติตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 รวมถึงกฎระเบียบ ข้อบังคับที่ประเทศคู่ค้ากำหนด ตลอดจนส่งเสริมให้ผู้ประกอบการดำเนินการตามหลักเกณฑ์การปฏิบัติทางสุขลักษณะที่ดี (Good Hygiene Practices, GHPs) หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point-HACCP) และระบบมาตรฐานคุณภาพโรงงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ด้วยกรมประมงตระหนักถึงความจำเป็นในการสนับสนุนให้มีการปฏิบัติตามกฎหมายและเพื่อประโยชน์ทางการค้าควบคู่กัน ทั้งนี้ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่อาจก่อให้เกิดอาหารสัตว์น้ำเสื่อมคุณภาพ คือ การเกิดเชื้อรา สารพิษจากเชื้อรา และพบเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงต้องคัดเลือกวัตถุดิบที่ดีในการนำมาผลิตประกอบสูตรอาหารสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามด้วยความหลากหลายของประเภทวัตถุดิบ เช่น ข้าวโพด กากถั่วเหลือง มันสำปะหลัง ฯลฯ และแหล่งที่มาซึ่งมีหลายพื้นที่ อีกทั้งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิภาคร้อนชื้น มีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในผลผลิตทางการเกษตร หากเก็บรักษาไม่ถูกวิธีก็สามารถทำให้เกิดเชื้อต่างๆ ได้ หากมีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบและการผลิตอาหารสัตว์น้ำที่ดี เมื่อนำอาหารไปใช้เลี้ยงสัตว์น้ำจะทำให้สัตว์น้ำใช้ประโยชน์ได้ดี ดังนั้นการตรวจสอบทางจุลชีววิทยา สามารถช่วยลดภัยคุกคามที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพและผลผลิตสัตว์น้ำ และควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์น้ำให้ปลอดภัยเป็นไปตามกฎหมายและมาตรฐานสากล

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

ลำดับ	รายการ	วิธีทดสอบ/เทคนิคที่ใช้
รายการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อรา		
1	เชื้อซัลโมเนลลา (<i>Salmonella</i> spp.)	In-house Method : Based on International Standard ISO 6579:2002
2	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (Total Bacteria)	Rapid Method : 3M Petrifilm Aerobic Count Plate
3	เชื้อรารวม (Total Mold)	Rapid Method : 3M Petrifilm Yeast and Mold Count Plate, 3M Petrifilm Rapid Yeast and Mold Count Plate
4	อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin)	Elisa-Enzyme immunoassay: R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC

วิธีทดสอบเรื่อง : เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.)

1. ขอบข่าย (Scope)

วิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์น้ำ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

In-house Method : Based on International Standard ISO 6579:2002 (Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.).

3. หลักการ (Principle)

ทำการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ Buffered Peptone Water เป็น Pre-enrichment medium และ ดูดเชื้อ ลงใน Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (ISO) (MKTTn broth) และ Rappaport and Vassiliadis Broth (RVS broth) เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อก่อนทำการ Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Selective agar ได้แก่ Hektoen Enricic Agar (HE agar) และ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD agar) จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและ Serological confirmation

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 อุปกรณ์

- 4.1.1 หมอนึ่งฆ่าเชื้อ
- 4.1.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- 4.1.3 ตูบมเชื้อ
- 4.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 4.1.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 4.1.6 เครื่องเตรียมพร้อมเจือจางตัวอย่างอัตโนมัติ
- 4.1.7 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง
- 4.1.8 ตู้ปลอดเชื้อ
- 4.1.9 เครื่อง pH meter
- 4.1.10 ไมโครปิเปต
- 4.1.11 loop เชื้อเชื้อไมโครปิเปต ทิป ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 200 ไมโครลิตร
- 4.1.12 เข็มเชื้อเชื้อ
- 4.1.13 จานเลี้ยงเชื้อ
- 4.1.14 ตะเกียงแกส
- 4.1.15 สไลด์
- 4.1.16 กระดาษกรอง
- 4.1.17 loop เชื้อเชื้อ
- 4.1.18 หลอดทดลองฝาเกลียว

4.1.19 ซ้อนดักสาร

4.2 สารเคมี (Reagent)

4.2.1 Buffered Peptone Water (BPW)

4.2.2 Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (ISO) (MKTTn broth)

4.2.3 Rappaport and Vassiliadis Broth (RVS broth)

4.2.4 Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD agar)

4.2.5 Hektoen Enteric Agar (HE agar)

4.2.6 Nutrient Agar (NA)

4.2.7 Triple Sugar Iron Agar (TSI agar)

4.2.8 MIL Medium

4.2.9 Urea Broth

4.2.10 Kovac 's reagent

4.2.11 Serological test

4.2.12 3% H₂O₂

4.2.13 แอลกอฮอล์ (70% v/v)

4.2.14 1 N NaOH

4.2.15 1 N Acetic acid

5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่เก็บไว้จากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

6.1 Pre-enrichment

ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เต็ม Buffered Peptone Water 225 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเตรียมพร้อมเจือจางตัวอย่างอัตโนมัติ ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาที มัดปากถุงหลวมๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง

6.2 Selective Enrichment

นำถุงตัวอย่างที่บ่มครบตามกำหนดเวลาออกจากตู้บ่มเชื้อ เขย่าถุงเบาๆ ก่อนดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ฉายเชื้อลงใน MKTTn broth 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง และดูดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร ฉายเชื้อลงใน RVS broth 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 41.5 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง

6.3 Selective Plating

6.3.1 เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำหลอด MKTTn broth และ RVS broth มา Streak ลงบนเพลทของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ HE agar และ XLD agar นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง โดยพลิกให้เพลทด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน

6.3.2 ลักษณะโคโลนีที่เป็นบวกของ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

- HE agar: โคโลนีมีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดปานกลาง สีเขียวน้ำเงิน จนถึงสีน้ำเงิน อาจพบจุดหรือไม่พบจุดดำตรงกลางโคโลนี อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีสีเขียว
- XLD agar: โคโลนีมีรูปร่างกลม ขนาดปานกลาง สีชมพูหรือสีแดง อาจพบจุดหรือไม่พบจุดดำตรงกลางโคโลนี เนื่องจากมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาหารบริเวณรอบๆ โคโลนีจะเป็นสีแดง

6.3.3 เมื่อครบตามกำหนดเวลา สามารถสังเกตลักษณะโคโลนีที่เป็นบวกของ *Salmonella* spp. บน HE agar พบโคโลนีมีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดปานกลาง สีเขียวน้ำเงิน จนถึงสีน้ำเงิน อาจพบจุดหรือไม่พบจุดดำตรงกลางโคโลนี อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีสีเขียว และ XLD agar พบโคโลนีมีรูปร่างกลม ขนาดปานกลาง สีชมพูหรือสีแดง อาจพบจุดหรือไม่พบจุดดำตรงกลางโคโลนี เนื่องจากมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาหารบริเวณรอบๆ โคโลนีจะเป็นสีแดง หากมีเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีที่เป็นบวกบน HE agar หรือ XLD agar ให้ทำการเลือกมา 2 โคโลนีหรือมากกว่า กรณีที่ไม่มีลักษณะโคโลนีที่เป็นบวก ให้เลือกลักษณะโคโลนีที่เป็นลบมา 2 โคโลนีหรือมากกว่า จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Plate) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง พลิกให้เพลทด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

6.4 Biochemical Screening

6.4.1 การทดสอบในอาหาร MIL

ใช้เข็มเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวมา 1 โคโลนี จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (plate) นำไป Stab ลงในสวนของ Butt ในลักษณะแนวตั้งตรง กดผาหลวมๆ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง อาหารทดสอบชนิดนี้ ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อได้ 3 ประการ คือ (1) Motility test : ผลบวก พบแนวการเคลื่อนที่ของเชื้อกระจายนอกแนวรอยแทงของเชื้อเป็นรอยขุ่น และเกิด Cloudy ทั่วหลอด ซึ่ง *Salmonella* spp. จะให้ผลเป็นบวก ในขณะที่ผลลบ เชื้อเกิดแนวขุ่นเฉพาะบริเวณรอยแทง แต่ไม่เกิด Cloudy

(2) ทดสอบความสามารถในการสร้าง Indone: ทดสอบการเกิด indone จากแบคทีเรียที่สร้าง enzyme Tryptophanase โดยการหยด Kovac 's reagent ลงในอาหาร หากพบว่ามีชั้นสีชมพูอยู่ด้านบนอาหาร แสดงว่าให้ผลบวก แต่หากอาหารไม่เปลี่ยนสีจะให้ผลเป็นลบ ซึ่ง *Salmonella* spp. จะให้ผลการทดสอบ indone เป็นลบ

(3) การทดสอบการเกิด Decarboxylase ของ Lysine: แบคทีเรียจะทำให้เกิด Decarboxylation ของกรดอะมิโน โดย Enzyme decarboxylase จะย่อยสลายกรดอะมิโนได้เอมีนและ CO₂ ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยวิธีการเปลี่ยนแปลง pH โดยใช้ Indicator ซึ่ง *Salmonella* spp. ให้ผล Lysine เป็นบวกแสดงว่าเชื้อสามารถสร้าง Enzyme lysine decarboxylase เกิดการย่อย Lysine ได้เป็น Cadaverine และ CO₂ อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง pH เป็นต่าง Indicator เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีม่วง ในขณะที่ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี

6.4.2 การทดสอบ Urease test

ใช้เข็มเย็บเชื้อที่ถ่ายเชื้อลงใน MIL แล้วมาถ่ายเชื้อตอลงใน Urea Agar โดย Streak บนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Slant ปดฝาหลวมๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 + 1 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ± 3 ชั่วโมง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เป็นการทดสอบการสร้าง Enzyme Urease ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ แบคทีเรียที่สามารถสร้าง Enzyme Urease ได้ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย ซึ่งจะทำให้ pH ของอาหารเป็นต่าง เปลี่ยนสี Indicator จากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น ผลเป็นบวก ในขณะที่ผลลบ คือ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง

6.4.3 การทดสอบการใช้น้ำตาลใน TSI

ใช้เข็มเย็บเชื้อที่ถ่ายเชื้อลงใน NA (Slant) แล้วมาถ่ายเชื้อตอลงใน TSI (Slant) โดย Streak บนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI (Slant) และ Stab เชื้อบนหลอดอาหารเดียวกัน ปดฝาหลวมๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 + 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI ดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การอ่านผลการทดสอบจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI

Test	Result		Salmonella species reaction
	Positive	Negative	
1. Slant	Yellow slant (Acid from lactose and/or Sucrose)	Red slant (Alkaline)	K
2. Butt	Yellow butt (Acid from glucose)	Red butt (Alkaline)	A
3. Gas	Gas	No gas	+
4. H ₂ S	Blackening	No blackening	+, -

หมายเหตุ ; K = Alkaline , A = Acid

- ส่วน Butt สีชมพู ส่วน Slant สีส้ม แสดงว่า ไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ กลูโคส แล็กโทส และซูโครส
- ส่วน Butt สีเหลือง ส่วน Slant สีแดง แสดงว่า มีการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส และหรือซูโครส
- ส่วน Butt สีเหลือง ส่วน Slant สีเหลือง แสดงว่า มีการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แล็กโทส และหรือซูโครส
- อาหารมีรอยแยก หรือยกตัวขึ้น แสดงว่า มีการผลิตก๊าซ
- อาหารมีสีดำ (Blackening of agar) แสดงว่า มีการสร้าง H_2S

โดยเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถใช้กลูโคสได้เพียงอย่างเดียว จึงให้ผลใน TSI เป็น K/A มีแก๊ส และอาจจะสร้างหรือไม่สร้าง H_2S

6.4.4 ใช้เข็มเย็บเชื้อที่ถ่ายเชื้อลงในอาหารเชื้อ Urea agar แล้วมาถ่ายเชื้อลงใน NA (Slant) โดย Streak บนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Slant) ปิดฝาหลวมๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบ Oxidase test และ Catalase test ต่อไป

6.4.4.1 Oxidase test

หยด Kovac's reagent ลงบนกระดาษกรอง แล้วนำแท่งแก้วเย็บเชื้อที่เลี้ยงใน NA (Slant) มาขีดบนกระดาษกรอง โดยเป็นการทดสอบหา Cytochrome C oxidase ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะไป Oxidize สารเคมีทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง ผลบวก คือ เป็นสีม่วงเข้มตรงรอยขีดภายใน 10 วินาที และผลลบ คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนสี

6.4.4.2 Catalase test

เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้ โดยนำแท่งแก้วเย็บเชื้อที่เลี้ยงใน NA (Slant) มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยด 3% H_2O_2 สังเกตว่ามีฟองอากาศหรือไม่ ต้อสังเกตผลทันที ถ้ามีการสร้างฟอง O_2 แสดงว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ แคตาเลสได้ ให้ผลเป็นบวก และผลลบ คือ ไม่เกิดฟอง

6.5 Serological test

ทำการทดสอบโดยซีโรวิทยาโดยวิธี Slide agglutination โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับแอนติซีรัม (Antiserum) จำเพาะ มีขั้นตอนดังนี้

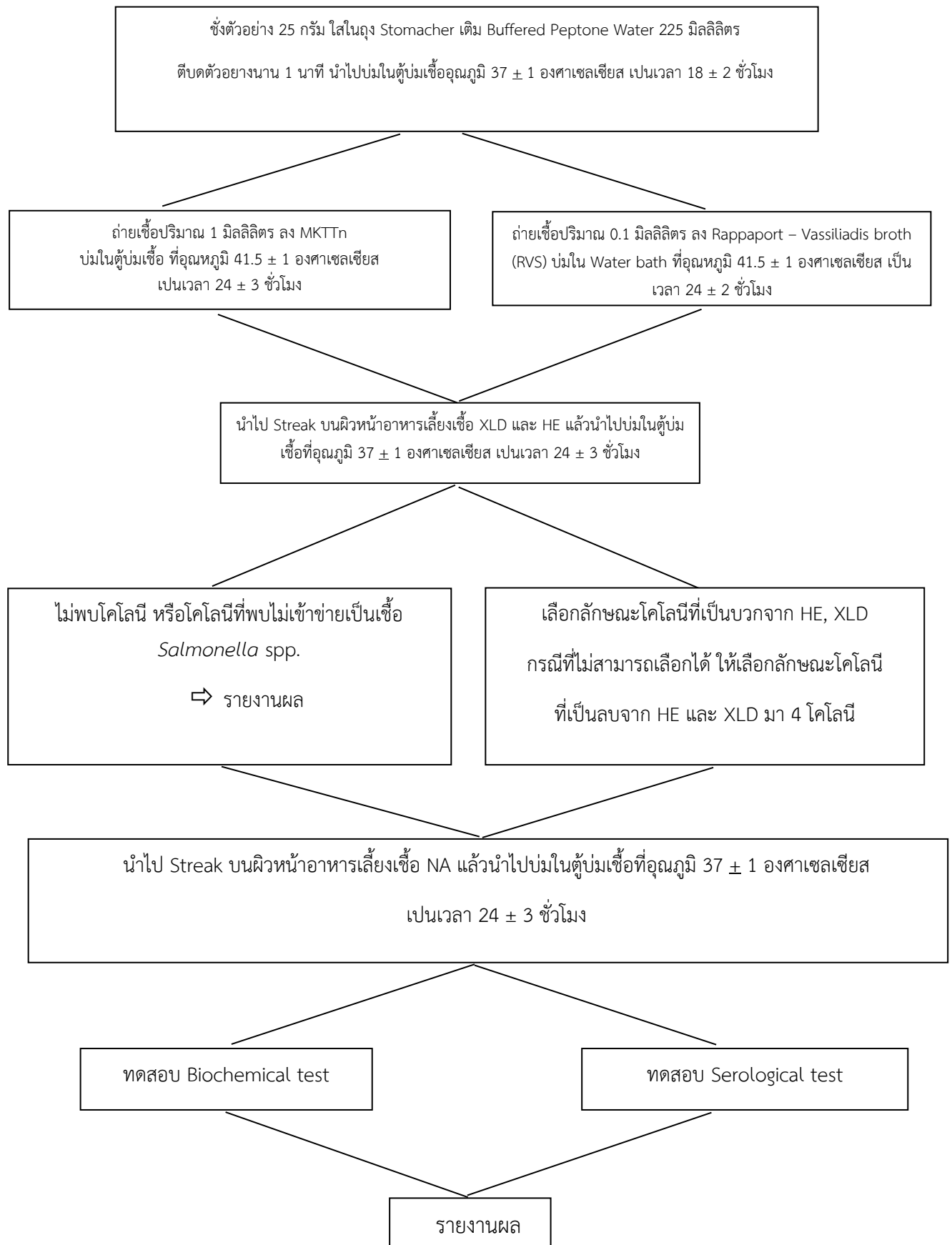
6.5.1 หยด Antiserum *Salmonella* Polyvalent A-I บน Slide 1 หยด เชื้อเชื้อจาก NA (Plate) มา จะเห็นภายใน 30 – 60 วินาที ถ้าตกตะกอนต่อ Antiserum แสดงว่ามี Antigen ต่อ Antiserum แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น Group ไต จะต้องนำมาทดสอบกับ Antiserum เดี่ยวแต่ละ Group ต่อไป

6.5.2 นำเชื้อจาก NA (Slant) มาทดสอบกับ Antiserum เดี่ยวแต่ละ Group คือ *Salmonella* Group B, Group C, Group D และ Group E ถ้าผลให้ Group ไตบวก ให้รายงานว่าเป็น *Salmonella* Group นั้น

7. การรายงานผล (Expression of results)

รายงานผลว่า พบ (D; Detect) หรือไม่พบ (ND; Not Detect) เชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม

แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการทดสอบเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.)



แผนภาพที่ 2 แสดงวิธีการทดสอบเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.)

การทดสอบเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.)

วันที่ 1 : เตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered peptone Water (BPW)



วันที่ 2 : เตรียมตัวอย่างและบ่มตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW

ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 18 ± 2 ชั่วโมง

Pre- Enrichment



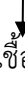
วันที่ 3 : ถ่ายตัวอย่างจากวันที่ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

RVS broth และ MKTTn broth

- RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง

- MKTTn broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง

Selective – Enrichment



วันที่ 4 : ถ่ายตัวอย่างจากวันที่ 3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Agar และ HE Agar โดยการ streak plate

บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง



วันที่ 5 : คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลา ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI, MIL, Urea, NA

บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง



วันที่ 6 : ทดสอบยืนยันผล Biochemical Test และ Serological test

(การวิเคราะห์โดยการตรวจแอนติบอดี) อ่านผลและแปลผลการวิเคราะห์



วันที่ 7 : รายงานผลการวิเคราะห์

รวมระยะเวลาในการทดสอบเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) ทั้งหมด 7 วัน

วิธีทดสอบเรื่อง : อะฟลาทอกซิน (Total Aflatoxin)

1. ขอบข่าย (Scope)

วิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Total Aflatoxin) ในอาหารสัตว์น้ำ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Elisa-Enzyme immunoassay: R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC

3. หลักการ (Principle)

ทำการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Total Aflatoxin) ในอาหารสัตว์น้ำ ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELIZA) โดยใช้ชุดทดสอบสารพิษอะฟลาทอกซิน (RIDASCREEN Aflatoxin SC) หลังจากนั้นทำการแปลผล และรายงานผล

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 อุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่องบดตัวอย่าง
- 4.1.2 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 4.1.3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 4.1.4 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์
- 4.1.5 เครื่อง Vortex
- 4.1.6 เครื่อง Microplate reader
- 4.1.7 ไมโครปิเปต
- 4.1.8 ไมโครปิเปต ทิป
- 4.1.9 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
- 4.1.10 ซ้อนตักสาร
- 4.1.11 จุกยาง
- 4.1.12 หลอดทดลอง
- 4.1.13 กรวยกรอง
- 4.1.14 กระดาษกรอง เบอร์ 1
- 4.1.15 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
- 4.1.16 Microwell holder และ Microtiter wells Free Aflatoxin (หลุม)
- 4.1.17 นาฬิกาจับเวลา

4.2 สารเคมี (Reagent)

- 4.2.1 ชุดทดสอบ Fast Aflatoxin SC
- 4.2.2 เมทานอล (70% v/v)
- 4.2.3 น้ำกลั่น

5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่เก็บไว้จากตุ่มเหียน ตั้งทิ้งไว้ให้เหียนที่อุณหภูมิห้อง และนำเข้าเครื่องบดตัวอย่างให้ละเอียด

6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 6.1 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ และเติมเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร
- 6.2 นำเข้าเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ 300 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 6.3 กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ในหลอดทดลอง
- 6.4 ดูดตัวอย่างที่กรองได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1
- 6.5 ดูด Standard 50 ไมโครลิตร ลงใน Microtiter well (หลุม) ของ Microwell holder ที่ A1 และดูดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ A2 ต่อไปตามจำนวนตัวอย่าง
- 6.6 เติม Enzyme conjugate 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม Standard และตัวอย่าง
- 6.7 เติม Anti-aflatoxin antibody solution 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม Standard และตัวอย่าง เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 6.8 เทสารละลายในหลุมทิ้ง โดยคว่ำ Microwell holder ลง และเคาะลงบนกระดาษซับเพื่อให้สารละลายออกจากหลุมให้หมด ล้างหลุมด้วย Washing buffer อย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วเทสารละลายออกให้หมด
- 6.9 เติม Substrate/Chromogen 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม Standard และตัวอย่าง เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 6.10 เติม stop solution 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม Standard และตัวอย่าง เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน อ่านผลด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาที

7. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

7.1 การอ่านผล

7.1.1 เครื่องและโปรแกรม SPECTROstar^{Nano}

7.1.2 โปรแกรม Ridasoft Win.NET

7.2 การรายงานผล

รายงานผลเป็น ppb โดยรายงานเป็นตัวเลขทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถ้าผลที่ได้ต่ำกว่า 2.00 ppb ให้รายงานผลเป็นน้อยกว่า 2.00 ppb

แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการทดสอบอะฟลาทอกซิน (Total Aflatoxin)

การวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซิน (Total Aflatoxin)

วันที่ 1 : เตรียมอุปกรณ์และตัวอย่างทดสอบ



วันที่ 2 : ทำการทดสอบ Elisa-Enzyme immunoassay: R-Biopharm RIDASCREEN FAST® Aflatoxin SC



อ่านผล และแปลผลการทดสอบ



วันที่ 3 : รายงานผลการทดสอบ

รวมระยะเวลาในการทดสอบอะฟลาทอกซิน (Total Aflatoxin) ทั้งหมด 3 วัน

วิธีทดสอบเรื่อง : ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (Total Bacteria)

1. ขอบข่าย (Scope)

วิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียรวมในอาหารสัตว์น้ำ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Rapid Method: 3M Petrifilm Aerobic Count Plate

3. หลักการ (Principle)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (Total Bacteria) ในอาหารสัตว์น้ำ โดยใช้ Buffered Peptone Water เพนตัวละลาย (Diluent) และดูตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงตรงกลางแผ่น 3M Prtrifilm™ ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป ใช้สำหรับการตรวจนับจำนวนแอโรบิกแบคทีเรีย (Aerobic Bacteria) จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโต โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้น แปรผล และรายงานผล

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 อุปกรณ์

- 4.1.1 หมอนึ่งฆ่าเชื้อ
- 4.1.2 ตูบมเชื้อ
- 4.1.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 4.1.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 4.1.5 เครื่องเตรียมพร้อมเจือจางตัวอย่างอัตโนมัติ
- 4.1.6 เครื่องตีผสมตัวอย่าง
- 4.1.7 เครื่อง pH meter
- 4.1.8 เครื่อง Vortex
- 4.1.9 ไมโครปิเปต
- 4.1.10 ไมโครปิเปต ทิป ขนาด 1 ml. และ 200 ไมโครลิตร
- 4.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 4.1.12 ข้อนตักสาร
- 4.1.13 ขวด Duran
- 4.1.14 กระบอกตวง
- 4.1.15 Magnetic stirrer
- 4.1.16 หลอดทดลอง
- 4.1.17 ถังพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด 7×11 เซนติเมตร (ถัง Stomacher)
- 4.1.18 แผ่น Spreader
- 4.1.19 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

4.2 สารเคมี (Reagent)

- 4.2.1 Buffered Peptone Water (BPW)
- 4.2.2 3M Petrifilm TM Aerobic Count Plate (AC)
- 4.2.3 แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- 4.2.4 1 N NaOH
- 4.2.5 1 N Acetic acid

5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่เก็บไว้จากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 6.1 ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติม Buffered Peptone Water 225 มิลลิลิตร
- 6.2 ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที
- 6.3 นำถุงตัวอย่างที่คลุกผสมกันด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง (ถุงตัวอย่าง เท่ากับ 10-1)
- 6.4 เจือจางตัวอย่าง (Dilution) ทำตามลำดับๆ ละ 10 เท่า โดยดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ BPW 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1 เท่ากับ 10^{-2}) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 10 วินาที
- 6.5 เจือจางตัวอย่างจากหลอดทดลองในข้อ 7.4 โดยดูด 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ BPW 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2 เท่ากับ 10^{-3}) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 10 วินาที
- 6.6 เจือจางตัวอย่างจากหลอดทดลองในข้อ 7.5 โดยดูด 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ BPW 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2 เท่ากับ 10^{-4}) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 10 วินาที
- 6.7 วางแผ่น 3M Prtrifilm TM Aerobic Count Plate (AC) บนพื้นราบ เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น
- 6.8 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากหลอดทดลองแต่ละระดับความเจือจาง (หลอดที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ) 1 มิลลิลิตร ลงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่าง โดยให้ไมโครปิเปตตั้งฉากกับแผ่น 3M Prtrifilm TM แล้วปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลง
- 6.9 วางแผ่น Spreader ทาบลงบนแผ่น 3M PrtrifilmTM จับแกนกลางแผ่น Spreader กดจนเห็นตัวอย่างกระจายทั่วบริเวณวงกลมอย่าบิดหรือเลื่อนแผ่น Spreader หลังจากนั้นยกแผ่น Spreader ขึ้น และรอ 2 ถึง 3 นาที เพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัว ก่อนเคลื่อนย้ายแผ่น 3M Prtrifilm TM
- 6.10 บ่มแผ่น 3M Prtrifilm TM ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง โดยให้ด้านใสหงายขึ้น สามารถซ้อนกันได้ไม่เกิน 20 แผ่น

7. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

7.1 การอ่านผล

เลือกนับโคโลนีของแบคทีเรียจากแผ่น 3M Prtrifilm™ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10 – 300 โคโลนี

7.2 การคำนวณ

7.2.1 คำนวณจาก 2 ระดับความเจือจาง และมีจำนวนโคโลนีไม่น้อยกว่า 10 โคโลนี ใช้สูตร

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1.1 \times d} \dots\dots\dots (\text{สูตรที่ 1})$$

หมายเหตุ ; $\sum C$ คือ ผลรวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สามารถนับจำนวนได้จาก 2 ระดับความเจือจาง

V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)

d คือ ระดับความเจือจางแรกที่นับโคโลนีได้

7.2.2 คำนวณจาก 1 ระดับความเจือจาง และมีจำนวนโคโลนีไม่น้อยกว่า 10 โคโลนี ใช้สูตร

$$N = \frac{C}{V \times d} \dots\dots\dots (\text{สูตรที่ 2})$$

หมายเหตุ ; C คือ จำนวนโคโลนีที่นับได้จาก 1 ระดับความเจือจาง

V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)

d คือ ระดับความเจือจางแรกที่นับโคโลนีได้

7.2.3 คำนวณปริมาณ Low count กรณีที่ Initial suspension หรือ First dilution มีน้อยกว่า 10 โคโลนี แต่ไม่น้อยกว่า 4 โคโลนี โดยใช้สูตรที่ 1 และรายงานผลเป็นค่าประมาณการ (Estimated) แต่ถ้าน้อยกว่า 4 โคโลนี รายงานผลปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่า $4 \times d$ โคโลนีต่อกรัม (< 40 โคโลนีต่อกรัม) เมื่อ d คือ ค่า Dilution factor

7.3 การรายงานผล

7.3.1 รายงานผลเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

7.3.2 กรณีที่ Initial suspension หรือ First dilution ไม่มีโคโลนีแบคทีเรีย รายงานผลเป็น น้อยกว่า $1/d$ โคโลนีต่อกรัม (< 10 CFU/g) เมื่อ d คือ ค่า Dilution factor ของ Initial suspension หรือ First dilution $d = 10^0 = 1$

7.3.3 กรณีที่นับจำนวนโคโลนีต่อแผ่น 3M Prtrifilm™ ในทุกระดับการเจือจาง มากกว่า 300 โคโลนี ให้ทำการทดสอบซ้ำ โดยเจือจางเพิ่มขึ้น

7.3.4 ผลการคำนวณ ให้รายงานเลขนัยสำคัญ 2 หรือทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยการปิดเศษให้ดูเลขนัยสำคัญตำแหน่งที่ 3 ถ้าน้อยกว่า 5 ให้ปัดลง แต่ถ้ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 ให้ปัดเพิ่ม

แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการทดสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (Total Bacteria)

การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (Total Bacteria)

วันที่ 1 : เตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Peptone Water (BPW)



วันที่ 2 : ทำการทดสอบ โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ Dilution 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} และถ่ายตัวอย่างลงแผ่น 3M PrtrifilmTM บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 3 ชั่วโมง



24 ชม.

วันที่ 3 : อยู่ในขั้นตอนของการบ่มตัวอย่าง



48 ชม.

วันที่ 4 : อ่านผล และแปลผลการทดสอบ



วันที่ 5 : รายงานผลการทดสอบ

รวมระยะเวลาในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (Total Bacteria) ทั้งหมด 5 วัน

วิธีทดสอบเรื่อง : ปริมาณเชื้อรารวม (Total Mold)

1. ขอบข่าย (Scope)

วิเคราะห์หาปริมาณเชื้อรารวมในอาหารสัตว์น้ำ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Rapid Method : 3M Petrifilm Yeast and Mold Count Plate

3. หลักการ (Principle)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อรารวม (Total Mold) ในอาหารสัตว์น้ำ โดยใช้ Buffered Peptone Water เปนตัวละลาย (Diluent) และดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงตรงกลางแผ่น 3M Prtrifilm™ ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป ช่วยให้การแยกแยะโคโลนีทำได้ชัดเจน และนับง่าย จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อเพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโต โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (21 ถึง 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 120 ± 3 ชั่วโมง (5 วัน) หลังจากนั้นทำการตรวจนับเชื้อราที่เกิดขึ้น แปรผล และรายงานผล

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 อุปกรณ์

- 4.1.1 หมอนึ่งฆ่าเชื้อ
- 4.1.2 ตูบมเชื้อ
- 4.1.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 4.1.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 4.1.5 เครื่องเตรียมพร้อมเจือจางตัวอย่างอัตโนมัติ
- 4.1.6 เครื่องตีผสมตัวอย่าง
- 4.1.7 เครื่อง pH meter
- 4.1.8 เครื่อง Vortex
- 4.1.9 ไมโครปิเปต
- 4.1.10 ไมโครปิเปต ทิป
- 4.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 4.1.12 ข้อนตักสาร
- 4.1.13 ขวด Duran
- 4.1.14 กระบอกตวง
- 4.1.15 Magnetic stirrer
- 4.1.16 หลอดทดลอง
- 4.1.17 ถังพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด 7×11 เซนติเมตร (ถัง Stomacher)
- 4.1.18 แผ่น Spreader
- 4.1.19 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

4.2 สารเคมี (Reagent)

- 4.2.1 Buffered Peptone Water (BPW)
- 4.2.2 3M Petrifilm TM Yeast and Mold Count Plate (YM)
- 4.2.3 แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- 4.2.4 1 N NaOH
- 4.2.5 1 N Acetic acid

5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่เก็บไว้จากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 6.1 ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติม Buffered Peptone Water 225 มิลลิลิตร
- 6.2 ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที
- 6.3 นำถุงตัวอย่างที่คลุกผสมกันด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง (ถุงตัวอย่าง เท่ากับ 10-1)
- 6.4 เจือจางตัวอย่าง (Dilution) ทำตามลำดับๆ ละ 10 เท่า โดยดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ BPW 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1 เท่ากับ 10-2) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 10 วินาที
- 6.5 เจือจางตัวอย่างจากหลอดทดลองในข้อ 7.4 โดยดูด 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ BPW 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2 เท่ากับ 10-3) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 10 วินาที
- 6.6 วางแผ่น 3M Petrifilm TM Yeast and Mold Count Plate (YM) บนพื้นราบ เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น
- 6.7 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากหลอดทดลองแต่ละระดับความเจือจาง (ถุงตัวอย่าง หลอดที่ 1 และ 2 เท่ากับ 10-1 10-2 และ 10-3 ตามลำดับ) 1 มิลลิลิตร ลงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่าง โดยให้ไมโครเปตตั้งฉากกับแผ่น 3M Petrifilm TM แล้วปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลง
- 6.8 วางแผ่น Spreader ทาบลงบนแผ่น 3M PetrifilmTM จับแกนกลางแผ่น Spreader กดจนเห็นตัวอย่างกระจายทั่วบริเวณวงกลมอย่าบิดหรือเลื่อนแผ่น Spreader หลังจากนั้นยกแผ่น Spreader ขึ้น และรอ 2 ถึง 3 นาที เพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัว ก่อนเคลื่อนย้ายแผ่น 3M Petrifilm TM
- 6.9 บ่มแผ่น 3M Petrifilm TM ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) โดยให้ด้านใสหงายขึ้น สามารถซ้อนกันได้ไม่เกิน 20 แผ่น

7. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

7.1 การอ่านผล

เลือกนับโคโลนีของเชื้อราจากแผ่น 3M Prtrifilm™ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10 – 300 โคโลนี

7.2 การคำนวณ

7.2.1 คำนวณจาก 2 ระดับความเจือจาง และมีจำนวนโคโลนีไม่น้อยกว่า 10 โคโลนี ใช้สูตร

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times 1.1 \times d} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 1})$$

หมายเหตุ ; ΣC คือ ผลรวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สามารถนับจำนวนได้จาก 2 ระดับความเจือจาง

V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)

d คือ ระดับความเจือจางแรกที่นับโคโลนีได้

7.2.2 คำนวณจาก 1 ระดับความเจือจาง และมีจำนวนโคโลนีไม่น้อยกว่า 10 โคโลนี ใช้สูตร

$$N = \frac{C}{V \times d} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 2})$$

หมายเหตุ ; C คือ จำนวนโคโลนีที่นับได้จาก 1 ระดับความเจือจาง

V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)

d คือ ระดับความเจือจางแรกที่นับโคโลนีได้

7.2.3 คำนวณปริมาณ Low count กรณีที่ Initial suspension หรือ First dilution มีน้อยกว่า 10 โคโลนี แต่ไม่น้อยกว่า 4 โคโลนี โดยใช้สูตรที่ 1 และรายงานผลเป็นค่าประมาณการ (Estimated) แต่ถ้า น้อยกว่า 4 โคโลนี รายงานผลปริมาณเชื้อราน้อยกว่า $4 \times d$ โคโลนีต่อกรัม (< 40 โคโลนีต่อกรัม) เมื่อ d คือ ค่า Dilution factor

7.3 การรายงานผล

7.3.1 รายงานผลเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

7.3.2 กรณีที่ Initial suspension หรือ First dilution ไม่มีโคโลนีเชื้อรา รายงานผลเป็น น้อยกว่า $1/d$ โคโลนีต่อกรัม (< 10 CFU/g) เมื่อ d คือ ค่า Dilution factor ของ Initial suspension หรือ First dilution $d = 10^0 = 1$

7.3.3 กรณีที่นับจำนวนโคโลนีต่อแผ่น 3M Prtrifilm™ ในทุกระดับการเจือจาง มากกว่า 300 โคโลนี ให้ทำการทดสอบซ้ำ โดยเจือจางเพิ่มขึ้น

7.3.4 ผลการคำนวณ ให้รายงานเลขนัยสำคัญ 2 หรือทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยการปิดเศษให้ดูเลขนัยสำคัญ ตำแหน่งที่ 3 ถ้าน้อยกว่า 5 ให้ปัดลง แต่ถ้ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 ให้ปัดเพิ่ม

แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการทดสอบปริมาณเชื้อรารวม (Total Mold)

การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อรารวม (Total Mold)

วันที่ 1 : เตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Peptone Water (BPW)



วันที่ 2 : ทำการทดสอบ โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ Dilution 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} และถ่ายตัวอย่างลงแผ่น 3M PrtrifilmTM บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 120 ชั่วโมง



24 ชั่วโมง

วันที่ 3 : อยู่ในขั้นตอนของการบ่มตัวอย่าง



48 ชั่วโมง

วันที่ 4 : อยู่ในขั้นตอนของการบ่มตัวอย่าง



72 ชั่วโมง

วันที่ 5 : อยู่ในขั้นตอนของการบ่มตัวอย่าง



96 ชั่วโมง

วันที่ 6 : อยู่ในขั้นตอนของการบ่มตัวอย่าง



120 ชั่วโมง

วันที่ 7 : อ่านผล และแปลผลการทดสอบ



วันที่ 8 : รายงานผลการทดสอบ

รวมระยะเวลาในการทดสอบปริมาณเชื้อรารวม (Total Mold) ทั้งหมด 8 วัน

หน่วยงาน :กลุ่มวิจัยและพัฒนาการตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์น้ำ(กวด.) กองวิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ

ชื่อกระบวนการ : กระบวนการตรวจวิเคราะห์ด้านความปลอดภัยอาหารสัตว์น้ำ

ลำดับ ที่	ผังกระบวนการ	ระยะเวลา	รายละเอียดงาน	ผู้รับผิดชอบ
1.		0.5 วันทำการ	ผู้ขอรับบริการยื่นคำขอรับบริการพร้อม ตัวอย่างอาหารสัตว์น้ำ	ผู้รับบริการ
2.		0.5 วันทำการ	ผอ.พิจารณาและมอบหมายหัวหน้ากลุ่ม วิจัยและพัฒนาการตรวจสอบคุณภาพ อาหารสัตว์น้ำ	ฝ่ายบริหาร ทั่วไป ผอ.กพอ. ท.กวด.
4.		0.5 วันทำการ	ท.กวด.พิจารณาและมอบหมาย เจ้าหน้าที่จัดส่งตัวอย่างให้ ห้องปฏิบัติการฯ	ผอ.กพอ. ท.กวด.
5.		12 วันทำการ	ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง ถูกต้องหรือไม่ จัดทำรายงานผลและทวนสอบผล วิเคราะห์	เจ้าหน้าที่กวด. ท.กวด.
6.		0.5 วันทำการ	เสนอผู้มีอำนาจลงนาม เพื่อพิจารณา ลงนาม	ท.กวด. ผอ.กพอ.
7.		1 วันทำการ	ผู้รับบริการรับผลวิเคราะห์	ผู้รับบริการ

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ
พ.ศ. ๒๕๕๙

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ และมาตรา ๕๘ (๒) แห่งพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ประกาศนี้เรียกว่า “ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. ๒๕๕๙”

ข้อ ๒ ประกาศฉบับนี้ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ข้อ ๓ อาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพตามมาตรา ๕๘ (๒) ได้แก่ อาหารสัตว์ตามมาตรา ๖ (๑) หรือ (๒) ที่มีลักษณะดังต่อไปนี้

(๑) มีเชื้อซัลโมเนลลา (Salmonella spp.)

(๒) มีเชื้อแบคทีเรียปริมาณมากกว่า ๘ x ๑๐^๖ โคโลนีต่อหนึ่งกรัมของน้ำหนักอาหารสัตว์ ยกเว้น อาหารสัตว์ที่มีสารเสริมชีวนะผสมอยู่

(๓) มีเชื้อราปริมาณมากกว่า ๑ x ๑๐^๕ โคโลนีต่อหนึ่งกรัมของน้ำหนักอาหารสัตว์ กรณีข้าวโพดปนมากกว่า ๕ x ๑๐^๕ โคโลนีต่อหนึ่งกรัมของน้ำหนักอาหารสัตว์ ยกเว้น อาหารสัตว์ที่มีสารเสริมชีวนะผสมอยู่

(๔) มีปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ประเภท ดังต่อไปนี้

(ก) ประเภทวัตถุดิบ

กากถั่วเหลือง	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
กากถั่วลิสง	มากกว่า	๕๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ปลาย่าน	มากกว่า	๔๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
รำข้าว :- รำละเอียด รำหยาบ	รำสกัดน้ำมัน		
	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ข้าวโพดปน	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ข้าวโพดเมล็ด	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม

(ข) ประเภทวัตถุดิบที่ผสมแล้ว

๑. ชนิดหัวอาหารสัตว์

หัวอาหารไก่	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
หัวอาหารเป็ด	มากกว่า	๔๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
หัวอาหารโค - กระบือ	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
หัวอาหารสุกร	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม

๒. ชนิดอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป

อาหารสำเร็จรูปไก่ไข่	มากกว่า ๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปไก่เนื้อ	มากกว่า ๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปเป็ด	มากกว่า ๓๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปสุกรแรกเกิดถึงน้ำหนัก ๑๕ กิโลกรัม	มากกว่า ๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปสุกรน้ำหนัก ๑๕ กิโลกรัมขึ้นไป	มากกว่า ๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปโคอายุไม่เกิน ๑ ปี	มากกว่า ๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปโคอายุตั้งแต่ ๑ ปีขึ้นไป	มากกว่า ๒๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม

ประกาศ ณ วันที่ ๑๑ เมษายน พ.ศ. ๒๕๕๙

พลเอก ฉัตรชัย สาริกัลยะ

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

หน้า ๘

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ (ฉบับที่ ๓)
พ.ศ. ๒๕๖๕

โดยที่เป็นการสมควรแก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. ๒๕๕๙ เพื่อให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น

อาศัยอำนาจตามมาตรา ๕ และมาตรา ๕๘ (๒) แห่งพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงออกประกาศ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ประกาศนี้เรียกว่า “ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ (ฉบับที่ ๓) พ.ศ. ๒๕๖๕”

ข้อ ๒ ประกาศนี้ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดหกสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ข้อ ๓ ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๖๓

ข้อ ๔ ให้ยกเลิกความใน (๔) ของข้อ ๓ แห่งประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. ๒๕๕๙ และให้ใช้ความต่อไปนี้แทน

“(๔) มีปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ประเภท ดังต่อไปนี้

(ก) ประเภทวัตถุดิบ

กากถั่วเหลือง	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
กากถั่วลิสง	มากกว่า	๕๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ปลาป่น	มากกว่า	๔๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
รำข้าว: -รำละเอียด รำหยาบ รำสกัดน้ำมัน			
	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ข้าวโพดป่น	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ข้าวโพดเมล็ด	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
กากคั่วซีเอส	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
รำข้าวสาลี	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ข้าวสาลีเมล็ด	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
ข้าวบาร์เลย์	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม

(ข) ประเภทวัตถุผสมแล้ว

(๑) ชนิดหัวอาหารสัตว์

หัวอาหารไก่	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
หัวอาหารเป็ด	มากกว่า	๔๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
หัวอาหารโค - กระบือ	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
หัวอาหารสุกร	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม

(๒) ชนิดอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป

อาหารสำเร็จรูปไก่ไข่	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปไก่เนื้อ	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปเป็ด	มากกว่า	๓๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปสุกรแรกเกิดถึงน้ำหนัก ๑๕ กิโลกรัม	มากกว่า	๕๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปสุกรน้ำหนัก ๑๕ กิโลกรัม	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปโคอายุไม่เกิน ๑ ปี	มากกว่า	๑๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปโคอายุตั้งแต่ ๑ ปีขึ้นไป	มากกว่า	๒๐๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปปลา	มากกว่า	๒๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม
อาหารสำเร็จรูปกุ้ง	มากกว่า	๒๐	ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม

ประกาศ ณ วันที่ ๒๘ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๕

ประภัตร โพธสุธน

รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ปฏิบัติราชการแทน

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์