abst.

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

วศ กช
อว 61

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7ว

การศึกษาการปนเปื้อนของซาล*โมเนลลา*ในแหนม

นางสาวนพมาศ สะพู

นางรวิวรรณ อาจสำอาง

กลุ่มงานจุลชีววิทยา

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

แหนมเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมรับประทานกันดิบๆ ซึ่งมีโอกาสที่จะได้รับเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ที่มักจะพบปนเปื้อนในเนื้อหมู ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพและอนามัยของผู้บริโภคได้ กลุ่มงานจุลชีววิทยา กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ในแหนม โดยซื้อแหนมที่จำหน่ายตามตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร จำนวน 67 ตัวอย่าง พบแหนมที่ปนเปื้อน*ซาลโมเนลลา* 47 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 70 จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าแหนมส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนจากเชื้อ*ซาลโมเนลลา* และเมื่อจำแนกแหนมตามแหล่งที่ผลิตและการมีฉลากแล้วนำไปทดสอบทางสถิติโดยใช้ Chi-square test เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งผลิตกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*และความสัมพันธ์ระหว่างการมีฉลากกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา* พบว่าทั้งแหล่งผลิตและการมีฉลากไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา* ซึ่งหมายถึงไม่ว่าแหนมจะผลิตจากแหล่งใด มีฉลากหรือไม่ก็มีโอกาสตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ได้ แสดงว่าแหล่งผลิตและสุขลักษณะในการผลิตแหนมไม่ได้เป็นปัจจัยหลักในการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ในแหนม แต่ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ในแหนมส่วนใหญ่น่าจะมาจากวัตถุดิบคือหมูที่ใช้ในการทำแหนม ซึ่งการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ในหมูเกิดได้จาก กระบวนการตั้งแต่อาหารสัตว์ การเลี้ยงหมู การฆ่าหมูและการขนส่งเนื้อหมูสู่ตลาด ฉะนั้นการบริโภคแหนมดิบจึงเป็นการเสี่ยงต่อการเกิดโรคท้องร่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ*ซาลโมเนลลา* ก่อนบริโภคแหนม ต้องทำให้แหนมสุกก่อน เพื่อความปลอดภัยในการบริโภค และสำหรับผู้ผลิตควรมีการเลือกหมูที่มีคุณภาพดี ซื้อจากแหล่งที่เชื่อถือได้ และมีสุขลักษณะที่ดีในการผลิตแหนม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	iv
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง	5
1.2 วัตถุประสงค์	5
1.3 ระยะเวลาดำเนินการ	5
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	5
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	6
2.1 รายละเอียดตัวอย่าง	7
2.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ	12
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	13
2.4 เชื้อมาตรฐาน	13
2.5 สารเคมี	13
2.6 วิธีการทดลอง	15
2.7 การประเมินผลทางสถิติ	18
บทที่ 3 ผลการทดลอง	12
3.1 ผลการวิเคราะห์ซาลโมเนลลาในแหนม	20
3.2 การประเมินผลทางสถิติใช้วิธี Chi-square test	25
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	30
กิตติกรรมประกาศ	31
เอกสารอ้างอิง	32

เลขหมู่ วศ กช
ว๖ ๖1
เลขทะเบียน 11557
วันที่ 16 / ธ.ค. / 46

ด้วยอภินันทนาการ
จาก
วศ.

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก รูปภาพของลักษณะภาชนะบรรจุแหนม 34

ภาคผนวก ข ค่าวิกฤติของ Chi-square (X^2) 35

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม 36

สารเคมี 43

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงจำนวนเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ที่ส่งมาทดสอบยืนยันระหว่างปี พ.ศ. 2537-2541	3
ตารางที่ 2	รายละเอียดของตัวอย่างแหนมซื้อจากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ต	7
ตารางที่ 3	ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนม	20
ตารางที่ 4	ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนมแยกตามแหล่งผลิต	25
ตารางที่ 5	ค่าความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาจริง (*O*) กับความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาตามทฤษฎีหรือที่คาดหวัง *(E)* เมื่อแยกตามแหล่งผลิต	26
ตารางที่ 6	ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนมแยกตามการมีฉลาก	26
ตารางที่ 7	ค่าความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาจริง (*O*) กับความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาตามทฤษฎีหรือที่คาดหวัง *(E)* เมื่อแยกตามการมีฉลาก	26

บทที่ 1 บทนำ

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่นิยมบริโภคกันทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันนิยมบริโภคเพิ่มขึ้นอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแหนมมีรสชาติอร่อย สามารถนำไปปรุงเป็นอาหารได้หลายชนิด แหนมมีคุณค่าทางอาหารคือ โปรตีนร้อยละ 20 ถึง 25 ไขมันร้อยละ 5 ถึง 8 มีวิตามินบีและเกลือแร่จำนวนเล็กน้อย[3] แหนมผลิตจากหมู ส่วนผสมโดยทั่วๆ ไปได้แก่ เนื้อหมูบด หนังหมู ข้าวสุก ดินประสิว พริกไทย กระเทียมและเกลือ ในสัดส่วนโดยประมาณดั้งนี้ เนื้อหมูแดงไม่มีมัน 1 กิโลกรัม หนังหมูต้มหั่นบาง ๆ 230 กรัม กระเทียม 50 กรัม เกลือป่น 25-30 กรัม ข้าวสุกหรือข้าวเหนียวนึ่งประมาณ 40 กรัม ดินประสิว 0.25 กรัม นำส่วนผสมทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วเอาใบตองหรือพลาสติกห่อให้แน่น เพื่อให้เนื้อแหนมมีอากาศน้อยที่สุดเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่จะทำให้เนื้อหมูเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมหมักเจริญเติบโตต่อไปได้ จุลินทรีย์ดังกล่าวนี้เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ซึ่งทำให้แหนมมีรสเปรี้ยว ระยะเวลาในการหมักประมาณ 3-4 วัน

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมูดิบ ซึ่งตามธรรมชาติจะมีเชื้อ*ซาลโมเนลลา* ปะปนอยู่ ถึงแม้ว่าเชื้อ*ซาลโมเนลลา*จะถูกยับยั้งจากกระบวนการหมัก แต่ก็อาจมีเชื้อหลงเหลืออยู่ ถ้ามีปริมาณมากหรือความเป็นกรดไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อดังกล่าว

นงคราญ และคณะ[2]ได้ทำการสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมและหมูยอที่ผลิตในจังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2532 ถึงเดือนตุลาคม 2534 พบการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ร้อยละ 2.8 ในปี 2534

ดวงดาว และคณะ[1] ได้ศึกษาการปนเปื้อนของพยาธิและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในแหนมตามภาคต่างๆ ตั้งแต่กุมภาพันธ์ ถึงมิถุนายน 2535 จำนวน 80 ตัวอย่าง พบ*ซาลโมเนลลา*ร้อยละ 12.5

นอกจากนี้ อำไพ[11] ได้รายงานว่าพบแหนมที่ปนเปื้อน*ซาลโมเนลลา*ในประเทศไทยจำนวน 114 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 12

ซาลโมเนลลา เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นท่อนเล็กๆ ไม่สร้างสปอร์ ต้องการอากาศ จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ (Enterobacteriaceae) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย

ชนิดโคลิฟอร์ม พบทั่วไปในธรรมชาติ ในลำไส้ของคนและสัตว์ ในเนื้อสัตว์โดยเฉพาะเป็ด ไก่ นก ไข่ไก่ และเนื้อสัตว์อื่นๆ จึงมีโอกาสแพร่กระจายไปในน้ำและอุจจาระซึ่งอาจติดต่อมาถึงคนได้ *ซาลโมเนลลา*ทุกชนิดเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ ก่อให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ โดยมีความรุนแรงต่างกัน ชนิดที่รุนแรงมากที่สุดทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ ถัดมาเป็นพาราไทฟอยด์และโรคอาหารเป็นพิษธรรมดา ซึ่งอาจเกิดได้เร็วกว่าโรคไทฟอยด์ก็ได้ แต่ความรุนแรงของโรคไม่เท่าไทฟอยด์ อาการเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ*ซาลโมเนลลา*นั้น ปกติเกิดภายหลังจากการบริโภค 12-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาว และท้องเดิน นอกจากนี้ยังมีอาการ หน้ามืด เป็นไข้ และอยากนอน[4]

*ซาลโมเนลลา*เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 29 ของผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วง โรคที่เกิดจาก*ซาลโมเนลลา* ชนิดต่างๆ ในคน เช่น โรคไทฟอยด์ เกิดจาก *Salmonella* Typhi มีระยะพักโรค 7-14 วัน มีอาการครั่นเนื้อครั่นตัว เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ เป็นไข้ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยเชื้อ *Salmonella* Typhimurium จะปรากฏอาการภายใน 8-48 ชั่วโมง มีอาการปวดศีรษะ ปวดท้อง ตัวเย็น อาเจียน และท้องร่วง[11]

*ซาลโมเนลลา*เป็นเชื้ออุจจาระร่วงที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยมาตลอด ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ในปี 2541 มีผู้ป่วย*ซาลโมเนลลา*คิดเป็นอัตราการป่วย 374.99 ต่อประชากรแสนคน และมีแนวโน้มของผู้ป่วยด้วยการติดเชื้อของ*ซาลโมเนลลา* เพิ่มขึ้นทุกปี อรุณ และคณะ[9] ได้ทำการทดสอบยืนยันเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ในระหว่างปี 2537-2541 เชื้อ*ซาลโมเนลลา*ที่ส่งมาทดสอบยืนยันเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและผู้ที่เป็นพาหะในอัตราสูงสุด คือร้อยละ 49.8-69.9 รองลงมาได้แก่ เนื้อไก่แช่แข็งเพื่อการส่งออกในอัตราร้อยละ 17.7-27 อาหารทะเลแช่แข็งเพื่อการส่งออกในอัตราร้อยละ 0.6-3.2 อาหารพร้อมบริโภคอยู่ในอัตราร้อยละ 0.8-4.3 อาหารพร้อมปรุงอัตราร้อยละ 0.2-20.7 ประเภทของอาหารสัตว์อยู่ในอัตราร้อยละ 0.5-3.9 ดังแสดงในตารางที่ 1

กรรมวิธีการชำแหละเนื้อสัตว์ที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้เพิ่มโอกาสการติดเชื้อนี้แก่เนื้อสัตว์และอวัยวะภายในมากยิ่งขึ้น เนื้อสัตว์ที่มีเชื้อนี้ปะปนอยู่สามารถแพร่ไปสู่อาหารต่างๆ เช่น สลัด ยำ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่างๆ นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยคอกในการเกษตรกรรม ทำให้เชื้อนี้แพร่ไปสู่อาหารพวกผักและผลไม้ได้อีกทางหนึ่ง แหนมเป็นอาหารหมักที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีโอกาสพบ*ซาลโมเนลลา*ปนเปื้อนแหนมได้

การปนเปื้อนของเชื้อซาล*โมเนลลา*ในแหนมนี้นับว่าเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตแหนมให้มีสุขลักษณะที่ดี การฉายรังสีเป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้แหนมปลอดจากเชื้อโรค วิธีนี้ไม่ทำให้กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของแหนมเปลี่ยนไป แหนมยังคงสภาพเป็นเนื้อดิบอยู่เหมือนเดิม แต่เชื้อโรคและพยาธิจะถูกทำลายไปด้วยรังสี จึงทำให้แหนมรังสีปราศจากเชื้อโรคและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค[5] นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตแหนม เพื่อให้ได้แหนมที่มีคุณภาพสูงขึ้นในด้านความสม่ำเสมอ ทั้งทางด้านความแน่นเนื้อ สี ความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค อายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น แต่การผลิตแหนมส่วนใหญ่ยังเป็นแบบอุตสาหกรรมในครอบครัว นิยมใช้วิธีการผลิตแบบดั้งเดิม เช่นใช้เชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และใช้แรงงานคนในการเตรียมวัตถุดิบ โดยเฉพาะการเลาะหนังหมู การหั่นหมู ส่วนการคลุกเคล้าส่วนผสมและบรรจุหีบห่อ จะใช้เครื่องจักรเฉพาะแหล่งผลิตใหญ่ๆ เท่านั้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้คุณภาพและสุขลักษณะของแหนมส่วนใหญ่ยังไม่ดีพอ

เนื่องจากแหนมเป็นอาหารที่ผู้บริโภคนิยมบริโภคในสภาพที่ไม่สุก และการผลิตแหนมก็เป็นการผลิตจากวิธีที่เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่สืบทอดกันมานาน ความปลอดภัยในการบริโภคแหนมจึงเป็นสิ่งหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องพึงพิจารณาก่อนบริโภค ถ้ารับประทานแหนมที่มีเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคก็จะทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการอาหารเป็นพิษได้

1.1 ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง

แหนมเป็นอาหารที่ผู้บริโภคนิยมบริโภคในสภาพที่ไม่สุก เพราะเมื่อนำแหนมไปทำให้สุกโดยวิธีผ่านความร้อน แหนมจะมีรสชาติเปลี่ยนไป เนื้อสัมผัสของแหนมจะเหนียวและไม่น่ารับประทาน แหนมมีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบหลักและขบวนการผลิตไม่มีขั้นตอนการผ่านความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อโรค การบริโภคแหนมดิบ จึงเสี่ยงต่อการเกิดโรคท้องร่วง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ*ซาลโมเนลลา* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบการปนเปื้อนได้ในเนื้อหมู ที่ผ่านมาได้มีการศึกษา*ซาลโมเนลลา*ในแหนม โดย รัตนสุดา พันธ์อุไร[6] โดยเก็บตัวอย่างแหนมมา 217 ตัวอย่าง พบ*ซาลโมเนลลา* 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ12.4) ในปี 2539 อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ[8] ได้ตรวจหาเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ที่ปนเปื้อนในแหนมพร้อมบริโภคที่จำหน่ายตามตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 40 ตัวอย่าง ตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ปนเปื้อน 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 75) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแหนมมีการปนเปื้อนจากเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ในอัตราที่สูง ซึ่งการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*นี้อาจมาจากเนื้อหมู ในปี 2535-2536 อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ[10] ได้ทำการศึกษา*ซาลโมเนลลา*ในเนื้อหมู โดยเก็บตัวอย่างจากตลาด 50 ตัวอย่าง ในจังหวัดชลบุรี พบการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ถึงร้อยละ 45 ผลงานที่ผ่านมาเว้นช่วงระยะเวลามาหลายปี ดังนั้นกลุ่มงานจุลชีววิทยาจึงได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ในแหนมขึ้นมาอีก เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคได้ตระหนักถึงข้อควรระวังในการบริโภคแหนมสด และผู้ผลิตได้ปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตแหนมให้ได้มาตรฐานต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงความปลอดภัยในการบริโภคแหนม โดยวิเคราะห์หา*ซาลโมเนลลา* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคตัวหนึ่ง

1.3 ระยะเวลาดำเนินการ

5 เดือน ตั้งแต่สิงหาคม - ธันวาคม 2543

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.4.1 เป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคได้ตระหนักถึงข้อควรระวังในการบริโภคแหนมสด

1.4.2 เป็นข้อมูลสำหรับผู้ผลิตในการเฝ้าระวังและปรับปรุงการผลิต

บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

2.1 รายละเอียดตัวอย่าง

ตัวอย่างแหนมซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ตและตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 67 ตัวอย่าง อย่างน้อยตัวอย่างละ 200 กรัม โดยมีรายละเอียดแหล่งที่ซื้อ ภาชนะบรรจุ การมีฉลากและแหล่งผลิตแสดงในตารางที่ 2 มีลักษณะภาชนะบรรจุต่างๆ เช่น แหนมห่อใบตอง ถุงพลาสติก ดังแสดงในรูป ภาคผนวก ก โดยมีแหนมที่ห่อพลาสติกจำนวน 64 ตัวอย่างและห่อใบตองจำนวน 3 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 รายละเอียดของตัวอย่างแหนมซื้อจากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ต

ตัวอย่าง	แหล่งที่ซื้อ	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต
1	ดินแดง	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
2	ดินแดง	ห่อใบตอง ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
3	ดินแดง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
4	ดินแดง	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
5	ดินแดง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
6	ดินแดง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
7	ดินแดง	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
8	ดินแดง	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
9	ห้วยขวาง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
10	ห้วยขวาง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ

ตัวอย่าง	แหล่งที่ซื้อ	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต
11	โรบินสัน รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
12	โรบินสัน รัชดา	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
13	โรบินสัน รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
14	โรบินสัน รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
15	โรบินสัน รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
16	โรบินสันรัชดา	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
17	โรบินสันรัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
18	เมืองทองธานี	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ปทุมธานี
19	เมืองทองธานี	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ลำปาง
20	ศรีย่าน	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
21	เทเวศน์	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
22	เทเวศน์	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
23	เทเวศน์	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
24	เทเวศน์	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
25	เทเวศน์	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร

ตัวอย่าง	แหล่งที่ซื้อ	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต
26	เทเวศน์	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
27	เทเวศน์	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
28	เทเวศน์	ห่อใบตอง ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
29	เทเวศน์	ห่อใบตอง ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
30	ตลาดสนามเป้า	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
31	ตลาดสนามเป้า	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
32	ตลาดสนามเป้า	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สุพรรณบุรี
33	ซอยราชวิถี 15	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
34	ซอยราชวิถี 15	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่มีฉลาก
35	นางเลิ้ง	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
36	นางเลิ้ง	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
37	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
38	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ขอนแก่น
39	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
40	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร

ตัวอย่าง	แหล่งที่ซื้อ	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต
41	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ปทุมธานี
42	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
43	โลตัส รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
44	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
45	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
46	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
47	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
48	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
49	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
50	จัสโก้ รัชดา	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
51	เคหะทุ่งสองห้อง ดอนเมือง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
52	เคหะทุ่งสองห้อง ดอนเมือง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
53	เคหะทุ่งสองห้อง ดอนเมือง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
54	เคหะทุ่งสองห้อง ดอนเมือง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
55	เคหะทุ่งสองห้อง ดอนเมือง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ

ตัวอย่าง	แหล่งที่ซื้อ	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต
56	เคหะทุ่งสองห้อง ดอนเมือง	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ
57	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
58	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
59	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
60	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
61	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ
62	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่
63	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
64	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
65	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
66	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร
67	บางเขน	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ

2.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ

- ตู้เย็นซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ 2-10 องศาเซลเซียส
- เครื่องตีป่น
- ตู้อบเพาะเชื้อซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส
- ตู้อบเพาะเชื้อซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 42 ± 1 องศาเซลเซียส
- เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (hot air sterilizer) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 170 -190 องศาเซลเซียส
- หม้อนึ่งอัด (autoclave) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 121 ± 1 องศาเซลเซียส
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.01 กรัม
- อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ของกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งอาหารสำเร็จรูปของบริษัท Oxoid[12], Difco,[13] Merck,[14] และที่เตรียมขึ้นเอง ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีดังต่อไปนี้

- เซเลไนต์ซีสทีนบรอท (selenite cystine broth, SC) ของ Merck
- ไซโลสไลซีนเดสซอกซีโคเลตอะการ์ (xylose lysine desoxycholate agar, XLD) ของ Difco
- ทริปโทนบรอท (tryptone broth) เตรียมโดยใช้ทริปโทนของ Difco
- ทริปเพิลชูการ์ไอร์ออนอะการ์ (triple sugar iron agar) ของ Difco
- บัฟเฟอร์เพปโทนวอเตอร์ (buffered peptone water, BPW) ของ Oxoid
- บิสมัทซัลไฟท์อะการ์ (bismuth sulfite agar, BS) ของ Difco
- เพลตเคาต์อะการ์ (plate count agar) ของ Difco
- ยูเรียอะการ์ (urea agar) ของ Oxoid
- แรพพาพอร์ทส วาสซิเลียดีส เอ็นริชเมนท์ บรอท (Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment broth) ของ Oxoid
- ไลซีนไอร์ออนอะการ์ (lysine iron agar) ของ Difco
- เอ็มอาร์-วีพีบรอท (MR-VP broth) ของ Merck
- เฮกโทเอนเอนเทอริกอะการ์ (hektoen enteric agar, HE) ของ Oxoid

2.4 เชื้อมาตรฐาน

ซาลโมเนลลา เอนเทอริทิดิส (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076)

2.5 สารเคมี

สารเคมีชนิดต่างๆ มีทั้งสำเร็จรูปและที่เตรียมขึ้นเอง ส่วนประกอบแต่ละชนิดและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก ค สารเคมีที่ใช้มีดังต่อไปนี้

- สารละลายครีเอทีน (creatine solution)
- 1 - เนฟทอลในเอทานอลิก (1-naphthol, ethanolic solution)
- สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide solution)
- โคแวกสรีเอเจนท์ (Kovac's reagent)

- ซาลโมเนลลาโพลีวาเลนท์ เอช แอนติซีรัม (*Salmonella* polyvalent H antiserum) ของ Difco
- ซาลโมเนลลาโพลีวาเลนท์ โอ แอนติซีรัม (*Salmonella* polyvalent O antiserum) ของ Difco

2.6 วิธีการทดลอง (ใช้วิธีของ ISO 6579 : 1995[15])

2.6.1 การเตรียมตัวอย่าง ใช้ช้อนซึ่งฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มมา 25 กรัม ใส่ลงในเครื่องตีป่น เติม BPW 225 มิลลิลิตร (ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส) ตีปั่นด้วยความเร็วสูง 1 - 2 นาที อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง

2.6.2 ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างจากข้อ 2.6.1 เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

2.6.2.1 ตัวอย่างจำนวน 10 มิลลิลิตร เติมลงใน 100 มิลลิลิตรของ SC อบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง

2.6.2.2 ตัวอย่างจำนวน 0.1 มิลลิลิตร เติมลงใน 10 มิลลิลิตรของ RV อบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 41 - 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.6.3 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.6.2 ขีดเป็นเส้น (streak) บนผิวหน้าที่แห้งแล้วของอาหารเลี้ยงเชื้อ BS XLD และ HE ในลักษณะที่จะให้โคโลนีแยกจากกัน โดยแยกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจากข้อ 2.6.2

2.6.4 นำไปอบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดดังต่อไปนี้

- BS ให้โคโลนีมีสีดำเงาวาว อาหารที่อยู่ใต้โคโลนีมีสีดำด้วย
- XLD ให้โคโลนีสีแดงหรือสีชมพูแดง อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี
- HE ให้โคโลนีสีน้ำเงินแกมเขียวหรือสีน้ำเงิน อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี

2.6.5 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ*ซาลโมเนลลา*อย่างน้อย 5 โคโลนีมาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยการขีดเป็นเส้นบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เพลตเคาต์อะการ์ อบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะของโคโลนี จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วนำมาตรวจสอบเพื่อยืนยันทางชีวเคมี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ดังนี้

2.6.5.1 เพาะเชื้อลงในทริปเพิลชูการ์ไอร์ออนอะการ์ โดยขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อและแทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเป็น*ซาลโมเนลลา*จะทำให้ส่วน

ภูมวิทยาศาสตร์บริการ

บนของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง ส่วนภายในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง อาจมีสีดำอยู่ในวุ้นถ้าเป็นชนิดที่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และมักจะมีก๊าซซึ่งสังเกตได้จากรอยแยกของวุ้น

2.6.5.2 เพาะเชื้อลงในไลซีนไอร์ออนอะการ์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 2.6.5.1 ถ้ามี*ซาลโมเนลลา* อาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีม่วงอย่างเดิมหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว อาจมีสีดำบ้างถ้าสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และอาจมีก๊าซด้วย ดูได้จากรอยแยกของวุ้น

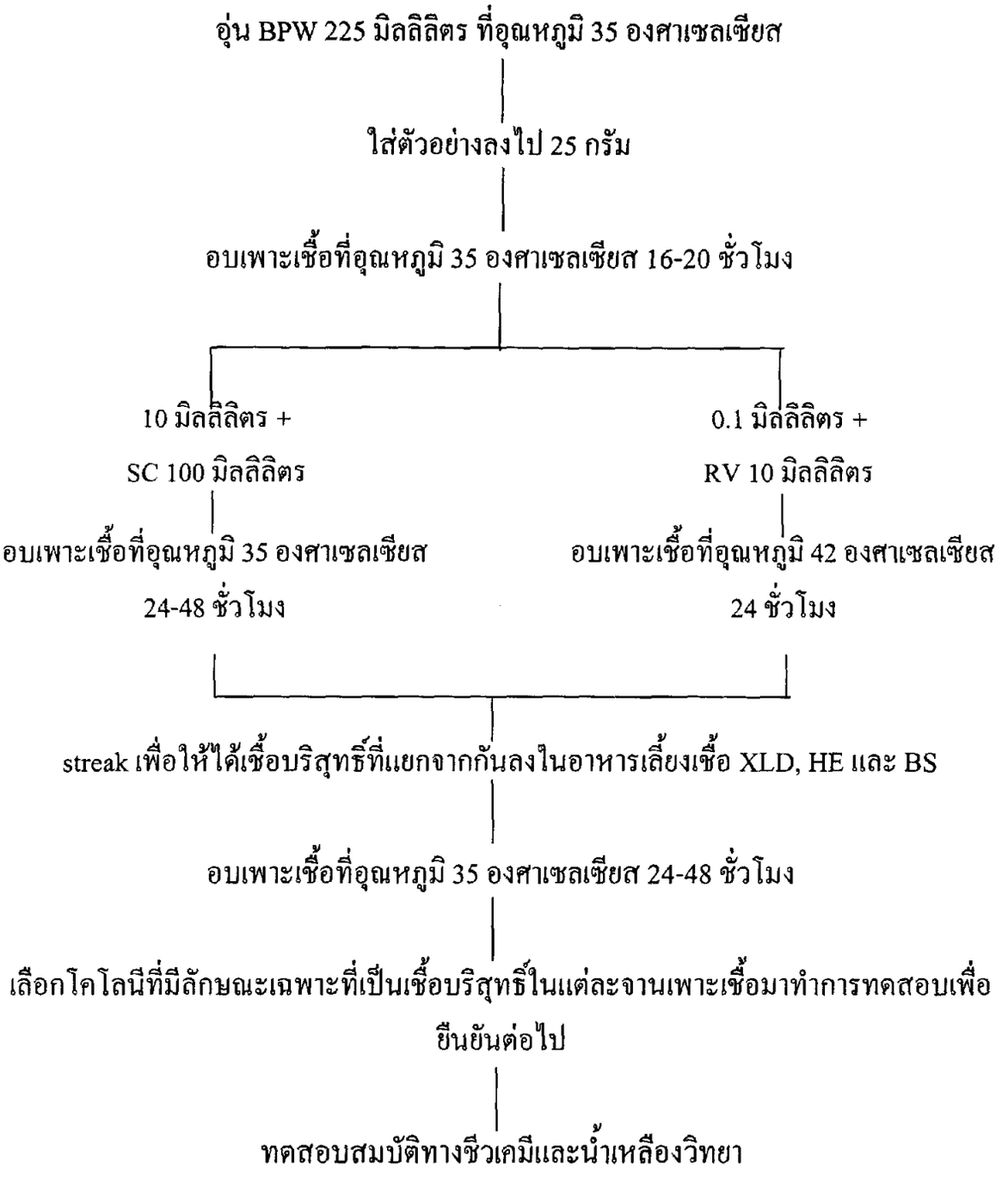
2.6.5.3 เพาะเชื้อลงในยูเรียอะการ์ อบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเป็น*ซาลโมเนลลา*จะไม่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ ปฏิกิริยาเป็นลบ(คอยสังเกตดูสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการเปลี่ยนเป็นสีชมพูต่อมาเป็นสีแดงเข้มระหว่างการอบแสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวก ไม่ใช่*ซาลโมเนลลา*)

2.6.5.4 เพาะเชื้อลงในทริปโทนบรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วเติมโคแวกสรีเอเจนท์ลงไป ถ้าเป็น*ซาลโมเนลลา*จะเกิดปฏิกิริยา อินโดล ลบ จะไม่เปลี่ยนสีของโคแวกสรีเอเจนท์

2.6.5.5 เพาะเชื้อลงใน เอ็มอาร์-วีพี บรอท อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายครีเอทีน (creatine solution) 2 หยด 1-เนฟทอลในเอทานอลิก (1-naphthol, ethanolic solution) 3 หยด และ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide solution) 2 หยด เขย่าหลังจากเติมแต่ละรีเอเจนท์ ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพู ภายใน 15 นาที แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวก ถ้าเป็น *ซาลโมเนลลา*ปฏิกิริยาเป็นลบ

2.6.6 นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดดังกล่าวมาแล้ว ไปทดสอบการเกาะกลุ่มบนแผ่นสไลด์ (agglutination) กับ*ซาลโมเนลลา*โพลีวาเลนท์ โอ แอนติซีรัม และ*ซาลโมเนลลา*โพลีวาเลนท์ เอช แอนติซีรัม ถ้าให้ผลบวกแสดงว่าเป็น*ซาลโมเนลลา*

<u>แผนภูมิที่ 1</u> ขั้นตอนการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*



2.7 การประเมินผลทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์หา*ซาลโมเนลลา*ในแหนมที่ผลิตจากแหล่งต่าง ๆ นำมาประเมินผลทางสถิติโดยใช้ Chi-square test[7] เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่ผลิตแหนมกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา* และดูความสัมพันธ์ระหว่างการมีฉลากของแหนมกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา* โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$X^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

การทดสอบโดยวิธีการนี้ ก็เพื่อจะหาดูว่าความถี่ของสิ่งที่ศึกษาได้มา จะอยู่ในรูปแบบเดียวกันกับความถี่ที่คาดหวังไว้โดยทฤษฎีหรือไม่

เมื่อให้ X^2 คือ ค่าของการแจกแจง Chi-square

O คือค่าความถี่ที่ได้มาจริง ๆ (observed frequency)

E คือความถี่ที่ได้มาตามทฤษฎีหรือที่คาดหวัง (expected frequency)

ในการคำนวณค่า X^2 เป็นการหาความแตกต่างระหว่างค่าความถี่ที่เป็นจริงกับค่าความถี่ตามทฤษฎี ถ้า $O = E$ ค่าของ X^2 จะเป็น 0 สิ่งที่ต้องการรู้ในที่นี้คือ X^2 จะมากกว่าหรือน้อยพอจะชี้ให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันระหว่าง O และ E เชื่อมั่นได้หรือไม่

การทดสอบ X^2 แบบนี้ไม่ต้องมีข้อตกลง (assumption) ว่าการแจกแจงของข้อมูลเป็นโค้งปกติ แต่ข้อมูลจะแบ่งเป็นกลุ่มหรือพวก (categories) เช่นเขตกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ หรือการพบหรือไม่พบ*ซาลโมเนลลา* ดังนี้เป็นต้น การคำนวณ X^2 ค่าจะมีนัยสำคัญขนาดใดขึ้นอยู่กับค่าองศาอิสระ (degree of freedom, df) และระดับนัยสำคัญ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้การทดสอบ Chi-square แบบที่เรียกว่าการทดสอบความเป็นอิสระ (test of independene) เพื่อที่จะดูความสัมพันธ์ระหว่างคุณลักษณะที่แยกได้เป็น 2 กลุ่ม (categories) จากวัตถุกลุ่มเดียวกันว่าเป็นอย่างไร แต่ละกลุ่มสามารถแยกออกเป็นหลายอย่าง ตัวอย่างเช่น แหล่งที่ผลิตแหนม (กรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ) ว่าสัมพันธ์กับการพบหรือไม่พบ*ซาลโมเนลลา*หรือไม่

เริ่มต้นจากการตั้งสมมติฐาน $H_0 : \rho = 0$

$H_1 : \rho \neq 0$

$\alpha = 0.05$

การยอมรับสมมุติฐาน H_0 (accepted H_0) แปลว่าตัวแปร 2 กลุ่ม ไม่สัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกัน แต่ถ้าไม่ยอมรับ H_0 (rejected H_0) ก็ไปยอมรับ H_1 แปลว่าตัวแปร 2 กลุ่มมีความสัมพันธ์กันหรือเกี่ยวข้องกัน

การหา *df* ของการทดสอบ X^2 แบบนี้ ต้องพิจารณาตัวแปรด้านแถวตั้ง (column) และตัวแปรด้านแนวนอน (row)

ดังนั้น df = (C-1) (R-1) เช่นถ้า C = 3 R = 4

ค่าของ df = (3-1) (4-1) = 6 ดังนี้เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบ

1. หาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่ผลิตแหนมกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*
2. หาความสัมพันธ์ระหว่างการมีฉลากของแหนมกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*

บทที่ 3 ผลการทดลอง

3.1 ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนม

ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในตัวอย่างแหนม 67 ตัวอย่าง ซึ่งซื้อมาจากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร มีทั้งบรรจุในถุงพลาสติกและห่อใบตอง พบการปนเปื้อนจาก*ซาลโมเนลลา* 47 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 70 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนม

ตัวอย่าง	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต	ผลการวิเคราะห์
1	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
2	ห่อใบตอง ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
3	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ
4	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
5	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ
6	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ
7	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
8	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
9	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
10	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ

ตัวอย่าง	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต	ผลการวิเคราะห์
11	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
12	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
13	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
14	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	พบ
15	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	พบ
16	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ
17	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	พบ
18	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ปทุมธานี	พบ
19	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ลำปาง	ไม่พบ
20	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
21	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
22	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
23	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
24	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
25	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ

ตัวอย่าง	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต	ผลการวิเคราะห์
26	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
27	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
28	ห่อใบตอง ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
29	ห่อใบตอง ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
30	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
31	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ
32	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สุพรรณบุรี	พบ
33	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
34	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่มีฉลาก	พบ
35	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
36	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
37	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
38	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ขอนแก่น	พบ
39	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
40	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ

ตัวอย่าง	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต	ผลการวิเคราะห์
41	ถุงพลาสติก มีฉลาก	ปทุมธานี	พบ
42	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
43	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	พบ
44	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
45	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
46	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	ไม่พบ
47	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
48	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	พบ
49	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
50	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
51	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
52	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
53	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
54	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	พบ
55	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ

ตัวอย่าง	ภาชนะบรรจุและฉลาก	แหล่งผลิต	ผลการวิเคราะห์
56	ถุงพลาสติก ไม่มีฉลาก	ไม่ระบุ	ไม่พบ
57	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
58	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
59	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
60	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	ไม่พบ
61	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	พบ
62	ถุงพลาสติก มีฉลาก	เชียงใหม่	พบ
63	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
64	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
65	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ
66	ถุงพลาสติก มีฉลาก	กรุงเทพมหานคร	พบ
67	ถุงพลาสติก มีฉลาก	สมุทรปราการ	ไม่พบ

3.2 การประเมินผลทางสถิติใช้วิธี Chi-square test

3.2.1 หาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่ผลิตแหนมกับการตรวจพบซาลโมเนลลาแสดงไว้ในตารางที่ 4 และความสัมพันธ์ระหว่างการมีฉลากของแหนมกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนม*แยกตามแหล่งผลิต

แหล่งผลิต	พบ*ซาลโมเนลลา* (ตัวอย่าง)	ไม่พบ*ซาลโมเนลลา* (ตัวอย่าง)	รวม (ตัวอย่าง)
กรุงเทพมหานครและปริมณฑล	19	12	31
ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	9	2	11
ไม่ระบุแหล่งผลิต	18	7	25
รวม	**46**	**21**	**67**

*ค่าในตารางเป็นค่าความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาจริง (*O*)

การคำนวณหาค่าความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาตามทฤษฎีหรือที่คาดหวัง *(E)* จากค่า *O* ในตารางที่ 4 ทำได้โดยเอาช่องรวมแถวตั้งและแถวนอน ตรงช่อง *O* นั้นแล้วคูณกัน แล้วหารด้วยผลรวมทั้งหมด
ได้ผลดังนี้

ถ้า O = 19 แล้ว $E = \frac{(46 \times 31)}{67} = 21.28$

ถ้า O = 12 แล้ว $E = \frac{(21 \times 31)}{67} = 9.72$

ถ้า O = 9 แล้ว $E = \frac{(46 \times 11)}{67} = 7.55$

ถ้า O = 2 แล้ว $E = \frac{(21 \times 11)}{67} = 3.45$

ถ้า O = 18 แล้ว $E = \frac{(46 \times 25)}{67} = 17.16$

ถ้า O = 7 แล้ว $E = \frac{(21 \times 25)}{67} = 7.84$

ตารางที่ 5 ค่าความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาจริง (*O*) กับความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาตามทฤษฎีหรือที่คาดหวัง (*E*) เมื่อแยกตามแหล่งผลิต

O	E	$O-E$	$(O-E)^2$	$\frac{(O-E)^2}{E}$
19	21.28	-2.28	5.20	0.24
12	9.72	2.28	5.20	0.53
9	7.55	1.45	2.10	0.28
2	3.45	-1.45	2.10	0.61
18	17.16	0.84	0.71	0.04
7	7.84	-0.84	0.71	0.09
67	67			$X^2 = 1.79$

X^2 ที่คำนวณได้มีค่า 1.79 จากตารางในภาคผนวก ข เป็นตารางการแจกแจงของ X^2 ถ้า X^2 มี df = (3-1)(2-1) = 2 และ α = 0.05 จะมีค่า 5.99 แต่ค่า X^2 ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า X^2 จากตาราง ดังนั้นเราจึงยอมรับ H_0 นั่นคือแหล่งผลิตแหนมไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา* อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

3.2.2 หาความสัมพันธ์ระหว่างการมีฉลากของแหนมกับการตรวจพบซาล*โมเนลลา*แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์*ซาลโมเนลลา*ในแหนม*แยกตามการมีฉลาก

ฉลาก	พบ*ซาลโมเนลลา* (ตัวอย่าง)	ไม่พบ*ซาลโมเนลลา* (ตัวอย่าง)	รวม (ตัวอย่าง)
มีฉลาก	30	13	43
ไม่มีฉลาก	17	7	24
รวม	**47**	**20**	**67**

*ค่าในตารางเป็นค่าความถี่ของการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา*ที่ได้มาจริง (*O*)

ตารางที่ 7 ค่าความถี่ของการตรวจพบซาล*โมเนลลา*ที่ได้มาจริง (O) กับความถี่ของการตรวจพบซาล*โมเนลลา*ที่ได้มาตามทฤษฎีหรือที่คาดหวัง (E) เมื่อแยกตามการมีฉลาก

O	E	$O-E$	$(O-E)^2$	$\frac{(O-E)^2}{E}$
30	30.16	-0.16	0.03	0.001
13	12.84	0.16	0.03	0.002
17	16.84	0.16	0.03	0.002
7	7.16	-0.16	0.03	0.004
67	67			$X^2 = 0.009$

X^2 ที่คำนวณได้มีค่า 0.009 เมื่อดูจากตารางในภาคผนวก ข เป็นตารางการแจกแจงของ X^2 ถ้า X^2 มี df = (2-1)(2-1) = 1 และ α = 0.05 จะมีค่า 3.84 แต่ค่า X^2 ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า X^2 จากตาราง ดังนั้นเราจึงยอมรับ H_0 นั่นคือการมีฉลากของแหนมไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบซาล*โมเนลลา* อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ในแหนมมีสูงถึงร้อยละ 70 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ Chi-square test เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่ผลิตแหนมกับการตรวจพบ*ซาลโมเนลลา* พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างแหล่งที่ผลิตกับการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา* ซึ่งหมายถึงไม่ว่าแหนมจะมีแหล่งผลิตจากกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือแหนมที่ไม่ระบุแหล่งผลิตก็มีโอกาสที่จะปนเปื้อนจาก*ซาลโมเนลลา*ได้ทั้งนั้น

การทดสอบทางสถิติอีกชุดหนึ่งได้ทำการทดสอบความสัมพันธ์ของการมีฉลากของแหนมว่าจะสัมพันธ์กับการพบ*ซาลโมเนลลา*หรือไม่ พบว่าทั้งสองตัวแปรไม่มีความสัมพันธ์กัน หมายความว่าไม่ว่าแหนมจะมีฉลากหรือไม่มีฉลากก็มีโอกาสที่จะปนเปื้อนจาก*ซาลโมเนลลา*ได้เท่า ๆ กัน ซึ่งการมีฉลากหรือไม่มีฉลากเป็นการบ่งชี้ทางอ้อมของการผลิตที่มีหน่วยงานของทางราชการควบคุมหรือไม่มี เนื่องจากแหนมที่มีฉลากเป็นแหนมที่ได้รับการอนุญาตให้ผลิตตามกฎหมายซึ่งต้องมีหน่วยงานของทางราชการที่เกี่ยวข้องกำกับดูแลและตรวจสอบ ซึ่งถ้าจะพิจารณาในแง่ของสุขอนามัยแล้ว โรงงานที่ผลิตแหนมที่มีฉลากน่าจะผลิตแหนมที่มีการปนเปื้อนจาก*ซาลโมเนลลา*น้อยกว่าโรงงานที่ผลิตแหนมที่ไม่มีฉลาก แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นปัจจัยหลักที่น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดสำหรับการปนเปื้อนของแหนมน่าจะมาจากวัตถุดิบคือเนื้อหมู ซึ่งการปนเปื้อนน่าจะมาจากกระบวนการตั้งแต่อาหารสัตว์ การเลี้ยงหมู การฆ่าหมูในโรงฆ่าสัตว์ และการขนส่งเนื้อหมูสู่ตลาด ซึ่งเห็นว่าเนื้อหมูมีอัตราการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ที่สูงมาก และเมื่อนำเนื้อหมูมาทำแหนม ผู้ผลิตมักจะไม่ล้างเนื้อหมูก่อน เพราะจะทำให้แหนมที่ได้ไม่เหนียวจับตัวกัน ดังนั้นเมื่อนำเนื้อหมูมาทำแหนมจึงทำให้แหนมปนเปื้อนจากเชื้อ*ซาลโมเนลลา*ได้ ถึงแม้ว่าเชื้อ*ซาลโมเนลลา*จะถูกยับยั้งจากกระบวนการหมัก แต่ก็อาจมีเชื้อหลงเหลืออยู่ถ้าในแหนมมีความเป็นกรดไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อดังกล่าวหรือมีเชื้อปนเปื้อนมาในปริมาณสูงมาก ฉะนั้นผู้ผลิตจึงควรเลือกเนื้อหมูที่มีคุณภาพดี ไม่เลือกซื้อหมูที่ตายโดยไม่ทราบสาเหตุ นอกจากนี้การปนเปื้อนอาจมาจากอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ในระหว่างกระบวนการผลิต สุขอนามัยของเจ้าหน้าที่และพนักงานในโรงงาน อุณหภูมิในการเก็บรักษาแหนมไม่ได้ตามที่กำหนด

ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยในการบริโภคแหนม ผู้บริโภคควรทำให้แหนมสุกโดยการต้ม นึ่งหรือทอดก่อนการบริโภค ในส่วนของผู้ผลิตต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของแหนมให้ดีขึ้น โดยการคัดเลือกเนื้อหมูที่มีคุณภาพดีมาทำแหนม โดยคำนึงถึงแหล่งที่มาและคัดเลือกผู้ขายที่เชื่อถือได้ สำหรับในการผลิตแหนมผู้ผลิตควรมีสุขลักษณะที่ดีในการผลิต มีการรักษาความสะอาดของสถานที่ผลิต (Good Manufacturing Practice/GMP) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต การดูแลสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดีของผู้ปฏิบัติงาน เจ้าหน้าที่ของรัฐต้องมีการควบคุมดูแลการผลิต ประชาสัมพันธ์ให้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายในการบริโภคแหนมดิบ

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณภาพของแหนม โดยวิเคราะห์หา*ซาลโมเนลลา*ในแหนม 67 ตัวอย่าง พบ*ซาลโมเนลลา* 47 ตัวอย่างหรือร้อยละ 70 เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่ผลิตแหนมพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่ผลิตแหนมกับการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา* และไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแหนมที่มีฉลากกับไม่มีฉลากกับการปนเปื้อนของซาลโมเนนลา ซึ่งแสดงให้เห็นทางอ้อมว่าสาเหตุใหญ่ของการปนเปื้อนของ*ซาลโมเนลลา*ในแหนมคือเนื้อหมู ส่วนสุขลักษณะในการผลิต อุปกรณ์ เครื่องใช้ต่างๆ ในการผลิต หรือจากคนงาน เป็นสาเหตุประกอบ แต่อย่างไรก็ตามการนำหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร(GMP) มาใช้ในการผลิตประกอบกับการคัดเลือกคุณภาพของเนื้อหมูที่จะนำมาผลิตจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจาก*ซาลโมเนลลา*ได้ อย่างไรก็ตามสำหรับผู้บริโภคควรนำแหนมมาทำให้สุกก่อนรับประทาน เพื่อความปลอดภัยในการบริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และคุณปรีชา ธรรมนิยม หัวหน้ากลุ่มงานจุลชีววิทยา ที่ช่วยให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานจุลชีววิทยาที่สนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ดวงดาว วงศ์สมมาตร์ และคณะ. พยาธิและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในแหนม. **วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์**. ปีที่ 36, ฉบับที่ 3, กรกฎาคม 2537, หน้า 164-171
2. นงคราญ เรืองประพันธ์ และ นิตยา พันธ์บัว. การสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมและหมูยอที่ผลิตในจังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. **อาหาร**. ปีที่ 22, ฉบับที่ 2, เมษายน – มิถุนายน 2535, หน้า 32-39
3. นันทนา แก้วอุบล. แหนม. **ข่าวกรมวิทยาศาสตร์บริการ**. ฉบับที่ 104, มกราคม 2527, หน้า 12-13
4. พวงพร โชติกไกร. **จุลชีววิทยาของอาหารและน้ำ**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรกฎาคม 2534, หน้า 317-318
5. ยุทธพงศ์ ประชาสิทธิศักดิ์. กินแหนมฉายรังสีดีอย่างไร. **ข่าว พปส**. ปีที่ 3.ฉบับที่ 5, พฤศจิกายน-ธันวาคม 2531-มกราคม 2532,หน้า 16-17
6. รัตนสุดา พันธ์อุไร. Non-Typhoidal Salmonellosis in Thailand:An Overview. **การสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย.** คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15-16 มกราคม 2541
7. ล้วน สายยศ และ อังศนา สายยศ **สถิติวิทยาทางการวิจัย** พิมพ์ครั้งที่ 3 พ.ศ. 2540 , หน้า 259-275, สุวีริยาสาส์น จัดพิพม์
8. อดิศร เสวตวิวัฒน์. และคณะ. Non-Typhoidal Salmonellosis in Thailand:An Overview. **การสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย.** คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15-16 มกราคม 2541
9. อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์. การดำเนินงานของศูนย์ทดสอบยืนยัน *Salmonella* และ *Shigella*. **การประชุมเชิงปฏิบัติการเพื่อจัดทำแผนระบบความปลอดภัยแห่งชาติด้านอาหาร**. วันที่ 6-8 กันยายน 2541.
10. อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ. Non-Typhoidal Salmonellosis in Thailand:An Overview. **การสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหา Non-**

Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย. คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15-16 มกราคม 2541

11. อำไพ อังสุนันทวิวัฒน์. แหนมฉายรังสีแกมมา. **ข่าว พปส.** ปีที่ 6. ฉบับที่ 4, กรกฎาคม – สิงหาคม 2534, หน้า 2-6
12. Bridson, E.Y. The Oxiod Manual 7th edition. 1995, p 2-182
13. Difco Manual, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, Tenth Edition, Difco Laboratories. 1994
14. Merck, Microbiology Manual, Darmstadt, 1996
15. ISO 6579.1995 Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella*

ภาคผนวก ก รูปภาพของลักษณะภาชนะบรรจุแหนม

ภาคผนวก ข

	Level of significance for a directional test					
	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
	Level of significance for a non-directional test					
df	.20	.10	.05	.02	.01	.001
1	1.64	2.71	3.84	5.41	6.64	10.83
2	3.22	4.60	5.99	7.82	9.21	13.82
3	4.64	6.25	7.82	9.84	11.34	16.27
4	5.99	7.78	9.49	11.67	13.28	18.46
5	7.29	9.24	11.07	13.39	15.09	20.52
6	8.56	10.64	12.59	15.03	16.81	22.46
7	9.80	12.02	14.07	16.62	18.48	24.32
8	11.03	13.36	15.51	18.17	20.09	26.12
9	12.24	14.68	16.92	19.68	21.67	27.88
10	13.44	15.99	18.31	21.16	23.21	29.59
11	14.63	17.28	19.68	22.62	24.72	31.26
12	15.81	18.55	21.03	24.05	26.22	32.91
13	16.98	19.81	22.36	25.47	27.69	34.53
14	18.15	21.06	23.68	26.87	29.14	36.12
15	19.31	22.31	25.00	28.26	30.58	37.70
16	20.46	23.54	26.30	29.63	32.00	39.29
17	21.62	24.77	27.59	31.00	33.41	40.75
18	22.76	25.99	28.87	32.35	34.80	42.31
19	23.90	27.20	30.14	33.69	36.19	43.82
20	25.04	28.41	31.41	35.02	37.57	45.32
21	26.17	29.62	32.67	36.34	38.93	46.80
22	27.30	30.81	33.92	37.66	40.29	48.27
23	28.43	32.01	35.17	38.97	41.64	49.73
24	29.55	33.20	36.42	40.27	42.98	51.18
25	30.68	34.38	37.65	41.57	44.31	52.62
26	31.80	35.56	38.88	42.86	45.64	54.05
27	32.91	36.74	40.11	44.14	46.96	55.48
28	34.03	37.92	41.34	45.42	48.28	56.89
29	35.14	39.09	42.69	46.69	49.59	58.30
30	36.25	40.26	43.77	47.96	50.89	59.70
32	38.47	42.59	46.19	50.49	53.49	62.49
34	40.68	44.90	48.60	53.00	56.06	65.25
36	42.88	47.21	51.00	55.49	58.62	67.99
38	45.08	49.51	53.38	57.97	61.16	70.70
40	47.27	51.81	55.76	60.44	63.69	73.40
44	51.64	56.37	60.48	65.34	68.71	78.75
48	55.99	60.91	65.17	70.20	73.68	84.04
52	60.33	65.42	69.83	75.02	78.62	89.27
56	64.66	69.92	74.47	79.82	83.51	94.46
60	68.97	74.40	79.08	84.58	88.38	99.61

ค่าวิกฤติของ Chi-square (X^2)

ภาคผนวก ค

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1.1 เซเลไนต์ซีสทีนบรอท (selenite cystine broth) ของ Merck

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน (peptone from casein)	5	กรัม
แล็กโทส (lactose)	4	กรัม
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)	10	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนเซเลไนต์ (sodium hydrogen selenite)	4	กรัม
แอล-ซีสทีน (L-cystine)	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 250 มิลลิเมตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดจุก ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้หมดภายในวันที่เตรียม

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.2 ไซโลสไลซีนเดสซอกซีโคเลตอะการ์ (xylose lysine desoxycolate agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ยีสต์เอกซแทรกต์	3	กรัม
แอลไลซีน (L-lysine)	12	กรัม
ไซโลส (xylose)	3.75	กรัม
แล็กโทส	7.5	กรัม
แซคคาโรส (saccharose)	7.5	กรัม
โซเดียมดีซอกซีคลอเรท (sodium desoxycholate)	2.5	กรัม
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (ferric ammonium citrate)	0.8	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate)	6.8	กรัม

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
วุ้น (agar)	14.0	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก ต้มให้เดือด ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.4 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.3 **ทริปโทน บรอท** (tryptone broth)

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน(tryptone)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

1.4 **ทริปเพิลชูการ์ไอร์ออนอะการ์** (triple sugar iron agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

บีฟเอกซแทรกต์ (beef extract)	3	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์ (yeast extract)	3	กรัม
เพปโทน(peptone)	15	กรัม
โพรทิโอสเพปโทน (proteose peptone)	5	กรัม
เดกซโทรส (dextrose)	1	กรัม
แล็กโทส	10	กรัม
ซูโครส (sucrose)	10	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate)	0.3	กรัม

วุ้น(agar)	12	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.024	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

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

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.4 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.5 บัฟเฟอร์เพปโทนวอเตอร์ (buffered peptone water) ของ Oxoid

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต(disodium phosphate)	3.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.2 ± 0.2

1.6 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
บริลเลียนท์ กรีน (brilliant green)	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

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

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.7 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.7 เพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน	5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	2.5	กรัม
เดกซโทรส	1	กรัม
วุ้น	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก เตรียมอีกส่วนแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดให้เอียงเป็นสแลนท์

ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายกับ 7.0 ± 0.2 องศาเซลเซียส

1.8 ยูเรียอะการ์ (urea agar) ของ Oxoid

ยูเรียอะการ์เบส(urea agar base)

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน	1.0	กรัม
กลูโคส(glucose)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	1.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.8	กรัม
ฟีนอลเรด	0.012	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.8 $\pm$ 0.2

สารละลายยูเรีย (urea solution)

ยูเรีย (urea)	400	กรัม
น้ำกลั่นเติมให้ครบ	1	ลิตร

ละลายยูเรียในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์ เมื่อต้องการจะใช้นำ 950 มิลลิลิตรของยูเรียอะการ์เบส ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติม 50 มิลลิลิตร ของสารละลายยูเรียผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร และเอียงหลอดทำสแลนท์

1.9 แรพพาพอร์ทส วาสซิเลียดีส เอ็นริชเมนท์ บรอท (Rappaport-Vassiliadis(RV) enrichment broth) ของ Oxoid

มีส่วนประกอบดังนี้

โซยาเพปโทน (soya peptone)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	8.0	กรัม

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	1. 6	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride)	40.0	กรัม
มาลาไคท์ กรีน (malachite green)	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 5.2 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.10 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

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

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.7 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.11 เอ็มอาร์-วีพี บรอท (MR-VP broth) ของ Merck

มีส่วนประกอบดังนี้

เพปโทน (peptone from meat)	7.0	กรัม
ดี(+)กลูโคส (D(+)glucose)	5.0	กรัม
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 3 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.9±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

1.12 เฮกโทเอน เอนเทอริก อะการ์ (hektoen enteric agar) ของ Oxoid

มีส่วนประกอบดังนี้

โพรทิโอสเพปโทน	12	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	3	กรัม
แล็กโทส	12	กรัม
ซูโครส	12	กรัม
ซาลิซิน (salicin)	2	กรัม
ไบล์ซอลต์เบอร์ 3 (bile salts No.3)	9	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	5	กรัม
แอมโมเนียมเฟอร์ริกซิเตรท (ammonium ferric citrate)	1.5	กรัม
แอซิดฟิวซิน (acid fuchsin)	0.1	กรัม
โบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue)	0.065	กรัม
วุ้น	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุกต้มให้เดือด ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

ความเป็นกรด-ด่างภายหลังฆ่าเชื้อแล้วเป็น 7.5 ± 0.2

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับทดสอบ Voges-Proskauer (VP) reaction

2.1.1 สารละลายครีเอทีน (creatine solution)

มีส่วนประกอบดังนี้

ครีเอทีนโมโนไฮเดรท(creatine monohydrate)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย ครีเอทีนโมโนไฮเดรทในน้ำกลั่น

2.1.2 1 - เนฟทอลในเอทานอลิก (1-naphthol ,ethanolic solution)

มีส่วนประกอบดังนี้

1 เนฟทอล(1-naphthol)	6	กรัม
เอทานอล, 96% (ethanol, 96% V/V)	100	มิลลิลิตร

ละลาย 1 เนฟทอลใน เอทานอล

2.1.3 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide solution)

มีส่วนประกอบดังนี้

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์(potassium hydroxide)	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่น

2.2 โคแวกสรีเอเจนท์ (Kovac's reagent)

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์(p-dimethylaminobenzaldehyde) 5 กรัม ในเอมิลอัลกอฮอล์(amyl alcohol) 75 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (hydrochloric acid (concentrated)) 25 มิลลิลิตร

2.3 *ซาลโมเนลลา*โพลีวาเลนท์ เอช แอนติซีรัม (*Salmonella* polyvalent H antiserum) ของ Difco

2.4 ซาลโมเนลลาโพลีวาเลนท์ โอ แอนติซีรัม (*Salmonella* polyvalent O antiserum) ของ Difco