ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Total Bacteria Count (cfu/g) (FDA-BAM 1998)

นำตัวอย่างปริมาณ 25 กรัม ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 225 มิลลิลิตร ใน stomacher bag ตีบดด้วยเครื่อง stomacher โดยใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 60 วินาที ได้ตัวอย่างที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับจนได้ระดับความเจือจางประมาณ 10^{-5} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารวุ้น PCA เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย Coliform และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) ระบบ 3 หลอด

1. การวิเคราะห์ขั้นแรก (Presumptive test)

ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 10, 1, 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่บรรจุอาหารเหลว lactose broth ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (double strength) และความเข้มข้นปกติ (single strength) พร้อมหลอดดักก๊าซ อย่างละ 1 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เกิดก๊าซ นับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซแล้วเปรียบเทียบกับตาราง MPN ซึ่งเป็นจำนวนของ Coliform ที่คาดว่าพบของการวิเคราะห์ขั้นแรก

2. การวิเคราะห์ขั้นยืนยัน (Confirm test)

เลือกหลอดที่เกิดก๊าซจากข้อ 1. ของแต่ละชุด เขย่าหลอดทดลอง แล้วใช้ ลูป (loop) ถ่ายเชื้อจาก lactose broth ลงในหลอดอาหาร (Brillient green lactose bile broth : BGLB) ที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เกิดก๊าซภายใน 48 ชั่วโมง แสดงว่าให้ผลบวกแล้วเปรียบเทียบกับตาราง MPN ซึ่งเป็นจำนวนของ Coliform ที่คาดว่าพบของการวิเคราะห์ในขั้นยืนยัน

3. การตรวจวิเคราะห์ขั้นสมบูรณ์ (Complete test)

ใช้ลูป (loop) ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในหลอด BGLB ลงในจานอาหารเพาะเชื้อที่มีอาหาร EMB agar ด้วยการ streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีสีเขียวมันวาวเหมือนรอยตัดของโลหะ (metallic sheen) ซึ่งเป็นโคโลนีของ *E.coli* จากนั้นเก็บโคโลนีที่มี metallic sheen เลี้ยงบน Nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ย้อมสี (gram staining), ดูลักษณะของแบคทีเรีย และทำ การทดสอบชีวเคมี ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาIMViC ถ้าผลทดสอบ IMViC ถ้าให้ผลเป็น ++-- และ เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ย้อมติดสีแกรมลบแสดงว่าพบ *E.coli* คำนวณค่า MPN ของ *E.coli* ต่อกรัมของอาหารจากหลอดที่ทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* (FDA-BAM 2001)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 50 g เติมลงใน phosphate buffer 450 ml ที่บรรจุใน flask ขนาด 1000 ml (10^{-1})
2. ทำ serial dilution เป็น 10:90 (10^{-2}), 10:90 (10^{-3})
3. ปิเปตแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 ml spread ลงบนอาหาร MYP agar (ทำ 2 ซ้ำ)
4. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าไม่ปรากฏ colony ให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง
5. เลือกจานอาหารที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 15-150 colony นับจำนวน colony ที่มีลักษณะโคโลนีสีชมพูล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นขาว ใช้ loop แตะโคโลนี 2 โคโลนี จาก MYP agar เขี่ยลงในอาหาร Nutrient agar slant สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ทดสอบทางชีวเคมี

Gram-stained *Bacillus cereus* จะให้ผลเป็น gram positive รูปร่างเป็นแท่ง มีสปอร์ ใช้ loop เขี่ยลงใน phosphate buffer 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมาทดสอบ Phenol red glucose broth เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร phenol red glucose broth ที่มีปริมาตร 3 ml บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง (GasPak anaerobic jar) สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะขุ่น และเปลี่ยนสีจากแดงเป็นเหลือง

Modified VP medium โดยการเขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร MRVP broth ที่มีปริมาตร 5 ml บ่มที 35 °C, 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม alpha-naphthol 0.6 ml และเติม 40% KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา1 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารเปลี่ยนเป็นชมพูหรือสีม่วง

MYP agar เขี่ยเชื้อ 1 loop ลงในอาหาร MYP agar บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยสีของอาหารจะไม่เปลี่ยนแปลง

การตรวจวิเคราะห์ *Clostriduim botulinum* (FDA-BAM 2001)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 1-2 g หรือ 1-2 ml เติมลงในอาหาร cooked meat medium ที่บรรจุในหลอด 10 ml (อาหาร cooked meat medium ก่อนใช้ต้องต้นไล่แก๊ส 10-15 นาที)
2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 5 วัน ถ้าไม่ขุ่นให้บ่มต่ออีก 5 วัน
3. สังเกต การสร้างแก๊ส, อาหารขุ่น และมีลักษณะเกิดการย่อยอาหาร
4. เขย่าอาหารให้เข้ากัน นำหลอดตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าอาหารให้เข้ากัน นำมา streak บนอาหาร anaerobic egg yolkagar บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงใน anaerobic jar

6. สังเกตุลักษณโคโลนี (แผ่คล้ายหยดน้ำตาเทียน โดยที่ ขอบไม่เรียบ และบริเวณรอบขอบของโคโลนลักษณะมันวาวในที่มีแสงสว่าง)นำโคโลนีที่สงสัยไปย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

การทดสอบ catalase test

1. ใช้ loop เขี่ยเชื้อแล้วแตะลงบน slide ที่สะอาด หยด H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บน slide

Positive : มีฟองเกิดขึ้นทันที

Negative : ไม่มีฟองเกิดขึ้น

การตรวจวิเคราะห์ *Clostriduim perfringens* (FDA-BAM 2001)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมลง 0.1% peptone 225 ml (10^{-1}) ตีให้เข้ากันด้วย Stomacher เป็นเวลา 2 นาที

2. ทำ serial dilutions เป็น 10:90 (10^{-2}) , 10:90 (10^{-3})

3. ปิเปตตัวอย่างแต่ละ dilution มา 1 ml ลงใน plate แล้ว pore plate ด้วยอาหาร TSC agar (ทำ 2 ซ้ำ) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน anaerobic jar

4. สังเกตลักษณโคโลนีสีดำขนาด 2-4 มิลลิเมตร รอบโคโลนีมีตะกอนขุ่นขาว นับ colony ที่มีจำนวน 20-200 colony

5. เขี่ยโคโลนีที่สงสัยลงในอาหาร fluid thioglycollate broth (อาหารก่อนใช้ต้องต้นไล่แก๊ส 10-15 นาที) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ทดสอบทางชีวเคมี

1. Gram-strain (*C. perfringens* จะให้ผลเป็น gram positive, rod shape, non motile)
2. Lactose-gelatin media

เขี่ยเชื้อจาก fluid thioglycollate broth แล้วทำการ stap ลงในอาหาร Lactose-gelatin media บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยจะมีการสร้างแก๊สและอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และเมื่อนำอาหารไปแช่ที่ 5°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะเกิด gelatin liquefaction

3. Limus milk

เขี่ยเชื้อจาก fluid thioglycollate broth แล้วทำการ stap ลงในอาหาร Limus milk บ่มที่ 46°C เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหาร Limus milk จะจับตัวเป็นก้อนอย่าเห็นได้ชัด

การตรวจวิเคราะห์ ***Staphyolcocus aureus*** (FDA-BAM 2001)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติมลงใน phosphate buffer ที่บรรจุใน flask 450 ml ตีให้เข้ากันด้วย Stomacher
2. ปิเปต 0.1 ml แล้ว spread บนอาหาร baird-parker agar (ทำ 3 ซ้ำ)
3. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 45-48 ชั่วโมง
4. สังเกตุลักษณะโคโลนี (โคโลนีมีสีเทาจนถึงดำ มีลักษณะกลม, ขอบเรียบ, นูน, ขนาด 2-3 mm) นับ colony ที่มีจำนวน 20-200 colony
5. Pick 2 colony เขี่ยลงในอาหาร Nutrient agar slant สำหรับการทดสอบทาง biochem
6. นำโคโลนีที่สงสัยไปย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

ทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบ catalase test ใช้ loop เขี่ยเชื้อแล้วแตะลงบน slide ที่สะอาด หยด H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บน slide

Positive : มีฟองเกิดขึ้นทันที

Negative : ไม่มีฟองเกิดขึ้น

การทดสอบ Coagulase plasma (rabbit) with EDTA

เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak บนอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 0.2-0.3 ml บ่มที่ 35 °C, 18-24 ชั่วโมง เติม Coagulase plasma (rabbit) with EDTA 0.5 ml นำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะเกิดการจับตัวกัน (clot)

การตรวจวิเคราะห์ ***Samonella*** **spp.** (FDA-BAM 2003)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมลงใน phosphate buffer 225 ml ที่บรรจุใน flask ตีให้เข้ากันด้วย Stomacher

2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 hr นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ปิเปต 0.1 ml ลงในอาหาร RV broth ปริมาตร 10 ml บ่ม 42°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. นำมา streak บนอาหาร XLD agar, HE agar นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. สังเกต colony โดยมีลักษณะโคโลนี โดย

- บนอาหาร XLD agar โคโลนีมีสีชมพูอาจจะมีหรือไม่สีดำตรงกลาง หรือโคโลนีอาจจะเป็นสีดำ

- บนอาหาร HE agar โคโลนีมีสีน้ำเงิน-เขียว จนถึงสีน้ำเงิน อาจจะมีหรือไม่สีดำตรงกลาง

6. Pick 2 colony เขี่ยลงในอาหาร Nutrient agar slant สำหรับการทดสอบทาง biochem นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ทดสอบทาง Biochem

ทดสอบทางชีวเคมี

Gram-stained (*Salmonella* spp. จะให้ผลเป็น Gram negative รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์)

1. TSI agar slant เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak บนอาหาร TSI agar slant บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง สังเกต การเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและสีดำ
2. Lysine decarboxylase agar slant เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak บนอาหาร Lysine decarboxylase agar slant บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง
3. Urea broth เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร Urea broth บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง
4. Malonate broth เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร Malonate broth บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง
5. Indole test เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร Tryptone water บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยด Kovac's reagent อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
6. Methyl red test เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร MRVP broth บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง ปิเปตไว้ 1 ml สำหรับการทดสอบ Voges-Proskauer test ส่วนที่เหลือหยดด้วย Methyl red โดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดง
7. Voges-Proskauer test อาหาร MRVP broth 1 ml เติม alpha-napthol 0.6 ml และ 40%KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ อาหารจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

8. simmon citrate agar เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak บนอาหาร simmon citrate agar slant บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า

การตรวจวิเคราะห์ *Shigella* sp. (FDA-BAM 2001)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมลงใน Shigella broth 225 ml ที่มี novobiocin 3 ug/ml บรรจุใน flask ตีให้เข้ากันด้วย Stomacher
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (in water bath) ใน anaerobic jar
3. นำมา streak บนอาหาร MacConkey agar
4. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
5. สังเกต colony โดยมีลักษณะโคโลนีสีชมพู ค่อนข้างใส ขอบไม่เรียบ
6. Pick 2 colony จาก MacConkey agar เขี่ยลงในอาหาร Nutrient agar slant สำหรับการทดสอบทาง biochem นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบทางชีวเคมี

1. Gram-stained (*Shigella* sp. จะให้ผลเป็น gram negative รูปแท่ง ไม่มีแฟลกเจลลา)
2. TSI agar slant เขี่ยเชื้อ 1 loopful แล้ว streak ลงบนอาหาร TSI agar slant นำไปบ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเปลี่ยนสีจากแดงเป็นเหลือง (*Shigella* sp. จะให้ผล positive)
3. Lysine decarboxylase broth เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak ลงบนอาหาร Lysine decarboxylase agar slant บ่มที 35 °C, 24 hr สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเป็นสีเหลือง (*Shigella* sp. จะ ให้ผล negative)
4. Motility agar เขี่ยเชื้อ 1 loopful แล้ว streak ลงบนอาหาร Motility agar slant บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเจริญเป็นเส้นตรง (*Shigella* sp. เป็น nonmotile)
5. Indole test เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร Tryptone water บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น หยด Kovac's reagent อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (*Shigella* sp. จะให้ผล negative)

การตรวจวิเคราะห์ *Vibrio Cholerae*(FDA-BAM 2004)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมลงใน Alkaline Peptone Water ที่บรรจุใน flask 225 ml
2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วนำมา streak บนอาหาร TCBS agar
3. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
4. สังเกต colony โดยมีลักษณะโคโลนีใหญ่ สีเหลือง ค่อนข้างแบน ขอบเรียบและมีสีใส
5. Pick 2 colony จาก TCBS agar เขี่ยลงในอาหาร T_1N_1 agar slant สำหรับการทดสอบทาง Bioche นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ทดสอบทาง Biochem

ทดสอบทางชีวเคมี

1. Gram-stained (*V. cholerae* จะให้ผลเป็น Gram negative rods, comma shaped)
2. Salt tolerance เขี่ยเชื้อจาก T_1N_1 agar slant ลงในอาหาร T_1N_0 broth และ T_1N_3 broth บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ โดย *V. cholerae* จะเจริญในอาหาร T_1N_0 broth เท่านั้น
3. simmon's citrate agar เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak บนอาหาร simmon citrate agar slant บ่มที 35 °C, นาน 48 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า
4. Voges-Proskauer test เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร MRVP broth บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง

ปิเปต 1 ml เติม alpha-napthol 0.6 ml และ 40%KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ อาหารอาจจะเปลี่ยนเป็นเป็นสีชมพูหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus*(FDA-BAM 2004)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติมลงใน Phosphate buffer ที่บรรจุใน flask 450 ml ตีให้เข้ากันด้วย Stomacher
2. ปิเปตตัวอย่าง
   - ที่ 10^{-1} ให้ปิเปต 10 ml ลงใน Alkaline peptone water (2X) จำนวน 3 หลอด
   - ที่ 10^{-2} ให้ปิเปต 10 ml ลงใน Alkaline peptone water (1X) จำนวน 3 หลอด
   - ที่ 10^{-3} ให้ปิเปต 10 ml ลงใน Alkaline peptone water (1X) จำนวน 3 หลอด

3. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C , overnight
4. นำมาแต่ละหลอดทุก dilution มา streak บนอาหาร TCBS agar นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C , overnight
5. สังเกต colony โดยมีลักษณะโคโลนีกลม ขนาด 2-3 mm. และตรงกลางโคโลนีมีสีเขียวหรือน้ำ เงิน
6. Pick 2 colony จาก TCBS agar เขี่ยลงในอาหาร TSA (3% NaCl) สำหรับการทดสอบทาง Biochem นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C , overnight
7. ทดสอบทางชีวเคมี

ทดสอบทางชีวเคมี

1. Gram-stained (*V. parahaemolyticus* จะให้ผลเป็น Gram negative, curved or straight rods)

2. Salt tolerance เขี่ยเชื้อจาก TSA (3% NaCl) ลงในอาหาร T_1N_0 broth และ T_1N_3 brot บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ โดย *V. parahaemolyticus* จะเจริญในอาหาร T_1N_3 broth เท่านั้น

3. simmon's citrate agar เขี่ยเชื้อ 1 loopful streak บนอาหาร simmon's citrate agar slant บ่มที่ 35 °C, 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า

4. Voges-Proskauer test เขี่ยเชื้อ 1 loopful ลงในอาหาร MRVP broth บ่มที 35 °C, 24 ชั่วโมง ปิเปต 1 ml เติม alpha-napthol 0.6 ml และ 40%KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ อาหารจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

6. Growth at 42°C เขี่ยเชื้อจาก TSA (3% NaCl) ลงในอาหาร TSB (3% NaCl) บ่มที 42 °C ใน water bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดย *V. parahaemolyticus* จะสามารถเจริญได้

ภาคผนวก ข
มาตรฐานด้านจุลินทรีย์

ตารางที่ 9 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขของอาหารประเภทต่างๆ

ดัชนีคุณภาพทางจุลชีววิทยา	วิธีวิเคราะห์	ประเภทอาหาร				
		อาหารดิบ	อาหารพร้อมบริโภค	อาหารปรุงสุก/แช่เย็น แช่แข็ง	น้ำดื่ม	น้ำผลไม้
Total bacterial count (cfu/g)	FDA-BAM (1998)	$< 1x10^6$	$< 1x10^6$	$< 1x10^6$	$< 1x10^6$	$< 1x10^6$
MPN Coliform (MPN/g)	FDA-BAM (2002)	<500	<500	<500	<20	<20
MPN *Escherichia coli*	FDA-BAM (2002)	<50	<10	<3	<2	<2
Bacillus cereus	FDA-BAM (2001)	<200	<100	<100	ไม่พบ	ไม่พบ
Clostridium botulinum	FDA-BAM (2001)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Clostridium perfringens	FDA-BAM (2001)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Staphylococcus aureus	FDA-BAM (2001)	<200	<100	<100	ไม่พบ	ไม่พบ
Salmonella sp.	FDA-BAM (2003)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

ตารางที่ 9 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขของอาหารประเภทต่างๆ (ต่อ)

ดัชนีคุณภาพทางจุลชีววิทยา	วิธีวิเคราะห์	ประเภทอาหาร				
		อาหารดิบ	อาหารพร้อมบริโภค	อาหารปรุงสุก/แช่เย็น แช่แข็ง	น้ำดื่ม	น้ำผลไม้
Shigella	FDA-BAM (2001)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Vibrio cholerae	FDA-BAM (2004)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Vibrio parahaemolyticus	FDA-BAM (2004)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ น้ำแข็ง ใช้เกณฑ์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 78 (พ.ศ 2527) เรื่อง น้ำแข็ง มาตรฐานต้องน้อยกว่า 2.2

ภาคผนวก ค
มาตรฐานด้านเคมี (การปนเปื้อนโลหะหนัก)

ตารางที่ 10 เกณฑ์คุณภาพทางเคมี ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขและกระทรวงอุตสาหกรรมของอาหารประเภทต่างๆ

ดัชนีคุณภาพทางเคมี	วิธีวิเคราะห์	ประเภทอาหาร				
		อาหารดิบ	อาหารพร้อมบริโภค	อาหารปรุงสุก/แช่เย็น แช่แข็ง	น้ำดื่ม	น้ำผลไม้
ตะกั่ว (Pb)	ICP-MS	1mg/Kg[1]	1mg/Kg[1]	1mg/Kg[1]	0.5mg/Kg[1]	0.5mg/Kg[1]
ปรอท (Hg)	ICP-MS	0.5 mg/Kg[1]	0.5 mg/Kg[1]	0.5 mg/Kg[1]	0.002mg/Kg[1]	0.002mg/Kg[1]
สารหนู (As)	ICP-MS	2mg/Kg[1]	2mg/Kg[1]	2mg/Kg[1]	0.05mg/Kg[1]	0.05mg/Kg[1]
แคดเมียม (Cd)	ICP-MS	1mg/Kg[2]	1mg/Kg[2]	1mg/Kg[2]	0.01mg/Kg[1]	0.01mg/Kg[1]

ที่มา : [1] คู่มือผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อเศรษฐกิจชุมชน (2543) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

[2] ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2548)

หมายเหตุ ; ตะกั่ว สำหรับอาหารที่มีสารตะกั่วปนเปื้อนตามธรรมชาติในปริมาณสูง ให้มีได้ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ปรอท เกณฑ์ 0.5 mg/Kg สำหรับอาหารทะเลและไม่เกิน 0.02 mg/ Kg สำหรับอาหารอื่น

ตารางที่ 11 แสดงตัวอย่างอาหารแต่ละประเภทที่นำมาวิเคราะห์ดัชนีคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และเคมี

ประเภทของตัวอย่าง	รายการตัวอย่างอาหาร
อาหารดิบ	- เนื้อสด - เนื้อไก่
อาหารปรุงสุก	- ลูกชิ้นหมู
อาหารพร้อมบริโภค	- สลัด - มะม่วงดอง - ส้มตำลาว - แหนมหมู - ปลาร้าดิบ - ไอศกรีมรถเข็น - ถั่วปั่น - น้ำกะทิสด - ข้าวโพดหวานตัดแต่ง - เผือกนึ่งตัดแต่ง - ลาบหมู - หน่อไม้ดอง
น้ำดื่ม	- ยี่ห้อ 1 - ยี่ห้อ 2
น้ำผลไม้	- น้ำลำไย - น้ำส้มคั้น