

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* อย่างรวดเร็ว ในผักสดเพื่อการส่งออก

ภณิดา พิสัยสวัสดิ์¹⁾, อานุกาฬ สังข์ศรีอินทร์²⁾ และวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด¹⁾
ชื่อผู้วิจัย^{1),2)} และ ชื่อหัวหน้าโครงการ¹⁾

- 1) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล *Email: scwpb@mahidol.ac.th
- 2) บริษัทกำแพงแสน คอมเมอร์เชียล จำกัด

บทคัดย่อ

ได้นำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ในผักสดหลายชนิด พบว่า ผักที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* โดยไม่ต้อง enrichment ได้แก่ ผักกวางตุ้งและผักชีไทย เป็นต้น และจากการ spread Petrifilm ควบคุมกันพบว่า จะตรวจพบเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR ในผักดังกล่าว ต้องมีปริมาณเชื้ออย่างน้อย 55 cells/g.ผัก , ผักที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* หลัง incubate 3 hr. ใน LB broth ได้แก่ ผักชีฝรั่ง, ผักชีลาว, ผักกาดหอม, หัวผักกาดและหน่อไม้ฝรั่ง , ผักที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* หลัง incubate 6 hr. ได้แก่ กระเพรา, สะระแหน่ และตะไคร้ และผักที่ตรวจพบเชื้อได้หลัง enrichment ตั้งแต่ 6 hr. ถึง overnight (~16 hr.) ได้แก่ ต้นหอม, ขา, ผักกระเฉดและคะน้า ผักที่ตรวจพบเชื้อได้หลังการ enrichment อาจเป็นเพราะมีเชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในผักปริมาณค่อนข้างน้อยหรืออาจมีสารบางอย่างรบกวนปฏิกิริยา PCR การ enrichment ด้วยเวลาต่างๆ กันเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อและอาจลดปริมาณสารยับยั้งลงได้ และจากการตรวจหาเชื้อ ด้วย PCR เปรียบเทียบกับ Petrifilm พบว่า PCR ใช้เวลาน้อยกว่าคือสามารถทราบผลตรวจได้อย่างช้าที่สุดภายในเวลา 24 hr. ขณะที่ Petrifilm ใช้เวลา 48 hr. และราคาที่ใช้ในการตรวจหา *E. coli* ด้วยวิธี PCR (~40 บาท/ตัวอย่าง) ถูกกว่า Petrifilm (~63 บาท/ตัวอย่าง)

KEY WORD: PCR, Petrifilm, *uidA* gene, *E. coli*

บทนำ

การป้องกันความปลอดภัยของอาหารและน้ำดื่มจะต้องตรวจไม่พบการปนเปื้อนของ fecal coliform ได้มีการใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม coliforms, *fecal streptococci*, *Escherichia coli* สายพันธุ์ทั่วไปหรือสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อโรคเช่น Enteropathogenic หรือ Enterotoxigenic *E. coli* เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของของเสียจากร่างกายแต่ข้อกำหนดทั่วไปนิยมใช้ *E. coli* เป็นตัวบ่งชี้ความสะอาดมากกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ เนื่องจากเชื้อมีพบมากในทางเดินอาหารทำให้บ่งบอกได้เฉพาะเจาะจงว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระ (Feng and Hastman, 1982) ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* จะต้องอาศัยลักษณะความสามารถในการสร้างกรดหรือแก๊สจากการใช้

น้ำตาล lactose หรืออาจใช้วิธีการ Most-Probable-Number (MPN) ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะใช้แรงงานและใช้เวลานาน ประมาณ 96 ชั่วโมง จึงได้มีการพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและมีความไวสูงในการตรวจหาเชื้อดังกล่าวซึ่งอาศัยหลักการตรวจหาเอนไซม์ β -glucuronidase (GUS) โดยที่ *E. coli* ประมาณ 94-97% จะสร้างเอนไซม์ชนิดนี้จากยีนที่ชื่อว่า *gus* gene หรืออีกชื่อหนึ่งคือ *uidA* gene (Killian and Bulow, 1979) อย่างไรก็ตามมีรายงานอื่นๆ ที่พบว่าเมื่อใช้ 4-methylumbelliferyl - β -D-glucuronide หรือ MUG ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์นี้ พบว่า 34% ของ *E. coli* ที่แยกได้จากคนไม่มี Gus activity (Chang et al, 1989)

ซึ่งแสดงว่าอาจมี *E. coli* จำนวนมากที่ไม่สร้าง GUS enzyme ในการใช้แผ่นเพาะเชื้อสำเร็จรูป 3 M Petrifilm ในการตรวจหา *E. coli* และ coliform ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่รวดเร็ว ทราบผลภายใน 48 ชั่วโมง โดยแผ่นเพาะเชื้อประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อไวโอลิตเรดไบต์ (VRB) สียอมเพื่อบ่งชี้ปฏิกิริยาจากเอนไซม์ β -glucuronidase เพื่อใช้ในการตรวจหา *E. coli* และ สียอมเพื่อช่วยในการนับโคโลนีของ coliform ซึ่งการพบเอนไซม์นี้ไม่ถึง 100% นี้อาจทำให้มีปัญหาในการตรวจสอบได้ โดยในการทำการทดลองนี้จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการตรวจสอบ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer 1 คู่ ที่ได้มาจาก *gus* gene (*uidA* gene) ใน *E. coli* คือ GAL-301 กับ GAR-432 ซึ่งเป็น primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงเพื่อขยายส่วนของ DNA จากเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผักสดที่สนใจ โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 0.153 kb เปรียบเทียบกับการใช้ petrifilm ในการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* ในผักสดหลายชนิดซึ่ง *gus* หรือ *uidA* gene นี้คาดว่ามียูใน *E. coli* ทุกสายพันธุ์ แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่มี GUS activity น่าจะเกิดจากผลของ mutation ใน regulatory gene หรือ structural gene ของ *gus* (Feng และคณะ, 1991) ซึ่งยังคงตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์ ถูสำหรับเครื่อง Stomacher, เครื่อง Stomacher, มีด sterile, เขียง sterile, vortex mixer, Petrifilm, sterilized PCR tube, sterilized new Eppendorf tubes, micro pipette ขนาด 1000 μ l, 200 μ l และ 20 μ l, Thermal cycler, ตู้ Laminar Flow, อุปกรณ์สำหรับ gel electrophoresis

ตัวอย่างผัก ผักสดจากตลาดมหานาคและผักจากโรงงานของบริษัทกำแพงแสน คอมเมอร์เชียล จำกัดซึ่งผักจากโรงงานจะมี 3 ขั้นตอน คือ ผักก่อนล้าง, ผักที่อยู่ในขบวนการผลิตและผักที่เป็นผลิตภัณฑ์

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์ LB (Luria Bertani) Broth (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) TE buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)

Primers ใช้ primer 1 คู่ที่ได้มาจาก *uidA* gene คือ GAL-301 กับ GAR-432 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ GAL-301 5'TgTTACgTCCTgTAGAAAgCCC-3' และ GAR-432 5'AAACTgCCTggCACAgCAATT-3' (Klungthong และคณะ, 1997)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างผักเพื่อสกัดเชื้อและ DNA

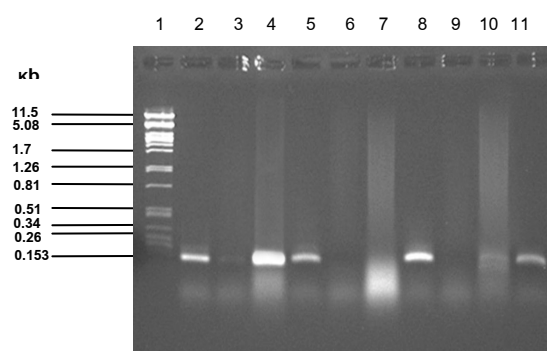
เตรียมผักสดก่อนตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR โดยนำผักสดมาหั่นและชั่งในถุงสำหรับ Stomacher 50 g. เติมน้ำ LB 225 ml. สกัดเชื้อจากผักด้วยเครื่อง Stomacher 30 วินาที นำ LB ที่ผ่านการสกัดเชื้อ incubate ที่ 37°C rotary shaker เป็นเวลา 0,3,6,8 ชั่วโมงและเลี้ยงข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละเวลามา 1,500 μ l ปั่น 10,000 rpm 3 นาที เอาเซลล์มาเติม TE 15 μ l ทำให้เซลล์กระจาย ต้ม 100°C 10 นาที ปั่น 10,000 rpm 3 นาที เอา supernatant ที่ได้สำหรับใช้ทำปฏิกิริยา PCR

2. การตรวจหาเชื้อ *E. coli* โดยวิธี PCR

นำ supernatant ที่ได้ 5 μ l ไปทำ PCR โดยเติมสารละลายสำหรับทำ PCR ดังนี้ 1Xbuffer, 25 mM MgCl₂, Deionize Distilled Water, 200 μ M dATP dCTP dGTP และ dTTP, 0.4 μ M ของ primer GAL-301 กับ GAR-432 และ Taq DNA polymerase 2.5 U เติมน้ำทั้งหมดให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 μ l นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยมีสภาวะการทำ PCR ดังนี้ Initial template denaturation 94°C 3 นาที, Template denaturation 94°C 1 นาที, Primer annealing 60 °C 1 นาที, Primer extension 72 °C 1 นาที, Final primer extension 72 °C 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

จากการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในผักสดจากตลาดสด (ตารางที่ 1) โดยใช้ optimized condition ในการตรวจ หลังจาก incubate ที่ 37 °C ใน rotary shaker เป็นเวลา 0, 3, 8 ชั่วโมง โดยการตรวจด้วย PCR และ petrifilm กับผักที่ซื้อจากตลาดจำนวนทั้งหมด 20 ชนิด ได้แก่ ผักบุ้ง, ผักกวางตุ้ง, ต้นหอม, ขึ้นช่าย, คื่นหะ, ผักกาดหอม, ถั่วงอก, หัวผักกาด, ผักกาดขาว, กะหล่ำปลี, ถั่วงอก, มะเขือเทศ, ผักชีไทย, ผักชีฝรั่ง, โหระพา, กระเพรา, สะระแหน่, กุยช่าย, ตะไคร้และ ข่า



รูปที่ 1 1.5% agarose gel แสดง PCR product ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* จากผักชนิดต่างๆ ที่ผสม *E. coli* 3×10^5 cells/1.5 ml (~1,000 cells/5 μ l ซึ่งใช้เป็น DNA template ใน 1 PCR reaction) หรือตรวจหาเชื้อจากผักหลัง enrichment ที่เวลาต่างๆ Lane 1 λ PstI, Lane 2 ผักกวางตุ้ง + spiked *E. coli*, Lane 3,4 ผักกวางตุ้ง enrichment 0,3 hr, Lane 5 ผักคะน้า +spiked *E. coli*, Lane 6,7 ผักคะน้า enrichment 0,3 hr, Lane 8 ผักกาดหอม + spiked *E. coli*, Lane 9,10 ผักกาดหอม enrichment 0,3 hr, Lane 11 control *E. coli*

- ผลที่ได้ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ด้วย PCR คือ ผักที่พบเชื้อโดยไม่ต้อง incubate (0 ชั่วโมง) ได้แก่ ผักบุ้ง กวางตุ้ง ขึ้นช่าย ผักกาดขาว ถั่วงอกและมะเขือเทศพบว่าสามารถตรวจเชื้อ *E. coli* ในผักสดด้วย PCR ซึ่งจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในผักน้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วย PCR โดยไม่ต้องมีการ enrichment (0 hr) คือ

10 cfu/ml หรือคิดเป็น 55 cfu/ผัก 1g. (นับโดยใช้ Petrifilm) ซึ่งผักที่พบที่ 0 hr ส่วนใหญ่เป็นผักที่มีดินติดตามลำต้น, ผลและราก หรืออาจจะเกิดการปนเปื้อนในตลาดสด แต่ผักบางชนิดเช่นพวกสมุนไพรจะตรวจด้วย PCR ไม่พบในปริมาณเชื้อน้อยๆ ซึ่งอาจเกิดจากผลรบกวนปฏิกิริยา จึงได้ทำการ enrichment โดย incubate ใน LB broth ที่เวลาต่างๆ กัน – ผักที่พบเชื้อด้วยวิธี PCR หลัง incubate 3 ชั่วโมง ได้แก่ ผักกาดหอม โหระพา ซึ่งการพบเชื้อในเวลา incubate 3 hr นี้อาจเกิดจากเชื้อในผักที่มีปริมาณน้อยเกินกว่าจะตรวจสอบได้ - สำหรับผักที่มีการตรวจพบเชื้อที่เวลา incubate 8 hr ได้แก่ ข่า สะระแหน่ ต้นหอม กระเพรา ตะไคร้ ซึ่งผักที่ตรวจพบเชื้อหลัง incubate เป็นเวลานาน 8 hr นี้ส่วนใหญ่มักเป็นผักที่มีกลิ่นแรงและเป็นพวกสมุนไพรที่อาจมีสารบางชนิด ที่อาจรบกวนการทำ PCR แต่เมื่อทำการ incubate นานขึ้นปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นและสารที่รบกวนการทำ PCR อาจลดลงทำให้ไม่มีการรบกวนปฏิกิริยา PCR ได้ หรืออาจตรวจพบเนื่องจากในผักนั้นมีเชื้อเริ่มต้นอยู่ปริมาณน้อยมาก จนต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนจนมากพอที่จะตรวจสอบได้ - จากผลการทำ control ด้วยการ spread Petrifilm ร่วมกับการทำ PCR พบว่าเป็นไปแนวทางเดียวกันคือ ถ้าพบเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR จะตรวจพบ *E. coli* ใน Petrifilm ด้วย อย่างไรก็ตามในการทดลองบางครั้งผลการตรวจ *E. coli* ด้วยวิธีทั้งสองไม่ตรงกันเช่น ต้นหอม ซึ่งในการทดลองวันที่ 3/12/2003 ในการ spread Petrifilm พบเชื้อแต่ตรวจด้วย PCR ที่เวลา 0 และ 3 hr ไม่พบ, ต้นหอมในการทดลองวันที่ 27/1/2004 พบเชื้อในการตรวจด้วย PCR ที่การ incubate 8 hr แต่ไม่พบเชื้อบนแผ่น Petrifilm, ผักกาดขาว ถั่วงอกและมะเขือเทศ วันที่ 27/1/2004 ตรวจพบเชื้อด้วย PCR แต่ไม่พบใน Petrifilm สาเหตุที่ได้ผลไม่ตรงกันนี้อาจเกิดจากเชื้อที่มีปริมาณน้อยเกินไปเพราะนำมาจาก LB ที่ผ่านการสกัดเชื้อในผักที่ยังไม่ incubate (0 hr) และในการนำมา spread บน Petrifilm ได้นำตัวอย่างมาเพียง 1 ml ในปริมาตรทั้งหมด โอกาสที่ไม่มีเชื้อในส่วนที่นำตัวอย่างมาตรวจแสดงว่ายังมีข้อผิดพลาดในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีทั้งสอง

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจเชื้อ *E. coli* จากผักสดที่ซื้อจากตลาดมหานาค

Date	Vegetable	PCR after incubation (hr)			Petrifilm Incubation (0 hr) Cfu/ml
		0	3	8	
25/11/03	ผักบุ้ง		+		430
29/11/03	กวางตุ้ง	+	+	ND	430
	ผักกาดหอม	-	+	ND	330
	คะน้า	-	-	ND	0
	ข้าวโพดอ่อน	-	-	ND	0
3/12/2003	ผักชีไทย	-	+	ND	90
	ต้นหอม	-	-	ND	90
	กะหล่ำปลี	-	-	ND	0
	ถั่วงอก	-	-	ND	0
8/12/2003	ต้นหอม	-	-	ND	0
	ผักบุ้ง	+	+	ND	710
	กวางตุ้ง	-	+	ND	50
	ถั่วงอก	-	-	ND	0
	ผักชีไทย	-	+	ND	10
12/12/2003	ผักบุ้ง	-	-	ND	0
15/12/03	ผักกวางตุ้ง	-	+	ND	ND
7/1/2004	ผักชีฝรั่ง	-	-	ND	ND
	ผักชีไทย	-	-	ND	ND
	หัวผักกาด	-	+	ND	ND
	ขึ้นฉ่าย	+	+	ND	ND
27/1/04	ผักชีไทย	-	+	ND	360
	โหระพา	-	+	ND	390
	สะระแหน่	-	-	+	320
	ต้นหอม	-	-	+	0
	กระเพรา	-	-	+	20
	ข่า	-	-	+	0
	ผักกาดขาว	+	+	ND	0
	ถั่วงอก	+	+	ND	0
	มะเขือเทศ	+	+	ND	0
	ตะไคร้	-	-	+	TNTC

หมายเหตุ + = ตรวจพบ DNA band ขนาด 153 bp., หรือตรวจพบ เชื้อ *E. coli* บน Petrifilm

- = ตรวจไม่พบ DNA band., หรือตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* บน Petrifilm

ND = (Not Done) ไม่ได้ทำ

TNTC = (Too Numerous To Count) นับไม่ได้

ในการตรวจเชื้อ *E. coli* จากผักสดที่ได้รับจากโรงงานโดยใช้ optimized condition (ตารางที่ 2 และ 3) ในการตรวจหลังจาก incubate ที่ 37 °C ใน rotary shaker เป็นเวลา 0, 3 และ 8 ชั่วโมง โดยการตรวจด้วย

PCR และ Petrifilm จากผักสดทั้งหมด 20 ชนิด ได้แก่ ผักชีไทย, กุ้ยช่าย, โหระพา, กระเพรา, ผักชีลาว, ผักชีฝรั่ง, สะระแหน่, คะน้า, ถั่วงอก, หน่อไม้ฝรั่ง, ข้าวโพดอ่อน, ใบแมงลัก, ใบเตย, กระเจต, ใบมะกรูด, พริกหยวก, พริกแดงเล็ก, พริกแดงใหญ่, พริกเหลือง และ พริกชี้หนู พบว่า -ผักที่พบเชื้อโดยไม่ต้อง incubate (0 ชั่วโมง) ได้แก่ ผักชีไทย (วันที่ 14/1/2004) กุ้ยช่ายก่อนล้าง ใบเตยก่อนล้าง และ ข้าวโพดอ่อน ขบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (วันที่ 3/2/2004) พบเชื้อในการทำ PCR ในผักที่ยังไม่ล้างซึ่งอาจมีดินติดอยู่ และผักที่มีชอกหลีบเยาะเช่นในข้าวโพดอาจทำให้ล้างได้ไม่สะอาดเท่าที่ควร -ผักที่พบเชื้อหลัง incubate 3 hr ได้แก่ ผักชีฝรั่งขบวนการผลิต (วันที่ 17/12/2003) ถั่วงอกก่อนล้าง ขบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์ ผักชีฝรั่งก่อนล้าง และผลิตภัณฑ์ใบมะกรูดก่อนล้างและขบวนการผลิต หน่อไม้ฝรั่งก่อนล้าง ขบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ (วันที่ 14/1/2004) พริกชี้หนูก่อนล้าง (วันที่ 20/1/2003) และในใบแมงลักก่อนล้าง ขบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ (วันที่ 3/2/2004) - ผักที่พบเชื้อหลังจาก incubate ตั้งแต่ 8 hr จนถึง overnight (ในภายหลังได้ทดลอง enrichment เป็นเวลา 6 hr ให้ผลเช่นเดียวกัน) ได้แก่ สะระแหน่ก่อนล้าง ตารางที่ 2 การตรวจเชื้อ *E. coli* จากผักสดของโรงงานและขบวนการผลิต, กระเจตก่อนล้าง และขบวนการผลิต, ใบเตย ผลิตภัณฑ์ (วันที่ 3/2/2004) การที่พบเชื้อหลัง incubate 3, 8 hr. หรือ overnight อาจเกิดจากที่เวลา incubate ที่นานขึ้น เชื้อเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนตรวจสอบได้และในผักอาจมีสารบางอย่างที่รบกวนปฏิกิริยา PCR ซึ่งการเพิ่มเวลา incubate อาจทำให้ inhibitor ที่มีในผักลดลงได้และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างผักสดที่ซื้อมาจากตลาดสดและผักที่นำมาจากโรงงานพบว่าผักจากทั้งสองแหล่งให้ผลการตรวจสอบตรงกันระหว่างวิธี PCR และ Petrifilm ยกเว้นหน่อไม้ฝรั่ง (ก่อนล้าง), ผักชีฝรั่ง (ก่อนล้าง), กระเพราและโหระพา(ขบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์) ที่ Petrifilm ตรวจพบแต่ PCR ที่ 0 ชม. ตรวจไม่พบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สรุปผลการตรวจเชื้อ *E. coli* จากผักสดของโรงงาน

Date	Vegetable	Process	PCR after Incubation (hr)		Petrifilm Incubation (0 hr)
			0	3	
17/12/03	ผักชีฝรั่ง	ก่อนล้าง	-	-	130
		ขบวนการผลิต	-	+	20
	กุยช่าย	ผลิตภัณฑ์	-	-	0
		ก่อนล้าง	-	-	0
	ผักชีลาว	ขบวนการผลิต	-	-	0
		ผลิตภัณฑ์	-	-	0
	กระเพรา	ขบวนการผลิต	-	-	0
		ผลิตภัณฑ์	-	-	0
	โหระพา	ขบวนการผลิต	-	-	30
		ผลิตภัณฑ์	-	-	10
	คะน้า	ขบวนการผลิต	-	-	10
		ผลิตภัณฑ์	-	-	90
	พริกหยวก	ก่อนล้าง	-	-	0
		ขบวนการผลิต	-	-	0
	พริกแดงเล็ก	ผลิตภัณฑ์	-	-	0
		ก่อนล้าง	-	-	0
	พริกแดงใหญ่	ขบวนการผลิต	-	-	0
		ผลิตภัณฑ์	-	-	0
	พริกชี้หนู	ก่อนล้าง	-	-	0
		ขบวนการผลิต	-	-	0
		ผลิตภัณฑ์	-	-	0
		ก่อนล้าง	-	-	0
14/1/04	ผักชีไทย	ขบวนการผลิต	+	+	430
		ผลิตภัณฑ์	+	+	TNTC
	ถั่วฝักยาว	ก่อนล้าง	-	+	0
		ขบวนการผลิต	-	+	0
	ผักชีฝรั่ง	ผลิตภัณฑ์	-	+	0
		ก่อนล้าง	-	+	0
	ใบมะกรูด	ขบวนการผลิต	-	-	0
		ผลิตภัณฑ์	-	+	0
	หน่อไม้ฝรั่ง	ก่อนล้าง	-	+	0
		ขบวนการผลิต	-	+	0
		ผลิตภัณฑ์	-	-	0
		ก่อนล้าง	-	+	70

หมายเหตุ + = ตรวจพบ DNA band ขนาด 153 bp., หรือตรวจพบเชื้อ

E. coli บน Petrifilm- = ตรวจไม่พบ DNAband หรือเชื้อ *E. coli* บน Petrifilm

TNTC = (Too Numerous To Count) นับไม่ได้

อย่างไรก็ตามเมื่อ incubate ตัวอย่างผักนานขึ้นเป็น 3 ชม. สามารถตรวจพบ *E. coli* ในผักหลายตัวอย่างด้วยวิธี PCR ได้แก่ ถั่วฝักยาว และหน่อไม้ฝรั่งได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ขณะที่ใบมะกรูด ตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างด้วยวิธี PCR ในขั้นตอนก่อนล้าง และขบวนการผลิตและในผักชีฝรั่งพบเชื้อ *E. coli* ในขั้นตอนก่อนล้างและในผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 2, 14/1/2004) และยังพบใน ผักชีฝรั่งขบวนการผลิต (ตารางที่ 2, 2, 17/12/2003) จากผลที่ได้จึงได้ทำการทดลองตรวจสอบหาเชื้อ *E. coli* ด้วย Petrifilm ในทุกช่วงเวลาที่เกิดขึ้นตัวอย่างมาทำ PCR ได้แก่ 0, 3 และ overnight (incubate ประมาณ 16 ชั่วโมง) ดังแสดงผลใน ตารางที่ 3 พบว่าที่ 0 ชม. วิธี Petrifilm ตรวจพบเชื้อในใบสะระแหน่ที่ขั้นตอนก่อนล้าง, ขบวนการผลิต และในใบแมงลักในทุกขั้นตอนการผลิต ขณะที่วิธี PCR ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ได้ แต่ในผัก เช่น กุยช่าย (ก่อนล้าง) และข้าวโพดอ่อน (ระหว่างขบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์) สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ได้ด้วยวิธี PCR ในขณะที่ Petrifilm ตรวจไม่พบ ในใบเตย กับผักกระเฉด ที่เวลาที่ 0 ชม. วิธี Petrifilm และ PCR ให้ผลตรงกัน (ตารางที่ 3) หลังจาก enrichment เป็นเวลา 3 ชม. ทั้ง PCR และ Petrifilm ให้ผลตรงกันคือตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* ในทุกขั้นตอนการผลิตในผักกระเฉด และที่ให้ผลตรงกันอีกคือ ตรวจไม่พบเชื้อในผลิตภัณฑ์ใน สะระแหน่และตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในใบเตยก่อนล้าง ในส่วนที่ให้ผลแตกต่างกันคือ ที่ 3 ชม. วิธี Petrifilm ตรวจพบ *E. coli* ในใบสะระแหน่ (ก่อนล้าง, ขบวนการผลิต) และใบเตย (ขบวนการผลิต) ขณะที่วิธี PCR ตรวจไม่พบขณะที่วิธี PCR ตรวจพบเชื้อในกุยช่าย (ก่อนล้าง), ข้าวโพดอ่อน (ขบวนการผลิต, ผลิตภัณฑ์) แต่วิธี Petrifilm ตรวจไม่พบ แต่เมื่อ incubate นานขึ้น (overnight ประมาณ 16 ชั่วโมง) ให้ผลตรงกันในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ยกเว้นข้าวโพดอ่อน ที่วิธี PCR ตรวจพบในขณะที่ Petrifilm ตรวจไม่พบ

ตารางที่3 ผลการตรวจเชื้อ *E. coli* จากผักสดของโรงงานหลัง enrichment 0, 3 และ overnight (~16 ชม.)

Vegetable 3/3/2004	Process	Result after incubate (hr)					
		0		3		Overnight (~16 hr)	
		PCR	Pe- trifilm	PCR	Pe- trifilm	PCR	Pe- trifilm
สะระแหน่	ก่อนล้าง	-	40	-	TNTC	+	TNTC
	ขบวนการผลิต	-	50	-	TNTC	+	TNTC
	ผลิตภัณฑ์	-	0	-	0	-	0
ใบแมงลัก	ก่อนล้าง	-	400	+	TNTC	+	TNTC
	ขบวนการผลิต	-	360	+	TNTC	+	TNTC
	ผลิตภัณฑ์	-	200	+	TNTC	+	TNTC
กระเจต	ก่อนล้าง	-	0	-	0	+	TNTC
	ขบวนการผลิต	-	0	-	0	+	12,000
	ผลิตภัณฑ์	-	0	-	0	-	0
กุยช่าย	ก่อนล้าง	+	0	+	0	+	6,000
	ขบวนการผลิต	-	0	-	0	-	0
	ผลิตภัณฑ์	-	0	-	0	-	0
ใบเตย	ก่อนล้าง	+	4,600	+	TNTC	+	TNTC
	ขบวนการผลิต	-	0	-	50	+	TNTC
	ผลิตภัณฑ์	-	0	-	0	+	TNTC
ข้าวโพดอ่อน	ขบวนการผลิต	+	0	+	0	+	0
	ผลิตภัณฑ์	+	0	+	0	+	0

หมายเหตุ + = ตรวจพบ DNA band ขนาด 153 bp., หรือตรวจพบ เชื้อ *E. coli* บน Petrifilm
 - = ตรวจไม่พบ DNA band หรือเชื้อ *E. coli* บน Petrifilm
 TNTC = (Too Numerous To Count) นับไม่ได้

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถตรวจหา *E. coli* ในตัวอย่างผักด้วยวิธี PCR ได้โดยใช้ primer GAL-301 และ GAR-432 ซึ่งมาจาก *uidA* gene ที่สร้างเอนไซม์ β -glucuronidase
2. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างผักซึ่งแสดงรายละเอียดในวิธีการทดลอง โดยผักบางชนิด

สามารถตรวจหาเชื้อได้โดยไม่ต้อง enrichment แต่ผักบางชนิดต้องมีขั้นตอน enrichment ที่เวลาต่างๆ (ดูผลการทดลอง)

3. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม DNA จากเชื้อในผักก่อนทำ PCR และการทำ PCR ดังแสดงรายละเอียดในวิธีการทดลอง

4. ผักที่สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ได้ทันทีโดยไม่ต้อง enrichment ได้แก่ ผักบุ้ง, ผักกวางตุ้ง, ขึ้นช่าย, ผักกาดขาว, ถั่วลันเตา, มะเขือเทศ, ผักชีไทย, กุยช่าย, ใบเตย, ข้าวโพดอ่อน, ใบมะกรูด จากการนับเชื้อโดยใช้ Petrifilm พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อมีเชื้อน้อยที่สุด 10 cfu/ml หรือคิดเป็น 55 cfu/g. ผัก ซึ่งในผักบางชนิดที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PCR ได้แก่ ผักกาดขาว, ถั่วลันเตา, ข้าวโพดอ่อนและมะเขือเทศ แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธี Petrifilm

5. ผักที่สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR หลัง enrichment 3 hr. ได้แก่ ผักกาดหอม หัวผักกาด โหระพา ผักชีฝรั่ง ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง สะระแหน่ ใบแมงลัก ผักชีลาวและคะน้า

6. ผักที่สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR หลัง enrichment 6 hr. ถึง overnight (~16 hr.) ได้แก่ กระเพรา, ต้นหอม, ข่า, ตะไคร้และกระเจต

7. เวลาที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR จะใช้เวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง ขณะที่การตรวจหาเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Petrifilm จะใช้เวลา 48 ชั่วโมง ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างของวิธี PCR ประมาณ 40 บาท ขณะที่ค่าใช้จ่ายในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* โดยใช้ Petrifilm ประมาณ 63 บาทต่อแผ่น

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงการอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี ประจำปี 2546 (IRPUS) และผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณชูศักดิ์ ชื่นประโยชน์ กรรมการผู้จัดการบริษัทกำแพงแสน คอมเมอร์เชียล จำกัด ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Modern and Rapid Technology on Microbiological Analysis of Food, พ.ศ. 2538, หน้า 23-30
2. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, สรวง อุดมวรภักดิ์ , หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม, เล่ม 1-2, พิมพ์ครั้งที่1 พ.ศ. 2536 , หน้า 11.15,-11.17, 9.1-9.3, 20.2-20.12
3. ศิวาภรณ์ จุฬาวังฤทธิ์, อาจารย์ นิลวงศ์ , senior project Detection of *Salmonella* by PCR, 1998. หน้า 7-27
4. Chang, G.W., Brill, J., and Lum, R. 1989. Proportion of β -glucuronidase negative *Escherichia coli* in human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (2):335-339
5. Frampton, W.W. and Restaino, E. (1993). Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and chemical samples based on β -glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.* 74:223-233
6. Feng, P., and Hartman, P.A. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(6):1320-1329
7. Garbutt, J. (1997). *Essential of Food Microbiology* 1st Ed. Arnold:Amesbury of the Hodder Healine Group, London.
8. Killian A. and Bulow P. (1979). Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae I. Detection of bacteria glycosidases. *Acta Patho Microbiol. Scan* (Section B) 84:245-251
9. Klungthong, C., Pilantanapak, A. Jayanetra, P. and Panbangret. W. (1997). Detection of *Escherichia coli* by hybridization and polymerase chain reaction. *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5:98-110.
10. Wilson, K.J., Jefferson, R.A. and Hughes, S.G. 1992. The *Escherichia coli* gene operon: Induction and Expression of the *gus* operon in *Escherichia coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In : *GUS Protocols*. Gallagher S. R. (ed) Academic Press, Inc., USA pp 7-22.
11. Rice, E. W., Allen M.J. and Edberg, S. C. (1990). Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1203-1205
12. Singh, A. and Mcfeters, F.A. 1992. Detection method for water borne pathogens. In : *Environmental microbiology*. Mitchell R. (ed). Wiley-Liss, New York. Pp 125-126.

<http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureecdi>

http://www.kcfresh.com/Pages/en/home_en.htm

<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>