abst

ข้อมูลข่าวสาร วศ.

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ
กช
อว 36

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7ว

เรื่องที่ 2

การศึกษาคุณภาพไอศกรีมทางจุลชีววิทยา

นางรวิวรรณ วงษ์สมุทร์
นางสิริพร สรนเสาวภาคย์
นางสาววรรณี สมพร
นางสาวเสริมศรี คงศักดิ์

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ข้อมูลส่วนตัวของบุคคล ได้รับการคุ้มครอง
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วส
เลขหมู่ ภช
ว036
เลขทะเบียน 10508
วันที่ 5 ก.พ. 45

บทคัดย่อ

จากการสำรวจโรงงานผลิตไอศกรีมในกรุงเทพ ฯ และนนทบุรี 19 โรงงาน พบว่าโรงงานขนาดเล็กมีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย ผู้ผลิตขาดความระมัดระวังเกี่ยวกับความสะอาดของวัตถุดิบ เครื่องใช้ และสถานที่ผลิต คนงานขาดความรู้ด้านสุขอนามัย บางโรงงานไม่ได้ใช้กรรมวิธีฆ่าเชื้อในกระบวนการผลิต ส่วนโรงงานขนาดใหญ่และขนาดกลางใช้ระบบการผลิตแบบอัตโนมัติ สุขลักษณะของโรงงานอยู่ในเกณฑ์ใช้ได้ จึงมีโอกาสปนเปื้อนได้น้อย เมื่อนำไอศกรีมจากโรงงานและตลาดแหล่งละ 100 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่า ไอศกรีมจากโรงงานไม่ผ่านมาตรฐาน ร้อยละ 31 จากตลาดไม่ผ่านมาตรฐาน ร้อยละ 37 เนื่องจากพบจุลินทรีย์เกินมาตรฐาน หรือพบเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) หรือพบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) หรือพบคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*Clostridium perfringens*) ไอศกรีมหวานเย็นที่ผสมผลไม้หรือวัตถุอื่นที่เป็นอาหาร มีการปนเปื้อนมากที่สุด พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค คือสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในไอศกรีมจากโรงงาน 9 ตัวอย่าง จากตลาด 13 ตัวอย่าง และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ในไอศกรีมจากโรงงาน 3 ตัวอย่าง จากตลาด 9 ตัวอย่าง หลังจากให้คำแนะนำแก่โรงงานในการแก้ไขข้อบกพร่อง เก็บตัวอย่างจากโรงงาน 12 โรงงาน จำนวน 29 ตัวอย่าง มาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าไอศกรีมที่มีคุณภาพมาตรฐานเป็นไปตามกำหนดจำนวน 8 โรงงาน โรงงานที่ได้ปรับปรุงแก้ไข คิดเป็นร้อยละ 66.7 การติดตามผลหลังจากการสำรวจโรงงานและให้คำแนะนำด้านสุขลักษณะการผลิต ได้เก็บตัวอย่างจากตลาดมาวิเคราะห์ พบว่ามีตัวอย่างไม่ผ่านมาตรฐานลดลงเหลือเพียงร้อยละ 10 แสดงว่าผู้ผลิตได้มีการปรับปรุงแก้ไขในด้านสุขลักษณะและกรรมวิธีผลิต ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติดีและปลอดภัยในการบริโภค

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	i
สารบาญตาราง	ii
สารบาญรูปภาพ	iii
สารบาญภาคผนวก	iv
บทที่ 1 - บทนำ	1
บทที่ 2 - วัตถุประสงค์	7
บทที่ 3 - วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	8
บทที่ 4 - ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 - วิจารณ์ผลการทดลอง	33
บทที่ 6 - สรุปผลการทดลอง	35
ประโยชน์ที่ได้รับ	36
คำขอบคุณ	38
เอกสารอ้างอิง	39

สารบาญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	ส่วนประกอบที่สำคัญในธาตุน้ำนมไม่รวมไขมันจากแหล่งต่าง ๆ	3
ตารางที่ 4.1	ปริมาณจุลินทรีย์ในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน	21
ตารางที่ 4.2	ปริมาณโคลิฟอร์มในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน	22
ตารางที่ 4.3	ตัวอย่างที่พบ อี.โคไล และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	23
ตารางที่ 4.4	ปริมาณยีสต์ในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน	24
ตารางที่ 4.5	ปริมาณสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน	25
ตารางที่ 4.6	ตัวอย่างไอศกรีมที่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านมาตรฐานจำแนกตามข้อบกพร่อง	26
ตารางที่ 4.7	การปรับปรุงแก้ไขของโรงงานที่ผลิตไอศกรีมไม่ได้มาตรฐานหลังจากการให้คำแนะนำและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์อีกครั้ง	29
ตารางที่ 4.8	ปริมาณจุลินทรีย์ในไอศกรีมที่เก็บจากตลาดในระหว่างสำรวจโรงงานและจากตลาดในช่วงติดตามผล	30
ตารางที่ 4.9	ตัวอย่างไอศกรีมจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานและในช่วงติดตามผล ที่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ไม่ผ่านมาตรฐานจำแนกตามข้อบกพร่อง	32

สารบาญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ไอศกรีมประเภทต่าง ๆ ที่ไม่ผ่านมาตรฐาน	27

สารบาญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก 1

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม 41
2. รีเอเจนท์ 52

ภาคผนวก 2

ตารางเอ็มพีเอ็น 54

บทที่ 1 - บทนำ

ปัญหาและที่มาของการวิเคราะห์

การบริโภคไอศกรีมในประเทศไทยเป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในฤดูร้อน และเนื่องจากการผลิตไอศกรีมมีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนจึงมีผู้นิยมผลิตมากตั้งแต่ผลิตแบบอุตสาหกรรมในครัวเรือนจนถึงอุตสาหกรรมใหญ่ การผลิตไอศกรีมที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเมื่อผู้บริโภคซื้อไอศกรีมเหล่านี้ไปบริโภคก็จะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เพื่อเป็นการให้ข้อมูลแก่ผู้บริโภคและเพื่อเป็นการยกระดับมาตรฐานการผลิตไอศกรีมจึงได้ทำการสำรวจโรงงานไอศกรีมและเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

คำนำ

ไอศกรีมเป็นอาหารที่มีผู้นิยมรับประทานกันทั่วโลก นอกเหนือจากรสชาติที่อร่อย สีสรรที่สะดุดตา ไอศกรีมยังเป็นอาหารที่ถือได้ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง ไอศกรีมเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำและน้ำตาลเป็นหลัก อาจมีนมหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม ไขมันชนิดอื่น ผลไม้ หรือวัตถุอื่นที่ใช้เป็นอาหารผสมอยู่ด้วย นอกจากนี้อาจมีการแต่ง สี กลิ่น รส ตามใจชอบ แล้วนำมาทำให้เยือกแข็ง ไอศกรีมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ย่อยง่าย เพราะได้ผ่านกระบวนการโฮโมจิไนส์ (homogenized) ซึ่งจะทำให้ไขมันแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ไอศกรีมมีรสหวาน เนื้อละเอียด มีลักษณะน่ารับประทาน จึงเป็นที่นิยมบริโภคกันมาก กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้ไอศกรีมเป็นอาหารที่ควบคุมเฉพาะ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 33 (พ.ศ.2522) และฉบับที่ 101 (พ.ศ. 2529)[1] ซึ่งได้แบ่งไอศกรีมออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่

1. ไอศกรีมนม เป็นไอศกรีมที่ทำจากนมหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม
2. ไอศกรีมดัดแปลง ได้แก่ไอศกรีมตามข้อ 1 ที่ทำขึ้นโดยใช้ไขมันชนิดอื่นแทนมันเนยทั้งหมดหรือแต่บางส่วน หรือไอศกรีมที่ทำขึ้นโดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันแต่ผลิตภัณฑ์นั้นมิใช่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม
3. ไอศกรีมผสม ได้แก่ไอศกรีมตามข้อ 1 หรือ 2 ซึ่งมีผลไม้หรือวัตถุอื่นที่เป็นอาหารเป็นส่วนผสมอยู่ด้วย
4. ไอศกรีมตาม ข้อ 1, 2 หรือ 3 ชนิดแห้งหรือผง

5. ไอศกรีมหวานเย็น ได้แก่ไอศกรีมที่ทำขึ้นโดยใช้น้ำและน้ำตาล หรืออาจมีวัตถุอื่นที่เป็นอาหารเป็นส่วนผสมอยู่ด้วย

กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของไอศกรีมดังนี้ คือมีบักเตรีได้ไม่เกิน 6.0×10^5 โคโลนีในอาหาร 1 กรัม (ยกเว้นไอศกรีมชนิดแห้งหรือผงมีได้ไม่เกิน 1.0×10^5 โคโลนีในอาหาร 1 กรัม) ตรวจไม่พบ อี. โคไล ในอาหาร 0.01 กรัม (ยกเว้นไอศกรีมแห้ง หรือผงมิได้กำหนดไว้) และต้องไม่พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค คือ ซาลโมเนลลา คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ และสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส

1.1 ส่วนผสมในไอศกรีม (วิสิฐ จะวะสิต[2], Andreasen และ Nielsen[3] , Varnam และ Sutherland[4])

ส่วนประกอบของไอศกรีม ได้แก่

1.1.1 ไขมัน

ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของไอศกรีมคือไขมัน ปริมาณไขมันที่ระบุในไอศกรีมมีตั้งแต่ร้อยละ 2.0 - 8.9 ไขมันไม่ว่าจะมาจากที่ใดก็ตาม จะต้องมีคุณภาพดี ไม่ทำให้ไอศกรีมที่ผลิตมีกลิ่นหืน แหล่งของไขมันได้มาจากนม ครีม นอกจากนี้ไขมันพืชก็สามารถนำมาใช้ได้ เช่น ไขมันมะพร้าว ไขมันปาล์ม ไขมันจากข้าวโพด ไขมันจากเมล็ดฝ้าย ซึ่งอาจใช้เดี่ยว ๆ หรือรวมกันก็ได้ การที่นิยมใช้ไขมันพืชอาจเป็นเพราะต้นทุนถูก อย่างไรก็ตามไอศกรีมพวกนี้ไม่เหมาะกับผู้ที่ต้องการควบคุมระดับไขมันในเส้นเลือด เพราะเป็นไขมันที่มีความอิ่มตัวสูง

1.1.2 ธาตุน้ำนมไม่รวมไขมัน (milk solid non-fat)

ส่วนประกอบส่วนใหญ่คือนม นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลแล็กโทส เกลือแร่ ตารางที่ 1.1 แสดงส่วนประกอบของธาตุน้ำนมไม่รวมไขมันที่มาจากแหล่งต่าง ๆ กัน

โปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในธาตุน้ำนมไม่รวมไขมัน มีส่วนช่วยให้ฟองอากาศในเนื้อไอศกรีมมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และมีลักษณะเนียนน่ารับประทาน ส่วนประกอบที่สำคัญอีกตัวหนึ่งได้แก่ แล็กโทสซึ่งเป็นน้ำตาลธรรมชาติในนม เป็นส่วนประกอบสำคัญของไอศกรีมเพราะให้รสหวาน

ตารางที่ 1.1 คุณภาพในธาตุน้ำนมจากแหล่งต่าง ๆ (Andreasen และ Nielsen[3])

	ไขมัน (ร้อยละ)	โปรตีน		แล็กโทส (lactose) (ร้อยละ)	เถ้า (ash) (ร้อยละ)	น้ำ (ร้อยละ)
		เคซีน (casein) (ร้อยละ)	โปรตีนจากเวย์ (whey protein) (ร้อยละ)			
นมขาดมันเนย (skimmed milk)	0.1	2.5	0.8	4.8	0.8	91.0
นมผงขาดมันเนย (skimmed milk powder)	1.0	27.7	9.3	52.0	7.0	3.0
เวย์ (whey)	1.0		13.0	73.0	9.0	4.0
โปรตีนจากเวย์เข้มข้น (whey protein concentrate)	2.0		35.0	51.0	7.0	5.0

1.1.3 สารให้ความหวาน (sweeteners)

สารให้ความหวานในกรณีนี้รวมถึง แล็กโทสที่อยู่ในธาตุน้ำนมไม่รวมไขมัน สารให้ความหวานที่ใส่ในไอศกรีมมีส่วนเกี่ยวข้องกับจุดเยือกแข็งของไอศกรีมและความนุ่มตัวของไอศกรีม สารให้ความหวานที่ใช้กันส่วนมากได้แก่ ซูโครส กลูโคสไซรัป ฟรุคโทส แล็กโทส ซอร์บิทอล กลีเซอรอล เป็นต้น

1.1.4 อีมัลซิไฟเออร์ (emulsifiers)

เป็นสารที่ทำให้น้ำและไขมันรวมตัวกันดีจนมีลักษณะเนียน เนื่องจากสารตัวนี้มีสมบัติในการเป็นตัวลดแรงดึงผิว โดยปกตินิยมใช้สารพวก โมโน-ไดกลีเซอร์ไรด์ (mono-diglycerides)

1.1.5 สารคงตัว (stabilizers)

สารนี้ช่วยในการอุ้มน้ำ และยังช่วยให้รักษาเนื้อของไอศกรีมให้คงตัวในกรณีที่อุณหภูมิในการเก็บไอศกรีมเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว สารคงตัวนี้ช่วยให้ไอศกรีมหลอมละลายช้าลง สารคงตัวที่นิยมใช้ในไอศกรีมได้แก่ เจลาติน คาราจีแนน (carageenan) โลคัส บีน กัม (locust bean gum)

นอกจากนี้ในไอศกรีมยังมีการเติมสารให้สี กลิ่น รส โดยเฉพาะไอศกรีมหวานเย็นจะมีการเติมรสชาติของผลไม้ เช่น ส้ม องุ่น สตรอเบอรี จึงมีการเติมกรดมะนาว หรือกรดมะขามด้วย สารอื่น ๆ เช่น เนื้อผลไม้ น้ำผลไม้ เมล็ดถั่ว ช็อคโกแลต ก็ใช้เติมเพื่อเพิ่มรสชาติ และเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์

1.2 บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่อคนในไอศกรีม

เนื่องจากประเทศไทยมีอากาศร้อน การบริโภคไอศกรีมจึงเป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในฤดูร้อนในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม และเนื่องจากกรรมวิธีในการผลิตไอศกรีมไม่ยุ่งยากซับซ้อน จึงมีผู้นิยมผลิตไอศกรีมขายมากขึ้น แต่การเก็บรักษาไอศกรีมให้เย็นจัดอุณหภูมิไม่สูงกว่า -2.2 องศาเซลเซียส นั้นมักจะเกิดอุปสรรค เมื่อไอศกรีมเย็นไม่ถึงอุณหภูมิที่กำหนดไว้คือ -2.2 องศาเซลเซียส จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเจริญแพร่พันธุ์ของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียจะตายเมื่อผ่านความร้อนตามอุณหภูมิและเวลาที่กำหนด และเมื่ออยู่ในที่เย็นจัดแบคทีเรียก็จะไม่เจริญเติบโตแต่จะมีชีวิตอยู่ได้นาน[5] ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิพอเหมาะคือได้รับความร้อนเพิ่มขึ้นเช่นในระหว่างขนส่ง หรือในระหว่างเก็บตอนจะขาย แบคทีเรียนี้เป็นพวกที่อยู่ในอากาศที่ปะปนเข้าไปในไอศกรีมในขณะขนส่ง หรือเป็นพวกที่อยู่ในไอศกรีมที่ผ่านความร้อนต่ำกว่าอุณหภูมิที่กำหนดในการผลิต หรือเวลาไม่ครบตามเวลาที่กำหนดไว้ในการให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ จึงทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตขึ้น เมื่อผู้บริโภครับประทานไอศกรีมนี้เข้าไปก็เกิดอาการท้องเสีย ท้องร่วงได้ นอกจากนี้ความสะอาดของวัตถุดิบ และสุขลักษณะของโรงงานก็เป็นสิ่งสำคัญ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคชนิดต่าง ๆ ที่สำคัญในไอศกรีม ได้แก่ ซาลโมเนลลา สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์

ซาลโมเนลลา ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเดิน อาจมีไข้เล็กน้อย อาการอาหารเป็นพิษนี้จะเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ 12-24 ชั่วโมง

สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส เป็นบักเตรีที่แสดงถึงสุขลักษณะของคนงาน มักจะมีการปนเปื้อนมาจากมือคนงาน เชื้อนี้สามารถผลิต enterotoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่จะไปทำลายเซลล์ของลำไส้ ทำให้เกิดอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเดิน อาการจะเกิดขึ้นมากหลังจากได้รับเชื้อ 2-4 ชั่วโมง มีรายงานว่ามีผู้พบเชื้อโคอะกูเลสโพซิตีฟสแตไฟโลคอกคัส ในไอศกรีม[6]

คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ เป็นบักเตรีที่ทนความร้อนได้สูง เมื่อเข้าสู่ร่างกายในภาวะที่เหมาะสม สามารถผลิต enterotoxin ได้เช่นเดียวกัน ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้และท้องเดิน อาการจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ 10-12 ชั่วโมง

ฝ่ายจุลชีววิทยา กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ได้เล็งเห็นความสำคัญเกี่ยวกับความปลอดภัยของผู้บริโภคไอศกรีม จึงได้ทำการศึกษาวิจัย เรื่องคุณภาพทาง

จุลชีววิทยาของไอศกรีม โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจากโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีทางอาหารของอาเซียน และหลังจากจบโครงการนี้แล้วก็ยังมีการติดตามผลอีกเป็นระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน

บทที่ 2 - วัตถุประสงค์

2.1 การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์ดังต่อไปนี้

การศึกษาสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของไอศกรีมที่ผลิตจากโรงงานและที่จำหน่ายในตลาดว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคหรือไม่

2.2 ระยะเวลาในการทำวิจัยครั้งนี้รวม 3 ปี 6 เดือน ตั้งแต่มกราคม พ.ศ. 2530 - มิถุนายน พ.ศ. 2533 ซึ่งรวมทั้งการสำรวจโรงงาน เก็บตัวอย่างจากโรงงานและจากตลาด การสำรวจตัวอย่างจากตลาดหลังจากการให้คำแนะนำแก่โรงงานที่มีข้อบกพร่องในการผลิต

2.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาวิจัยตามโครงการนี้จะเป็นประโยชน์ต่อโรงงานผลิตไอศกรีม โรงงานตรวจพบข้อบกพร่องในการผลิตเมื่อได้รับคำแนะนำถึงกรรมวิธีผลิตและสุขลักษณะที่ดีในการผลิต จะสามารถปรับปรุงการผลิตให้ดีขึ้นผลิตไอศกรีมมีมาตรฐาน สามารถส่งสินค้าไปขายแข่งขันกับต่างประเทศได้ ถ้าคุณภาพของไอศกรีมของประเทศไทยเป็นที่ยอมรับของต่างประเทศมากขึ้น จะสามารถขยายตลาดในต่างประเทศได้กว้างขวางยิ่งขึ้น และยังให้ประโยชน์ต่อผู้บริโภคไอศกรีมในแง่ที่ได้บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

บทที่ 3 - วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

ตู้เย็น ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ - 20 ± 0.2 องศาเซลเซียส

เครื่องตีปั่น

ตู้อบเพาะเชื้อ ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส

ตู้อบเพาะเชื้อ ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส

เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (hot air sterilizer) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 170 – 175 องศาเซลเซียส

หม้อนึ่งอัด (autoclave) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 121 ± 1 องศาเซลเซียส

เครื่องอังน้ำ ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 45 ± 0.05 องศาเซลเซียส

เครื่องอังน้ำ ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 80 ± 1 องศาเซลเซียส

ตู้อบเพาะเชื้อปราศจากออกซิเจน (anaerobic incubator)

เครื่องนับโคโลนี

กระติกน้ำแข็ง

อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งอาหารสำเร็จรูปของบริษัท Difco[7], Merck[8], Eiken[9] และที่เตรียมขึ้นเอง ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก 1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีดังต่อไปนี้

คุกมีทมีเดียม (cooked meat medium) ของ Oxoid

ซิมมอนส์ ซิเตรท อะการ์ (Simmons citrate agar) ของ Difco

เซเลไนต์ซีสทีนบรอท (selenite cystine broth) ของ Merck

ทริปโทน บรอท (tryptone broth)

ทริปเพิลชูการ์ไอร์ออนอะการ์ (triple sugar iron agar) ของ Difco

นิวเทรียนท์อะการ์ (nutrient agar) ของ Difco

บริลเลียนท์กรีนไบล์ ร้อยละ 2 (brilliant green bile 2%) ของ Difco

บริลเลียนท์กรีนอะการ์ (brilliant green agar) ของ Difco

บิสมัทซัลไฟท์อะการ์ (bismuth sulfite agar) ของ Difco

เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท (brain heart infusion broth) ของ Difco
แบร์คปาร์กเกอร์อะการ์เบส (Baird-Parker agar base) ของ Difco
โปเทโทเดกซโทรสอะการ์ (potato dextrose agar) ของ Difco
เพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar) ของ Difco
โมไทลิติไนเตรทมีเดียม (motility nitrate medium)
ยูเรียบรอท (urea broth) ของ Difco
ลอริลซัลเฟตบรอท (lauryl sulfate broth) ของ Merck
ลีวายน์ อี เอ็ม บี อะการ์ (Levine EMB agar) ของ Difco
แล็กโทสบรอท (lactose broth) ของ Difco
แล็กโทสเจลาทินมีเดียม (lactose gelatin medium)
ไลซีนไอร์ออนอะการ์ (lysine iron agar) ของ Difco
อีซีมีเดียม (EC medium) ของ Difco
เอฟเอ็มซีดับบลิวอะการ์ (FM-CW agar) ของ Eiken Chemical Co., Ltd.
เอส-เอสอะการ์ (SS agar) ของ Difco
เอ็มอาร์-วีพี มีเดียม (MR-VP medium) ของ Difco

3.3 รีเอเจนท์

รีเอเจนท์ชนิดต่าง ๆ มีทั้งสำเร็จรูปและที่เตรียมขึ้นเอง ส่วนประกอบแต่ละชนิดและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก 1

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสำรวจโรงงาน

เจ้าหน้าที่จากฝ่ายจุลชีววิทยา กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพได้ไปสำรวจโรงงานผลิตไอศกรีมในกรุงเทพ ฯ และจังหวัดใกล้เคียง คือ นนทบุรี จำนวน 19 โรงงาน เพื่อศึกษากรรมวิธีผลิตและสุขลักษณะของโรงงาน ในการสำรวจครั้งนี้เมื่อพบข้อบกพร่องในกระบวนการผลิตที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อน และสุขลักษณะของโรงงาน จะให้คำแนะนำแก่โรงงานเกี่ยวกับสิ่งที่ควรแก้ไข ปรับปรุง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เข้าไปในผลิตภัณฑ์

3.5 การเก็บตัวอย่างไอศกรีมสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ได้เก็บตัวอย่างไอศกรีมที่ผลิตจากโรงงาน และที่จำหน่ายในท้องตลาดแหล่งละ 100 ตัวอย่าง ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน เพื่อไม่ให้เป็นการสับสนจะให้ชื่อตัวอย่างที่เก็บจากตลาดในช่วงนี้ว่า ตัวอย่างจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน หลังจากนั้นก็จะมีการวิเคราะห์ข้อมูลของตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน เมื่อวิเคราะห์ผลแล้วทราบว่าทางโรงงานใดมีตัวอย่างที่ไม่ได้มาตรฐาน จะแจ้งผลการวิเคราะห์ ข้อบกพร่อง และแนะนำวิธีแก้ไข หลังจากนั้นก็จะมีการเก็บตัวอย่างจากโรงงานดังกล่าวอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีการเก็บตัวอย่างในท้องตลาดในช่วงระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน เพื่อดูแนวโน้มทั่ว ๆ ไปว่าไอศกรีมที่ขายตามท้องตลาดมีคุณภาพดีขึ้นหรือไม่ โดยการเก็บตัวอย่างไอศกรีมทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เก็บจากตลาดในครั้งนี้จะเรียกว่า ตัวอย่างจากตลาดในช่วงติดตามผล

3.5.1 วิธีเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างได้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่ม แล้วแบ่งเป็น 2 ชุด แต่ละชุดมีน้ำหนักอย่างน้อย 200 กรัม เมื่อไปถึงห้องปฏิบัติการแล้วจะนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ทันทีหนึ่งชุด อีกหนึ่งชุดนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ซ้ำในกรณีมีปัญหา

3.5.1.1 วิธีสุ่มตัวอย่างจากโรงงาน ได้ใช้วิธีแตกต่างกันตามลักษณะของตัวอย่าง คือ

ไอศกรีมชนิดแท่ง มีการบรรจุต่างกัน 2 ชนิด

<u>ชนิดใส่ซองกระดาษ</u> ไม่ปิดสนิท มักจะเปิดด้านที่มีไม้เสียบอยู่ ไอศกรีมชนิดนี้ต้องระมัดระวังในการเก็บตัวอย่างเป็นพิเศษ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ได้เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกชนิดฆ่าเชื้อแล้ว (sterile polyethylene disposable bag) ก่อนบรรจุตัวอย่างต้องนำถุงพลาสติกไปแช่ในกระติกน้ำแข็งซึ่งมีน้ำแข็งแห้งบรรจุอยู่อย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ถุงเย็นจัด เวลาบรรจุไอศกรีมจะได้ไม่ละลาย ก่อนการเก็บตัวอย่าง ล้างมือให้สะอาด ใช้แอลกอฮอล์ซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เช็ดมือเพื่อฆ่าเชื้อและเช็ดบริเวณปากถุง แล้วฉีกปากถุงตามรอยปรุ เปิดปากถุง รีบบรรจุตัวอย่างไอศกรีมลงไปอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในอากาศ ปิดปากถุงโดยม้วนปากถุงลงมาพับปลายทั้งสองข้างด้วยแถบลวดที่ติดมากับถุง ถุงพลาสติกนี้จะอยู่ในสภาพปิดสนิท ในการเก็บตัวอย่างไอศกรีมชนิดนี้

ได้สุ่มตัวอย่างขณะผลิต คือ หลังจากถอดไอศกรีมออกจากแท่งพิมพ์ และบรรจุซองกระดาษเสร็จใหม่ ๆ

<u>ชนิดใส่ถุงกระดาษ</u> ผนึกสนิท ไอศกรีมชนิดนี้อยู่ในสภาพที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนได้อยู่แล้ว ผู้ผลิตจะนำไอศกรีมหลาย ๆ แท่งมาบรรจุรวมในถุงพลาสติก เย็บปากถุง ได้สุ่มตัวอย่างหลังจากบรรจุในถุงพลาสติกแล้ว โดยใช้หลักการดังกล่าวข้างต้น

ไอศกรีมชนิดถ้วยหรือชนิดโคน หลังจากผ่านกรรมวิธีแช่แข็งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ผู้ผลิตจะนำไอศกรีมหลาย ๆ ชิ้นมาห่อรวมกันในถุงกระดาษ ได้สุ่มตัวอย่างหลาย ๆ ถุง แล้วแบ่งเป็น 2 ชุด ใช้หลักการและวิธีการเช่นเดียวกับการสุ่มตัวอย่างไอศกรีมแท่งที่บรรจุในซองกระดาษ

3.5.1.2 วิธีสุ่มตัวอย่างจากตลาด ได้สุ่มตัวอย่างที่วางจำหน่ายในตู้แช่จากจุดต่าง ๆ แล้วแบ่งเป็น 2 ชุด ใช้หลักการและวิธีการเช่นเดียวกับการสุ่มตัวอย่างไอศกรีมแท่งที่บรรจุซองกระดาษ

หลังจากสุ่มตัวอย่างแล้วได้นำตัวอย่างไปบรรจุในกระติกน้ำแข็งซึ่งมีน้ำแข็งแห้งอยู่ โดยใช้น้ำแข็งแห้ง 2 กิโลกรัม ต่อความจุของกระติก 1 ลูกบาศก์ฟุต ทั้งนี้เพื่อควบคุมอุณหภูมิของไอศกรีมไม่ให้เกิน -18 อาศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการละลายของไอศกรีม การใช้น้ำแข็งแห้งนอกจากจะทำให้อุณหภูมิเย็นจัดกว่าน้ำธรรมดาแล้ว ยังมีข้อดี คือน้ำแข็งแห้งจะระเหิดกลายเป็นแก๊ส ไม่ละลายกลายเป็นน้ำเหมือนน้ำแข็งธรรมดา จึงป้องกันการปนเปื้อนตัวอย่างได้ดีกว่า

3.6 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การวิเคราะห์ดัดแปลงจาก AOAC[10] และตาม Ohashi[11]

3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ช้อนซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้ว ตักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มมา 25 กรัม ใส่ลงในเครื่องตีป่น เติมสารละลายเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยความเร็วสูง 1 ถึง 2 นาที จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 ต่อ 10 ทำให้เจือจางต่อไปเรื่อย ๆ โดยใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในสารละลายเจือจาง 9 มิลลิลิตร จนถึง 1 ต่อ 1 000 000

3.6.2 วิธีวิเคราะห์

3.6.2.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count)

-ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง (จากข้อ 3.6.1) ซึ่งมีความเข้มข้นต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ความเข้มข้นละ 2 จาน เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ที่หลอมเหลวแล้ว มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 10-15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อเบา ๆ เพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากับอาหาร รอจนอาหารเป็นวุ้นแข็งตัวจึงคว่ำจาน นำไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

-นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยใช้เครื่องนับโคโลนีที่มีแว่นขยายและแสงสว่างช่วย นับในจานเพาะเชื้อที่มี 30-300 โคโลนี นับทั้ง 2 จาน แล้วหาค่าเฉลี่ย คำนวณและรายงานเป็น จำนวนโคโลนีต่อกรัม

3.6.2.2 ยีสต์

วิธีเตรียมตัวอย่างทำเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 และวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.1 แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโปเทโทเดกซโทรสอะการ์ และอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 2-5 วัน

3.6.2.3 โคลิฟอร์มและอี.โคไล

ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 10, 1 ต่อ 100 และ 1 ต่อ 1 000 ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อลอริลซัลเฟตบรอทอยู่หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด นำหลอดทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ถึง 48 ชั่วโมง ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้น นำไปทดสอบต่อโดยนำหลอดที่มีแก๊สมาเขย่าเบา ๆ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อบริลเลียนท์กรีนไบล์ร้อยละ 2 อบเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ตรวจดูถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเป็นโคลิฟอร์ม คำนวณหาค่าเอ็มพีเอ็นจากจำนวนหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้น โดยใช้ตารางเอ็มพีเอ็น (ภาคผนวก 2)

สำหรับการตรวจสอบ อี.โคไล ในตัวอย่าง 0.01 กรัม ดูจากอาหารเลี้ยงเชื้อลอรีลซัลเฟตบรอท ที่เติมตัวอย่างซึ่งมีความเข้มข้น 1 ต่อ 100 ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นหลังการอบเพาะเชื้อ 24 และ 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออีซีมีเดียม อบเพาะเชื้อในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นนำไปขีดเป็นเส้น ๆ (streak) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อลีวายน์อีเอ็มบีอะการ์

ในลักษณะที่จะให้โคโลนีแยกจากกันหลังการอบเพาะเชื้อ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีซึ่งมีสีเข้มมีเหลือบโลหะ เลือกมาอย่างน้อย 2 โคโลนี นำไปถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเทรียนท์อะการ์ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

-เพาะเชื้อลงในทริปโทนบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทดสอบการเกิดอินโดลโดยเติมโคแวกสรีเอเจนท์ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นที่ส่วนบนซึ่งเป็นชั้นของแอลกอฮอล์ แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวก

-เพาะเชื้อในเอ็มอาร์-วีพีมีเดียม อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเพื่อทดสอบอะเซทิลเมทิลคาร์มินอล โดยเติมสารละลายแอลฟาเนฟทอลร้อยละ 5 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร) 0.2 มิลลิลิตร และครีเอทีน 2-3 เกล็ด เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นแสดงว่าปฏิกิริยาวีพีเป็นบวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสี แสดงว่าปฏิกิริยาวีพีเป็นลบ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพีที่เหลือไปอบเพาะเชื้อต่ออีก 48 ชั่วโมง ทดสอบปฏิกิริยาเมทิลเรด โดยเติมสารละลายเมทิลเรดลงไป 5 หยด ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวก

-เพาะเชื้อในซิมมอนส์ซิเตรทอะการ์ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 96 ชั่วโมง บันทึกผลของการเจริญเติบโตเป็นบวกหรือลบ (การทดสอบซิเตรท)

อี. โคไล จะให้ปฏิกิริยา อินโดลเป็นบวกหรือลบ เมทิลเรดเป็นบวก วีพีเป็นลบ ซิเตรทเป็นลบ

3.6.2.4 ซาลโมเนลลา

-ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล็กโทสบรอท 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

-ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในเซเลไนต์ซีสทีนบรอท อบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อจากเซเลไนต์ซีสทีนบรอท แล้วขีดเป็นเส้น ๆ บนผิวหน้าที่แห้งแล้วของอาหารเลี้ยงเชื้อบิสมัทซัลไฟท์อะการ์ อาหารเลี้ยงเชื้อเอส-เอสอะการ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อบริลเลียนท์กรีนอะการ์ ในลักษณะที่จะให้โคโลนีแยกจากกันหลังการอบเพาะเชื้อ นำไป

อบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีที่ไม่มีสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอส-เอสอะการ์ หรือโคโลนีที่มีสีดำหรือสีเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อบิสมัทซัลไฟท์อะการ์ และโคโลนีสีแดงหรือสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อบริลเลียนท์กรีนอะการ์ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของซาลโมเนลลา

-นำเชื้อที่มีลักษณะของซาลโมเนลลาที่บริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบเพื่อยืนยัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดดังนี้

3.6.2.4.1 เพาะเชื้อลงในทริปเพิลซูการ์ไอร์ออนอะการ์ โดยขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อและแทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ้ามีซาลโมเนลลาจะทำให้ส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง ส่วนภายในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง อาจมีสีดำอยู่ในวุ้นถ้าเป็นชนิดที่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ และมักจะมีแก๊สซึ่งสังเกตุได้จากรอยแยกของวุ้น

3.6.2.4.2 เพาะเชื้อลงในไลซีนไอร์ออนอะการ์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.4.1 ถ้ามีซาลโมเนลลาอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีม่วงอย่างเดิมหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว อาจมีสีดำบ้างถ้าสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ และอาจมีแก๊สด้วย ดูได้จากรอยแยกของวุ้น

3.6.2.4.3 เพาะเชื้อลงในยูเรียบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ถ้าเป็นซาลโมเนลลาจะไม่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ (คอยสังเกตุดูสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการเปลี่ยนสีระหว่างการอบแสดงว่าไม่ใช่ซาลโมเนลลา)

3.6.2.4.4 เพาะเชื้อลงในทริปโทนบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง แล้วเติมโคแวกสรีเอเจนท์ลงไป ถ้าเป็นซาลโมเนลลาจะเกิดปฏิกิริยาอินโดล ลบ จะไม่เปลี่ยนสีของโคแวกสรีเอเจนท์

นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดดังกล่าวมาแล้ว ไปทดสอบการจับตัวเป็นก้อน (agglutination) กับโพลีวาเลนท์โอ (polyvalent O) และโพลีวาเลนท์เอชแอนติซีรา (polyvalent H antisera) ถ้าให้ผลบวกแสดงว่าเป็นซาลโมเนลลา

3.6.2.5 สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส

ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.6.1 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ หยดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแบร์คปาร์กเกอร์อะการ์เบส ที่เติม อี วาย เทลลูไรท์ลงไปแล้ว อย่างละ 3 จาน ใช้แท่ง

แก้วโค้งงอซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ กลับจานเพาะเชื้อ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูถ้ามีโคโลนีซึ่งมีลักษณะเฉพาะคือมีสีดำ เป็นมันนูน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีมีลักษณะทึบ มักจะมีบริเวณใสรอบนอก และดูโคโลนีซึ่งไม่มีลักษณะเฉพาะคือมีลักษณะและขนาดเหมือนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีไม่มีลักษณะทึบและใส นับจำนวนโคโลนีแต่ละชนิดแยกจากกัน เลือกโคโลนีแต่ละชนิดมา 2-3 โคโลนี นำไปดูลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสีแบบกรัม (gram stain) ถ้าพบว่าเป็นเซลล์แบบกลม (cocci) เกาะกันเหมือนพวงองุ่นและติดสีน้ำเงินคือเป็นกรัมบวกจึงนำไปทดสอบโคอะกูเลสต่อ โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท 5 มิลลิลิตร อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

การทดสอบโคอะกูเลส

ละลายโคอะกูเลสพลาสมา อีดีทีเอ (coagulase plasma EDTA) 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดพลาสมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วเล็ก ๆ เติมเชื้อที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท ลงไป 2 หยด อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจดูการแข็งตัวของพลาสมาทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ้ามีการแข็งตัวของพลาสมาเกิดขึ้นแสดงว่ามีแบคทีเรียชนิดสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส

3.6.2.6 คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์

เติมตัวอย่างไอศกรีม 1 กรัม ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อคุกมีทมีเดียม 2 หลอด นำไปแช่ในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วเททับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย พาราฟินที่ฆ่าเชื้อแล้ว อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 3 วัน ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นให้ใช้ที่เขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงในจานเพาะเชื้อเอฟเอ็มซีดับบลิวอะการ์ที่มีเอกโยล์กผสมอยู่ อบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อปราศจากออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีสีเหลืองหรือเหลืองอมขาว มีรัศมีขุ่นรอบ ๆ นำเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวไปตรวจสอบดังนี้

3.6.2.6.1 เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโมไทลิตไนเตรทมีเดียม โดยแทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อ ถ้าเป็นคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

จะมีการเจริญเติบโตเฉพาะแนวที่เพาะเชื้อลงไป (non-motile) แล้วนำไปทดสอบการเกิดไนไตรท์โดยใช้ไนไตรท์เทสท์รีเอเจนท์ โดยการเติมสารละลายเอ 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายบี 0.2 มิลลิลิตร ถ้ามีสีส้มเกิดขึ้นภายใน 15 นาที แสดงว่ามีไนไตรท์ ถ้าไม่มีสีเกิดขึ้น เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าไม่มีสีเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อได้รีดิวซ์ไนเตรทไปหมดแล้ว แต่ถ้ามีสีส้มเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท

3.6.2.6.2 เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล็กโทสเจลาทินมีเดียม อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจดูถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นและสีของอาการเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลแล็กโทสทำให้เกิดกรด แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ตรวจดูว่าเจลาทินกลายเป็นของเหลวหรือไม่ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปอบเพาะเชื้ออีก 24 ชั่วโมง แล้วตรวจว่าเจลาทินกลายเป็นของเหลวหรือไม่อีกครั้งหนึ่ง

3.6.2.6.3 เพาะเชื้อลงในทริปโทนบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทดสอบการเกิดอินโดลโดยเติมโคแวกสรีเอเจนท์ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นที่ส่วนบนซึ่งเป็นชั้นของแอลกอฮอล์ แสดงว่ามีการสร้างอินโดลขึ้น

คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์จะมีการเจริญเติบโตเฉพาะแนวที่เพาะเชื้อ รีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ให้กรดและแก๊สจากแล็กโทส ทำให้เจลาทินละลายเป็นของเหลวใน 48 ชั่วโมง และไม่สร้างอินโดล

บทที่ 4-ผลการทดลอง

4.1 ผลการสำรวจโรงงาน

หลังจากการสำรวจโรงงาน ได้พบข้อบกพร่องต่าง ๆ ดังนี้

4.1.1 กรรมวิธีในการฆ่าเชื้อ

จากการสำรวจโรงงานผลิตไอศกรีม จำนวน 19 โรงงาน มีโรงงาน 6 โรงงานไม่ได้ใช้กรรมวิธีฆ่าเชื้อในกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นกรรมวิธีผลิตที่ไม่ถูกต้อง เพราะตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 33 (พ.ศ.2522) เรื่อง กำหนดไอศกรีมเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานและวิธีการผลิต ได้กำหนดไว้ว่าไอศกรีม นอกจากชนิดแห้งหรือผง ต้องผ่านกรรมวิธีทำให้ร้อน จึงได้แนะนำให้โรงงานเหล่านี้ใช้กรรมวิธีฆ่าเชื้อส่วนประกอบต่าง ๆ หลังจากนำมาผสมรวมกัน โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 68.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที หรือที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 25 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.2 การเก็บส่วนผสมหลังการฆ่าเชื้อ

เมื่อผสมส่วนประกอบต่าง ๆ แล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินไปก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ หรือหลังจากฆ่าเชื้อแล้ว ไม่ทำให้เย็นลงทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน โดยไม่มีฝาปิดภาชนะ วัตถุดิบต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการผลิตไอศกรีม เช่น นมหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม น้ำตาล ผลไม้ ฯลฯ ย่อมมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ เมื่อนำมาผสมรวมกันในน้ำ ทำให้ส่วนผสมนั้นมีภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพราะมีส่วนประกอบของอาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ ครบถ้วน จุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างเช่น เชื้ออี.โคไล ซึ่งถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะในการผลิต เชื้อนี้สามารถแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 ภายในเวลา 15-20 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารและอุณหภูมิ ซึ่งถ้ามีเชื้ออี.โคไลอยู่เพียง 1 เซลล์ในส่วนผสมของไอศกรีม เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแบ่งตัว เชื้อจะสามารถเพิ่มจำนวนเป็น 512 เซลล์ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้การฆ่าเชื้อเป็นไปได้ยากขึ้น ต้องใช้อุณหภูมิหรือเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อจะไม่ทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่จะทำลายเฉพาะจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค จุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แต่ถ้านำไปเก็บที่อุณหภูมิ

ต่ำการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์จะช้าลง จึงเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การที่ไม่มีฝาปิดภาชนะบรรจุส่วนผสมของไอศกรีม ทำให้จุลินทรีย์ในอากาศและฝุ่นละอองมีโอกาสลงไปปนเปื้อนทำให้จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น จึงได้แนะนำผู้ผลิตให้ปิดฝาภาชนะบรรจุต่าง ๆ ตลอดเวลา

สำหรับโรงงานที่พบข้อบกพร่องต่าง ๆ เหล่านี้ ได้อธิบายเหตุผลต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และได้แนะนำให้ผู้ผลิตรีบใช้ความร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาตามข้อ 4.1.1 เพื่อฆ่าเชื้อส่วนผสมของไอศกรีม ถ้าไม่สามารถทำได้ทันทีต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ไม่ควรเก็บไว้นานเกินกว่า 2 ชั่วโมง หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว ต้องรีบทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งควรใช้เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง และต้องเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา จนกว่าจะนำไปผลิตเป็นไอศกรีมต่อไป

4.1.3 การฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนนำไปผสม

มีการเติมส่วนประกอบบางชนิดลงไปหลังจากได้ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อแล้ว เช่น ทุเรียน ขนุน ลอดช่อง เฉาก๊วย ฯลฯ ผู้ผลิตไอศกรีมมักจะใช้เครื่องฆ่าเชื้อชนิด plate-type heater ซึ่งเป็นเครื่องฆ่าเชื้อชนิดใช้อุณหภูมิสูง ระยะเวลาสั้น เพื่อให้ส่วนผสมที่เป็นของเหลวผ่าน plate exchanger ซึ่งเป็นตัวให้ความร้อน ส่วนผสมนั้นจะร้อนถึงอุณหภูมิตามที่ต้องการภายในระยะเวลาสั้น แล้วผ่านเครื่อง cooler ซึ่งจะทำให้เย็นลงถึง 4 องศาเซลเซียส การฆ่าเชื้อโดยใช้ plate-type heater ไม่สามารถใช้กับส่วนประกอบที่เป็นของแข็งได้ ผู้ผลิตจึงเติมส่วนประกอบเหล่านี้ลงไปหลังจากผ่าน plate-type heater มาแล้ว ส่วนประกอบที่เติมลงไปนี้ ไม่ได้ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อมาก่อน จึงทำให้จุลินทรีย์ลงไปปนเปื้อนในส่วนผสมไอศกรีมที่เตรียมไว้

ได้แนะนำผู้ผลิตใช้กรรมวิธีฆ่าเชื้อส่วนประกอบต่าง ๆ ก่อนนำไปเติมลงในส่วนผสมของไอศกรีม โดยใช้กรรมวิธีแตกต่างกันตามแต่ลักษณะ และชนิดของส่วนประกอบเหล่านี้

-ผลไม้สด ให้เลือกผลไม้ที่ไม่เน่าเสีย ผิวภายนอกอยู่ในสภาพเรียบร้อย ไม่มีรอยช้ำหรือถลอก ผลไม้สดชนิดนำไปคั้นเอาน้ำผลไม้ไปใช้ เช่น ส้ม มะนาว ให้นำไปล้างน้ำให้สะอาด แช่ในน้ำซึ่งมีคลอรีนอิสระ (available chlorine) 100 ส่วนในล้านส่วน นาน 1 นาที แล้วนำไปล้างน้ำสะอาดอีกครั้งหนึ่ง จึงนำไปคั้นน้ำโดยใช้เครื่องมือที่สะอาด สำหรับผลไม้ที่ใช้เติมลงไปโดยตรงเช่น ทุเรียน ขนุน ฯลฯ ต้องระมัดระวังความสะอาดให้มากขณะแกะออกมาจากเปลือก ถ้าสามารถนำไปล้างน้ำ

ก่อนได้ ให้นำไปล้าง โดยใช้น้ำสะอาดแล้วนำไปนึ่งให้เดือด 30 นาทีหรือต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่อุณหภูมินี้จนกว่าจะนำไปใช้

-ขนมต่าง ๆ เช่น ลอดช่อง สลิ่ม เฉาก๊วย ผู้ผลิตมักจะซื้อขนมเหล่านี้มาจากตลาด ซึ่งวางขายอยู่ในสภาพไม่ถูกสุขลักษณะ วางขายอยู่ในภาชนะไม่มีฝาปิดให้มิดชิด เพื่อป้องกันฝุ่นละอองและแมลงต่าง ๆ ใช้มือหรือทัพพีที่ไม่สะอาด หยิบหรือตักขนมเหล่านี้ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้มาก ได้ให้คำแนะนำให้ผู้ผลิตต้มขนมเหล่านี้ให้เดือดอย่างน้อย 10 นาที ทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่อุณหภูมินี้จนกว่าจะนำไปใช้

-ส่วนประกอบที่ต้องทำให้สุกก่อน เช่น ข้าวเหนียว ข้าวโพด เผือก สาคู ถั่วดำ ถั่วเขียว ส่วนประกอบพวกนี้ต้องใช้เวลาในการต้มหรือนึ่งนาน ซึ่งจะเป็นการทำลายจุลินทรีย์ได้ แต่มักจะมีการปนเปื้อนหลังจากสุกแล้ว ผู้ผลิตขาดความระมัดระวังในการเก็บส่วนประกอบเหล่านี้ จึงได้แนะนำให้ทำให้เย็นลงทันทีและเก็บเช่นเดียวกับขนมต่าง ๆ

4.1.4 การปิดฝาแท่งพิมพ์

ในการทำไอศกรีมแท่ง ขณะแช่แท่งพิมพ์ในบ่อน้ำเกลือเพื่อให้ไอศกรีมแข็งตัว ไม่ได้ปิดฝาแท่งพิมพ์ ทำให้จุลินทรีย์ในอากาศและน้ำสกปรกจากบ่อน้ำเกลือมีโอกาสลงไปปนเปื้อนได้ ได้ชี้แจงถึงเหตุผลความจำเป็นและแนะนำให้ปิดฝาแท่งพิมพ์ตลอดเวลา เปิดฝาในช่วงที่จะเสียบแท่งไม้ลงไปก่อนไอศกรีมจะแข็งตัว

4.1.5 น้ำที่ใช้ในการแช่แท่งพิมพ์

ในการถอดไอศกรีมแท่งออกจากแท่งพิมพ์ ผู้ผลิตจะนำแท่งพิมพ์ไปแช่ในอ่างน้ำ ไม่มีการเปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่บ่อย ๆ มีไอศกรีมตกลงไปปนเปื้อนในน้ำที่ใช้แช่ จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในไอศกรีมที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญเติบโต แต่เมื่อลงไปอยู่ในน้ำซึ่งมีอุณหภูมิสูงขึ้น (ประมาณ 20 กว่า องศาเซลเซียส) จุลินทรีย์จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากมาย ทำให้น้ำที่ใช้แช่แท่งพิมพ์มีจุลินทรีย์จำนวนมากมาย น้ำที่ใช้แช่นี้มีโอกาสกระเด็นไปปนเปื้อนไอศกรีม ทำให้จุลินทรีย์ลงไปปนเปื้อนในไอศกรีม ได้แนะนำให้ผู้ผลิตพยายามเปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่แท่งพิมพ์บ่อย ๆ และให้ใช้น้ำสะอาดซึ่งมีคุณภาพตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับ 61 (พ.ศ. 2524) เท่านั้น

4.1.6 การสัมผัสแท่งไอศกรีม

คนงานใช้มือจับแท่งไม้เสียบไอศกรีม หรือจับแท่งไอศกรีมบรรจุในซอง ทำให้จุลินทรีย์ลงไปปนเปื้อนไอศกรีม ได้แนะนำให้ผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสโดยตรงกับไอศกรีม สวมถุงมือที่สะอาดถูกสุขลักษณะ ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีสารละลายหลุดออกมาปนเปื้อนอาหาร และของเหลวซึมผ่านไม่ได้

4.1.7 การรักษาความสะอาดของเครื่องใช้ และสถานที่ผลิต

โรงงานขนาดเล็กผู้ผลิตมักขาดความระมัดระวังเรื่องความสะอาดของเครื่องใช้ และสถานที่ผลิต ได้แนะนำผู้ผลิตให้ล้างเครื่องใช้ต่าง ๆ ให้สะอาดทันทีหลังจากเลิกใช้แล้ว ก่อนนำไปใช้ให้ฆ่าเชื้อโดยพ่นด้วยไอน้ำ เป็นเวลา 3-5 นาที หรือแช่ในน้ำร้อนซึ่งมีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที หรือใช้น้ำยาคลอรีนซึ่งมีคลอรีนอิสระ 300 ส่วนในล้านส่วน สำหรับบริเวณสถานที่ผลิตต้องทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ และตลอดเวลา หลังจากเลิกงานแล้วให้ล้างให้สะอาด และฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอรีนซึ่งมีคลอรีนอิสระ 200 ส่วนในล้านส่วน

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพไอศกรีมทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างจากโรงงานและจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไอศกรีมจากโรงงาน 100 ตัวอย่าง และจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน 100 ตัวอย่าง ในระยะเวลาเดียวกัน พบว่าไอศกรีมจากโรงงานและจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานมีคุณภาพไม่ผ่านมาตรฐานร้อยละ 31 และร้อยละ 37 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็น จำนวนตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานที่มีปริมาณจุลินทรีย์ในช่วงต่าง ๆ ไอศกรีมที่มีจุลินทรีย์มากกว่า 6.0×10^5 ต่อกรัม ถือว่าเกินมาตรฐาน พบว่าตัวอย่างไอศกรีมเก็บจากโรงงานร้อยละ 25 มีจุลินทรีย์เกินมาตรฐาน ในขณะที่ตัวอย่างจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานร้อยละ 30 เกินมาตรฐาน

ตารางที่ 4.1 ปริมาณจุลินทรีย์ในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน

จุลินทรีย์ โคโลนี/กรัม	จำนวนตัวอย่าง	
	จากโรงงาน	จากตลาด
$0 - 6.0 \times 10^5$	75	70
$6.1 \times 10^5 - 1.0 \times 10^7$	9	20
$1.1 \times 10^7 - 1.0 \times 10^8$	13	9
$1.1 \times 10^8 - 1.0 \times 10^9$	3	1
รวมตัวอย่างทั้งหมด	100	100

ปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่างไอศกรีมแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานที่มีปริมาณโคลิฟอร์มน้อยกว่า 3 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม มีร้อยละ 33 และ 31 ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงไม่พบโคลิฟอร์มในตัวอย่าง 0.1 กรัม ส่วนปริมาณโคลิฟอร์มสูงมากกว่า 1 000 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม จะพบทั้งในตัวอย่างจากโรงงานและจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน ซึ่งมีถึงร้อยละ 33 และ 37 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโคลิฟอร์มในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน

โคลิฟอร์ม (เอ็มพีเอ็น/กรัม)	จำนวนตัวอย่าง	
	จากโรงงาน	จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน
< 3	33	31
3 - 100	15	17
101 - 1 000	19	15
> 1 000	33	37
รวมตัวอย่างทั้งหมด	100	100

สำหรับ อี.โคไลและคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ก็พบในตัวอย่างไอศกรีมทั้งจากโรงงานและจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบ อี.โคไลในตัวอย่าง 0.01 กรัม ร้อยละ 18 และ 20 ของตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ ส่วนคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ พบร้อยละ 3 และ 9 ของตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างที่พบ อี. โคไล และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ใน 100 ตัวอย่าง

ชนิดของจุลินทรีย์	จำนวนตัวอย่างที่พบ	
	จากโรงงาน	จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน
อี. โคไล ใน 0.01 กรัม	18	20
คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	3	9

ปริมาณยีสต์ในไอศกรีมแสดงในตารางที่ 4.4 ตัวอย่างที่ไม่พบยีสต์เลยมีถึงร้อยละ 25 และ 27 ของตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ ตัวอย่างไอศกรีมที่มีปริมาณยีสต์มากกว่า 1.0×10^2 มีถึงร้อยละ 61 และ 65 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณยีสต์ในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน

ยีสต์ โคโลนี/กรัม	จำนวนตัวอย่าง	
	จากโรงงาน	จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน
0	25	27
$1.0 \times 10 - 1.0 \times 10^2$	14	10
$> 1.0 \times 10^2$	61	65
รวมตัวอย่างทั้งหมด	100	100

สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส พบในตัวอย่างไอศกรีมเพียงร้อยละ 9 และ 13 ของตัวอย่างจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

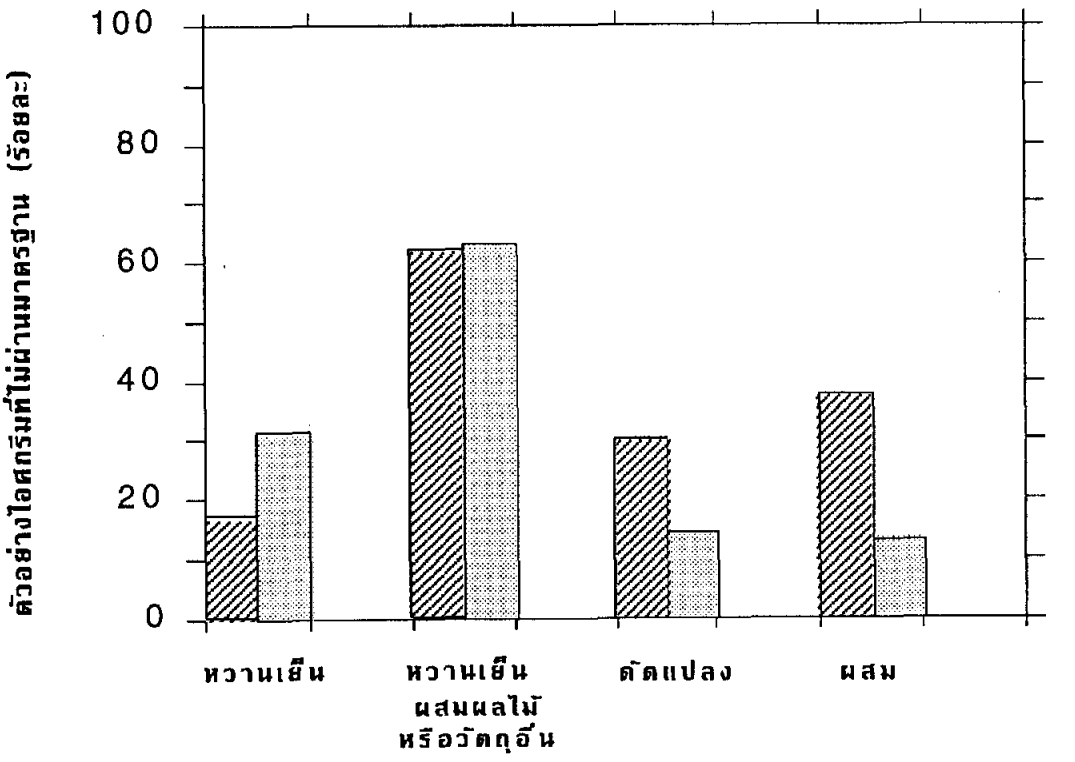
ตารางที่ 4.5 ปริมาณสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในไอศกรีมที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน

สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส โคโลนี/กรัม	จำนวนตัวอย่าง	
	จากโรงงาน	จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน
0	91	87
$1.0 \times 10 - 1.0 \times 10^2$	3	0
$1.1 \times 10^2 - 1.0 \times 10^3$	3	12
$1.1 \times 10^3 - 1.0 \times 10^4$	3	1
รวมตัวอย่างทั้งหมด	100	100

ไม่พบซาลโมเนลลาในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 4.6 เป็นสรุปจำนวนตัวอย่างไอศกรีมจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานที่ไม่ผ่านมาตรฐานจำแนกตามข้อบกพร่อง พบว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานที่มาจากสาเหตุมีจุลินทรีย์และอี.โคไลเกินมาตรฐานมีปริมาณมากกว่าสาเหตุอื่น ๆ

เมื่อเปรียบเทียบประเภทของไอศกรีมชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ผ่านมาตรฐาน จะพบว่าไอศกรีมหวานเย็นผสมผลไม้หรือวัตถุอื่นที่เป็นอาหารมีจำนวนตัวอย่างไม่ผ่านมาตรฐานมากที่สุด โดยมีไอศกรีมที่ไม่ผ่านมาตรฐานสูงถึงร้อยละ 61.9 และ 63.3 ของตัวอย่างไอศกรีมหวานเย็นผสมผลไม้ทั้งหมดที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ไอศกรีมประเภทต่าง ๆ ที่ไม่ผ่านมาตรฐาน
เก็บจาก โรงงาน ▨ และเก็บจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน ▩

ตารางที่ 4.6 ตัวอย่างไอศกรีม*ที่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ไม่ผ่านมาตรฐานจำแนกตามข้อบกพร่อง

สาเหตุที่ทำให้ไม่ผ่านมาตรฐาน	จำนวนตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐาน	
	จากโรงงาน	จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน
จุลินทรีย์เกิน 6.0 x 10^5 โคโลนี/กรัม	9	7
พบ อี.โคไล ใน 0.01 กรัม	1	2
พบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส	2	0
พบคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	3	4
จุลินทรีย์เกิน 6.0 x 10^5 โคโลนี/กรัม และพบ อี.โคไล	9	7
จุลินทรีย์เกิน 6.0 x 10^5 โคโลนี/กรัม และพบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส	1	5
จุลินทรีย์เกิน 6.0 x 10^5 โคโลนี/กรัม พบ อี.โคไล และสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส	6	7
จุลินทรีย์เกิน 6.0 x 10^5 โคโลนี/กรัม พบ อี.โคไล และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	0	3
จุลินทรีย์เกิน 6.0 x 10^5 โคโลนี/กรัม พบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	0	1
พบ อี.โคไล และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	0	1
ร้อยละ	31	37

*ตัวอย่างจากโรงงานและตลาดแหล่งละ 100 ตัวอย่าง

4.3 การแก้ไขข้อบกพร่องของโรงงาน

หลังจากการวิเคราะห์ข้อมูลของตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานรวมอย่างละ 100 ตัวอย่าง แล้วก็ได้มีการแจ้งข้อบกพร่องให้แก่ผู้ผลิต 12 โรงงาน พร้อมทั้งได้ให้คำแนะนำวิธีแก้ไขเกี่ยวกับ

- การฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนนำไปผสม
- การเก็บส่วนผสมหลังจากฆ่าเชื้อ
- การใช้น้ำสะอาดในการแช่แท่งพิมพ์
- สุขลักษณะของโรงงานและคนงาน
- การรักษาความสะอาดของเครื่องมือ เครื่องใช้ในการผลิตและการฆ่าเชื้อโดยใช้น้ำร้อนหรือน้ำผสมคลอรีน

หลังจากผู้ผลิตได้แก้ไขข้อบกพร่องแล้ว ได้เก็บตัวอย่างจากโรงงานเหล่านี้มาวิเคราะห์คุณภาพ ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.7 จากโรงงานทั้งหมด 12 โรงงาน พบว่ามี 8 โรงงานผลิตไอศกรีมที่ผ่านมาตรฐาน คิดเป็นร้อยละ 66.7 ของโรงงานทั้งหมด และจากตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บ 29 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ผ่านมาตรฐาน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐาน 9 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.7 การปรับปรุงแก้ไขของโรงงานที่ผลิตไอศกรีมไม่ได้มาตรฐานหลังจากการให้คำแนะนำและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์อีกครั้ง

โรงงานที่ให้คำแนะนำ	จำนวนตัวอย่างที่เก็บมาวิเคราะห์	จำนวนตัวอย่างที่ผ่านมาตรฐาน	จำนวนตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐาน
โรงงานที่ 1	2	2	-
2	1	1	-
3	3	-	3
4	3	-	3
5	5	5	-
6	1	1	-
7	3	3	-
8	1	1	-
9	2	-	2
10	1	1	-
11	2	1	1
12	5	5	-
รวม 12	29	20	9

4.4 การติดตามผล

หลังจากการสำรวจโรงงาน การเก็บตัวอย่างจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน การแก้ไขข้อบกพร่องของโรงงานรวมทั้งการเก็บตัวอย่างจากโรงงานเหล่านี้อีก ก็ได้มีการเก็บตัวอย่างจากตลาดอีก 100 ตัวอย่าง ในระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน เพื่อดูผลจากการปรับปรุงการผลิตระยะยาว ตารางที่ 4.8 แสดงจำนวนตัวอย่างจากตลาดในช่วงการสำรวจโรงงานและตัวอย่างจากตลาดในช่วงติดตามผล พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างจากตลาดในช่วงติดตามผล น้อยกว่า 6.0×10^5 มีถึงร้อยละ 92 ในขณะที่ตัวอย่างจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานมีร้อยละ 70

ตารางที่ 4.8 ปริมาณจุลินทรีย์ในไอศกรีมที่เก็บจากตลาดในระหว่างสำรวจโรงงานและจากตลาดในช่วงติดตามผล

จุลินทรีย์ โคโลนี/กรัม	จำนวนตัวอย่างจากตลาด	
	ในระหว่างสำรวจโรงงาน	ระยะติดตามผล
0 - 6.0×10^5	70	92
6.1×10^5 - 1.0×10^7	20	8
1.1×10^7 - 1.0×10^8	9	0
1.1×10^8 - 1.0×10^9	1	0
รวมตัวอย่างทั้งหมด	100	100

ไม่พบ อี.โคไล ใน 0.01 กรัมของตัวอย่าง 100 ตัวอย่างที่เก็บจากตลาดในระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน ในช่วงติดตามผล พบคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ 9 ตัวอย่าง ซึ่งเท่ากับตัวอย่างที่เก็บจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน ส่วนสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส พบเพียง 1 ตัวอย่าง ในขณะที่ตัวอย่างจากตลาดในช่วงแรกที่มีการสำรวจโรงงานมี 13 ตัวอย่าง จาก 100 ตัวอย่าง ส่วนซาลโมเนลลาไม่พบในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 4.9 เป็นสรุปจำนวนตัวอย่างไอศกรีมจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน และในช่วงติดตามผลที่ไม่ผ่านมาตรฐานจำแนกตามข้อบกพร่อง พบว่าตัวอย่างที่เก็บจากตลาดในช่วงติดตามผลไม่ผ่านมาตรฐานร้อยละ 10 ในขณะที่ตัวอย่างจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานไม่ผ่านมาตรฐานร้อยละ 37 ตัวอย่างในช่วงติดตามผลส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์

ตารางที่ 4.9 ตัวอย่างไอศกรีมจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานและในช่วงติดตามผล ที่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ไม่ผ่านมาตรฐานจำแนกตามข้อบกพร่อง

สาเหตุที่ทำให้ไม่ผ่านมาตรฐาน	จำนวนตัวอย่างจากตลาดที่ไม่ผ่านมาตรฐาน	
	ช่วงสำรวจโรงงาน	ช่วงติดตามผล
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม	7	1
พบ อี.โคไล ใน 0.01 กรัม	2	0
พบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส	0	0
พบคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	4	4
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม และพบ อี.โคไล	7	0
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม และพบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส	5	0
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม และพบคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	0	4
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม พบ อี.โคไล และสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส	7	0
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม พบ อี.โคไล และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	3	0
จุลินทรีย์เกิน 6.0×10^5 โคโลนี/กรัม พบสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	1	0
พบ อี.โคไล และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	1	1
ร้อยละ	37	10

*ตัวอย่างจากโรงงานและตลาดแหล่งละ 100 ตัวอย่าง

บทที่ 5 - วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจโรงงานพบว่า การผลิตไอศกรีมชนิดแท่งในโรงงานขนาดเล็กมีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย มีการใช้มือเสียบแท่งไม้ลงในไอศกรีมโดยไม่ได้สวมถุงมือ การถอดไอศกรีมออกจากแท่งพิมพ์ไม่ได้ระวังเกี่ยวกับการใช้น้ำที่มีคุณภาพบริโภคได้ในการแช่แท่งพิมพ์ บางครั้งคนงานขาดความระมัดระวัง ทำให้น้ำที่ใช้แช่แท่งพิมพ์กระเด็นเข้าไปปนเปื้อนไอศกรีมได้ เมื่อถอดไอศกรีมออกจากแท่งแล้ว นำไปวางในถาดหรือบนโต๊ะ ซึ่งมักจะไม่ระมัดระวังความสะอาด ใช้มือจับไอศกรีมไปห่อกระดาษหรือบรรจุซองกระดาษโดยตรง จึงทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย ไม่ได้ระมัดระวังความสะอาดของวัตถุดิบ เครื่องใช้ คนงาน และสถานที่ผลิต สำหรับโรงงานขนาดใหญ่หรือขนาดกลาง ใช้เครื่องจักรในการผลิตแบบอัตโนมัติ สุขลักษณะของโรงงานอยู่ในเกณฑ์ดี จึงไม่ค่อยมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

การวิเคราะห์คุณภาพไอศกรีมจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามกราฟรูปที่ 4.1 ไอศกรีมหวานเย็นผสมผลไม้หรือวัตถุอื่นที่เป็นอาหาร มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ไม่ผ่านมาตรฐาน ร้อยละ 61.9 และ 63.3 ของไอศกรีมหวานเย็นที่ผสมผลไม้ทั้งหมด โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ แสดงว่าความสะอาดของวัตถุดิบที่ผสมเข้าไปยังไม่เพียงพอ ผู้ผลิตมักจะผสมวัตถุดิบเหล่านี้ลงไปหลังจากผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อส่วนผสมอื่น ๆ แล้ว

ตารางที่ 4.1 และ 4.8 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ในไอศกรีม การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของไอศกรีม และยังใช้ตรวจสอบความสะอาดของอุปกรณ์ในการผลิต สิ่งแวดล้อม ตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานที่มีจำนวนจุลินทรีย์ในไอศกรีมเกิน 6.0×10^5 ถือว่า ไม่ผ่านมาตรฐาน จะเห็นว่าตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานมีจำนวนตัวอย่างที่มีจุลินทรีย์เกินมาตรฐานในจำนวนใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.1) ส่วนตัวอย่างที่เก็บจากตลาดในช่วงติดตามผลมีจำนวนตัวอย่างที่มีจุลินทรีย์เกินมาตรฐาน ลดลงอย่างมาก (ตารางที่ 4.8) ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความสะอาดในการผลิตมีมากขึ้นกว่าเดิม นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หายีสต์ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งช่วยบ่งถึงกรรมวิธีผลิตไม่ถูกสุขลักษณะและใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ ในกรณีที่พบยีสต์เป็นปริมาณมาก

เมื่อวิเคราะห์ดูสาเหตุที่ทำให้คุณภาพทางจุลินทรีย์ไม่ผ่านมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 ไอศกรีมจากโรงงาน 100 ตัวอย่าง ไม่ผ่านมาตรฐาน 31

ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 31 จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน 100 โรงงาน ไม่ผ่านมาตรฐาน 37 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37 พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค คือ สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในตัวอย่างไอศครีมจากโรงงาน 9 ตัวอย่าง จากตลาด 13 ตัวอย่าง สุมณฑาและคณะ[12] ก็รายงานว่าพบเชื้อสแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในตัวอย่างไอศกรีมร้อยละ 24.5 ของตัวอย่างอาหารที่เก็บมาวิเคราะห์ทั้งหมด การปนเปื้อนของเชื้อนี้มักจะมีสาเหตุมาจากการสัมผัสด้วยมือของคนงานในระหว่างการผลิต ซึ่งเชื้อนี้จะแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะตามผิวหนังคน การพบเชื้อนี้ปนเปื้อนในไอศกรีมจะเป็นตัวบอกถึงสุขลักษณะในการผลิตยังไม่ดี ต้องหลีกเลี่ยงการสัมผัสไอศกรีมด้วยมือให้มากที่สุด

นอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ในตัวอย่างไอศกรีมจากโรงงาน 3 ตัวอย่าง จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน 9 ตัวอย่าง

ส่วนโคลิฟอร์มและ อี.โคไล ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 พบในไอศกรีมที่เก็บจากทั้งในโรงงานและจากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน จุลินทรีย์พวกนี้จะพบอยู่ทั่วไปในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น การพบจุลินทรีย์พวกนี้ในผลิตภัณฑ์จะบ่งถึงสุขลักษณะที่ไม่ถูกต้องขณะผลิตหรืออาจมีการปนเปื้อนหลังการผลิต

การติดตามผลการปรับปรุงแก้ไขของโรงงานหลังจากให้คำแนะนำ จากผลการวิเคราะห์ตามตารางที่ 4.7 ได้เก็บตัวอย่างไอศกรีมมาวิเคราะห์ทั้งหมด 29 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ผ่านมาตรฐาน 20 ตัวอย่าง ไม่ผ่านมาตรฐาน 9 ตัวอย่าง

ถ้าพิจารณา แต่ละโรงงานที่มีการปรับปรุงแก้ไขแล้ว ทำการผลิตไอศกรีมมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ผ่านมาตรฐาน 8 โรงงาน จาก 12 โรงงาน คิดเป็นร้อยละ 66.7

การติดตามผลโดยการเก็บตัวอย่างจากตลาด 100 ตัวอย่างในช่วงระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน พบว่ามีตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานลดลงอย่างมาก ทั้งนี้สาเหตุหนึ่งมาจากการปรับปรุงคุณภาพของโรงงานผลิตไอศกรีมในช่วงที่มีการสำรวจ และได้รับการแนะนำให้มีการปรับปรุงการผลิตให้ถูกต้อง จึงทำให้ผลิตไอศกรีมออกมามีคุณภาพที่ดี มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น

บทที่ 6 - สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจโรงงานพบว่าโรงงานผลิตไอศกรีมในโรงงานขนาดเล็กมีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไอศกรีมชนิดแท่ง มีการใช้มือสัมผัสกับไอศกรีมมากในการเสียบแท่งไม้ การถอดไอศกรีมออกจากแท่ง และการบรรจุ ผู้ผลิตขาดความระมัดระวังเกี่ยวกับความสะอาดของวัตถุดิบ เครื่องใช้ และสถานที่ผลิต คนงานขาดความรู้ด้านสุขอนามัย บางโรงงานไม่ได้ใช้กรรมวิธีฆ่าเชื้อในกระบวนการผลิต ส่วนโรงงานขนาดใหญ่และขนาดกลาง ใช้ระบบการผลิตแบบอัตโนมัติ สุขลักษณะของโรงงานอยู่ในเกณฑ์ใช้ได้ จึงมีโอกาสปนเปื้อนได้น้อย

การวิเคราะห์คุณภาพไอศกรีมทางจุลชีววิทยาพบว่า ตัวอย่างไอศกรีมเก็บจากโรงงานมีคุณภาพไม่ผ่านมาตรฐาน 31 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 31 ของตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานทั้งหมด จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงานไม่ผ่านมาตรฐาน 37 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37 ของตัวอย่างที่เก็บจากตลาด ไอศกรีมหวานเย็นที่ผสมผลไม้หรือวัตถุอื่นที่เป็นอาหารมีการปนเปื้อนมากที่สุด โดยมีตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานถึงร้อยละ 61.9 และ 63.3 ของไอศกรีมหวานเย็นที่ผสมผลไม้ทั้งหมด โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานและตลาดในช่วงสำรวจโรงงานตามลำดับ แสดงว่าความสะอาดของวัตถุดิบที่ผสมเข้าไปยังไม่เพียงพอ ผู้ผลิตมักจะผสมวัตถุเหล่านี้ลงไปหลังจากผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อส่วนผสมอื่น ๆ แล้ว นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค คือ สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในไอศกรีมจากโรงงาน 9 ตัวอย่าง จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน 13 ตัวอย่าง และคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ในไอศกรีมจากโรงงาน 3 ตัวอย่าง จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน 9 ตัวอย่าง พบ อี.โคไล ในตัวอย่าง 0.01 กรัม ในไอศกรีมจากโรงงาน 18 ตัวอย่าง จากตลาดในช่วงสำรวจโรงงาน 20 ตัวอย่าง ไม่พบซาลโมเนลลาในทุกตัวอย่าง

การติดตามผลการปรับปรุงแก้ไขของโรงงาน หลังจากได้ให้คำแนะนำ พบว่าส่วนใหญ่ปรับปรุงดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 66.7 ของโรงงานที่ให้คำแนะนำ ส่วนตัวอย่างจากตลาดในช่วงติดตามผลพบว่ามีการปรับปรุงดีขึ้น โดยมีตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานร้อยละ 10 ของตัวอย่างจากตลาดในช่วงติดตามผลทั้งหมด

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. *ประโยชน์ต่ออาเซียน*

การศึกษาวิจัยตามโครงการนี้ ได้รับการพิจารณาจากคณะทำงานอาเซียนว่าด้วยการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีทางอาหารแล้วว่า เป็นโครงการที่มีประโยชน์ในด้านการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงได้อนุมัติเงินสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยได้ให้ความรู้ทางวิชาการแก่โรงงานผลิตไอศกรีมในด้านสุขลักษณะและกรรมวิธีผลิตที่ถูกต้องทางเทคนิค หลังจากโรงงานได้ปรับปรุงแก้ไขตามที่ได้รับคำแนะนำ สามารถผลิตไอศกรีมที่มีคุณภาพดีและปลอดภัยในการบริโภค ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ของโครงการที่ต้องการยกระดับมาตรฐานการผลิตของโรงงาน

ปัจจุบัน ประเทศต่าง ๆ ในกลุ่มอาเซียนได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับพิษภัยของอาหารที่บริโภค ผลการวิจัยตามโครงการนี้ จะได้นำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาโรงงานของประเทศในกลุ่มอาเซียน สำหรับประเทศที่ยังไม่เคยศึกษาในเรื่องนี้ จะได้นำผลการวิจัยตามโครงการนี้ไปใช้ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและพัฒนาโรงงาน

2. *ประโยชน์ต่อผู้ผลิตไอศกรีม*

ผู้วิจัยได้ให้ความรู้ทางวิชาการแก่ผู้ผลิตไอศกรีม ดังนี้

-วิธีฆ่าเชื้อส่วนผสมของไอศกรีมโดยการใช้กรรมวิธีที่เหมาะสม

-วิธีฆ่าเชื้อส่วนประกอบที่ต้องเติมลงไปภายหลังการฆ่าเชื้อส่วนผสม โดยใช้ plate-type heater ซึ่งจำเป็นต้องใช้วิธีแตกต่างกัน ตามลักษณะและชนิดของส่วนประกอบเหล่านั้น

-วิธีการเก็บส่วนผสมทั้งก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ โดยการเก็บที่อุณหภูมิที่พอเหมาะ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

-การปิดฝาภาชนะที่ใช้ในการผลิตและฝาแท่งพิมพ์เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

-ความสำคัญของการใช้น้ำสะอาดในกรรมวิธีผลิต

-วิธีฆ่าเชื้อเครื่องมือ เครื่องใช้ในการผลิต โดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี การใช้สารเคมี ได้ให้ความรู้ในการเลือกใช้สารเคมีชนิดที่ปลอดภัย และการใช้ในประมาณที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

-สุขลักษณะของโรงงานและคนงาน

หลังจากผู้ผลิตได้ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องตามที่ได้รับคำแนะนำแล้ว สามารถผลิตไอศกรีมมีคุณภาพตามมาตรฐาน เป็นการช่วยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต

ไอศกรีมให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ผู้ผลิตสามารถส่งสินค้าไปขายแข่งขันกับต่างประเทศได้ ขณะนี้มีบางโรงงานส่งไอศกรีมไปจำหน่ายที่ประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์ ถ้าคุณภาพของไอศกรีมของประเทศไทยเป็นที่ยอมรับของต่างประเทศมากขึ้น จะสามารถขยายตลาดในต่างประเทศได้กว้างขวางยิ่งขึ้น

3. *ประโยชน์ต่อผู้บริโภค*

เมื่อผู้ผลิตได้พัฒนาและปรับปรุงกรรมวิธีผลิต เพื่อให้ไอศกรีมมีคุณภาพตามมาตรฐาน ผู้บริโภคไม่ต้องเสี่ยงต่อการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งจะทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ มีอาการอาเจียน ท้องเสีย ซึ่งจากการติดตามผลโดยการเก็บตัวอย่างจากตลาด ก็พบว่าไอศกรีมผ่านมาตรฐานมากกว่าช่วงสำรวจโรงงาน จึงนับว่าผู้บริโภคได้รับประโยชน์อย่างมากในแง่ที่ได้บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีขึ้นได้มาตรฐาน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ อาจารย์เสริมศรี คงศักดิ์ อดีตรองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์บริการ ในการให้คำปรึกษาและแนะนำจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพในการให้คำแนะนำและแก้ไขการเขียนผลงานนี้ งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีทางอาหารของอาเซียน จึงขอขอบคุณมา ณ. โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 33 (พ.ศ. 2522) และฉบับที่ 101 (พ.ศ. 2529) เรื่องกำหนดไอศกรีมเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และกำหนดคุณภาพ หรือมาตรฐานและวิธีการผลิต

2. วิสิฐ จะวะสิต. ไอศกรีม. **หมอชาวบ้าน** ปีที่ 15, ฉบับที่ 178, มีนาคม 2537, หน้า 76-78

3. Andreasen, T. G. and Nielsen, H. Ice cream and aerated desserts. In: **The Technology of Dairy Products**, ed., R. Early. R., VCH Publishers, Inc., New York, 1992, p.197-219.

4. Varnam, A. H. and Sutherland, P. J. **Milk and Milk Products**. Chapman & Hall, London, 1994, p. 387-431.

5. Frazier, W. C. **Food Microbiology**. McGraw-Hill Book Company. New York, 1967, p. 325.

6. Tanminga, S. K., Beumer, R. R. and Kampelmacher, E. H. Bacteriological examination of ice-cream in the Netherlands: Comparative studies on methods. **Journal of Applied Bacteriology**. 1980, vol. 49, p. 244-245.

7. Difco Manual Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10^{th} ed. Difco Laboratories. Detroit Michigan 1984.

8. E. Merck, Handbook Culture Media Merck, Darmstadt, 1983.

9. Eiken Products for Culture Media. Eiken Chemical Co., Ltd. Tokyo Japan.

10. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14^{th} ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, Virginia 1984: 941-943, 963-969, 971.

11. Chashi, M. H., Murakami, H., Kudoh, Y., Sakai, S. **Manual for the Laboratory Diagnosis of Bacterial Food Poisoning and the Assessment of the Sanitary Quality of Food**. Seamic Publication, Tokyo. 1978, p. 55-57

12. สุมณฑา วัฒนสินธุ์ จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์ และ ธัญลักษณ์ นินบดี. การแพร่กระจายของเชื้อ สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส ในอาหาร. **วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์** ปีที่ 22, ฉบับที่ 4, 2523, หน้า 193-208

ภาคผนวก 1

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1.1 คุกมีทมีเดียม (cooked meat medium) ของ Oxoid

มีส่วนประกอบดังนี้

หัวใจวัว	454	กรัม
เพปโทน (peptone)	10	กรัม
แลบเล็มโก พาวเดอร์ (lab-lemco powder)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ใช้คุกมีทมีเดียม 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 ซิมมอนส์ ซิเตรท อะการ์ (Simmons citrate agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate)	0.2	กรัม
แอมโมเนียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (ammonium dihydrogen phosphate)	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	1	กรัม
โซเดียมซิเตรท (sodium citrate)	2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
บรอมไทมอลบลู (brom thymol blue)	0.08	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.8 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอด ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดให้เอียงจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวให้มีส่วนสแลนท์ (slant)

1.3 เซเลไนต์ซีสทีนบรอท (selenite cystine broth) ของ Merck

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน (tryptone)	5	กรัม
แล็กโทส (lactose)	4	กรัม
โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate)	10	กรัม
โซเดียมแอซิดเซเลไนต์ (sodium acid selenite)	4	กรัม
แอล-ซีสทีน (L-cystine)	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด แบ่งใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้หมดภายในวันที่เตรียม

1.4 ทริปโทน บรอท (tryptone broth)

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

1.5 ทริปเพิลชูการ์ไอร์ออนอะการ์ (triple sugar iron agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์ (beef extract)	3	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์ (yeast extract)	3	กรัม
เพปโทน	15	กรัม
โพรทีโอสเพปโทน (proteose peptone)	5	กรัม
เดกซโทรส (dextrose)	1	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
ซูโครส (sucrose)	10	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate)	0.2	กรัม

โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate)	0.3	กรัม
วุ้น	12	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.024	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองขนาดขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดให้เอียงจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวให้มีส่วนบัทท์ (butt) และส่วนสแลนท์ (slant)

1.6 นิวเทรียนท์ (nutrient agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์	3	กรัม
เพปโทน	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.8 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.7 บริลเลียนท์กรีนไบล์ ร้อยละ 2 (brilliant green bile 2%) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน	10	กรัม
ดีวัว (Oxgall)	20	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
บริลเลียนท์กรีน (brilliant green)	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดจับแก๊ส ดูแรห์มคว่ำอยู่ในหลอด บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.8 บริลเลียนท์กรีนอะการ์ (brilliant green agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

โพรทีโอสเพปโทน	10	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	3	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
แซ็กคาโรส (saccharose)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
บริลเลียนท์กรีน	0.0125	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.9 บิสมัทซัลไฟท์อะการ์ (bismuth sulfite agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์	5	กรัม
เพปโทน	10	กรัม
เดกซโทรส	5	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต (disodium phosphate)	4	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต	0.3	กรัม
บิสมัทซัลไฟท์อินดิเคเตอร์ (bismuth sulfite indicator)	8	กรัม
วุ้น	20	กรัม
บริลเลียนท์กรีน	0.025	กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.7 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดฝา ต้มให้เดือดไม่เกิน 1-2 นาที ต้องระวังอย่าให้เดือดนานกว่านี้ ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.10 เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท (brain heart infusion broth) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

อินฟิวชั่นจากสมองลูกวัว (infusion from calf brain)	200	กรัม
อินฟิวชั่นจากหัวใจวัว (infusion from beef heart)	250	กรัม
โพทีโอสเพปโทน	10	กรัม
เดกซโทรส	2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

1.11 แบร์คปาร์กเกอร์อะการ์เบส (Baird-Parker agar base) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน	10	กรัม
บีฟเอกซแทรกต์	5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	1	กรัม
ไกลซีน (glycine)	12	กรัม
โซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate)	10	กรัม
ลิเทียมคลอไรด์ (lithium chloride)	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส เติม อี วาย เทลลูไรท์ เอ็นริชเมนท์ (EY tellurite enrichment, Difco) 50 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.12 โปเทโทเดกซโทรสอะการ์ (potato dextrose agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

อินฟิวชั่นจากมันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซโทรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 5.6 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปรับความเป็นกรด-ด่างก่อนนำไปใช้ให้เท่ากับ 3.5 โดยใช้ กรดทาร์ทาริกร้อยละ 10 (10% tartaric acid) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปใช้ได้ทันที

1.13 เพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน	5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	2.5	กรัม
เดกซโทรส	1	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.14 โมไทลิติไนเตรทมีเดียม (motility nitrate medium)

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์	3	กรัม
เพปโทน	5	กรัม
โพแทสเซียมไนเตรท (potassium nitrate)	5	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
กาแล็กโทส (galactose)	5	กรัม
กลีเซอรอล (glycerol)	5	กรัม
วุ้น	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.3 ± 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีจุกเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.15 ยูเรียบรอท (urea broth) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ยีสต์เอกซแทรกต์	0.1	กรัม
โมโนโพแทสเซียม ฟอสเฟต (monopotassium phosphate)	9.1	กรัม
ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต	9.5	กรัม
ยูเรีย (urea)	20	กรัม
ฟีนอลเรด	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.8 ± 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์ แบ่งใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อขนาด 13 x 125 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 3 มิลลิลิตร

1.16 ลอริลซัลเฟตบรอท (lauryl sulfate broth) ของ Merck

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส (tryptose)	20	กรัม
ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต	2.75	กรัม
โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	2.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
แล็กโทส	5	กรัม
โซเดียม ลอริล ซัลเฟต (sodium lauryl sulfate)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.8 ± 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดจับแก๊ส ดูแรห์ม (durham) คว่ำอยู่ในหลอด บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

1.17 ลีวายน์ อี เอ็ม บี อะการ์ (Levine EMB agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน	10	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	2	กรัม
อีโอซิน วาย (Eosin Y)	0.4	กรัม
เมทิลลีน บลู (methylene blue)	0.065	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส เติมส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.18 แล็กโทสบรอท (lactose broth) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์	3	กรัม
เพปโทน	5	กรัม
แล็กโทส	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

1.19 แล็กโทสเจลาทินมีเดียม (lactose gelatin medium)

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส	15	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	10	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	5	กรัม
ฟีนอลเรด	0.05	กรัม
เจลาทิน (gelatin)	120	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.5 ± 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีจุกเกลียวขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.20 ไลซีนไอร์ออนอะการ์ (lysine iron agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน	5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	3	กรัม
เดกซโทรส	1	กรัม
แอล-ไลซีน ไฮโดรคลอไรด์ (L-lysine hydrochloride)	10	กรัม

เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	0.04	กรัม
บรอมครีซอลเพอร์เพิล (brom cresol purple)	0.02	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.7 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดให้เอียงจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวให้มีส่วนบัทท์ และส่วนสแลนท์

1.21 อีซีมีเดีย (EC medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส	20	กรัม
แล็กโทส	5	กรัม
ไบล์ซอลต์หมายเลข 3 (bile salts No. 3)	1.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	4	กรัม
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต	1.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีหลอดจับแก๊ส ดูแรห์ม คว่ำอยู่ในหลอด บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.22 เอฟเอ็มซีดับบลิวอะการ์ (FM-CW agar) ของ Eiken Chemical Co. Ltd.

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน	15	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	5	กรัม

อินฟิวชั่นจากสมองลูกวัว	50	กรัม
อินฟิวชั่นจากหัวใจวัว (infusion from ox heart)	65	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
ฟีนอล เรด	0.05	กรัม
ฟราดิโอมัยซิน (fradiomycin)	400	มิลลิกรัม
วุ้น	15	กรัม

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.6

เติมส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก ต้มให้เดือด ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมเอกโยล์กเอ็นริชเมนท์ (egg yolk enrichment, Difco) ร้อยละ 10 ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.23 เอส-เอสอะการ์ (SS agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์	5	กรัม
โพรทีโอสเพปโทน	5	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
ไบล์ซอลท์	8.5	กรัม
โซเดียมซิเตรท	8.5	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	8.5	กรัม
เฟอร์ริก ซิเตรท (ferric citrate)	1	กรัม
บริลเลียนท์กรีน	0.33	มิลลิกรัม
นิวทรัลเรด (neutral red)	0.025	กรัม
วุ้น	13.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก ต้มให้เดือด 2-3 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ

55-60 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

1.24 เอ็มอาร์-วีพี มีเดียม (MR-VP medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บัฟเฟอร์ เพปโทน (buffered peptone)	7	กรัม
ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต	5	กรัม
เดกซโทรส	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

2. รีเอเจนท์

2.1 กรดทาร์ทาริกร้อยละ 10 (10% tataric acid)

ชั่งกรดทาร์ทาริก 10 กรัม ใส่น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 โคแวกสรีเอเจนท์ (Kovac's reagent)

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimethy-aminobenzaldehyde) 5 กรัม ในเอมิลอัลกอฮอล์ 75 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

2.3 โคอะกูเลสพลาสมา อีดีทีเอ (coagulase plasma EDTA) ของ Difco

2.4 ซาลโมเนลลาโพลีวาเลนท์ เอช แอนติซีรัม (Salmonella polyvalent H antiserum) ของ Difco

2.5 ซาลโมเนลลาโพลีวาเลนท์ โอ แอนติซีรัม (Salmonella polyvalent O antiserum) ของ Difco

2.6 ไนไตรท์เทสท์รีเอเจนท์ (nitrite test reagent)

2.2.1 สารละลายเอ

ละลายกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) 8 กรัม ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 5 โมลต่อ ลิตร จำนวน 1 ลิตร

2.2.2 สารละลายบี

ละลายแอลฟาแนฟทอล (α-naphthol) 5 กรัม ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 5 โมลต่อ 1 ลิตร จำนวน 1 ลิตร

2.7 สารละลายเจือจาง

ใช้สารละลายริงเกอร์ (ringer solution) - ¼ strength ringer solution tablets ของ Oxoid

มีส่วนประกอบดังนี้

โซเดียมคลอไรด์	2.25	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)	0.105	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride $6H_2O$)	0.12	กรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate)	0.05	กรัม

ค่าความเป็นกรด-ด่าง สุดท้ายเท่ากับ 7.0

ส่วนประกอบที่สำเร็จแล้วจะเป็นเม็ด (tablet) ละลาย 1 เม็ด ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายริงเกอร์เจือจาง 1 ใน 4 ซึ่งใช้เป็นสารละลายเจือจางในการเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก 2

ตารางเอ็มพีเอ็น (AOAC 1984)

(ใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ความเข้มข้นละ 3 หลอด)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก				จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม	0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม	0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม	0.1	0.01	0.001	เอ็มพีเอ็น/กรัม
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	<3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100