บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยในครั้งนี้ มีดังนี้

2.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อโคและผลิตภัณฑ์

2.2 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหาร

2.3 คุณภาพของจุลินทรีย์ในอาหาร

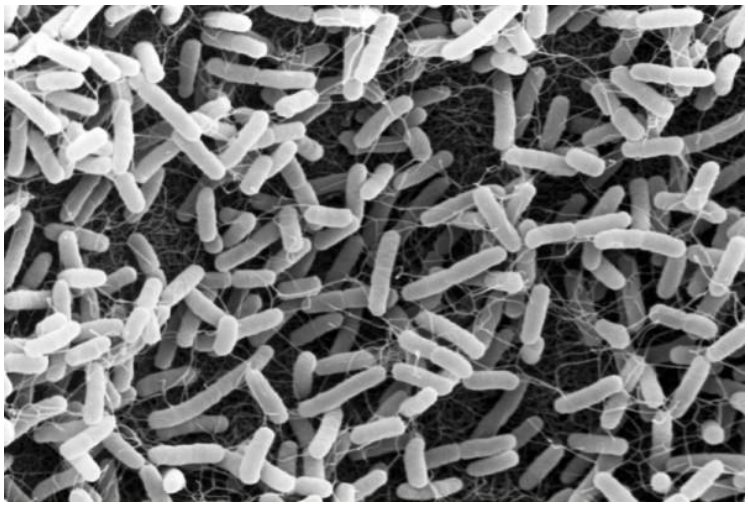
2.4 จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณภาพอาหาร

2.1 **การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อโคและผลิตภัณฑ์**

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่มาจากภายนอก โดยอาจปนเปื้อนในระหว่างการฆ่าและการชำแหละ จุลินทรีย์เหล่านี้มาจากขน หนัง กีบเท้า ทางเดินอาหารสัตว์ เสื้อผ้า มือของผู้ชำแหละ เครื่องมือเครื่องใช้ อากาศ ในระหว่างจำหน่ายจุลินทรีย์อาจมาจากภาชนะบรรจุ บริเวณวางจำหน่าย ผู้ซื้อหรือตัวผู้ขายเอง จุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ สำรับแบคทีเรียที่พบได้แก่ Pseudomonas, Alcaligenes, Bacillus, Proteus, Clostridium, Escherichia, Flavobacterium, Leuconostoc, Micrococcus, Streptococcus, Sarcina, Staphylococcus, และ Salmonella (พวงพร โชติกไกร, 2542 : วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2539 และ Warriss, 2000)

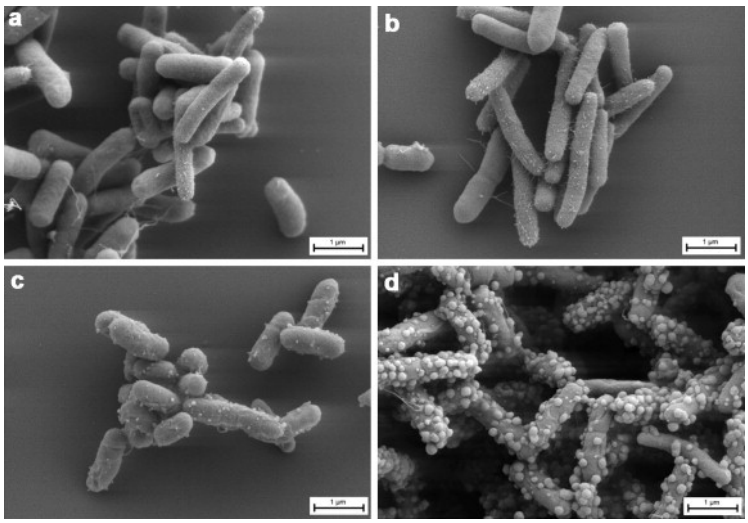
สำหรับเชื้ออันตรายที่ควรระวังซึ่งอาจปนเปื้อนมากับเนื้อโคและผลิตภัณฑ์ ได้แก่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิด *Salmonella* (non-typhi) และ *E. coli* (enteric) โดยมีจุดเสี่ยงคือ โรงฆ่าสัตว์และตลาด ในขณะที่ *Taenia* spp. และ Sarcocyst นั้นเป็นชนิดอันตรายที่ควรตรวจติดตาม ส่วนอันตรายทางเคมีที่พบในเนื้อโคขุน เลือด และเครื่องในโค ได้แก่ การตกค้างของสารปฏิชีวนะ Chlorotetracycline, Penicillin, Alflatoxin และสารเร่งเนื้อแดง Salbutamol เป็นอันตรายที่ควรตรวจติดตาม โดยมีจุดเสี่ยง คือ ฟาร์ม โรงฆ่าสัตว์ และตลาดจำหน่าย (สถาบันอาหาร, 2547) นอกจากนี้ยังสามารถพบ Staphylococcus ที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อวัวได้ โดยยุพิน แวงสุข (2547) ได้อธิบายว่า เชื้อดังกล่าวพบได้ทั่วไปตามผิวหนัง โพรงจมูก บาดแผล ฝี หนอง และอุจจาระของคนและสัตว์ จึงถือได้ว่าเชื้อนี้เป็นดัชนีแสดงให้เห็นถึงสุขาภิบาลของการผลิตที่ไม่ดี มีการจับต้อง

อาหาร ไม่ถูกหลักอนามัย ความสะอาดของเครื่องใช้ที่ไม่เพียงพอ นอกจากนี้ยังเป็นดัชนีแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัย เนื่องจากมีสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษปนเปื้อนมาทำให้เป็นอันตรายได้ โดยสารพิษที่ได้รับปริมาณเพียง 1 มิลลิกรัม ก็สามารถก่อให้เกิดโรคได้ อาหารที่มักมีปัญหาจากเชื้อนี้ได้แก่ เนื้อสัตว์ ขนมหวานที่มีนมหรือไข่ นอกจากนี้ นวลจิตต์ เชาวกีรติพงศ์ (2542) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่าผู้ที่ได้สารพิษจากแบคทีเรียพวกสแตฟไฟโลคอกคัส เพียง 2-4 ชั่วโมง จะแสดงอาการคลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริว ท้องเดิน และอ่อนเพลียประมาณ 1-2 วัน ก็จะทุเลาและหายไปเองถ้าไม่มีโรคอื่นแทรกซ้อน



ภาพประกอบที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของ *E. coli* เมื่อถ่ายภายใต้กล้อง SEM

(ที่มา: http://www.biomed.in.th/image-of-the-week-2-escherichia-coli/)



ภาพประกอบที่ 2.2 ลักษณะเซลล์ใต้กล้อง SEM ของ *Salmonella typhimurium* เมื่อเจริญในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน

(ที่มา: Xiaowei Su and Doris H. D'Souza, 2012)

ภาพประกอบที่ 2.3 ลักษณะเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* เมื่อถ่ายภายใต้กล้อง SEM

(ที่มา: http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/Main/Staphylococcus)

ภาพประกอบที่ 2.4 ลักษณะเซลล์ของ *Clostridium perfringens* เมื่อถ่ายภายใต้กล้อง SEM (ที่มา:http://www.visualphotos.com/image/1x3745107/clostridium_perfringens_clostridium_perfringens)

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สดนั้น พรศิริ พรหมกิ่งแก้ว และ อนิรุธ เนื่องเม็ก (2548) ได้ทำการตรวจหา Salmonella และ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ในตลาดสดเขตภาคเหนือ รวม 881 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเนื้อสุกร ไก่ กระบือ และโค จำนวน 523, 216, 102 และ 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบ *Salmonella, S. aureus* ในระดับที่เกินมาตรฐาน (>100 cfu/g) และพบทั้ง Salmonella และ *S. aureus* ในระดับที่เกินมาตรฐานในตัวอย่างเดียวกันร้อยละ 12.03, 11.69 และ 3.75 ตามลำดับ เมื่อจำแนกตามชนิดของเนื้อสัตว์ ในเนื้อสุกร ไก่ กระบือ และโค พบ Salmonella ร้อยละ 13.58, 10.19, 7.84 และ 10.00 ตามลำดับ พบ *S. aureus* ในระดับที่เกินมาตรฐาน ร้อยละ 13.96, 8.80, 9.80 และ 2.50 ตามลำดับ และพบทั้ง Salmonella และ *S. aureus* ในระดับที่เกินมาตรฐานในตัวอย่างเดียวกันร้อยละ 2.68, 6.48, 3.92 และ 2.50 ตามลำดับ

2.2 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหาร

วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่จะใช้ในการตรวจสอบอาหารเพื่อบอกปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ต้องระบุวิธีให้ชัดเจน และต้องเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับในระดับสากล โดยเฉพาะการตรวจเพื่อได้ตามเกณฑ์มาตรฐานและเกณฑ์ข้อกำหนด โดยสมัชชานานาชาติว่าด้วยข้อตกลงด้านจุลิน-

ทรีย์ในอาหาร (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods : ICMSF) ได้มีมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่เรียกว่า มาตรฐาน ISO ประเทศสหรัฐอเมริกามีหน่วยงาน American Public Health Association (APHA) ได้จัดพิมพ์เครื่องมือมาตรฐานในการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาไว้ 4 เล่ม ดังนี้ Standard Methods for the Examination of Dairy Products, Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food และ Standard Method for the Examination of Seawater and Shellfish ส่วนสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้รวบรวมและจัดพิมพ์โดยหน่วยงาน Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ชื่อหนังสือ Bacteriological Analytical Manual of Food and Drug Administration โดยหลายๆ ประเทศได้ยึดวิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาจากคู่มือเหล่านี้ รวมทั้งหน่วยงานประเทศไทยที่รับผิดชอบในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ก็ใช้หนังสือที่กล่าวไว้ เช่น กรมประมง และกองอาหาร (อุษามาส วังชัยสุนทร, 2547)

2.3 คุณภาพของจุลินทรีย์ในอาหาร (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

คำว่า "คุณภาพของอาหาร" หมายถึง ระดับของความเป็นเลิศของผลิตภัณฑ์อาหาร แต่สำหรับแนวคิดเกี่ยวกับคุณภาพของอาหารในทางจุลชีววิทยานั้นประกอบด้วย 3 ประการดังนี้

1. ความปลอดภัย (Safety) โดยอาหารที่มีคุณภาพต้องไม่มีเชื้อโรคหรือสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายเมื่อผู้บริโภคนำไปบริโภค

2. การยอมรับและอายุการเก็บรักษา (Acceptability and shelf-life) อาหารที่มีคุณภาพต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษาอาหารสั้นไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

3. ความสม่ำเสมอ (Consistency) โดยอาหารที่มีคุณภาพต้องมีความปลอดภัยและอายุการเก็บรักษาที่คงที่ทุกหน่วยและทุกรุ่นของการผลิต

เกณฑ์ของจุลินทรีย์ในอาหาร

โดยปกติจะใช้ผลการตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาในการยอมรับหรือไม่ยอมรับคุณภาพอาหารโดยใช้เกณฑ์ทางจุลินทรีย์ที่ได้กำหนดขึ้นมา โดยสมัชชานานาชาติ (ICMSF) ว่าด้วยข้อตกลงด้านจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งได้จำแนกเกณฑ์ของจุลินทรีย์ในอาหารเป็น 3 ประเภทดังนี้

1. เกณฑ์ด้านมาตรฐาน (Microbiological standard) เป็นเกณฑ์ของจุลินทรีย์ที่ระบุในกฎหมาย ซึ่งกำหนดโดยองค์กรที่ทำหน้าที่ควบคุมอาหาร สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขเป็นผู้กำหนดมาตรฐานทางจุลินทรีย์ในอาหารประเภทต่างๆ โดยการเก็บข้อมูลจริงจากการทดลองเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในอาหารและได้ประกาศเป็นกฎหมาย

2. เกณฑ์ด้านข้อกำหนด (Microbiological specification) เป็นเกณฑ์ของจุลินทรีย์ที่ทำการตกลงระหว่างผู้ซื้อและผู้ขาย และเกณฑ์ที่กำหนดขึ้นโดยองค์กรการค้าระหว่างประเทศ

3. เกณฑ์ด้านแนวปฏิบัติ (Microbiological guideline) เป็นเกณฑ์การเฝ้าระวังการผลิตและการจัดบริการอาหารให้อยู่ในระดับที่ยอมรับ โดยเกณฑ์ในข้อนี้เป็นการแนะนำให้ปฏิบัติมากกว่าการบังคับใช้ ซึ่งแตกต่างกับเกณฑ์ข้อที่ 1 และข้อที่ 2

มาตรฐานอาหารทางจุลชีววิทยา

ในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ไม่ว่าจะใช้เกณฑ์ตามข้อไหนก็ตามจะต้องทำแผนชักตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของอาหารทั้งหมด เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่จะต้องตรวจคือจุลินทรีย์ทั้งหมด ได้แก่ Acerobic plate count, Psychrotrophic count, Thermoduric count, ยีสต์และรา จุลินทรีย์ดัชนีบ่งชี้ได้แก่ Coliform และ Faecal coliform จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารได้แก่ *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus,* Clostridium และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์อาจจะตรวจในวัตถุดิบ ขั้นตอนกระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรือในขั้นตอนการผลิตที่วิเคราะห์แล้วว่าเป็นจุดวิกฤตในการทำระบบ HACCP รวมทั้งตรวจวิเคราะห์สภาพแวดล้อมในการผลิต เช่น คุณภาพน้ำใช้ความสะอาดพื้นผิว และคุณภาพของอากาศในโรงงาน เป็นต้น

มาตรฐานจุลินทรีย์ที่กำหนดขึ้นควรต้องมีความเหมาะสมกับอาหารแต่ละชนิด เช่น จำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหารดิบและอาหารสุกต้องแตกต่างกัน และในกรณีของการ

ตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดในผลิตภัณฑ์อาหารต่างชนิดกันจะต้องตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคที่ต่างชนิดกันด้วย เช่น อาหารกระป๋องควรจะตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *Clostridium* spp.

2.4 จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณภาพอาหาร

2.4.1 จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count)

เป็นวิธีที่ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งนิยมเรียกกันว่าวิธี Standard Plate Count หรือ Aerobic Plate Count ถ้าตัวอย่างอาหารตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดเกินมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบที่นำมาผลิต ผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก กระบวนการผลิตอาจไม่ถูกสุขาภิบาล และอาจมีการเก็บอาหารในสภาวะที่ไม่เหมาะสม แม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค แต่ถ้ามีจำนวนมากเกินมาตรฐานที่กำหนดก็สามารถก่อโรคทางเดินอาหารได้เช่นกัน (กองสุขาภิบาล, 2537)

ในการตรวจวิเคราะห์ถ้าในตัวอย่างอาหารมีจุลินทรีย์จำนวนมาก ต้องทำความเจือจางให้ลดลงทีละสิบเท่าที่เรียกว่า (Ten fold dilution) หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดเจริญได้ที่นิยมใช้ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar หรือ Plate Count Agar ความเป็นกรด – ด่างเป็น 7.0 – 7.4 เป็นผลให้แบคทีเรียเจริญได้ สภาวะในการบ่มต้องมีออกซิเจน ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้จะเป็นกลุ่ม Aerobe หรือ Facultative anaerobe ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ ขึ้นอยู่กับว่าตัวอย่างอาหารจะมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อกลุ่มไหน ถ้าตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนโอกาสส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียกลุ่ม Thermophile ดังนั้นจะบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 วัน ถ้าตัวอย่างอาหารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะพบแบคทีเรียกลุ่ม Mesophile ดังนั้นจะบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง แต่ถ้าตัวอย่างอาหารที่เก็บแช่เย็นจะพบแบคทีเรียกลุ่ม Psychrophile ดังนั้นจะบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 7 °C เป็นเวลา 10 วัน หรือบ่มที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 7 วัน (วีรานุช หลาง, 2552)

เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อมีหลายวิธี ได้แก่ Spread plate, Pour plate, Drop plate และ Spiral plate ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างที่ปริมาตรของตัวอย่างอาหารที่ใช้ เช่น เทคนิค Drop plate ใช้ตัวอย่างอาหารปริมาตร 0.02 มิลลิเมตร เทคนิค Spread plate ใช้ตัวอย่างอาหารปริมาตร 0.1 มิลลิเมตร ส่วนเทคนิค Pour plate ใช้ตัวอย่างอาหารปริมาตร 1 มิลลิเมตร นอกจากนี้

แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันในการเลือกใช้ โดยพบว่าเทคนิค Spread plate มีข้อดีกว่าเทคนิค Pour plate เพราะในการตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Pour plate อาหารเลี้ยงเชื้อที่เท ใส่จานเพาะเชื้อค่อนข้างร้อน อาจยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม Psychrophile ได้ ส่วนเทคนิค Spread plate จะตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียได้ชัดเจนเพราะเชื้อเจริญอยู่บนอาหารแข็งเท่านั้น ส่วนการรายงานผลในทุกวิธีให้รายงานผลเป็น Colony forming unit/gram (CFU/g) (Forsythe และ Hayes, 1998)

2.4.2 จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ (Indicator organisms) (Ray, 1996)

การตรวจหาจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ ครั้งแรกเริ่มใช้กับการตรวจคุณภาพของน้ำว่ามีการปนเปื้อนจากอุจจาระหรือไม่ แต่ต่อมาได้นำมาใช้ในการตรวจในอาหาร โดยปกติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อต้องการเฝ้าระวังการเกิดโรคระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจะทำการตรวจหาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ แต่เนื่องจากตัวอย่างอาหารส่วนมากต้องผ่านกระบวนการแปรรูปมาก่อน เช่น การแช่เยือกแข็งการทำให้แห้ง การใช้ความร้อน การใช้รังสี เป็นต้น ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่พบในอาหารจึงมีปริมาณน้อยอาจทำให้การตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงใช้จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ (Indicator organisms) เป็นตัวแทนในการบ่งชี้ความปลอดภัยของอาหารและการสุขาภิบาลในการผลิตอาหาร โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่นิยมตรวจหาได้แก่ แบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากอุจจาระ (Faecal colifrom) และแบคทีเรียที่ไม่ได้ปนเปื้อนจากอุจจาระ (Non-f aecal coliform)

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้มนุษย์ และสัตว์เลือดอุ่น
2. เป็นจุลินทรีย์พบมากในอุจจาระมนุษย์
3. ควรตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เมื่อตรวจพบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ
4. มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อม มากกว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในสภาวะเดียวกันอุณหภูมิเท่ากัน
5. สามารถรอดชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้เหมือนเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

6. มีวิธีการตรวจวิเคราะห์ทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ การตรวจหาแบคทีเรียที่ก่อโรคอาหารเป็นที่พิษต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ ขั้นตอนมากและต้องมีเทคนิคที่ซับซ้อนไม่เหมาะสมที่จะใช้ในงานประจำ

7. เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคถ้าทำการตรวจหาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาจเป็นอันตรายต่อผู้ตรวจได้ ถ้าไม่ระมัดระวัง แต่แบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับมนุษย์ เพราะปกติเชื้อนี้อาศัยในร่างกายมนุษย์อยู่แล้ว

2.4.2.1 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacterial)

โคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteriae ซึ่งมีคุณสมบัติทั่วไปดังนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Facultative anaerobic สามารถเฟอร์เมนท์น้ำตาลแลกโตสได้ กรดและแก๊ส สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่สกุล Escherichia, Enterobacter, Klebsiella และ Citrobacter แบคทีเรียในกลุ่มนี้ไวต่อความร้อน พบว่าการใช้ความร้อนระดับพาสเจอไรส์เซชันสามารถทำลายจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้ ซึ่งโดยปกติโคลิฟอร์มจะอาศัยในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นจึงตรวจพบมากในอุจจาระ แต่ที่แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางตัวอาศัยตามสิ่งแวดล้อม เช่น Enterobacter และ Klebsiella อาศัยตามพื้นดิน ดังนั้นการตรวจพบโคลิฟอร์มในอาหารจึงสรุปว่าอาหารนั้นปนเปื้อนอุจจาระไม่ได้ แต่จะถือว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะความสะอาด (Food sanitation index) (สถาบันอาหารและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2545) ดังนั้นจึงต้องหาจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ว่าอาหารปนเปื้อนจากอุจจาระ และนั่นก็คือแบคทีเรีย Faecal coliform

ในกรณีที่มีการตรวจพบโคลิฟอร์มเกินมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่ากระบวนการให้ความร้อนในการผลิตยังไม่เพียงพอ หรือมีการปนเปื้อนจากวัตถุดิบในปริมาณที่มาก อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไม่สะอาด หรือกรรมวิธีการผลิตไม่ถูกต้อง รวมทั้งสุขลักษณะส่วนบุคคลของผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวกับอาหารไม่ดีพอ

2.4.2.2 ฟีคัลโคลิฟอร์ม (Faecal coliform) (อุษามาส วังชัยสุนทร, 2547)

จุลินทรีย์สำคัญในกลุ่ม Faecal coliform คือ *E. coli* ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นจะพบเชื้อชนิดนี้มากในอุจจาระ จากวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานที่

ระบุใน Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods พบว่า ในทางปฏิบัติ ถ้าต้องการแยกแบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์มออกจากนอนฟีคัลโคลิฟอร์ม (Non – faecal coliform) ถ้าในตัวอย่างอาหารทะเลทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC Broth และบ่มที่อุณหภูมิ 44.5±0.2 °C ส่วนตัวอย่างอาหารประเภทอื่นๆ ให้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC Broth และบ่มที่อุณหภูมิ 45.0±0.2 °C เนื่องจากที่อุณหภูมินี้แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ แต่แบคทีเรียนอนฟีคัลโคลิฟอร์มไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ยังอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีบางชนิดที่สามารถแยกฟีคัลโคลิฟอร์มออกจากแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มคือ การทดสอบ IMVIC test (Indole test, Methyl red – Vogesproskauer : MR –VP test, Citrate utilixation) ซึ่ง *E. coil* จะให้ผลการทดสอบเป็น + + - หรือ - + -

ในกรณีการตรวจวิเคราะห์อาหาร ถ้าพบฟีคัลโคลิฟอร์มเกินมาตรฐานแสดงว่าอาหารถูกปนเปื้อนจากอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น (Faecal contamination) แสดงว่าผู้เกี่ยวข้องกับอาหารมีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี โดยภายหลังเข้าห้องน้ำล้างมือไม่สะอาดแล้วมาจับต้องอาหาร หรือวัตถุดิบ ภาชนะเกิดการปนเปื้อนมาจากเชื้อกลุ่มนี้ จึงนิยมใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าอาหารปนเปื้อนด้วยอุจจาระหรือไม่

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *E. coli* ที่นิยมคือวิธี Most Probable Number (MPN) การตรวจหาด้วยวิธีนี้เป็นการคำนวณทางสถิติหาค่าความน่าจะเป็นที่มีโอกาสเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่ออ่านผลบวกจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ได้เป็นการนับจุลินทรีย์โดยตรงเหมือนกับวิธี Total viable count หรือการนับจุลินทรีย์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์จะมี 3 ขั้นตอนดังนี้

การทดสอบขั้นต้น (Presumptive test)

เริ่มด้วยนำตัวอย่างอาหารมาทำการเจือจางเป็น 3 ระดับ จากนั้นใส่ตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิเมตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth 10 มิลลิเมตร ความเจือจางละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ภายในเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเฟอร์เมนท์น้ำตาลแลกโตส เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถเฟอร์เมนท์น้ำตาลแลกโตสได้กรดและแก๊ส แต่ก็มีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่สามารถเฟอร์เมนท์ได้เช่นกัน ดังนั้นต้องทำการทดสอบขั้นต่อไป

การทดสอบขั้นยืนยัน (Confirm test)

ในขั้นตอนนี้เป็นการยืนยันว่าผลบวกในขั้นตอนแรกใช่เชื้อโคลิฟอร์มจริง และยังแยกแบคทีเรีย *E. coli* ออกจากกลุ่มโคลิฟอร์ม โดยนำเชื้อที่ให้ผลบวกในการทดสอบขั้นต้นมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ภายในเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม จะมีการสร้างแก๊สเกิดขึ้น ส่วนการตรวจหาเชื้อ *E. coli* โดยนำเชื้อที่ให้ผลบวกในการทดสอบขั้นต้นมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45± 0.2 °C ภายในเวลา 48 ชั่วโมง แล้วดูการสร้างแก๊สที่เกิดขึ้น จากนั้นนำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อไปอ่านค่าจากตาราง MPN รายงานผลเป็นปริมาณโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์มต่อกรัมอาหาร (MPN/กรัม) แต่สำหรับฟีคัลโคลิฟอร์มก่อนที่จะรายงานผลได้ต้องมีการทดสอบอีกขั้นเพื่อเป็นการยืนยันผล

การทดสอบขั้นสมบูรณ์ (Complete test)

นำหลอดที่ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar (EMB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าพบโคโลนีสีเข้มอาจมีหรือไม่มีเงาโลหะ (Metallic sheen) ให้นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเอาเชื้อไปย้อมแกรม เพื่อดูการติดสีแกรมรวมทั้งรูปร่าง และศึกษาการทดสอบทางชีวเคมีได้แก่ IMVIC test ถ้าผลการทดสอบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน และผลการทดสอบ IMVIC test เป็น + + - - หรือ - + - - ให้นำค่าจากตาราง MPN มารายงานได้

2.4.3 จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (Pathogenic bacteria)

โรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษของแบคทีเรีย (Food intoxication) เกิดจากแบคทีเรียเจริญเติบโตในอาหารมากพอและสร้างสารพิษขึ้นในอาหารทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Staph. aureus* และ *Cl. botulinum* เป็นต้น อีกกลุ่มเกิดจากการรับประทานอาหาร ที่มีเซลล์แบคทีเรียเข้าไป (Food infection) แล้วเซลล์แบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนในลำไส้ก่อให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Salmonella* spp.,

Staph. aureus, V. parahaemmolyticus, B. cereus, Cl. Botulinum และ *L. monocytogenes* เป็นต้น (Garbutt, 1997)

การตรวจหาจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผลิตภัณฑ์อาหารอาจจะทำการตรวจวิเคราะห์ได้ยากเสียเวลาหลายวัน เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อาจบาดเจ็บจากการที่ตัวอย่างอาหารต้องผ่านกระบวนการแปรรูปอาหาร เช่น การเยือกแข็ง การทำให้แห้ง การใช้ความร้อน เป็นต้น ดังนั้นเซลล์อาจจะเหลือรอดมาในปริมาณที่น้อย ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เป็นคู่แข่งอาจพบปริมาณมาก ดังนั้นจะต้องมีการฟื้นฟูหรือซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บเนื่องจากเซลล์ที่บาดเจ็บจะไม่มีการเพิ่มจำนวนจนกว่าจะถูกซ่อมแซม โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่บาดเจ็บในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกว่า Pre – enrichment จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective enrichment ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้คัดแยกแบคทีเรียที่ต้องการออกจากแบคทีเรียหลายๆ ชนิด โดยการเติมสารเคมีเพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียที่ต้องการตรวจเจริญได้ดี ขณะเดียวกันจะเติมสารเคมีเพื่อยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการให้เจริญ แล้วจึงนำไปแยกเชื้อต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective differential agar ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะแยกโคโลนีเชื้อที่ต้องการออกจากเชื้ออื่นๆ ดังนั้นโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective differential agar จะเป็นแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ แต่ยังไม่สามารถสรุปผลได้ ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการยืนยันผลโดยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) หรือทำการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา (Serological test) จึงสามารถสรุปผลได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ทำการตรวจวิเคราะห์ (Harrigan, 1998)