abst

วศ ก๘
ว47

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6ว

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพน้ำยาล้างผักชนิดต่าง ๆ ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักสด

นางชุติมา วิไลพันธ์

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6ว

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพน้ำยาล้างผักชนิดต่าง ๆ ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักสด

เลขหมู่ วฝ กธ
ค 47
เลขทะเบียน 11253
วันที่ 9, ก.ย. 461

นางชุติมา วิไลพันธ์

ด้วยอภินันทนาการ
จาก
ชุติมา วิไลพันธ์

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดปริมาณจุลินทรีย์ในผักสด 7 ชนิดได้แก่ ผักกาดหอม บัวบก ผักชี ต้นหอม คื่นช่าย ถั่วงอก ถั่วฝักยาว โดยใช้น้ำยา 4 ชนิด ได้แก่ น้ำยาล้างผักในท้องตลาดที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก (7 % Sodium lauryl ether sulfate) สารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.1 % $KMnO_4$) สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร (2 % acetic acid) และสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยแช่ผักสดลงในน้ำยาดังกล่าวเป็นเวลา 10 นาที พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โคลิฟอร์ม (coliforms) ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) ก่อนล้างด้วยน้ำยามีค่าอยู่ระหว่าง 6-7 $\log_{10}$ CFU, 5-6 $\log_{10}$ CFU และ 1-3 $\log_{10}$ CFU ต่อกรัมตามลำดับ โดยตรวจพบ *อี.โคไล (E. coli)* ในผักกาดหอม บัวบก ต้นหอม และคื่นช่าย และตรวจไม่พบ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* (*Clostridium perfringens*) ในผักสดทั้ง 7 ชนิด

ผลการทดลองหลังจากล้างผักสดด้วยน้ำยาทั้ง 4 ชนิด พบว่าการล้างด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นวิธีที่ให้ผลในการลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *อี. โคไล* ได้ดีกว่าการล้างผักสดด้วยน้ำยาอีกสามชนิดที่ทำการศึกษา โดยสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ประมาณร้อยละ 17-33 ลดจำนวนโคลิฟอร์มได้ประมาณร้อยละ 17-60 และลดจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มได้ประมาณร้อยละ 33-67 รวมทั้งตรวจไม่พบเชื้อ *อี.โคไล* นอกจากนั้นยังสามารถคงสภาพความสดของผักได้เหมือนเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับการล้างด้วยสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่มีผลทำให้ผักเหี่ยวสูญเสียสภาพความสดไป และการล้างด้วยสารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ทำให้ผักมีการเปลี่ยนแปลงของสีและความสดลดลง ส่วนน้ำยาล้างผักในท้องตลาดพบว่าให้ผลในการลดปริมาณจุลินทรีย์ได้น้อยมาก

ดังนั้นการล้างผักสดด้วยสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นวิธีการที่สะดวกและให้ผลในการลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ดีกว่าน้ำยาล้างผักอีกสามชนิดที่ใช้ทดลอง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญตาราง	ii
สารบัญภาพ	iii
1. คำนำ	1
ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง	9
วัตถุประสงค์	9
ระยะเวลาดำเนินการ	9
ประโยชน์ที่ได้รับ	9
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	10
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์ผลการทดลอง	30
สรุปผลการทดลอง	32
กิตติกรรมประกาศ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม	36
สารเคมีและวิธีเตรียม	43

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	22
ตารางที่ 2	จำนวนโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	24
ตารางที่ 3	จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่างๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	26
ตารางที่ 4	ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *อี. โค ไล* ที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	28
ตารางที่ 5	ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ*คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	29

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	23
ภาพที่ 2	จำนวนโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	25
ภาพที่ 3	จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่างๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา	27

1.คำนำ

ผักและผลไม้สดมักจะเกิดการเสียหลังการเก็บเกี่ยว ในระหว่างการขนส่งจากแหล่งผลิตสู่ตลาด การจำหน่าย และการรอเข้าโรงงานเพื่อการแปรรูป ผักและผลไม้มีความแตกต่างจากอาหารอื่น ๆ คือ เมื่อถูกเก็บเกี่ยวแล้วก็จะยังคงมีชีวิตอยู่เนื่องจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของผักและผลไม้ยังคงทำงานอยู่ตลอดเวลามีการหายใจเอาออกซิเจนไปสันดาปกับสารอินทรีย์ภายในโดยมีเอนไซม์เป็นตัวกระตุ้น ได้พลังงานออกมาเสริมสร้างและเปลี่ยนแปลงสิ่งต่าง ๆ ภายในเซลล์ การหายใจของผักและผลไม้จะมีการสูญเสียน้ำซึ่งจะทำให้น้ำหนักของผลไม้สดและผักสดลดน้อยลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อ่อนแอต่อการทำลายของจุลินทรีย์ และเกิดการเน่าเสียได้ สภาพการเก็บผักและผลไม้ก็มีความสำคัญต่อความแข็งแรงของผักและผลไม้สด

ผักและผลไม้นอกจากจะนำมาบริโภคสดในฤดูกาลแล้ว ยังมีการเก็บรักษาและแปรรูปเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดต่าง ๆ เพื่อเก็บไว้บริโภคนอกฤดูกาลด้วย เช่น การผลิตเป็นผักหรือผลไม้กระป๋อง การหมักดอง การทำแห้ง เป็นต้น

การปนเปื้อนของผักและผลไม้[6,13]

ผักและผลไม้จะมีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมตั้งแต่ยังอยู่ในแปลงหรือในสวนและทันทีที่ผักและผลไม้ถูกเก็บเกี่ยวเพื่อนำไปจำหน่าย อาจมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นจากผู้ที่เกี่ยวข้อง จากภาชนะบรรจุ และจากผักหรือผลไม้ด้วยกันเอง ภายหลังการเก็บเกี่ยวมักจะนำผักและผลไม้มาใส่รวมกันในภาชนะบรรจุจนเต็ม ผักบางต้นหรือผลไม้บางผลอาจเกิดการเน่าเสียและผู้เก็บเกี่ยวมิได้คัดออกไปจึงเกิดการปนเปื้อนไปยังผักและผลไม้ที่มีสภาพดีด้วย การบรรจุผักและผลไม้ในภาชนะบรรจุแน่นเกินไป การโยนภาชนะบรรจุและการทับถมกันมาก ๆ ของภาชนะบรรจุในขณะขนส่ง อาจทำให้ผักและผลไม้ช้ำและง่ายต่อการทำลายของจุลชีพที่ติดอยู่ได้

การล้างหรือการพรมน้ำผักและผลไม้ให้สดนั้น อาจทำโดยการนำผักและผลไม้ไปจุ่มแกว่งน้ำหรือใช้วิธีสเปรย์ซึ่งอาจเป็นการแพร่กระจายเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนที่เสียไปยังส่วนที่ดีได้ อีกทั้งเป็นการเพิ่มความชื้นให้กับอาหารซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีขึ้น

การทำความสะอาดผักและผลไม้ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้ออาจเป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ติดมาได้

การคัดเลือกเอาผักหรือผลไม้ที่เสียออกไปจากส่วนที่ดี หรือการตัดส่วนที่เสียออกจากส่วนที่ดีจะช่วยขจัดจุลินทรีย์ได้มาก แต่ส่วนที่ถูกตัดจะง่ายต่อการทำลายยิ่งขึ้น การใช้ปูนป้ายส่วนที่ถูกตัดไปจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ดี ขณะที่ผักและผลไม้ถูกนำไปจำหน่ายในตลาดอาจเกิดการปนเปื้อนจากภาชนะบรรจุหรือแผงที่วางขาย นอกจากนี้การเลือกซื้อของผู้บริโภคอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ถ้ามือของผู้บริโภคไม่สะอาด สำหรับผักหรือผลไม้นำไปแปรรูป อาจเกิดการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นหรือจุลินทรีย์อาจถูกขจัดออกไปเมื่อผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ในขบวนการแปรรูป เช่น การทำความสะอาด การลวกด้วยน้ำร้อน หรือการแช่ในน้ำด่างซึ่งจะช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ การบ่มผลไม้ให้สุกอาจมีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ได้ การตัดแต่งผลผลิตอาจเกิดการปนเปื้อนจากเครื่องมือเครื่องใช้ที่เกี่ยวข้องได้ถ้าไม่ระมัดระวังในเรื่องความสะอาด เครื่องมือต่าง ๆ ควรทำด้วยโลหะผิวเรียบซึ่งจะทำความสะอาดได้ง่ายกว่าชนิดที่ทำด้วยไม้ การลวกผักด้วยน้ำร้อนแม้ว่าจะช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ลง แต่ก็อาจเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophile) สร้างสปอร์เพิ่มขึ้นซึ่งจะเป็นปัญหาในการผลิตอาหารกระป๋องได้

การขจัดจุลินทรีย์ออกไปจากผักและผลไม้[2,6]

การทำความสะอาดผักและผลไม้ก่อนที่จะนำไปเก็บรักษานั้นอาจทำให้จุลินทรีย์ที่ปะปนมาหลุดออกไปได้มาก การทำความสะอาดอาจทำโดยการแช่ผักหรือผลไม้ในอ่างแล้วใช้มือถูทำความสะอาดและคอยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ ครั้ง หรืออาจจะใช้เครื่องฉีดน้ำไปยังผักหรือผลไม้ในอ่าง หรือใช้เครื่องกวนน้ำให้น้ำเคลื่อนที่พัดเอาฝุ่นผง ดินให้หลุดออกไป หรือใช้เครื่องพ่นฝอยให้น้ำพ่นไปยังผักหรือผลไม้ที่เคลื่อนมาตามสายพานก็ได้ การใช้หลายวิธีร่วมกันจะทำให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น แต่ถ้าน้ำที่ใช้ล้างนั้นไม่สะอาดก็อาจเป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ให้กับผักหรือผลไม้ได้ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น สารละลายคลอรีน หรือบอแรกซ์ ทำความสะอาดจะช่วยขจัดจุลินทรีย์ได้ดี

สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (chemical sanitizer)

สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะช่วยลดปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ คุณสมบัติ ชนิด และปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อมีรายละเอียดดังนี้[8,10,11]

สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1. ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด
2. มีประสิทธิภาพในทุกสภาวะ
3. ละลายน้ำได้ดี
4. มีความคงตัว
5. สะดวกในการใช้
6. หาได้ง่าย
7. ราคาถูก
8. ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง
9. ไม่เป็นพิษ
10. ไม่มีกลิ่นที่น่ารังเกียจ

การจำแนกชนิดของสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ

1. สารประกอบพวกคลอรีน (chlorine compounds) เช่น
   - ไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite)
   - คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide)
   - คลอรีนเหลว (liquid chlorine)
   - สารประกอบพวกคลอรามีนทั้งในรูปสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ (inorganic/organic chloramines)
2. สารประกอบพวกไอโอดีน (iodine compounds) เช่น
   - ไอโอโดฟอร์ (iodophor)
   - สารละลายแอลกอฮอล์-ไอโอดีน (alcohol-iodine solution)
   - สารละลายไอโอดีน (aqueous iodine solution)
3. กลุ่มโบรมีน (bromine sanitizer)

4. กลุ่มควอเทอร์นารี แอมโมเนียม (quaternary ammonium sanitizer, quats)
5. กลุ่มที่เป็นกรด (acid sanitizer) เช่น
   - กรดแอซีติก
   - กรดเพอร์ออกซีแอซีติก
   - กรดแลคติก
   - กรดโพรพิโอนิค
   - กรดฟอร์มิก
6. โอโซน

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ของสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ

1. ระยะเวลาการสัมผัส
2. อุณหภูมิที่ใช้
3. ความเป็นกรด-ด่าง
4. ระดับของการปนเปื้อน
5. คุณภาพของน้ำที่ใช้
6. บริเวณที่จุลินทรีย์ปนเปื้อน
7. ความเข้มข้นที่ใช้

กลไกในการทำลายจุลินทรีย์ของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ[3,7,9,10,12]

1. สารประกอบพวกคลอรีน

- เข้าไปทำลายแคปซูลของแบคทีเรีย
- เปลี่ยนแปลงสภาพโปรโตพลาสซึมของเซลล์
- เกิดเป็นสารพิษตกค้างภายในเซลล์
- เปลี่ยนแปลงสภาพการซึมผ่านสารเข้าออกของเซลล์
- ทำให้โปรตีนของเซลล์ตกตะกอน
- มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

กลไกการทำงานเกิดจากเมื่อคลอรีนรวมตัวกับน้ำเกิดเป็นกรดไฮโปคลอรัส

$$Cl_2+H_2O \rightarrow HCl + HClO \text{ (Hypochlorus acid)}$$

ทำนองเดียวกัน ไฮโปคลอไรท์ และคลอรามีน ก็แตกตัวให้เกิดกรดไฮโปคลอรัส เช่นกัน ซึ่งกรดไฮโปคลอรัส ต่อมาจะแตกตัวปล่อยอะตอมออกซิเจน (nascent oxygen); $HClO \rightarrow HCl+O$ ซึ่งอะตอมออกซิเจนที่ออกมาเป็นสารออกซิไดซ์ อย่างแรงเมื่อทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ จึงส่งผลทำลายจุลินทรีย์

2. กลุ่มที่เป็นกรด เมื่อกรดเข้าไปในเซลล์จุลินทรีย์จะแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน เกิดการยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์

3. กลุ่มที่เป็นเกลือ เช่น โซเดียมคลอไรด์ นั้นเกิดจากความแตกต่างของความเข้มข้นของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์ทำให้เซลล์เหี่ยว (plasmolysis) รวมทั้งเกิดการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างตัวกลางที่เซลล์จุลินทรีย์เกาะติดอยู่กับเกลือ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์หลุดออก

4. กลุ่มที่มีสารลดแรงตึงผิว (surfactants, anionic surfactant) เป็นส่วนประกอบ เช่น โซเดียมอัลคิลซัลเฟต (sodium alkyl sulfates) ซึ่งได้จากปฏิกิริยา

$$n\text{-}C_{11}H_{23}CH_2OH \xrightarrow{H_2SO_4} n\text{-}C_{11}H_{23}CH_2OSO_3H \xrightarrow{NaOH} n\text{-}C_{11}H_{23}CH_2OSO_3\text{-}Na^+$$

Lauryl alcohol Lauryl hydrogen sulfate Sodium lauryl sulfate

จะช่วยลดแรงตึงผิวทำให้เซลล์จุลินทรีย์หลุดออกมา และทำให้สารฆ่าเชื้อเข้าไปทำลายได้ง่ายขึ้น

5. โอโซนและด่างทับทิมหรือโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ทำลายจุลินทรีย์โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเหมือนสารประกอบพวกคลอรีน

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารและผักสด

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารแต่จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขลักษณะและความปลอดภัยในการบริโภคผักสดได้แก่[1,5,13]

1. ปริมาณของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในผัก (aerobic plate count / total plate count)

สามารถใช้บอกได้ถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหล่งที่เพาะปลูกและแหล่งน้ำที่ใช้ การจัดการรวมถึงสุขลักษณะของขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิต เนื่องจากถ้าบริเวณที่เพาะปลูกและแหล่งน้ำมีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูงก็จะทำให้ผักมีการปนเปื้อนในปริมาณสูงด้วย นอกจากนี้ภายหลังการเก็บเกี่ยวถ้าไม่มีการล้างทำความสะอาดเพื่อลดปริมาณแบคทีเรียและ/หรือในระหว่างการขนส่งและเก็บรักษาไม่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ การปนเปื้อนจากคนงาน ภาชนะและอุปกรณ์ต่างๆ ก็จะทำให้แบคทีเรียดังกล่าวแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีสารอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ อันจะส่งผลต่อคุณภาพด้านจุลชีววิทยาและความสดของผัก ดังนั้นการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในผักจึงถูกใช้เป็นดัชนีที่บอกถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยรวมและคุณภาพทางด้านความสดของผักได้อีกทางหนึ่ง

2. โคลิฟอร์ม (coliforms bacteria)

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์เอนเทอโรแบคเทอริเอซิอี (Enterobacteriaceae) ลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน มีคุณสมบัติเฉพาะที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดและก๊าซภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่สกุล *เอสเชอริเชีย (Escherichia), เอนเทอโรแบคเตอร์ (Enterobacter), ซิโตรแบคเตอร์ (Citrobacter), เครบเซลลา (Klebsiella)* ส่วนฟีคัล โคลิฟอร์ม (fecal coliforms) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดและก๊าซที่อุณหภูมิประมาณ 44.5-45.5 องศาเซลเซียสได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่สกุล *เอสเชอริเชีย* และ *เครบเซลลา* บางชนิด

แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม มักถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้สุขลักษณะในแหล่งน้ำ อาหาร รวมถึงกระบวนการผลิต เนื่องจากพบได้ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตและสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น ดินและแหล่งน้ำได้ดี ซึ่งถ้าพบในอาหารหรือน้ำก็แสดงถึงโอกาสของการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายของสิ่งมีชีวิต ดิน ฯลฯ ส่วนฟีคัล โคลิฟอร์ม มักถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้โอกาสของการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายของมนุษย์เนื่องจากพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป โดยแบคทีเรียที่สำคัญและถูกกำหนดให้เป็นตัวบ่งชี้อยู่เสมอๆ ได้แก่ *อี. โคไล* (*Escherichia coli)* ซึ่งถ้าพบในอาหารหรือน้ำก็แสดงให้เห็นถึงโอกาสการปนเปื้อนจากอุจจาระของมนุษย์ โดยอาจเกิดจากการขาดการควบคุมระบบสุขลักษณะที่ดีหรือกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกต้อง โดยการบ่งชี้ดังกล่าวนอกจากจะบอกถึงความสะอาดแล้วยังบอกถึงอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบในระบบทางเดินอาหาร เช่น *ซาลโมเนลลา* (*Salmonella* spp.) *ชิเกลลา* (*Shigella* spp.) *วิบริโอ* (*Vibrio* spp.) เป็นต้น นอกจากนี้ *อี. โคไล* บางสายพันธุ์ยังถูกจัดไว้ในกลุ่ม เอนเทอโรไวรูเลนท์ *อี. โคไล* (enterovirulent *E. coli)* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญอีกด้วย

3. *คลอสตริเดียม* (*Clostridium* spp.)

เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (anaerobic bacteria) ซึ่งพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติเช่น ดิน น้ำ มูลสัตว์ นอกจากนี้ยังพบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ โดยจะมีทั้งที่ทำให้เกิดโรคและไม่ทำให้เกิดโรค *คลอสตริเดียม* มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore)ได้ ตำแหน่งและรูปร่างของสปอร์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *คลอสตริเดียม* เช่น *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* (*Clostridium perfringens)* มีสปอร์รูปไข่อยู่ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ *คลอสตริเดียม โบทูลินุม* (*C. botulinum)* มีสปอร์รูปไข่อยู่ตรงกลางหรือบางครั้งอาจพบอยู่ค่อนไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วน *คลอสตริเดียม เตตานิ* (*C. tetani)* มีสปอร์รูปกลมอยู่ที่ตำแหน่งปลายสุดของเซลล์ *คลอสตริเดียม* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย โดยชนิดที่มีความสำคัญและทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้บ่อยๆ เช่น *คลอสตริเดียม เตตานิ* ที่ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก *คลอสตริเดียม โบทูลินุ่ม* โดยเฉพาะชนิด A, B, E และ F ทำให้เกิดโรค โบทูลิซึ่ม (Botulism) โดยการสร้างเอกซ์โซทอกซิน

(exotoxin) ที่ไม่ทนความร้อนแต่มีความรุนแรงมาก ซึ่งสารพิษนี้จะไปมีผลต่อการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ทำให้เกิดโรคแก๊สแกงกรีน (gas gangrene) ซึ่งจะทำให้แผลเกิดการบวมมีก๊าซอยู่ภายใน แผลมีสีคล้ำและมีกลิ่นเหม็น แต่ถ้าเป็น *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ชนิด A จะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่เชื้อสร้างขึ้น โดยจะมีอาการปวดท้องอย่างรุนแรง อุจจาระร่วง อาจมีอาการคลื่นไส้และอาเจียนร่วมด้วย ส่วนใหญ่มักปรากฏอาการภายใน 8-24 ชั่วโมง ถ้าเป็น *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ชนิด C จะทำให้เกิด เนคโครไทซิ่ง เจจูนิสติก (necrotizing jejunitis) ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้องอย่างรุนแรง อุจจาระเป็นเลือด คลื่นไส้ อาเจียน เกิดภาวะร่างกายขาดน้ำและช็อครวมถึงมีสารพิษในกระแสเลือดซึ่งมักมีอาการรุนแรงจนถึงตายได้

คลอสตริเดียม ที่มีบทบาทสำคัญในผักสดได้แก่ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์*ซึ่งการบริโภคผักสดที่มีการปนเปื้อน *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* และสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นเข้าไปภายในร่างกายจะทำให้เกิดเป็นโรคขึ้น โดยจะพบแบคทีเรียชนิดนี้ในระบบทางเดินอาหารและสิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำลงในแหล่งน้ำที่ใช้เพาะปลูกรวมทั้งจากดิน นอกจากนี้กระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม กระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ การเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้อง จะมีผลทำให้ *คลอสตริเดียม* ปนเปื้อนอยู่โดยเฉพาะในลักษณะของสปอร์ซึ่งจะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นเมื่อสภาวะเหมาะสม

ปัญหาและที่มาของการทดลอง

ปัจจุบันนี้ผู้บริโภคได้ให้ความใส่ใจกับสุขภาพอนามัยกันมากขึ้นและได้มีความนิยมบริโภคอาหารที่สดที่ผ่านกรรมวิธีน้อยที่สุด ผักสดจึงเป็นอาหารสำคัญที่ผู้บริโภคนิยมกันมาก กลุ่มงานจุลชีววิทยามีหน้าที่วิเคราะห์ทดสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นผักสดที่นำมาบริโภคนั้นควรมีความสะอาดและปลอดภัยต่อการบริโภค จึงได้ทำการศึกษาวิจัยการล้างผักด้วยน้ำยาล้างผักชนิดต่าง ๆ ว่าสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผักสดได้ดีเพียงพอต่อการบริโภคหรือไม่

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาล้างผักชนิดต่าง ๆ ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักสด

ระยะเวลาดำเนินการ

5 เดือน (มกราคม – พฤษภาคม 2545)

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้วิธีล้างผักที่สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยน้ำยาล้างผักที่ให้ผลดี
2. ใช้เป็นข้อมูลแนะนำผู้บริโภคในการบริโภคผักสดได้อย่างปลอดภัย
3. เป็นข้อมูลเผยแพร่สู่ประชาชนที่สนใจ

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (hot air sterilizer) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 170 –190 องศาเซลเซียส

1.2 เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียด 0.01 กรัม

1.3 เครื่องตีป่น (stomacher)

1.4 ตู้เย็นซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 2-10 องศาเซลเซียส

1.5 ตู้อบเพาะเชื้อซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 35± 1 องศาเซลเซียส

1.6 เครื่องอังน้ำ (water bath) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 45.5± 0.2 องศาเซลเซียส

1.7 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 121± 1 องศาเซลเซียส

2.วัสดุ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปของบริษัท Difco[2] และ Merck[6] ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีดังต่อไปนี้

2.1.1 เพลตเคาน์อะการ์ (Plate count agar) ของ Difco

2.1.2 แมคคองกี้อะการ์ (MacConkey agar) ของ Difco

2.1.3 อีซี มีเดียม (EC medium) ของ Difco

2.1.4 ลีวาย อีเอ็มบีอะการ์ (Levine EMB agar) ของ Difco

2.1.5 ทริบโทน (Tryptone) ของ Difco

2.1.6 เอ็มอาร์ – วีพี มีเดียม (MR-VP medium) ของ Difco

2.1.7โคเซอร์ซิเตรท มีเดียม (Koser citrate medium) ของ Difco

2.1.8 คุกมีท มีเดียม (Cook meat medium) ของ Difco

2.1.9 ทีเอสซีอะการ์ (TSC agar) ของ Merck

2.1.10 ทีเอสซีอะการ์ ซัพพลีเมนต์ (TSC agar supplement) ของ Merck

2.1.11 โมทิลิตีไนเตรทมีเดียม (Motility Nitrate medium) ของ Difco

2.1.12 แลคโทสเจลาตินมีเดียม (Lactose gelatin medium) ของ Difco

2.1.13 ลิตมัสมิลค์ (Litmus milk) ของ Difco

2.1.14 ฟลูอิด ไธโอไกลโคเลท บรอท (Fluid thioglycollate broth)

2.2 สารเคมี

วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวก สารเคมีที่ใช้มีดังต่อไปนี้

2.2.1 สารละลายสำหรับเจือจาง (dilution fluid)

2.2.2 โคแวกสรีเอเจนท์ (Kovac's reagent)

2.2.3 สารเคมีสำหรับทดสอบ Voges-Proskauer (VP) reaction

2.2.4 ไนเตรตดีเทคชั่นรีเอเจนท์ (nitrate detection reagent)

2.3 น้ำยาล้างผัก

2.3.1 น้ำยาล้างผักในท้องตลาดที่มีส่วนประกอบของโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก

2.3.2 สารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร

2.3.3 สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร

2.3.4 สารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร

2.4 ตัวอย่างผักสด

ผักกาดหอม บัวบก ผักชี ต้นหอม คื่นช่าย ถั่วงอก ถั่วฝักยาว (แต่ละชนิดทำ 2 ซ้ำ) จากตลาดนนทบุรี

3. อุปกรณ์

3.1 แอนแอโรบิคจาร์ (anaerobic jar) และแอนแอโรบิคซิสเท็ม (anaerobic system)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ของกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

การทดลอง[1,5,11,13]

1. การเตรียมตัวอย่างก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างผัก

นำตัวอย่างผักสด 7 ชนิดๆ ละประมาณ 500 กรัมมาล้างด้วยน้ำประปา สะเด็ดน้ำให้แห้งวางบนตะแกรงทิ้งให้น้ำหยดประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นชั่งตัวอย่างผักสดดังกล่าวมา 25 กรัม โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) แล้วเติมสารละลายสำหรับเจือจางลงไป 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีปั่น ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายตัวอย่างผักสดที่มีความเจือจาง 1:10 จากนั้นทำเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า โดยใช้สารละลายสำหรับเจือจางจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม (ประมาณ 10^{-1}-10^{-6}) แล้วนำมาตรวจสอบจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่บ่งชี้สุขลักษณะคือ โคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม *อี.โคไล* และจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในผักสดคือ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์*

2. การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count)

2.1 *วิธีทดลอง*

2.1.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างตามข้อ 1 ที่มีความเจือจางต่างๆ กันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อโดยทำความเจือจางละ 2 จาน

2.1.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2.1.3 คัดเลือกจานเพาะเชื้อซึ่งจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี มานับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter) แล้วบันทึกผล

2.1.4 หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ แล้วคูณด้วยค่าไดลูชั่นแฟคเตอร์ (dilution factor) ของความเจือจางที่นับจำนวนได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนี (colony forming unit หรือ CFU) ที่พบในตัวอย่าง 1 กรัม

2.2 หลักการคำนวณ

2.2.1 ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้ของความเจือจางแรกที่ใช้น้อยกว่า 25 โคโลนี ให้หาค่าเฉลี่ยแล้วรายงานผลเป็นค่าโดยประมาณและใส่เครื่องหมายกำกับไว้เพื่อบ่งบอกว่าค่าที่ได้เป็นค่าที่อยู่นอกช่วง 25-250 โคโลนี

2.2.2 ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้ของความเจือจางสุดท้ายที่ใช้มากกว่า 250 โคโลนี ให้เลือกนับจำนวนโคโลนีในบริเวณที่มีการกระจายตัวของโคโลนีสม่ำเสมอ 4 บริเวณ ในพื้นที่บริเวณละ 1 ตารางเซนติเมตร นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อทั้งหมด (ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาด 15x100 มิลลิเมตร จะมีพื้นที่เท่ากับ 65 ตารางเซนติเมตร) นำผลที่ได้มาคูณด้วยค่าไดลูชั่นแฟคเตอร์ แล้วรายงานผลเป็นค่าโดยประมาณและใส่เครื่องหมายกำกับไว้เพื่อบ่งบอกว่าค่าที่ได้เป็นค่าที่อยู่นอกช่วง 25-250 โคโลนี

2.2.3 ถ้าไม่พบจำนวนโคโลนีเกิดขึ้นในทุกความเจือจางที่เลือกใช้ ให้รายงานผลเป็นตัวเลขที่น้อยกว่าความเจือจางแรกที่เลือกใช้ เช่นที่ 1:100 ให้รายงานผลเป็น น้อยกว่า 100 CFU

2.2.4 ถ้าในความเจือจางเดียวกันที่เลือกใช้มีจานเพาะเชื้อหนึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี ส่วนอีกจานเพาะเชื้อหนึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่นอกเหนือค่า 25-250 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีจากทั้ง 2 จาน หาค่าเฉลี่ย แล้วคูณด้วยค่าไดลูชั่นแฟคเตอร์

2.2.5 ถ้าในความเจือจางต่อเนื่องกันที่เลือกใช้ในแต่ละความเจือจางมีจานเพาะเชื้อหนึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี ส่วนอีกจานเพาะเชื้อหนึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่นอกเหนือค่า 25-250 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีจากทั้ง 4 จาน หาค่าเฉลี่ยรวมแล้วคูณด้วยค่า dilution factor

2.2.6 ถ้าในความเจือจางต่อเนื่องกันที่เลือกใช้ความเจือจางแรกมีจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้ออยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนีทั้งสองจาน ส่วนความเจือจางต่อมามีจานเพาะเชื้อหนึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี ส่วนอีกจานหนึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่นอกเหนือค่า 25-250 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีจากทั้ง 4 จาน หาค่าเฉลี่ยรวมแล้วคูณด้วยค่า ไดลูชั่นแฟคเตอร์

2.2.7 ถ้ามีการแผ่กระจายของโคโลนี (spread) ในจานเพาะเชื้อที่จำเป็นต้องใช้นับจำนวนโคโลนี ให้รายงานผลว่าพบการแผ่กระจายของโคโลนี หรืออาจนับบริเวณที่แผ่กระจายเป็น 1 โคโลนีแล้วนับจำนวนโคโลนีที่เหลือตามปกติ หาค่าเฉลี่ย แล้วคูณด้วยค่าไดลูชั่นแฟคเตอร์

2.3 *การรายงานผล*

ให้รายงานผลเป็นตัวเลขเพียง 2 ลำดับ เช่น 28,000 CFU, 1,600 CFU เป็นต้น โดยถ้าตัวเลขในลำดับที่ 3 ของค่าเฉลี่ยมีค่ามากกว่า 5 ให้ปรับตัวเลขในลำดับที่ 2 เพิ่มขึ้นอีก 1 ค่า เช่น 28,800 ให้รายงานเป็น 29,000 ถ้าตัวเลขในลำดับที่ 3 ของค่าเฉลี่ยมีค่าน้อยกว่า 5 ให้ปรับตัวเลขในลำดับที่ 3 เป็นศูนย์ เช่น 28,400 ให้รายงานเป็น 28,000 แต่ถ้าตัวเลขในลำดับที่ 3 ของค่าเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 5 ให้พิจารณาจากตัวเลขในลำดับที่ 2 ถ้าเป็นเลขคี่ให้ปัดตัวเลขในลำดับที่ 2 ขึ้น 1 ค่า เช่น 37,500 ให้รายงานเป็น 38,000 ถ้าเป็นเลขคู่ให้ปรับตัวเลขในลำดับที่ 3 เป็นศูนย์ เช่น 36,500 ให้รายงานเป็น 36,000

แต่ปัจจุบันการรายงานผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดหรือจำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่มีรายงานในวารสาร (Journal) หรือบทความต่างๆทางจุลชีววิทยา นิยมรายงานผลในรูปของค่า Log ฐาน 10 ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการแสดงผลและง่ายต่อความเข้าใจ เช่น ผลที่ได้เท่ากับ 10,000 CFU / กรัม จะมีค่าเท่ากับ 4 $\log_{10}$ CFU / กรัม เป็นต้น

3. การตรวจหาจำนวนโคลิฟอร์มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

3.1 *วิธีทดลอง*

3.1.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างตามข้อ 1 ที่มีความเจือจางต่างๆ กันประมาณ (10^{-1}-10^{-6}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อโดยทำความเจือจางละ 2 จาน

3.1.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อแมคคองกี้อะการ์ ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันกับสารละลายตัวอย่างตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.1.3 คัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนีมาเลือกนับจำนวนโคโลนีเฉพาะที่มีลักษณะสีชมพูแดง ด้วยเครื่องนับจำนวนโคโลนี คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีของโคลิฟอร์มต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.2 *หลักการคำนวณ*

ใช้หลักการตามที่อ้างถึงในข้อ 2.2

3.3 *การรายงานผล*

ใช้หลักการตามที่อ้างถึงในข้อ 2.3

4. การตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์ม

4.1 *วิธีทดลอง*

4.1.1 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีชมพูแดงจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แมคคองกี้อะการ์ในข้อ 3.1.2 โดยการสุ่มนับมาใส่ลงในอีซีบรอท ที่มีหลอดดักก๊าซอยู่ด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส (ในเครื่องอังน้ำควบคุมอุณหภูมิ) นาน 24-48 ชั่วโมง

4.1.2 สังเกตก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ หลอดที่มีก๊าซบันทึกผลเป็นผลบวก หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์มหลังจากการตรวจสอบยืนยันแล้วคูณด้วยไดลูชั่นแฟคเตอร์ของความเจือจางที่นับจำนวนได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์มต่อตัวอย่าง 1 กรัม

4.2 *หลักการคำนวณ*

ใช้หลักการตามที่อ้างถึงในข้อ 2.2

4.3 *การรายงานผล*

ใช้หลักการตามที่อ้างถึงในข้อ 2.3

5. การตรวจหา *อี. โคไล*

5.1 *วิธีทดลอง*

5.1.1 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากอีซีบรอทในข้อ 4.1.2 มาขีด (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลีวาย อีเอ็มบีอะการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.1.2 คัดเลือกโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *อี. โคไล* บน ลีวาย อีเอ็มบีอะการ์ โดย *อี. โคไล* บน ลีวาย อีเอ็มบีอะการ์ จะมีโคโลนีสีม่วงดำเป็นมันวาวปนสีเขียว (metallic sheen) หรือโคโลนีสีม่วงดำมาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนอะการ์ที่วางให้เป็นแนวเอียง (nutrient agar slant) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาศึกษาทดสอบอิมวิคเทสท์ (IMViC test) ซึ่งประกอบด้วย

5.1.2.1. ความสามารถในการสร้างอินโดล โดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 5.1.2 ลงในอาหาร-เหลวทริปโตนบรอท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการหยดโคแวกสรีเอเจนท์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2-3 หยด เขย่าให้ผสมกัน ถ้าเกิดสีชมพูแดงในชั้นของรีเอเจนท์ (เดิมสีเหลือง) ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลืองเหมือนเดิมให้บันทึกผลเป็นลบ

5.1.2.2 ความสามารถในการสร้างกรด จากการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 5.1.2 ลงในอาหารเหลวเอ็มอาร์-วีพี ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุก 48 ชั่วโมงแต่ไม่เกิน 96 ชั่วโมง โดยการเติมสารละลายเมธิลเรดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3-5 หยด ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงบันทึกผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองบันทึกผลเป็นลบ

5.1.2.3 ความสามารถในการสร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินอล (acetylmethylcarbinol) จากการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 5.1.2 ลงในอาหารเหลวเอ็มอาร์-วีพี 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเติมสารละลายแอลฟา เนฟทอลร้อยละ 5 (5 % alpha-naphthol) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรและโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 (40 % potassium hydroxide) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าอาหารมีสีชมพูเกิดขึ้นบันทึก

ผลเป็นบวก ส่วนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เปลี่ยนสีให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อดูผลภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกผลเป็นลบ

5.2.1.4 ความสามารถในการใช้ซิเตรต โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 5.1.2 ลงบนผิวหน้าอาหาร โคเซอร์ ซิเตรต มีเดียม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูการเจริญและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ้ามีการเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ ถ้าไม่มีการเจริญและอาหารใสเหมือนเดิมแสดงว่าแบคทีเรียนั้นไม่สามารถใช้ซิเตรตได้

อี. โคไล จะมีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้ก๊าซและมีปฏิกริยาของ IMViC เป็น + + - - หรือ - + - -

5.2 *การรายงานผล*

รายงานผล พบหรือไม่พบ อี.โคไล ในตัวอย่าง 0.1 กรัม

6. การตรวจหา*คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์*

6.1 *วิธีทดลอง*

6.1.1 ปิเปตต์ตัวอย่างจากข้อ 1 ที่มีความเจือจาง 1:10 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อคุกมีท มีเดียม ที่ต้มไล่อากาศและทิ้งให้เย็นลงแล้ว หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปวางในเครื่องอังน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีเพื่อทำลายเซลล์ปกติ (vegetative cell) แต่ไม่ทำลายสปอร์ เทวุ้นร้อยละ 2 ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทุกหลอด หลอดละ 1-2 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันอากาศละลายผ่านลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

6.1.2 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากอาหารคุกมีท มีเดียม ที่มีลักษณะเกิดการย่อยเนื้อและมีก๊าซดันขึ้นมาขีดลงบนอาหารทีเอสซีอะการ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (ใน anaerobic jar หรือ anaerobic incubator)

6.1.3 คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ซึ่งลักษณะโคโลนีของ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* บน ทีเอสซีอะการ์ จะมีลักษณะโคโลนีสีดำมันวาว มาเลี้ยงในฟลูอิดไธโอไกลโคเลทบรอท ซึ่งต้มไล่อากาศและทิ้งให้เย็นแล้ว บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ได้ไว้ในในฟลูอิดไธโอไกลโคเลทบรอท เพื่อใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

6.1.4 การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อการยืนยัน *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์*

6.1.4.1 การทดสอบการเกิด สตรอมมี เฟอร์เมนเทชั่น (stormy fermentation) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากในฟลูอิดไธโอไกลโคเลทบรอท ใส่ลงในลิตมัส มิลค์ มีเดียม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นคอยตรวจดูผลทุกๆ ชั่วโมง จนถึง 6 ชั่วโมง ซึ่งถ้าเป็น *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* จะพบลักษณะ สตรอมมี เฟอร์เมนเทชั่น โดยนมจะเกิดการจับรวมตัวกันเป็นก้อนหลวมๆ คล้ายฟองน้ำลอยอยู่เหนือผิวหน้าของของเหลว ถ้าไม่เกิดปฏิกริยาดังกล่าวภายใน 6 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อที่แยกได้ไม่ใช่ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ในทางตรงกันข้ามอาจมี *คลอสตริเดียม* บางชนิดที่สามารถทำให้เกิดสตรอมมี เฟอร์เมนเทชั่น ได้ เช่น *คลอสตริเดียม บราราทิไอ* (*C. baratii*) ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการทดสอบยืนยันด้วยขั้นตอนต่อไป

6.1.4.2 การทดสอบการเคลื่อนที่และการรีดิวส์ไนเตรต โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจาก ในอาหารฟลูอิดไธโอไกลโคเลทบรอท หรือเชื้อบริสุทธิ์จากจานอาหารทีเอสซีอะการ์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโมทิลิตี ไนเตรต มีเดียม โดยแทง (stab) เข็มเขี่ยเชื้อลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่ง *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยจะพบการเจริญเฉพาะในแนวรอยที่แทงไว้ แต่ถ้าเป็นเชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะพบการเจริญออกนอกแนวรอยแทงและกระจายทั่วในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตทำได้โดยหลังจากอ่านผลการเคลื่อนที่แล้วให้หยดสารละลาย เอ็น – (1-เนฟทิล) เอททิลลีนไดอามีน (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) ลงไป 0.2 มิลลิลิตรและสารละลาย กรดซัลฟานิลิค (sulfanilic acid) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองเล็กน้อย ซึ่งถ้าเกิดสีม่วงหรือสีม่วงแดงภายใน 5 นาที แสดงว่ามีไนไตรต์เกิดขึ้นจากการรีดิวส์ไนเตรต

แต่ถ้าไม่มีสีม่วงหรือม่วงแดงเกิดขึ้นให้เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อยตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ถ้ายังไม่มีสีม่วงหรือม่วงแดงเกิดขึ้นอีกแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวส์ไปเป็นไนไตรต์และกลายไปเป็นก๊าซไนโตรเจนจนหมดแล้ว แต่ถ้ามีสีม่วงหรือสีม่วงแดงเกิดขึ้นแสดงว่าไนเตรตไม่สามารถถูกรีดิวส์ไปเป็นไนไตรต์ โดย *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* จะสามารถรีดิวส์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้

6.1.4.3 การทดสอบการใช้น้ำตาลแลคโตสและการย่อยสลายเจลาติน โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจากในฟลูอิดไธโอไกลโคเลทบรอท หรือเชื้อบริสุทธิ์จากจานอาหารทีเอสซีอะการ์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตสเจลาติน มีเดียม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดย *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดกับก๊าซ จึงพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองและมีฟองอากาศเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ซึ่งทดสอบโดยการนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็นที่ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จะพบว่าเจลาตินไม่สามารถกลับกลายเป็นของแข็งได้ ถ้าพบว่าเจลาตินยังสามารถกลายเป็นของแข็งได้ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่เย็นอีกครั้งถ้าพบว่าเจลาตินยังสามารถกลายเป็นของแข็งได้อีกแสดงว่าเชื้อที่นำมาทดสอบไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ จึงไม่ใช่ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* แต่อาจเป็น *คลอสตริเดียม บราราทิไอ* หรือ *คลอสตริเดียม พาราเพอร์ฟริงเจนส์* (*C. paraperfringens*) ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้

6.2 *การรายงานผล*

รายงานผล พบหรือไม่พบ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ในตัวอย่าง 0.1 กรัม

7. การทดลองหลังล้างตัวอย่างผักสดด้วยน้ำยาล้างผัก

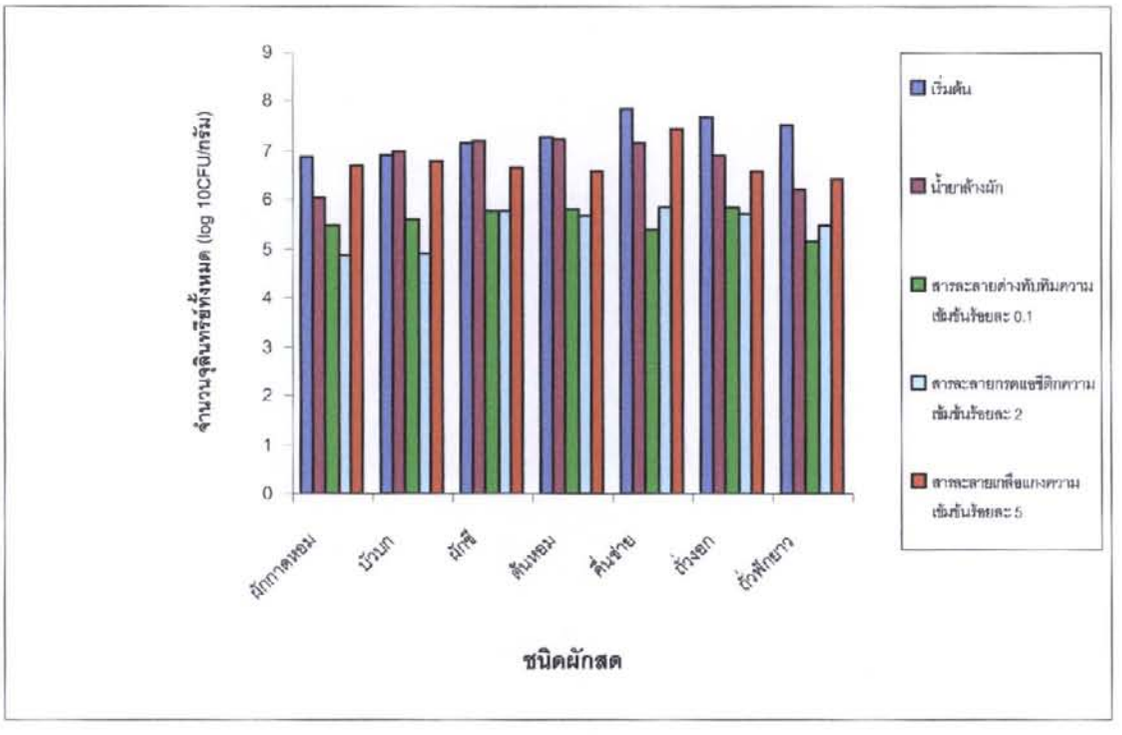
ทำการทดลองซ้ำดังที่กล่าวถึงในข้อ 2-6 แต่ใช้ผักสดที่ได้จากข้อ 1 ที่ได้ผ่านการแช่ด้วยน้ำยาล้างผัก 4 ชนิด ชนิดละ 4 ลิตร เป็นเวลา 10 นาที สะเด็ดน้ำให้แห้ง ล้างออกด้วยน้ำประปา สะเด็ดน้ำให้แห้งอีกครั้ง วางบนตะแกรง ทิ้งให้น้ำหยดประมาณ 30 นาที

3. ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักสดทั้ง 7 ชนิด คือ ผักกาดหอม บัวบก ผักชี ต้นหอม คื่นช่าย ถั่วงอก ถั่วฝักยาว ก่อนและหลังใช้น้ำยาล้างผัก 4 ชนิดคือ น้ำยาล้างผักในท้องตลาดที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 สารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่ชี้บ่งสุขลักษณะ คือ โคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม *อี. โคไล* และจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในผักสด คือ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1-5 และภาพที่ 1-3

ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่ศึกษา

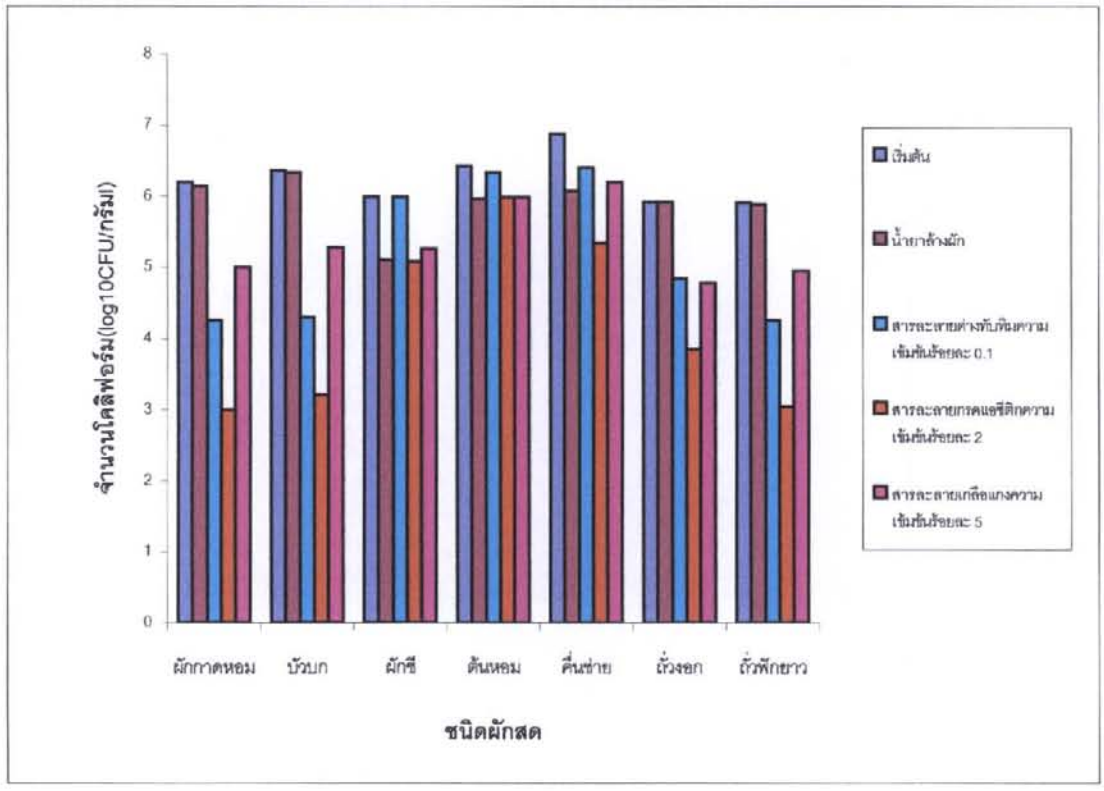
ชนิดผักสด	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log_{10} CFU / กรัม)				
	ก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างผัก	หลังล้างด้วยน้ำยาล้างผัก			
		น้ำยาล้างผัก (โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต) ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก	สารละลายด่างทับทิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร	สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร	สารละลายเกลือแกง ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร
ผักกาดหอม	6.88	6.05	5.50	4.88	6.72
บัวบก	6.92	6.98	5.61	4.90	6.79
ผักชี	7.15	7.21	5.78	5.77	6.66
ต้นหอม	7.29	7.26	5.81	5.69	6.60
คื่นช่าย	7.86	7.17	5.38	5.85	7.43
ถั่วงอก	7.68	6.92	5.83	5.72	6.58
ถั่วฝักยาว	7.53	6.20	5.15	5.49	6.43



ภาพที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่างๆก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา

ตารางที่ 2 จำนวนโคลิฟอร์มในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่ศึกษา

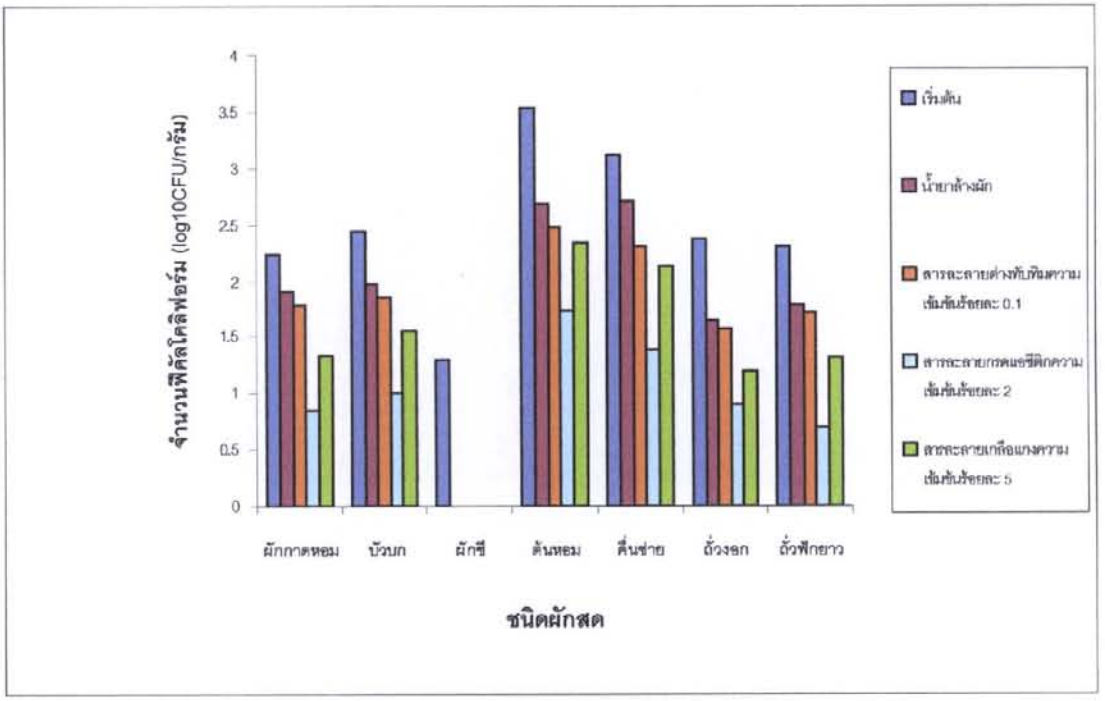
ชนิดผักสด	จำนวนโคลิฟอร์ม (log_{10}CFU / กรัม)				
	ก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างผัก	หลังล้างด้วยน้ำยาล้างผัก			
		น้ำยาล้างผัก (โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต) ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก	สารละลายด่างทับทิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร	สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร	สารละลายเกลือแกง ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร
ผักกาดหอม	6.20	6.15	4.26	3.00	5.00
บัวบก	6.36	6.34	4.30	3.21	5.28
ผักชี	5.99	5.11	5.99	5.08	5.26
ต้นหอม	6.43	5.97	6.34	5.99	5.99
คื่นช่าย	6.88	6.08	6.41	5.34	6.20
ถั่วงอก	5.92	5.92	4.85	3.85	4.78
ถั่วฝักยาว	5.91	5.89	4.26	3.05	4.95



ภาพที่ 2 จำนวนโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่างๆก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา

ตารางที่ 3 จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่ศึกษา

ชนิดผักสด	จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์ม (log_{10}CFU / กรัม)				
	ก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างผัก	หลังล้างด้วยน้ำยาล้างผัก			
		น้ำยาล้างผัก (โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต) ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก	สารละลายด่างทับทิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร	สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร	สารละลายเกลือแกง ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร
ผักกาดหอม	2.23	1.90	1.79	0.85	1.34
บัวบก	2.45	1.97	1.85	1.00	1.56
ผักชี	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00
ต้นหอม	3.54	2.69	2.47	1.73	2.33
คื่นช่าย	3.11	2.70	2.30	1.38	2.13
ถั่วงอก	2.38	1.64	1.57	0.90	1.20
ถั่วฝักยาว	2.30	1.79	1.72	0.70	1.32



ภาพที่ 3 จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในผักสดชนิดต่างๆก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาที่ศึกษา

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ชนิด *อี. โคไล* ในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่ศึกษา

ชนิดผักสด	*อี. โคไล* (ในตัวอย่าง 0.1 กรัม)				
	ก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างผัก	หลังล้างด้วยน้ำยาล้างผัก			
		น้ำยาล้างผัก (โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต) ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก	สารละลายด่างทับทิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร	สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร/ปริมาตร	สารละลายเกลือแกง ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร
ผักกาดหอม	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
บัวบก	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ผักชี	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ต้นหอม	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
คื่นช่าย	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ถั่วงอก	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ถั่วฝักยาว	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ชนิด *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ในผักสดชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่ศึกษา

ชนิดผักสด	*คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* (ในตัวอย่าง 0.1 กรัม)				
	ก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างผัก	หลังล้างด้วยน้ำยาล้างผัก			
		น้ำยาล้างผัก (โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต) ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก	สารละลายด่างทับทิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร	สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร	สารละลายเกลือแกง ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร
ผักกาดหอม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
บัวบก	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ผักชี	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ต้นหอม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
คื่นช่าย	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ถั่วงอก	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ถั่วฝักยาว	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนผักสดทั้ง 7 ชนิด (ปริมาณเริ่มต้น) ก่อนใช้น้ำยาล้างผักนั้น มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ 6-7 $\log_{10}$ CFU / กรัม และหลังจากใช้น้ำยาล้างผักแล้วพบว่า เมื่อล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงน้อยมากโดยยังคงมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 6-7 $\log_{10}$ CFU / กรัม ล้างด้วยสารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงประมาณร้อยละ 14-17 ล้างด้วยสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงประมาณร้อยละ 17-33 และล้างด้วยสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงประมาณร้อยละ 14 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนจำนวนโคลิฟอร์มมีปริมาณเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5-6 $\log_{10}$ CFU / กรัม และหลังจากใช้น้ำยาล้างผักแล้วพบว่า เมื่อล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 จำนวนโคลิฟอร์มลดลงน้อยมากโดยยังคงมีปริมาณอยู่ในช่วง 5-6 $\log_{10}$ CFU / กรัม ล้างด้วยสารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวนโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ 20 ล้างด้วยสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวนโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ 17-60 และล้างด้วยสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวนโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ 17 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 สำหรับจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์ม พบว่ามีปริมาณเริ่มต้นอยู่ในช่วง 1-3 $\log_{10}$ CFU / กรัม และหลังจากใช้น้ำยาล้างผักแล้วพบว่า เมื่อล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ 33-100 ล้างด้วยสารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ 33 ล้างด้วยสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ33-67 และล้างด้วยสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มลดลงประมาณร้อยละ 33 ดังแสดงในตารางที่ 3 สำหรับการวิเคราะห์หาเชื้อ *อี.โคไล* ในผักสดทั้ง 7 ชนิดที่ศึกษานั้น

ตรวจไม่พบในตัวอย่างผักชี ถั่วงอก ถั่วฝักยาว และตรวจพบในผักกาดหอม บัวบก ต้นหอม และคื่นช่าย และเมื่อล้างด้วยน้ำยาล้างผักพบว่า หลังล้างด้วยสารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 ตรวจไม่พบเชื้อ *อี.โคไล* เลย แต่หลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 ยังคงพบเชื้อ *อี.โคไล* ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 ส่วนผลการวิเคราะห์เชื้อก่อโรคชนิด *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ผลที่ได้คือตรวจไม่พบในตัวอย่างผักสดทั้ง 7 ชนิด ที่ศึกษาทั้งก่อนและหลังล้างด้วยน้ำยาล้างผักทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 5

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการล้างผักสดด้วยน้ำยาล้างผักชนิดต่างๆถึงแม้จะสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนลงได้ในระดับหนึ่ง แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าผักสดดังกล่าวที่ผ่านการล้างจะมีความปลอดภัยต่อการบริโภค ทั้งนี้เนื่องจากยังอาจมีจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคหลงเหลืออยู่ การลดลงของปริมาณจุลินทรีย์เป็นเพียงดัชนีบ่งชี้ถึงการลดอัตราเสี่ยงต่อการได้รับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเข้าไปในร่างกาย รวมทั้งควรมีการศึกษาทดลองเพิ่มเติมถึงค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ต่อการล้างผักสดด้วยน้ำยาล้างผักแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับการที่ล้างโดยการให้น้ำประปาไหลผ่านเพียงอย่างเดียว และศึกษาปริมาณผักสดสูงสุดที่สามารถล้างด้วยน้ำยาในแต่ละครั้งอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อที่จะได้ประโยชน์สูงสุดทั้งความปลอดภัยต่อการบริโภคและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายอีกด้วย

5. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการล้างผักสดด้วยสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นวิธีที่ให้ผลในการลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่บ่งชี้สุขลักษณะ คือ โคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *อี. โคไล* และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคคือ *คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์* ได้ดีกว่าการล้างผักสดด้วยน้ำยาล้างผักอีกสามชนิดที่ทำการศึกษาคือ น้ำยาล้างผักที่มีโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 7 สารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 รวมทั้งยังสามารถคงสภาพความสดอยู่ได้เหมือนเดิม ซึ่งการล้างด้วยสารละลายเกลือแกงความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่าทำให้ผักมีความเหี่ยว สูญเสียสภาพเดิมไปมาก และการล้างด้วยสารละลายด่างทับทิมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 มีผลทำให้สีของผักเปลี่ยนแปลงไปและความสดลดลง สำหรับสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 นั้นผู้บริโภคสามารถเตรียมขึ้นได้เองเพราะสารละลายกรดแอซีติกนั้นคือน้ำส้มสายชู ดังนั้นเมื่อนำน้ำส้มสายชูที่วางขายตามท้องตลาดซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 5 มา 40 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร ก็จะได้สารละลายที่เทียบเท่ากับสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 2 แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการล้างเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำยาล้างผักนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเริ่มต้นและสิ่งสกปรกอื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่ในผักสดด้วย ถ้าผักสดมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเริ่มต้นและสิ่งสกปรกอื่นๆที่ปนเปื้อนสูงก็ส่งผลให้น้ำยาล้างมีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้นในการบริโภคผักสดที่มีขายอยู่ตามท้องตลาดทั่วไปนั้น สิ่งสำคัญก่อนที่จะนำมาบริโภคควรผ่านการล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง เพราะจะเป็นการช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในผักสดลงได้ส่วนหนึ่ง และควรล้างด้วยน้ำยาล้างผักที่มีประสิทธิภาพซ้ำเพื่อความปลอดภัยในการบริโภค นอกจากนั้นในการเลือกซื้อผักสดควรเลือกผักที่มีคุณภาพดีไม่เน่าเสีย เพราะผักที่เสื่อมคุณภาพนั้นจะมีจุลินทรีย์ในปริมาณที่สูงกว่าผักที่ยังใหม่และสด นอกจากนั้นเนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีมาตรฐานกำหนดความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ในผักที่ใช้บริโภคสด ผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องเลือกซื้อและปฏิบัติให้มีความสะอาดสูงสุดก่อนการบริโภคเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคเอง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี คุณปรีชา ธรรมนิยม ดร. วราภา มหากาญจนกุล ในการทำผลงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. **จุลชีววิทยาประมง : ห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจวิเคราะห์.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ธันวาคม 2540.
2. สุมาลี เหลืองสกุล. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, กรุงเทพ. 2527, 416 น.
3. Attwood, D.and A.T. Florence. **Surfactant systems : Their chemistry, pharmacy and biology.** London : Champman and Hall. 1983,784 p.
4. Difco Laboratory. Difco manual : **Dehydrated Culture and Reagents for Microbiology, 10th ed.** Michigan. 1984, 1155 p.
5. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual, 8th ed.** AOAC International, Arlington. 1998.
6. Frazier, W.C. **Food Microbiology.** McGraw-Hill Book company, New York. 1967, 537 p.
7. Gutcho, Sidney J. **Surfactants and sequestrants recent advances.** New Jersy : Noyes Data. 1997, 291 p.
8. Merck. **Microbiological manual.** Merck KGaA, Darmstadt. 1996, 405 p.
9. Rosen, Milton J. **Surfactants and Interfacial Phenomena 2nd ed.** New york : Wiley.1989, 431 p.
10. Rufask, Guthrie K. **Food sanitation, 3rd ed.** New York. 1988, 330 p.
11. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods of Analysis.** Association of Official Analytical Chemists. Inc., Virginia. 2000.
12. Troller, John A. **Sanitation in Food Processing : Food Science and Technology, A series of Monographs.** Academic Press, Inc. New york. 1983.

13. Vanderzant, Carl and Don F. Splittstoesser. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed.** American Public Health Association, Washington, DC. 1992, 1219 p.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1.1 เพลตเคานต์อะการ์ (Plate count agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน (tryptone)	5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.5 กรัม
เดกซ์โทรส (dextrose)	1 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

สารละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

ความเป็นกรด – ด่าง ภายหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.0±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.2 แมคคองกี้อะการ์ (MacConkey agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน (peptone)	17 กรัม
โปรตีโอส เพปโทน (proteose peptone)	3 กรัม
แลคโทส (lactose)	10 กรัม
เกลือน้ำดี (bile salts No.3)	1.5 กรัม
โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride)	5 กรัม
วุ้น (agar)	13.5 กรัม
นิวทรัลเรด (neutral red)	0.03 กรัม
คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)	0.001 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

ความเป็นกรด – ด่างหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.1±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.3 อีซีมีเดียม (EC medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส (tryptose)	20 กรัม
แลคโทส (lactose)	5 กรัม
เกลือน้ำดี (bile salts No.3)	1.5 กรัม
ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	1.5 กรัม
โมโนโพแทสเซียม ฟอสเฟต (monopotassium phosphate)	1.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) ปิดจุกแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด – ด่าง ภายหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.9±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.4 ลีวาย อีเอ็มบีอะการ์ (Levine EMB agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน (peptone)	10 กรัม
แลคโทส (lactose)	10 กรัม
ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	2 กรัม

วุ้น (agar) 15 กรัม

อีโอซินวาย (eosin y) 0.4 กรัม

แมทิลลีน บลู (methylene blue) 0.065 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

ความเป็นกรด – ด่างหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.1±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.5 ทริปโทน บรอท (Tryptone broth) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโตน (tryptone) 10 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่มีอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.6 เอ็มอาร์ – วีพีมีเดียม (MR – VP medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บัฟเฟอร์ เพปโทน (Buffered peptone) 7 กรัม

ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต (dipotassium phosphate) 5 กรัม

เดกซ์โทรส (dextrose) 5 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 3 มลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด – ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.9±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.7 โคเซอร์ ซิเตรท มีเดียม (Koser citrate medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

โซเดียม แอมโมเนียม ฟอสเฟต (sodium ammonium phosphate)	1.5 กรัม
โมโนเบสิก โพแทสเซียม ฟอสเฟต (monobasic potassium phosphate)	1 กรัม
แมกเนเซียม ซัลเฟต (magnesium sulfate)	3 กรัม
โซเดียม ซิเตรท (sodium citrate)	3 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 3 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด – ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.7±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.8 คุกมีท มีเดียม (Cooked meat medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟฮาร์ท (beef heart)	454 กรัม
โปรติโอส เพปโทน (proteose peptone)	20 กรัม
เดกซ์โทรส (dextrose)	2 กรัม
โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride)	5 กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ชั่งมา 1 กรัม ใส่หลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด – ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.2±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.9 ทีเอสซี อะการ์ (TSC agar) ของ Merck

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโตส (tryptose)	15 กรัม
เพปโทน (peptone from soymeal)	5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5 กรัม
โซเดียมไดซัลไฟต์ (sodium disulfite)	1 กรัม
แอมโมเนียม ไอออน (III) ซิเตรท (ammonium iron (III) citrate)	1 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ผสมไซโคลเซอรีน (cycloserine) 0.40 กรัม/ลิตร หรือ TSC agar supplement เขย่าให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร

ความเป็นกรด – ด่างหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.4±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.10 โมทิลิตีไนเตรทมีเดียม (Motility Nitrate medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (beef extrate)	3 กรัม
เพปโทน (peptone)	5 กรัม
โปแตสเซียมไนเตรท (potassium nitrate)	1 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate)	2.5 กรัม
วุ้น (agar)	3 กรัม
น้ำตาลกาแลคโตส (galactose)	5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในหลอดฝาเกลียวหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากเตรียมเสร็จหรือไม่เช่นนั้นให้นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีและทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องเขย่าก่อนนำไปใช้

ค่าความเป็นกรด – ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเท่ากับ 7.3 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.11 แลคโทสเจลาตินมีเดียม (Lactose gelatin medium) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโตส (tryptose)	15 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10 กรัม
น้ำตาลแลคโตส (lactose)	10 กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.05 กรัม
เจลาติน (gelatin)	120 กรัม

ละลายทริปโตส สารสกัดจากยีสต์และน้ำตาลแลคโตสในน้ำ 400 มิลลิลิตร และแยกละลายเจลาตินในน้ำที่เหลืออีก 600 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 50-60 องศาเซลเซียส จนส่วนผสมทั้งสองส่วนละลาย นำมาผสมกัน เติมฟีนอลเรดลงไปแล้วแบ่งใส่

หลอดทดลองฝาเกลียว หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

ค่าความเป็นกรด – ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเท่ากับ 7.5 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.12 ฟลูอิดไธโอไกลโคเลทบรอท (Fluid thioglycollate broth) ของ Difco มีส่วนประกอบดังนี้

แอล – ซีสตีน (L – cystine)	0.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	2.5 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose)	5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5 กรัม
ทริปโตน (tryptone)	15 กรัม
โซเดียมไธโอไกลโคเลท (sodium thioglycollate)	0.5 กรัม
สารละลายโซเดียมเรซาซูริน (sodium resazurin solution, 1:1,000)	1 มิลลิลิตร
วุ้น (agar)	0.75 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ควรใช้สารละลาย sodium resazurin ที่เตรียมขึ้นใหม่ ๆ และถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อต้องถูกเก็บไว้นานเกินกว่า 4 ชั่วโมง หลังการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้งานควรนำมาต้มในอ่างน้ำเดือด เพื่อไล่อากาศและออกซิเจนก่อน

ค่าความเป็นกรด – ด่างหลังฆ่าเชื้อแล้วเท่ากับ 7.1 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

2. สารเคมีและวิธีเตรียม

2.1 สารละลายสำหรับเจือจาง (dilution fluid)

เตรียมดังนี้

2.1.1 ละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด – ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 1 นอร์แมล ให้ได้ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 7.2±0.2 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.1.2 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เตรียมโดยใช้สารละลายที่ได้จากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 1.25 มิลลิลตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.1.3 บรรจุสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตรในหลอดทดลองฝาเกลียว และในขวดแก้วปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดันที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.2 โคแวกสรีเอเจนท์ (Kovac's reagent)

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮน์ (p – dimethylaminobenzaldehyde) 5 กรัม ในเอมิลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) 75 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentrated hydrochloric acid) 25 มิลลิลิตร

2.3 สารเคมีสำหรับทดสอบ Voges – Proskauer (VP) reaction

2.3.1 สารละลายแอลฟาเนฟทอลในเอทานอล (L – naphthol ethanolic solution)

มีส่วนประกอบดังนี้

แอลฟาเนฟทอล (α – naphthol)	6 กรัม
เอทานอลร้อยละ 96 (ethanol, 96% V/V)	100 มิลลิลิตร

ละลายแอลฟาเนฟทอลในเอนาทอล

2.3.2 สารละลายครีเอทีน (creatine solution)

มีส่วนประกอบดังนี้

ครีเอทีนโมโนไฮเดรท (creatine monohydrate)	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายครีเอทีนโมโนไฮเดรทในน้ำกลั่น

2.3.3 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)

มีส่วนประกอบดังนี้

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)	40 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่น

2.4 ไนเตรตดีเทคชั่นรีเอเจนท์ (nitrate detection reagent)

2.4.1 สารละลายเอน-(1-เนฟทิล) เอทิลลีนไดอามีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (N – (1 – naphthyl) ethylenediamine)

N – (1– naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride	0.25 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2 สารละลายกรดซัลฟานิลิค (sulfanilic acid)

กรดซัลฟานิลิค (sulfanilic acid/ *p* – aminobenzene sulfonic)	1 กรัม
5 นอร์แมล กรดแอซีติก (5 N acitic acid)	125 มิลลิลิตร

ละลายกรดซัลฟานิลิคในกรดแอซีติก ถ้าพบว่าไม่ค่อยละลายให้อุ่นด้วยความร้อนเล็กน้อย จะทำให้การละลายดีขึ้น