



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในกระบวนการผลิตขั้นต้นของผักสดส่งออก

The Contamination of *Salmonella* spp. on Exported Fresh Produce during Primary Production

نامผู้วิจัย นางสาววิภาวดี อินทาม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราภา มหากาญจนกุล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุดสาย ตรีวานิช, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์นิภา โชคสัจจะวาที, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุลย์ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในกระบวนการผลิตขั้นต้นของผักสดส่งออก

The Contamination of *Salmonella* spp. on Exported Fresh Produce during Primary Production

โดย

นางสาววิภาวดี อ้นท้วม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิภาวดี อันท้วม 2553: การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในกระบวนการผลิตชิ้นส่วนของผักสด
ส่งออก ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราภา มหากาญจนกุล, Ph.D. 111 หน้า

อุบัติการณ์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดเพื่อการส่งออกในปี 2005 ทำให้ประเทศผู้ซื้อสินค้าไม่เชื่อมั่นในความปลอดภัยสินค้าอาหารและเพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบยิ่งขึ้นจึงมีผลกระทบต่อทั้งโรงงานผักสดส่งออก องค์กรรัฐบาลผู้รับผิดชอบ ตลอดจนผู้เกี่ยวข้องโดยเฉพาะเกษตรกรผู้ปลูก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในโหระพาและผักชีเพื่อการส่งออก ตลอดจนสิ่งแวดล้อม จากแปลงผัก 2 แปลงในจังหวัดนครปฐม ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับเทคนิค MPN (MPN-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและให้ผลเชิงปริมาณ ทั้งนี้เพื่อระบุแหล่งการปนเปื้อน ให้สามารถเสนอวิธีการจัดการความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในกระบวนการส่งออกผักสด ทั้งยังเพื่อประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงของจุลินทรีย์โดยกลุ่มวิจัยอื่นต่อไป พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. สูงที่สุดพบในโหระพาล้างล้างในปริมาณ 210 MPN/g สามารถคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้ซีโรไทป์ Hvittingfoss (group I) และ Singapore (group C) และ Weltevreden (group E) จากโหระพาก่อนล้างและโหระพาพร้อมส่งออก ในขณะที่จำแนกซีโรไทป์ Bovismorbificans (group C) และ Aberdeen (group F) ได้จากถุงมือและโต๊ะตัดแต่งและคัดแยกซีโรไทป์ II 17: g,t: - (O: 17) ได้จากตะกร้าบรรจุโหระพา ในกรณีของผักชีพบปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักชีส่งออกเท่ากับ 44 MPN/g จำแนกได้ซีโรไทป์ Augustenborg (group C) ในผักชีก่อนล้างหลังซัดราก หน้าโรงงาน รวมทั้ง น้ำที่ใช้ในการล้างผัก ส่วนซีโรไทป์ Singapore (group C) คัดแยกได้จากผักชีพร้อมส่งออก ในขณะที่สายพันธุ์ Newport (group C), Albany (group C) และ IIIb 48: 1, V: 1, 5, 7 (O: 48) คัดแยกได้จากผักชีหลังล้าง น้ำที่ใช้ในแปลงเพาะปลูกและโต๊ะตัดแต่ง ตามลำดับ สรุปได้ว่าตรวจพบตัวอย่างปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค MPN-PCR คิดเป็นร้อยละ 65.60 จากตัวอย่างทั้งหมด 282 ตัวอย่าง ซึ่งการพัฒนาการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค MPN-PCR พบว่าให้ผลแม่นยำและรวดเร็วใช้เวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีคิดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (Modified standard method) ซึ่งใช้เวลา 4-6 วัน จากการศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อผสมระหว่าง *Salmonella* spp. กับ *E. coli* ที่อุณหภูมิ 25 และ 40 °C ในปุ๋ยมูลสัตว์ พบว่า *Salmonella* spp. อยู่รอดได้ในปุ๋ยมูลค่างควาได้นานที่สุด 21 วัน (ที่ 25 °C) ส่วนปุ๋ยมูลไก่ ตรวจไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ของการเก็บรักษา (ที่ 40 °C) ขณะที่ *E. coli* ในปุ๋ยมูลค่างควา (ที่ 25°C) มีชีวิตรอดนานที่สุดถึง 12 วัน และตรวจไม่พบ *E. coli* ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ในปุ๋ยทั้ง 3 ชนิด คือ ปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยมูลไก่ (ที่ 40 °C) นอกจากชนิดของปุ๋ยปัจจัยของการเก็บรักษาโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิมีผลอย่างยิ่งต่อการอยู่รอดของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในปุ๋ยมูลสัตว์เหล่านี้

Wipawadee Ontoum 2010: The Contamination of *Salmonella* spp. on Exported Fresh Produce during Primary Production. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Assistant Professor Warapa Mahakarnchanakul, Ph.D. 111 pages.

In 2005, the incidence of *Salmonella* spp. contaminated in fresh produce export caused an unreliable tame and put more stringency in export inspection by oversea buyers. Therefore, the incidence caused negative impact on Thai fresh produce market and all the stakeholders in their business chain. The PCR technique combination with MPN method (MPN-PCR) was conducted to investigate the amount of *Salmonella* spp. in sweet basil and coriander during primary production and farm environment. All samples were taken from 2 farms in Nakhonpathom province then microbial contamination was analysed by modified standard method and MPN-PCR. This MPN-PCR gives the rapid qualitative results and provides the useful information to manage risk in fresh produce exporting. Moreover the number of *Salmonella* spp. contamination in fresh produce production will be useful for further research such as microbial risk assessment. The isolates from typical colony on selective media were also identified. The highest number of *Salmonella* spp. found on sweet basil was 210 MPN/g and serotype Hvitittingfoss (group I) was found in sample before washing. Singapore (group C) and also Weltevreden (group E) serotype were found in exported sweet basil, as well as Aberdeen (group F) and Bovismorbificans (group C) in glove and table. And group J II 17: g,t: - (O: 17) was found from container. The highest count of *Salmonella* spp. was 44 MPN/g on coriander for exporting. Augustenborg (group C) were found in samples before washing, after soil remove, after transporting to factory and in washing water. In addition Singapore (group C) was isolated from exported coriander. Serotype Newport (group C), Albany (group C) and IIIb 48: 1, V: 1, 5, 7 (O: 48) were found in coriander samples after washing, irrigating water and table, respectively. MPN-PCR method gave a rapid result (≤ 48 h.) and better recovery compare to modified standard method (4-6 days), a total of 282 samples was found positive as 65.60%. The investigation of cell survival in four type of manure using as fertilizers at 25°C and 40°C was investigated. The results showed that *Salmonella* spp. survived in bat manure within 21 days at 25°C. While cell in chicken manure was not detected since day 1 at 40°C. The ability of *E. coli* survival in bat manure (25°C) was found at day 12 where as, *E. coli* were not detected in swine, cow and chicken manure (40°C) at day 1. Besides the manure type, the storage condition particularly the temperature affected on the survival of both pathogens in these fertilizers.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วราภา มหากาญจนกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผศ. ดร. สุธาสัย ศรีวานิช และ ดร.นิภา โชคสังกะวาที่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูง ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำทั้งในส่วนของการเรียนและงานวิจัย และขอกราบขอบพระคุณ ดร. จิตศิริ ราชตะนันทน์ ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ รศ. ดร.นภาพร เชื้อชาญ จากภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ผู้แทนภายนอกในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้ายเป็นอย่างสูง ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและอำนวยความสะดวกในเรื่องของการใช้สถานที่ อุปกรณ์เครื่องใช้สำหรับระหว่างปฏิบัติงานทดลอง รวมถึง บริษัท วิ.เอส.เพรสโก จำกัด และ บริษัท ชัชวาลย์ อิมพอร์ต-เอ็กซ์พอร์ต แอนด์ แพ็คกิ้ง ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลและสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่อบรม สั่งสอนมาจนถึงบัดนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร เจ้าหน้าที่ห้องสมุดคณะอุตสาหกรรมเกษตร เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่หอสมุดกลาง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาต่างๆ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตปริญญาเอก โท และตรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร โดยเฉพาะสมาชิกห้อง Food Safety ทุกคน รวมถึงพี่ๆ ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่ให้ความช่วยเหลือแนะนำ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

และท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่ให้การอบรมสั่งสอนเสมอมา ขอบคุณสมาชิกในครอบครัว ที่มอบแรงกายแรงใจให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดระยะเวลาการศึกษา และการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงถึงวันนี้

วิภาวดี อ้นท้วม

ตุลาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	36
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	79
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	85
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมสารในปฏิกิริยา PCR	87
ภาคผนวก ง ภาพการเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง	89
ภาคผนวก จ ตาราง Most Probable Number	92
ภาคผนวก ฉ ตารางแสดงข้อมูล	96
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	111

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ข้อมูลการแจ้งเตือนการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ในผักสดส่งออก	4
2	อุบัติการณ์การเกิดโรครจากผักผลไม้สดและผลิตภัณฑ์สดเป็นพาหะ	7
3	ค่าพีเอช ปริมาณความชื้นและธาตุอาหารในปุ๋ยคอก	21
4	แหล่งการปนเปื้อนจากตัวอย่าง ผักสด สิ่งแวดล้อมบริเวณแปลงเพาะปลูกและจุดตัดแต่ง	27
5	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ <i>Salmonella</i> spp. ที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อมในแปลงเพาะปลูกระหว่างการผลิตขึ้นต้นเพื่อการส่งออก	48
6	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ <i>Salmonella</i> spp. ที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อมขั้นตอนตัดแต่งระหว่างการผลิตขึ้นต้นเพื่อการส่งออก	49
7	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ <i>Salmonella</i> spp. ที่ตรวจพบในผักสดระหว่างการผลิตขึ้นต้นเพื่อการส่งออก	50
8	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตขึ้นต้นของโหระพาเพื่อการส่งออก	56
9	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตขึ้นต้นของผักชีเพื่อการส่งออก	57
10	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ที่คัดแยกได้จากผักสดเพื่อการส่งออก	57
11	ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ <i>S. Hvittingfoss</i> ในปุ๋ยมูลสัตว์ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน	65
12	ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ <i>S. Augustenborg</i> ในปุ๋ยมูลสัตว์ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค1 ปริมาณและความเข้มข้นของส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR	88
จ1 ตาราง Most Probable Number	93
ฉ1 ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดิน ปุ๋ย และน้ำจากแปลงเพาะปลูกโหระพา	97
ฉ2 ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างโหระพาในกระบวนการผลิตขั้นต้น	98
ฉ3 ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างอุปกรณ์ขั้นตอนการตัดแต่งโหระพา	99
ฉ4 ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำล้างและการขนส่งโหระพา	100
ฉ5 ปริมาณจุลินทรีย์จาก ดิน ปุ๋ยและน้ำจากแปลงปลูกผักชี	101
ฉ6 ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างผักชีในกระบวนการผลิตขั้นต้น	102
ฉ7 ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างอุปกรณ์ขั้นตอนการตัดแต่งและจัดรากผักชี	103
ฉ8 ปริมาณจุลินทรีย์ในกระบวนการล้างและขนส่งผักชี	104
ฉ9 ปริมาณจุลินทรีย์ในโหระพาและผักชีส่งออก	105
ฉ10 จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เจริญและรอดชีวิตในปุ๋ยมูลค่างควา และปุ๋ยมูลสุกรที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน	106
ฉ11 จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เจริญและรอดชีวิตในปุ๋ยมูลวัว และปุ๋ยมูลไก่ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน	107
ฉ12 ค่าพีเอชในปุ๋ยมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C	108
ฉ13 ปริมาณความชื้นในปุ๋ยมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C	109
ฉ14 อุณหภูมิในปุ๋ยมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C	110

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR reaction)
2	เส้นทางการแพร่เชื้อและปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สู่อาหาร
3	การตรวจผล PCR ด้วย Gel Electrophoresis
4	แผนภูมิแสดงกระบวนการการผลิตขั้นต้นของโหระพาเพื่อการส่งออก
5	แผนภูมิแสดงกระบวนการการผลิตขั้นต้นของผักชีเพื่อการส่งออก
6	ปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ด้วยเทคนิค MPN-PCR เปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (ISO 6579) ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณเพาะปลูกจากกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก
7	ปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ด้วยเทคนิค MPN-PCR เปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (ISO 6579) ในตัวอย่างผักสดจากกระบวนการผลิตขั้นต้นของผักสดเพื่อการส่งออก
8	ปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ด้วยเทคนิค MPN-PCR เปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (ISO 6579) ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมขั้นตอนตัดแต่งจากกระบวนการผลิตขั้นต้นของผักสดเพื่อการส่งออก
9	ปริมาณการรอดชีวิตและการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ในปุ๋ยมูลค่างควา ปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัว ปุ๋ยมูลไก่ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C
10	ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ <i>S. Hvittingfoss</i> และ <i>S. Augustenborg</i> ในปุ๋ยมูลค่างควา ปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยไก่ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง1 การเก็บตัวอย่าง ดิน ปุ๋ย น้ำในแปลงเพาะปลูก	90
ง2 การเก็บตัวอย่าง น้ำล้างผัก ผักคลุมผักและผักสดจากภาชนะ	90
ง3 การเก็บตัวอย่างจากถุงมือ/มือ กรรไกรตัดแต่ง ภาชนะบรรจุผักสด	91

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	= base pair (s)
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
CFU	= colony forming unit
DNA	= deoxyribonucleic acid
DW	= distilled water
g	= gram
km	= kilometer
m	= meter
mm	= millimeter
ml	= milliliter
ppm	= part per million
μg	= microgram (s)
μl	= microliter (s)
rpm	= revolution per minute
MPN	= most probable number
°C	= degree celsius
x g	= relative centrifugal force (acceleration gravity)

การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในกระบวนการผลิตขั้นต้นของผักสดส่งออก

The Contamination of *Salmonella* spp. on Exported Fresh Produce during Primary Production

คำนำ

ในปัจจุบันความต้องการของผู้บริโภคในการบริโภคผักสดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการส่งออกผักสดประเภทผักสวนครัว ได้แก่ ผักชี สะระแหน่ ใบแมงลัก กระเพรา และอื่นๆ ซึ่งมีจุดประสงค์หลักเพื่อจำหน่ายแก่ร้านอาหารไทย และเพื่อจำหน่ายเป็นเครื่องปรุงสำหรับผู้ที่ชื่นชอบอาหารตะวันออกในการประกอบอาหารในครัวเรือน การส่งออกผักเหล่านี้ในปริมาณมากจำเป็นต้องมีคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งมาตรการการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารเคมีและจุลินทรีย์ก่อโรคในผักสดเพื่อการส่งออกและการนำเข้า ในปัจจุบัน ประเทศนำเข้าสินค้าเกษตรหลายประเทศในกลุ่มประเทศยุโรป ต่างมีข้อกำหนดด้านจุลินทรีย์ที่เข้มงวดมากขึ้นและมีการตรวจสอบอย่างเข้มแข็ง ทำให้หลายครั้งพบว่าผักสดนำเข้าจากประเทศไทยเหล่านี้ไม่ผ่านคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และสารเคมี ทำให้ถูกกักกันหรือถูกทำลาย ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผู้ส่งออกและมีผลกระทบถึงการค้าขายสินค้าเกษตรรวมทั้งเกษตรกรผู้ผลิตในประเทศ

ผักสวนครัวเหล่านี้ถูกผลิตจากเกษตรกรรายย่อย ต่อมาจึงถูกรวบรวมโดยผู้ขายและผู้ส่งออก ทำให้ผักสดซึ่งมาจากหลายแหล่ง มีการปฏิบัติและการผลิตผักที่ถูกสุขลักษณะแตกต่างกัน ส่งผลให้คุณภาพและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากน้อยต่างกัน นอกจากนี้การรวบรวมผักจากหลายแหล่งทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างผู้ผลิตด้วยกันเองในแหล่งรวบรวม การสืบค้นปัญหาคุณภาพทำได้ยาก เนื่องจากยังไม่มีระบบสืบย้อนกลับที่สมบูรณ์ นอกเหนือไปจากนั้น ลักษณะทางกายภาพของผักสดบางชนิดส่งเสริมให้มีการทำความสะอาดที่ล้างน้อยครั้ง เนื่องจากผักสดเหล่านี้เสื่อมเสียง่าย ผักบางชนิดจึงมักไม่ล้างน้ำ หรือ บางชนิดนิยมส่งออกทั้งราก หรือ ส่งออกในรูปแบบแ่ง เหง้า การคัดเลือกตลอดจนการคัดแต่งอาจจะลดการปนเปื้อนได้บ้างแต่อาจหลงเหลือดินปนเปื้อน ด้วยเหตุนี้ จึงมีปัญหาคูณภาพด้านจุลินทรีย์ในการส่งออก

ด้วยเหตุนี้ ผักสดส่งออกจากประเทศไทยจึงมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. แม้ว่าจะเกิดขึ้นเป็นบางครั้งบางคราวแต่ทำให้เกิดการติกลับของสินค้าผักสด และสร้างความไม่เชื่อมั่นของสินค้าเกษตร ซึ่งมีผลกระทบต่อโรงงานส่งออก พ่อค้าคนกลางตลอดจนเกษตรกร แหล่งของการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในผักสดเหล่านี้มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ จากดิน ปุ๋ยมูลสัตว์ น้ำที่ใช้ในแปลงเพาะปลูก ผู้สัมผัสผัก (เกษตรกรและคนงานผู้ตัดแต่ง) ตลอดจนภาชนะบรรจุที่ไม่สะอาดที่สำคัญคือ การผลิตที่ไม่ถูกต้องตามสุขลักษณะที่ดี ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุที่เชื้อก่อโรคมิโอบาสปนเปื้อนและทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยอาหารแก่ผู้บริโภคทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหากผักสดถูกปนเปื้อนตั้งแต่กระบวนการผลิตขั้นต้น คือตั้งแต่การปลูก การเก็บเกี่ยว ตลอดจนการปนเปื้อนในโรงคัดแยกผักก่อนเข้าสู่โรงงาน การกำจัดแบคทีเรียเหล่านี้กำจัดได้ยาก การล้างไม่สามารถลดการปนเปื้อนในผักได้หมด (Beuchat, 1996) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การสำรวจ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญที่ระบุไม่ให้มีในผักสดเพื่อการส่งออก เพื่อระบุแหล่งของเชื้อ ผลจากการวิจัยครั้งนี้นอกเหนือจากได้เสนอแนะวิธีการที่สามารถป้องกันและควบคุมการปนเปื้อน เนื่องจากวิธีการตรวจ *Salmonella* spp. เป็นการตรวจนับปริมาณ (Quantitative method) แทนการตรวจแบบคุณภาพ (Qualitative method) ด้วยเหตุนี้ข้อมูลและปริมาณการปนเปื้อนจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงซึ่งจักเป็นข้อมูลสนับสนุนในการกำหนดมาตรฐานและเป็นโมเดลการจัดการความเสี่ยงของอันตรายในผักในการวิจัยอื่นๆ ต่อไป

อนึ่ง มีรายงานว่า การปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ในผักสดส่งออกของไทย ในปี 2005 มีแหล่งมาจากปุ๋ยมูลสัตว์ (กรมวิชาการเกษตร, 2537) ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* spp. ร่วมกับ *E. coli* ในปุ๋ยอินทรีย์ โดยเฉพาะปุ๋ยมูลสัตว์ผสมซึ่งกำลังเป็นที่นิยมใช้ในกระบวนการผลิตผักอินทรีย์ในปัจจุบัน เพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนของเชื้อในระหว่างกระบวนการปลูก คาดว่าผลการศึกษาจะเป็นข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์แก่เกษตรกรผู้ปลูกและเสนอแนะการควบคุมการเก็บรักษาปุ๋ยมูลสัตว์ในการเพาะปลูกพืชต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบการปนเปื้อนปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี MPN-PCR และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจากกระบวนการผลิตผักสด สังกะยมในแปลงเพาะปลูก ระหว่างการตัดแต่ง ขั้วต้น และในผลิตภัณฑ์ผักสดเพื่อส่งออก กำหนดโรคราและผักชีเป็นตัวแทนผักสดส่งออก
2. จำแนก serotype ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากระหว่างกระบวนการผลิต ขั้วต้นของผักสดทั้งสองชนิดเพื่อการส่งออก
3. ศึกษาปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อผสม *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ในปุ๋ยอินทรีย์ประเภทปุ๋ยมูลสัตว์

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ในผักสดส่งออก

ปริมาณและมูลค่าการส่งออกของผักสดของประเทศจากสถิติการส่งออกผักสดไปยังสหภาพยุโรป ในปี พ.ศ. 2549 รวมทั้งสิ้น 15,334,868 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็นมูลค่าสูงถึง 457,241,750 บาท เฉพาะผักสดสวนครัวได้แก่ โหระพาและผักชี มียอดการส่งออกจากสหภาพยุโรปคิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 6,335,173 และ 9,443,814 บาทต่อปี (กรมวิชาการเกษตร, 2549) ผักสดทั้งสองชนิดนี้เป็นที่นิยมนำมาปรุงอาหาร เป็นส่วนประกอบของอาหารตะวันตกโดยเฉพาะอาหารไทย แต่การบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อนหรือผ่านความร้อนไม่มากพอที่จะทำให้ลายเชื้อโรคที่ปนเปื้อนอาจก่อให้เกิดปัญหาโรคจากอาหารเป็นพาหะ ได้มีรายงานแจ้งเตือนการปนเปื้อนของ เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผักสดส่งออกจากประเทศไทยระบุว่าผักสดสวนครัวเหล่านี้ปนเปื้อนจาก *Salmonella* spp. (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ข้อมูลการแจ้งเตือนการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดส่งออก

วันที่	ประเทศที่พบ	สายพันธุ์ที่พบ	ชนิดผักสด
26 พ.ค. 2548	นอร์เวย์	<i>Salmonella</i> Aberdeen	สะระแหน่
26 พ.ค. 2548	นอร์เวย์	<i>Salmonella</i> Augustenborg	ผักชี
27 พ.ค. 2548	นอร์เวย์	<i>Salmonella</i> Zanzibar	สะระแหน่
11 ม.ค. 2550	ฟินแลนด์	<i>Salmonella</i> Hvitvingfoss	ผักบุ้ง
7 เม.ย. 2552	ฟินแลนด์	<i>Salmonella</i> Weltevreden	ข่า

ที่มา: RASFF (2009)

Johnston *et al.* (2005) ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผักและผลไม้สดจากข้อมูลของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคพบว่าในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาการเกิดโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในผักและผลไม้สดเป็นพาหะ มีจำนวนอุบัติการณ์การเกิดโรคเพิ่มขึ้นทุกปี จากการศึกษาเส้นทางการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้สดที่มาจากกระบวนการเพาะปลูก ตลอดจนการจัดการใน

ระหว่างการเก็บเกี่ยว พบว่า ผักและผลไม้สดที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคล้วนเป็นผลิตผลที่ได้มาจากทางตอนใต้ของประเทศสหรัฐอเมริกา จากจำนวนของตัวอย่างผักและผลไม้ทั้งหมด 398 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักใบเขียว สมุนไพรและแคนตาลูป เมื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนโคลิฟอร์มทั้งหมด จำนวน *Enterococcus* ทั้งหมดและ *E. coli* ตลอดจนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ได้แก่ *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 พบว่า ผักใบเขียวและสมุนไพรมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.5 - 6.2 log CFU/g จำนวน Coliforms และ *Enterococcus* ตรวจพบน้อยกว่า 1 - 4.3 log CFU/g และ *E. coli* ตรวจพบน้อยกว่า 1-1.5 log CFU/g ผักบางชนิดเช่น ผักชี (Cilantro) และผักชีลาว (Dill) มีปริมาณ Coliform เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการบรรจุ ผลไม้บางชนิดเช่น แคนตาลูปมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บมาจากสวนและตัวอย่างระหว่างบรรจุ โดยปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 6.4-7.0 log CFU/g จำนวน Coliforms อยู่ในช่วง 2.1- 4.3 log CFU/g ปริมาณ *Enterococcus* ตรวจพบในช่วง 3.5- 5.2 log CFU/g และ *E. coli* พบเชื้อมากกว่า 1- 2.5 log CFU/g แสดงให้เห็นว่าผักและผลไม้มีโอกาสปนเปื้อนจุลินทรีย์โดยธรรมชาติ และหากการผลิตขั้นต้น ได้แก่ การตัดแต่ง การบรรจุ ไม่ถูกสุขอนามัยที่ดี ทำให้จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในระหว่างการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว การปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคเหล่านี้อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงในการบริโภคได้

2. ลักษณะและสมบัติของ *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ขนาด 0.7-1.5 μm ยาว 2.0-5.0 μm เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ริ้วขั้วเซลล์ไฟฟ้าให้เป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถใช้ citrate decarboxylate lysine และ ornithine นอกจากนี้ยังสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ (Ziprin, 1994) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) แบคทีเรียชนิดนี้บางชนิดโรไทป์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น สายพันธุ์ Pullorum และ Gallinarum (Banwart, 1981) ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 8-45 °C อุณหภูมิที่เจริญได้ดีที่สุด คือ 37 °C (Roberts *et al.*, 1996) ค่าออสโมติกแอคติวิตี (a_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 0.93 - 0.99 และสามารถเจริญได้ที่ค่า a_w เพียง 0.49 (Guthrie, 1991) ภายใต้อุณหภูมิและอาหารที่เหมาะสมสามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด - เบสหรือค่าพีเอช 4.5 - 9.0 แต่ในช่วงค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วงประมาณ 6.5 - 7.5 ซึ่งค่าพีเอชนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

Salmonella spp. ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ 60 °C เป็นเวลา 15 - 20 นาที หรือที่อุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 4 นาที (อรุณและคณะ, 2540; Doyle and Mazzotta, 2000) *S. Senftenberg* เป็นซีโรไทป์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่า *Salmonella* ซีโรไทป์อื่น 10 - 20 เท่า กล่าวคือ ทนความร้อนถึง 62 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลาย *Salmonella* spp. เพียงแต่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์เท่านั้น ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C หรืออุณหภูมิสูงกว่า 44 - 47 °C ยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* บางซีโรไทป์ได้ในภาวะของอุณหภูมิแช่เยือกแข็งแบบที่เรียกว่าไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้และพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือนำอาหารแช่เยือกแข็งนั้นมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการผลิตที่มีการใช้ความร้อนร่วมกับอุณหภูมิต่ำ เช่น กระบวนการผลิตที่มีขั้นตอนการลวกอาหารร่วมกับการแช่เยือกแข็งจะช่วยลดการปนเปื้อนของอาหารจาก *Salmonella* spp. ได้ดี

ตารางที่ 2 แสดงอุบัติการณ์การเกิดโรคจากผักผลไม้สดเป็นพาหะทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วย และบางรายเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต พบว่า เชื้อก่อโรคหลายชนิดปนเปื้อนในผักสดมีสาเหตุจากปุ๋ยมูลสัตว์ที่ใช้ในการเพาะปลูกเป็นแหล่งก่อโรค

ตารางที่ 2 อุบัติการณ์การเกิดโรคจากผักผลไม้สดและผลิตภัณฑ์สดเป็นพาหะ

ปี	ประเทศ	ชนิดของปฏิก	ชนิดจุลินทรีย์	พาหะ	ป่วย (เสียชีวิต)	อ้างอิง
1979-1981	แคนาดา	มูลแกะ	<i>Listeria monocytogenes</i>	กะหล่ำปลี	ป่วย 34 ราย (เสียชีวิต 7 ราย)	Schlech <i>et al.</i> , 1983
1985	อังกฤษ	มูลวัว	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	มันฝรั่ง	ป่วย 49 ราย (เสียชีวิต 1 ราย)	Morgan <i>et al.</i> , 1988
1992	เยอรมนี	มูลวัว กระบือ	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ผักสด	ป่วย 4 ราย (เสียชีวิต 1 ราย)	Cieslak <i>et al.</i> , 1993
1993	เยอรมนี	มูลวัว กระบือ	<i>Cryptosporidium</i> spp.	น้ำแอปเปิ้ลสด	ป่วย 160 ราย	Millard <i>et al.</i> , 1994
1996	สหรัฐอเมริกา	มูลสัตว์ปีก	<i>Salmonella</i> Hartford	น้ำ	ป่วย 30 ราย/รับการรักษาที่ โรงพยาบาล 1 ราย	Centers for Disease Control and Prevention, 1998

ที่มา: ดัดแปลงจาก Guan and Holley (2003)

3. การเกิดโรคจาก *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เกือบทุกซีโรไทป์เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารในมนุษย์ (Beuchat, 1996) แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ทั่วไปในสัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งมนุษย์ แบคทีเรียชนิดก่อให้เกิดโรคได้ง่ายในผู้ที่มีความต้านทานต่ำหรือได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเป็นจำนวนมาก การบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนจะทำให้เกิดโรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) อาการของโรคเกิดจากสารพิษชนิด endotoxin ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharide - polypeptide lipid A ที่ปรากฏอยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Varnam and Evans, 1991) สารพิษจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบบริเวณลำไส้เล็ก ดังนั้น เมื่อบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียนี้เข้าไปในปริมาณที่สูงพอ จะเกิดอาการของโรคซัลโมเนลโลซิสภายใน 6 - 36 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะอาการของโรคซัลโมเนลโลซิสที่มีสาเหตุมาจาก *Salmonella* spp. จำแนกออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

3.1. ไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) แสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด สาเหตุจาก *S. Typhi* ในบรรดาผู้ป่วยซัลโมเนลโลซิสทั้งหมดในประเทศสหรัฐอเมริกา พบผู้ป่วยไทฟอยด์ไม่มากนักก็น้อยกว่าร้อยละ 2.5 แหล่งของ *S. Typhi* จะอยู่ในคนเท่านั้น ดังนั้นการติดต่อของ *S. Typhi* เกิดจากการปนเปื้อนของอุจจาระจากผู้ป่วยสู่แหล่งน้ำและอาหาร อาการของไข้ไทฟอยด์ค่อนข้างรุนแรง พบการติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) มีไข้สูง ปวดหัว ท้องเสีย อาเจียน และท้องร่วง อาจพบจุดสีแดงบนหน้าอกและคอ มีเลือดออกจากลำไส้และจมูก ผู้ป่วยจะแสดงอาการตั้งแต่ 1-8 สัปดาห์ (Tauxe 1991; Robinson *et al.*, 2000)

การติดเชื้อเริ่มจากแบคทีเรียเข้ามาในระบบย่อยอาหารและผ่านมาถึงลำไส้เล็ก จากนั้นแบคทีเรียจะบุกรุก epithelial cell ของ villi ในลำไส้เล็กตอนล่าง ผ่านไปยัง lamina propria แล้วเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองของผู้ป่วย เซลล์ macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันจะโอบล้อมแบคทีเรียเพื่อทำลายแบคทีเรียซึ่งถือว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมในระบบน้ำเหลือง เป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันการติดเชื้อในร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม *S. Typhi* สามารถทนต่อการทำลายของเซลล์ macrophage ได้ จึงรอดชีวิตและสามารถเจริญอยู่ภายในเซลล์ macrophage นั้น หลังจากนั้นแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวนและกระจายออกมาสู่กระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ม้าม กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น จึงเป็นผลให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตและอวัยวะต่างๆ ต่อไป

3.2. ไข้เอนเทอริก (Enteric fever) ส่วนใหญ่เกิดจาก *Salmonella* spp. 3 ชนิด ได้แก่ *S. Paratyphi* type A, B และ C พบผู้ป่วยน้อยกว่าร้อยละ 0.5 ของผู้ป่วยซัลโมเนลโลซิสทั้งหมด กลุ่มอาการของไข้เอนเทอริกคล้ายคลึงกับไข้ไทฟอยด์ แต่รุนแรงน้อยกว่า มีการติดเชื้อในกระแสเลือด มีไข้ ปวดหัว และปวดท้องน้อย ผู้ป่วยมีอาการ 1-3 สัปดาห์ (Robinson *et al.*, 2000)

3.3. ภาวะเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis syndrome) เป็นกลุ่มโรคที่พบบ่อยที่สุดในประเทศสหรัฐอเมริกา สาเหตุเกิดจาก *Salmonella* หลายชนิด อาการที่พบบ่อย ได้แก่ ท้องร่วง ปวดท้องน้อย ตัวเย็น มีไข้ อาเจียน ขาดน้ำ และปวดหัว ในผู้ป่วยเด็กและคนชราพบอัตราการตายสูง อยู่ระหว่างร้อยละ 0.1-0.2 ระยะฟักตัวอยู่ในช่วง 5 - 72 ชั่วโมง แสดงอาการป่วยระหว่าง 1-4 วัน (Cliver and Doyle, 1990)

การเกิดอาการภาวะเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. เข้าไปยังระบบย่อยอาหารเป็นจำนวนมากพอที่จะเข้าสู่ lamina propria เชื้อมีการเจริญบริเวณนั้นซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการอักเสบ (Inflammatory response) บริเวณลำไส้เล็ก แต่ไม่มีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายจึงไม่พบการติดเชื้อในกระแสเลือดและบริเวณอวัยวะต่างๆ

4. การตรวจและจำแนก *Salmonella* spp.

การจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. โดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยาหลักการคือ ขึ้นกับสมบัติของโปรตีนที่มีความจำเพาะตามลักษณะทางพันธุกรรมและใช้วิธีที่ประยุกต์เพื่อทดสอบสปีชีของเชื้อแบคทีเรีย ในขั้นแรกจะทำการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่ผิวเซลล์ เรียกว่า somatic antigens (O-antigens) ก่อน โดยจำแนกซีโรวาร์ออกเป็นกลุ่มๆ ตามตัวอักษรอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ เช่น A, B และ C เรื่อยไป ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Salmonella* spp. ที่มี O-antigens 6 และ 7 ได้รับการจัดไว้ในกลุ่ม C₁ ต่อไปขั้นที่สองเป็นการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่แฟลกเจลลาของแบคทีเรีย เรียกว่า flagellar antigens (H-antigens) ซึ่งจำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ เฟส 1 หรือเฟสจำเพาะ (Specific phase) และเฟส 2 หรือเฟสกลุ่ม (Group phase) เฟส 1 ประกอบด้วย *Salmonella* spp. ไม่ก่สปีชีส์ เชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จัดอยู่ในเฟส 2 ซึ่งเชื้อ *Salmonella* spp. หนึ่งๆ อาจมี H-antigens ตกอยู่ในเฟสใดเฟสหนึ่งเพียงเฟสเดียว หรือตกอยู่ทั้งสองเฟสก็ได้ปกติ เฟส 1 ใช้สัญลักษณ์เป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็ก ส่วนเฟส 2 ใช้ตัวเลขอารบิก ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์แอนติเจนของ *S. Choleraesuis* ปรากฏผลเป็น 6, 7, c, 1, 5 เลข 6, 7 เป็น

ตัวแทนของ O-antigens gr. C₁ ตัวอักษร c แทน H-antigens เฟส 1 และเลข 1, 5 แทน H-antigens เฟส 2

สำหรับชื่อซีโรวาร์ของ *Salmonella* spp. เป็นข้อตกลงระหว่างประเทศ ซีโรวาร์ที่ไปถึง สปีชีส์ถูกตั้งชื่อตามสถานที่ที่แยกเชื้อนั้นได้เป็นครั้งแรก เช่น *S. London*, *S. Miami*, *S. Richmond*, *S. Muenchen*, *S. Bangkok* และ *S. Rachaburi* เป็นต้น (สุมณฑา, 2545)

5. ลักษณะและสมบัติของ *E. coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียในแฟมิลี enterobacteriaceae และอยู่ในกลุ่ม fecal coliform อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลื้อยคลาน จึงพบในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้เป็นดัชนีบ่งบอกว่าอาหารนั้นอาจมีการปนเปื้อนจากอุจจาระ (Index of fecal contamination) เป็นการแสดงให้เห็นว่าโรงงานนั้นมีการสุขาภิบาลที่ไม่ดีหรือไม่ถูกต้อง รูปร่างและคุณสมบัติทั่วไปคือ เซลล์รูปท่อนสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ พบอยู่ในลำไส้ของคน และสัตว์เลื้อยคลาน ในอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนอุจจาระ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม fecal coliform มีคุณสมบัติพิเศษและแตกต่างจากโคลิฟอร์มแบคทีเรียจากแหล่งอื่น คือ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 44.5 - 45.5°C (สุมณฑา, 2545)

การจำแนก *E. coli* แบ่งตามความรุนแรงของการเกิดโรค สมบัติในการเจริญ และลักษณะทางพันธุกรรมทำให้แบ่ง *E. coli* ได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) และ enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC) (ICMSF, 1996) *E. coli* สายพันธุ์ EPEC, EIEC และ ETEC พบแพร่กระจายอยู่ในน้ำและอาหารส่วน *E. coli* เกือบทุกชนิดปนเปื้อนมาจากอุจจาระ ในขณะที่ EHEC มักเกี่ยวข้องกับอาหารที่มีเนื้อวัวเป็นส่วนประกอบ โดยเฉพาะเนื้อบด แต่อาจมีข้อยกเว้นเพราะเกิดจากการปนเปื้อนข้ามได้ ซึ่งความรุนแรงของเชื้อ *E. coli* แต่ละกลุ่มสรุปได้ดังนี้

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

E. coli สายพันธุ์นี้แม้ว่าจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้นแต่มิได้เป็นผลมาจากเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) จากการศึกษพบว่า แบคทีเรียทำให้เกิดโรคโดยกลไกการเกาะติด

เฉพาะที่กับเซลล์ของเนื้อเยื่อเมือกของลำไส้แล้วขับโปรตีนออกมายับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาวโดยทั่วไป EPEC ทำให้ทารกที่มีอายุดำกว่าหนึ่งขวบท้องร่วง

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

เชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) การทำลายเซลล์ของโฮสต์โดยการเจาะเข้าไปทางเซลล์ชั้นนอกของโฮสต์ (Epithelial cells) แล้วกระจายไปยังเซลล์ใกล้เคียง ซึ่งคล้ายกับพฤติกรรมของเชอบีค (Cheasty and Rowe, 1983) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ชอบอยู่ในลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงทั้งแบบที่ถ่ายมีเลือดปนและไม่มีเลือดปน มักพบการระบาดในเด็กก่อนและคนชรา เวลาในการฟักตัวระหว่าง 2 – 48 ชั่วโมง (เฉลี่ย 18 ชั่วโมง) EIEC เป็น *E. coli* สายพันธุ์แรก ที่พบว่าทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยเกิดการระบาดในประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1947 ในครั้งนั้นเกิดขึ้นกับนักเรียนในโรงเรียนแห่งหนึ่งที่บริโกลาแลมมอน แม้ว่าจะพิสูจน์ได้ว่าการระบาดครั้งนั้นมาจากอาหารแต่ทำให้ทราบข้อมูลเพิ่มเติมว่า EIEC สามารถแพร่จากคนสู่คนได้

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

แบคทีเรียชนิดนี้สร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ซึ่งมีสมบัติต่างกัน 2 แบบ คือ ทนความร้อน (Heat-stable toxin - ST) จำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ ST_A หรือ ST-I และ ST_A หรือ ST-II ซึ่งคล้ายสารพิษของซิกเซลลา และสมบัติที่ไม่ทนความร้อน (Heat-labile toxin - LT) จำแนกออกเป็น 2 ชนิดเช่นกัน คือ LT_A และ LT_B มีสมบัติคล้ายสารพิษของเชื้ออหิวาต์

โรคจากอาหารเป็นพิษสาเหตุจาก ETEC เริ่มจากการได้รับเชื้อที่มีชีวิตประมาณ $10^6 - 10^{10}$ CFU/g เข้าสู่ร่างกาย แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนในลำไส้เล็ก เจริญพร้อมกับขับสารพิษออกมา ทำให้ผู้ป่วยมีอาการท้องร่วง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำคล้ายกับได้รับเชื้ออหิวาต์ แต่อาการรุนแรงน้อยกว่า อุจจาระมักไม่มีเลือดปน อาการท้องร่วงเป็นผลมาจากสารพิษชนิดที่ไวต่อความร้อนกระตุ้นให้ขับสาร adenylate cyclase จากผนังลำไส้ ซึ่งเป็นผลให้มีสาร cAMP (Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate) เพิ่มขึ้น ทำให้มีของเหลวหลั่งออกมามากในทางเดินอาหาร ส่วนสารพิษที่ทนความร้อนจะกระตุ้นให้มีการหลั่ง cGMP (Cyclic guanosine monophosphate) เพิ่มขึ้นในเยื่อเมือก ทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวและอิเล็กโทรไลต์ของร่างกาย

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

E. coli สายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่มีสมบัติคล้ายกับสารพิษของซิกเกตตา (Shiga like toxins) และเป็นสารพิษประเภท verotoxin หรือ verocytotoxin คือ สารพิษที่สามารถฆ่า vero cells ในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งเซลล์ชนิดนี้ได้จากไตของลิงเขียวแอฟริกันชนิดหนึ่ง จากการศึกษาสารพิษของ EHEC มี 2 แบบ คือ SLT-I หรือ VT-I และ SLT-II หรือ VT-II แต่ปัจจุบันนิยมใช้ Stx₁ และ Stx₂ ตามลำดับ (Calderwood *et al.*, 1996) ซึ่งสารพิษทั้งสองชนิดนี้ต่างกันที่องค์ประกอบทางเคมี ทำให้ปฏิกิริยาการตอบสนองทางพันธุกรรมต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น *E. coli* O157 : H7

6. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับเทคนิค most probable number (MPN)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่มีอาหารและน้ำเป็นพาหะที่สำคัญ หลายประเทศทั่วโลกพบการระบาดของเชื้อชนิดนี้เป็นจำนวนมากในอาหาร โดยเฉพาะอาหารสดที่มีแหล่งมาจากเนื้อสัตว์กลุ่มสัตว์ปีก ไข่ และเนื้อสัตว์ทั้งโคและสุกร การรับประทานดิบๆ สุกๆ ตลอดจนการขาดสุขลักษณะที่ดีในการเตรียมอาหารทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น การพัฒนาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ระยะเวลาไม่นานนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Standard method) จึงได้รับการยอมรับเพิ่มขึ้น โดยวิธีมาตรฐานการตรวจหาเชื้อจะใช้เวลานานถึง 4 – 6 วัน ในการคัดแยกเชื้อ แต่ในขณะที่การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะใช้เวลาน้อยลงและได้ผลที่แม่นยำ ด้วยเหตุนี้จึงมีแนวโน้มปัจจุบันและในอนาคตที่หลายหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนสนใจการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีนี้

PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาในหลอดทดลอง (In vitro) หรือเกิดขึ้นนอกเซลล์สิ่งมีชีวิต หลักการพื้นฐานของ PCR จะเลียนแบบกระบวนการ DNA replication ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยปริมาณของสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ด้วย PCR จะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าในทุกๆ รอบของปฏิกิริยา มีการประมาณการกันว่า การทำปฏิกิริยา PCR ที่มีประสิทธิภาพร้อยละ 100 จำนวน 20 รอบ จะได้ผลผลิต PCR เท่ากับ 10⁶ ต่อหนึ่งโมเลกุลเริ่มต้นของ DNA เป้าหมาย แต่การทำ PCR ในทางปฏิบัติจะให้ประสิทธิภาพช่วงร้อยละ 60 – 80 (สุคสายและสายพิน, 2546) แต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 1) ได้แก่

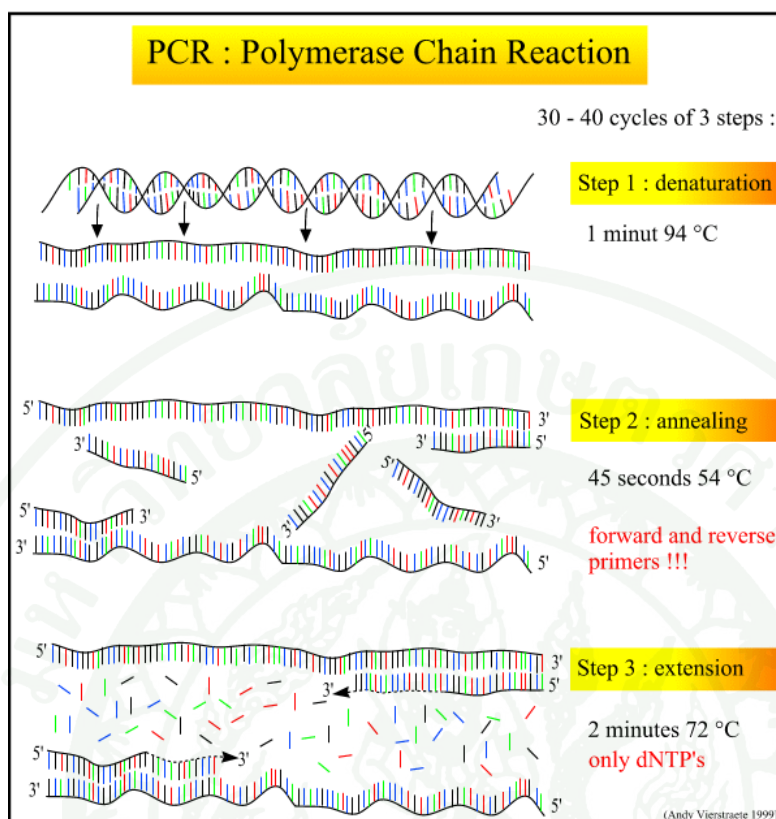
1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นโดยควบคุมอุณหภูมิที่สูงประมาณ 90 – 95 °C ความร้อนจะทำให้สายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (Double stranded) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยว 2 สาย (Two single strands) และอยู่เป็นอิสระ โดยแต่ละสายจะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication

2. Primer annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ (Primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่ได้ออกแบบให้จำเพาะในลักษณะเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่จะสังเคราะห์ (Annealing site) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 40 – 60 °C ปฏิบัติการต้องพิจารณาถึงชนิดของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

3. Primer extension หรือ Primer elongation เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ไปเข้าคู่แบบคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์ (5' → 3' extension) เอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปตามความยาวของสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์และเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ไปเรื่อยๆ จนได้ดีเอ็นเอสายคู่สมบูรณ์ ในการทำปฏิกิริยาของสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้ที่สำคัญขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ และความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน เป็นต้น

6.1. การตรวจวิเคราะห์ผล (PCR products)

การตรวจผลจากปฏิกิริยา PCR สามารถทำได้หลายวิธี เช่น membrane hybridization, color complement assay (CCA), microtitre plate detection assay และ gel electrophoresis วิธีหลังนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป โดยนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาแยกตามขนาดของ DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวแน่นอน (DNA marker) ตรวจสอบผลโดยการย้อมแถบแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่จะแทรกเข้าไปใน DNA ทำให้มองเห็นเป็นแถบ DNA ชัดเจนภายใต้แสง UV สามารถตรวจสอบแถบหรือแบนด์ที่มี DNA เพียง 1 – 10 ng (สุดสายและสายพิณ, 2546)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR reaction)

ที่มา: Vierstraete (1999)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

agarose เป็นสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมีโครงสร้างพื้นฐานแบบพอลิเมอร์เชิงเส้น agarose gel ทางการค้าจากแต่ละบริษัทมีความไม่บริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน การปนเปื้อนของ พอลิแซ็กคาไรด์ เกลือ และโปรตีน ซึ่งส่งผลถึงคุณภาพของ DNA ที่แยกออกมา ในปัจจุบันมีการพัฒนา agarose มีคุณภาพพิเศษ ซึ่งลดการมีสารยับยั้ง (Inhibitor) และเอนไซม์นิวคลีเอส นอกจากนี้ ยังดัดแปลง agarose gel ให้หลอมเหลวที่อุณหภูมิต่ำได้ (Low – gelling – temperature agarose) ทำให้สามารถใช้วิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 10 – 500 bp การเตรียม agarose gel ทำได้โดย หลอม agarose ในบัฟเฟอร์จนกระทั่งได้สารละลายใส โปร่งแสง หลังจากนั้นเทสารละลาย agarose ใส่ลงในแม่พิมพ์ปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นจึงสามารถนำไปใช้ในการทำ gel electrophoresis เพื่อดูผลผลิต DNA ที่เกิดขึ้น (สุดสาย และ สายพิน, 2546)

ในปี ค.ศ. 2003a Malorny *et al.* ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ 139, 141 จากยีน *invA* ซึ่งมีความจำเพาะดีกว่า *Ori C*, *Omp C* และ *ST11*, *ST15* พบว่า มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ทั้ง *Salmonella enterica* ทุก subspecies และ *Salmonella bongori* แต่ให้ผลลบกับสายพันธุ์ที่ไม่มี *invA* คือสายพันธุ์ Saintpaul เนื่องจาก *invA* gene มีความสำคัญต่อการรุกรานอีพิเทลิเยลเซลล์ (Invade epithelial cell) ดังนั้นสายพันธุ์ที่ไม่มียีนนี้อาจเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถรุกรานเซลล์เจ้าบ้านหรือใช้กลไกอื่น คณะวิจัยกลุ่มนี้ยังทดสอบการใช้ internal amplification control (IAC) โดยใช้ IAC 30 – 300 copies/reaction พบว่า ถ้าใช้ IAC ในปริมาณมาก อาจจะทำให้เกิดยับยั้งปฏิกิริยา แต่หากใช้น้อยเกินไป แถบของ IAC จะปรากฏไม่สม่ำเสมอ ต่อมาในปีเดียวกัน มีการพัฒนาการสกัด DNA โดยวิธี chelex ด้วยสารละลาย Chelex 100 ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการตรวจสอบแบบดั้งเดิม คือ ให้ประสิทธิภาพการตรวจสอบมากกว่าร้อยละ 97.5 ซึ่ง การเติม Chelex -100 ช่วยยับยั้งสารกลุ่ม PCR inhibit ได้ แต่ไม่ทุกกรณี อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีสาร PCR enhancer ช่วย (Malorny *et al.*, 2003b)

ปี ค.ศ. 2002 Liu *et al.* ได้ใช้เทคนิค Nested PCR ในการตรวจสอบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดแรก *invA* 1 กับ *invA* 2 และ ชุดที่สอง *invAnest* 1 กับ *invAnest* 2 ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 437 และ 199 bp โดยวิธีนี้เริ่มจากการนำตัวอย่างสัตว์ปีก บ่มใน tetrathionate brilliant green broth ที่อุณหภูมิ 41.5 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัด DNA โดยการต้มแล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำ PCR 2 ครั้ง ครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ชุดแรกโดยมีสภาวะดังนี้ DNA denaturation 93 °C 1 วินาที, primer annealing 42 °C 1 วินาที และ primer extension 72 °C 1 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำ PCR อีกครั้ง โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่สอง มีสภาวะดังนี้ DNA denaturation 94 °C 10 วินาที, primer annealing 55 °C 10 วินาที และ primer extension 72 °C เวลา 35 วินาที จำนวน 30 รอบ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า บน agarose gel ร้อยละ 1.5 ตรวจสอบผลการแยกด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่า การใช้ไพรเมอร์ชุดแรกสามารถตรวจสอบ *Salmonella* spp. ได้ตั้งแต่ 430 เซลล์ โดยมีขนาด DNA เท่ากับ 437 bp และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรกมาทำ PCR อีกครั้ง โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่สองสามารถตรวจสอบ *Salmonella* spp. ได้ตั้งแต่ 4 เซลล์ โดยมีขนาด DNA เท่ากับ 199 bp เพิ่มความไวของการตรวจสอบได้อย่างมาก

ในขณะที่ Oliveira *et al.* (2002) ได้ใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ และระบุชนิดของ *Salmonella* spp. จากสัตว์ปีกจำนวน 103 ตัวอย่าง และใช้เชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับในการทดลอง

156 strains แบ่งเป็น *Salmonella* 32 ซีโรไทป์ และ non – *Salmonella* 16 สปีชีส์ และใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด โดยชุดแรกเป็น *InvA* ชุดที่สองเป็น *FliC* และชุดที่สามเป็น *SefA* มีการ pre-enrichment ตัวอย่างใน trypticase soy broth ที่อุณหภูมิ 37 °C 18 ชั่วโมง แล้วทำ selective enrichment ใน rappaport vassiliadis (RV) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C 18 ชั่วโมง จากนั้นสกัด DNA template ที่ได้ไปทำ PCR ที่สภาวะ DNA denaturation 94 °C 1 นาที (รอบแรก 5 นาที), primer annealing 55 °C 1 นาที และ primer extension 72 °C 2 นาที (รอบสุดท้าย 7 นาที) เป็นจำนวน 35 รอบ นำผลผลิตจาก PCR ที่ได้มาแยกโดยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ร้อยละ 1.2 ตรวจสอบผลการแยกโดยการย้อมแถบ DNA ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่า *Salmonella* ทุก strains ให้ผลผลิต PCR ขนาด 284 bp เมื่อใช้ primer *InvA* ส่วน *S. Typhimurium* ให้ผลผลิต PCR ขนาด 620 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ *Fli 15* กับ *Typ 04* สำหรับ *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* และ *S. Pullorum* ให้ผลผลิตขนาดเดียวกันคือ 488 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ *A058* และ *A01* เมื่อทดสอบความไวของเทคนิค พบว่า การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *invA* สามารถตรวจสอบ *S. Enteritidis* , *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* และ *S. Typhimurium* ได้ตั้งแต่ 8×10^3 , 1.1×10^3 , 1.8×10^5 และ 2 เซลล์ ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *sefA* สามารถตรวจสอบ *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* ได้ตั้งแต่ 1.2×10^3 , 1.8×10^6 และ 4.4×10^7 เซลล์ ตามลำดับ สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *fliC* สามารถตรวจสอบ *S. Typhimurium* ได้ตั้งแต่ 7 เซลล์

สำหรับการตรวจนับเชื้อด้วยวิธี MPN เป็นการตรวจนับแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหรือชนิดแข็งก็ได้ แต่เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนในตัวอย่างอยู่น้อย เทคนิคนี้ในกรณีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจเชื้อด้วยอาหารแข็ง โดยเตรียมตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในหลอดทดลองที่ระดับความเข้มข้นละ 3 หรือ 5 หลอด ซึ่งจะเรียกว่าเทคนิค MPN แบบ 9 หลอด หรือ 15 หลอด ตามลำดับ การประเมินผลจำนวนแบคทีเรียอ่านได้จากตาราง MPN ซึ่ง MPN จากตารางคำนวณโดยใช้เทคนิคทางสถิติ ผลการนับแบคทีเรียจาก MPN โดยทั่วไปมักสูงกว่าการตรวจนับโดยเทคนิค standard plate count เทคนิค MPN นับได้ว่าได้รับความนิยมกันอย่างกว้างขวางทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเป็นเทคนิคที่ง่ายไม่ซับซ้อนและอาจตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเลือกชนิดเฉพาะ (Selective media) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่จำแนกความแตกต่าง (Differential media) (สุมนทนา, 2545) นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกวิธีใหม่ในการตรวจหาปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ร่วมกับการใช้เทคนิค PCR (MPN-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่แม่นยำและรวดเร็วสามารถทราบการปนเปื้อนในเชิงปริมาณ

Yen *et al.* (2009) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Bacillus cereus* ด้วยวิธี MPN-PCR ในธัญพืชพร้อมบริโภค เช่น อาหารสำหรับทารก ธัญพืชที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูป ธัญพืชชนิดแท่งและธัญพืชพร้อมดื่มถึงสำเร็จรูป เป็นต้น พบว่า ความชุกจากการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* คิดเป็นร้อยละ 78 ของตัวอย่างธัญพืชที่ผ่านกระบวนการแปรรูป ช่วงปริมาณการปนเปื้อนเท่ากับ 30 – 2,400 MPN/g ในขณะที่พบความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *B. cereus* ในธัญพืชพร้อมบริโภคคิดเป็นร้อยละ 95 และ 76 ตามลำดับ และพบว่าจากตัวอย่างทั้งที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* เพียงร้อยละ 3.6 ที่มีปริมาณการปนเปื้อนสูงกว่า 10,000 MPN/g และสาเหตุที่ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วมีการปนเปื้อนคาดว่ามาจากการปนเปื้อนข้ามในระหว่างการผลิต

จึงสรุปได้ว่าการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี MPN-PCR เป็นทางเลือกของห้องปฏิบัติการอีกวิธีหนึ่งเนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว และมีความแม่นยำเป็นผลดีกับการตรวจวิเคราะห์เชื้อปนเปื้อนชนิดอื่นๆ ในตัวอย่างที่มีจำนวนมากเนื่องจากสามารถลดความซับซ้อนของขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์และประหยัดเวลาโดยจะทราบผลภายในระยะเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสามารถรายงานผลในเชิงปริมาณเพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่น การเปรียบเทียบเกณฑ์มาตรฐานและการนำไปประเมินความเสี่ยงต่อไป

7. ความสำคัญของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดจากการใช้ปุ๋ยอินทรีย์

ผักสดเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ได้ง่าย การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงต้องมีการควบคุมที่ดี โดยเริ่มตั้งแต่แหล่งเพาะปลูก ขณะเพาะปลูก การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว การขนส่งจนกระทั่งถึงการจำหน่าย แบคทีเรียชนิดที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษและมักพบว่าปนเปื้อนมากับผักผลไม้พร้อมบริโภค ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* spp. (Singh *et al.*, 2002) ซึ่งมีการพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยมีแหล่งจากดิน น้ำและปุ๋ย (Brackett, 2000) ตลอดจนบริเวณพื้นที่ในการใช้เลี้ยงสัตว์ แหล่งเหล่านี้มักมีจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์

การใช้ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยมูลสัตว์ผสมในการบำรุงดินและพืชเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่อาหาร มีรายงานล่าสุดยืนยันการตรวจพบแบคทีเรียชนิดก่อโรค *S. Typhimurium* และ

E. coli O157:H7 ที่ใบและรากของผักที่ปลูกโดยใช้ปุ๋ยคอก (Natvig *et al.*, 2002) ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผักสดเน้นพืชผักสวนครัวเพื่อส่งออก เน้นชนิดจุลินทรีย์ก่อโรคคือ *Salmonella* spp. จากตัวอย่างทั้งผักและสิ่งแวดล้อมในแปลงเพาะและโรงคัดบรรจุ ณ สถานที่ที่เคยมีประวัติว่ามีการปนเปื้อนในผักสดส่งออก เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงและเพื่อพัฒนาการจัดการความเสี่ยงที่สามารถปฏิบัติได้ในการส่งออกผักต่อไป นอกจากนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาการอยู่รอดและการคงอยู่ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในปุ๋ยมูลสัตว์ที่ผลิตในประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการจัดการความเสี่ยงของจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้ปนเปื้อนในพืชและอาหาร

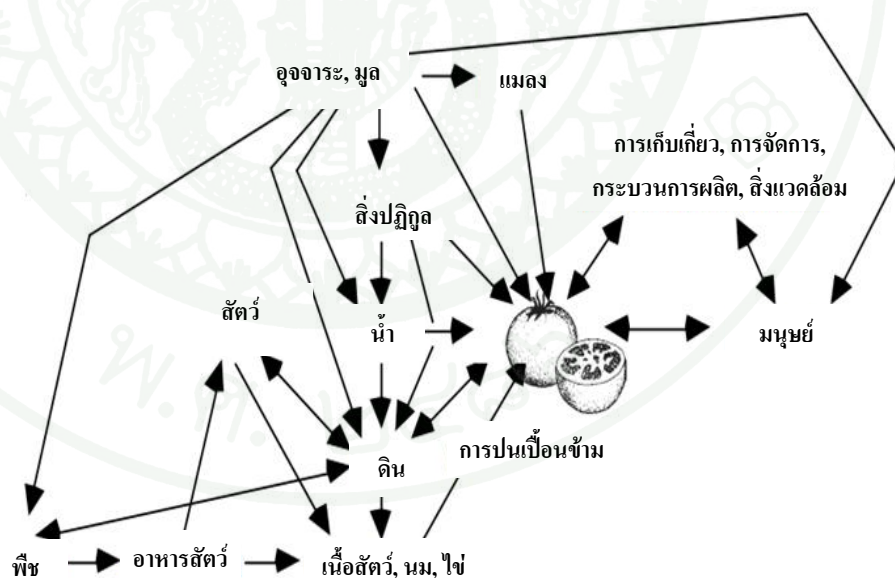
ปุ๋ยคอกเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งได้มาจากการเลี้ยงสัตว์และได้มีการนำมาใช้ทางการเกษตรอย่างแพร่หลายเป็นเวลานานปีมาแล้ว ปุ๋ยคอกไม่เพียงแต่จะให้อินทรีย์วัตถุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่ยังช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ดินมีการระบายน้ำและอากาศดีขึ้น ช่วยเพิ่มความคงทนให้แก่ผิวดินเป็นการลดการชะล้างพังทลายของดินและช่วยรักษาน้ำดินไว้ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งธาตุอาหารของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดิน ซึ่งมีผลทำให้กิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพและยังช่วยเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย ในอดีตการใช้ปุ๋ยคอกเป็นไปอย่างง่าย ๆ ตามธรรมชาติจากมูลของสัตว์ที่เกษตรกรผลิตได้ในฟาร์มเช่น วัว ควาย สุกร ม้า แพะ แกะ ฯลฯ (นิรนาม, 2551)

สำหรับคุณค่าทางอาหารพืชของปุ๋ยคอกที่ผลิตจากมูลสัตว์นั้นจะแตกต่างกันไปตามแหล่งวิธีการเลี้ยงและการเก็บรักษา ในแง่ของธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการคือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมมีปริมาณค่อนข้างน้อย ยกเว้น มูลสุกร มูลไก่ และมูลค้างคาวซึ่งมีธาตุอาหารหลักอยู่สูง แต่ข้อดีของมูลสัตว์คือ จะให้ธาตุอาหารรองได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน และธาตุอาหารเสริม เช่น เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง โบรอน โมลิบดีนัม และคลอรีน (ตารางที่ 3) นอกเหนือจากนั้นปุ๋ยมูลสัตว์ยังให้ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับพืชอีกมากมาย แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามูลสัตว์เหล่านี้ก่อให้เกิดโรคปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ โดยมีแหล่งจากปุ๋ยคอก มีผลทำให้เกิดการปนเปื้อนในผักและผลไม้ และก่อให้เกิดปัญหาโรคระบาด บางโรคร้ายแรงถึงแก่ชีวิต ตัวอย่างเช่น การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในปุ๋ยคอกและในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ รวมถึงแสดงอัตราการเจ็บป่วยและ

เสียชีวิตแสดงก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ก่อโรคในสภาวะการหมักและการเก็บรักษา ขึ้นกับ

- ชนิดของปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยมูลสัตว์
- ค่าความเป็นกรด-เบสหรือพีเอช
- อินทรีย์วัตถุที่มีอยู่ในปุ๋ยคอก เช่น เศษพืช ผัก ฟาง หญ้า
- อุณหภูมิ
- ชนิดและจำนวนของเชื้อก่อโรคที่มีในปุ๋ยคอก
- การแข่งขันการอยู่รอดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในปุ๋ยคอก

ส่วนปัจจัยประกอบอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์ของผักและผลไม้สดมีหลายปัจจัย ที่พบมากคือ ระบบการชลประทาน สุขลักษณะที่ไม่ดีของเกษตรกรรมอันเนื่องมาจากคน และการทำความสะอาดอุปกรณ์เพื่อใช้ในการเกษตรไม่ดีพอ (Beuchat, 1996) มีหลายเส้นทางที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถปนเปื้อนจากมูลสัตว์มาสู่ผักและผลไม้สดได้ สรุปได้และแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 เส้นทางแพร่เชื้อและปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สู่อาหาร
ที่มา: ดัดแปลงจาก Beuchat (1996)

ภาพที่ 2 แสดงเส้นทางในการที่เชื้อจุลินทรีย์มีโอกาสแพร่กระจายไปยังผักและผลไม้ ได้ ยกตัวอย่าง เช่น จุลินทรีย์ในมูลสัตว์มีการกระจายลงสู่สิ่งปฏิกูลรวมถึงน้ำโสโครก ต่อมากระจายลงสู่แหล่งน้ำที่ใช้ในการเกษตร ด้วยเหตุนี้ จึงมีโอกาที่เชื้อจุลินทรีย์จะปนเปื้อนสู่ผักและผลไม้ได้ หรือการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในมูลสัตว์สู่ผักและผลไม้โดยตรงเมื่อเกษตรกรนำมูลสัตว์มาใช้เพื่อทำปุ๋ยเพื่อเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Beuchat, 1996)

ในปี ค.ศ. 2003 Jiang *et al.* ศึกษาอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 5 strain ในปุ๋ยมูลวัวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Autoclaved) ที่ปริมาณความชื้นร้อยละ 38 โดยเปรียบเทียบการเก็บปุ๋ยมูลวัวที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 50, 55, 60, 65 และ 70 °C ตรวจสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy agar (TSA) ที่เติม ampicillin พบเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในปุ๋ยมูลวัวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีจำนวนลดลง 4 log CFU/g ที่ 8, 3 ชั่วโมงและ 15, 2 และน้อยกว่า 1 นาที่ ที่อุณหภูมิ 50, 55, 60, 65 และ 70 °C ตามลำดับ เวลาที่ใช้ในการลดจำนวนจุลินทรีย์ในปุ๋ยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อน้อยกว่าปุ๋ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ค่า D-value ของปุ๋ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 50, 55, 60, 65 และ 70°C มีค่า 137, 50.3, 4.1 1.8 และ 0.93 นาที่ ตามลำดับ ส่วนค่า D-values ของปุ๋ยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60°C มีค่า 135, 35.4 และ 3.9 นาที่ ตามลำดับ

ในขณะที่ Islam *et al.* (2004) ศึกษาการปนเปื้อนจากเชื้อ *S. Typhimurium* ในแครอทและแรดดิช โดยการสร้างการปนเปื้อนของเชื้อ *S. Typhimurium* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7 log CFU/g ลงใน ปุ๋ยมูลสัตว์ปีก ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยมูลวัวที่มีการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 และน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกมีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 log CFU/ml เพื่อศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อ *S. Typhimurium* ในดินที่มีการผสมกับปุ๋ยรวมถึงน้ำที่ใช้เพาะปลูกที่มีการปนเปื้อนดังกล่าว พบว่า *S. Typhimurium* รอดชีวิตได้ในดินเป็นเวลา 203-231 วัน และสามารถตรวจพบเชื้อในแปลงหลังจากหวานเมล็ดแครอทและแรดดิชได้นาน 203 และ 84 วันตามลำดับ เชื้อมีชีวิตรอดได้นานที่สุดในดินที่ผสมด้วยปุ๋ยมูลสัตว์ปีกและเจริญได้น้อยที่สุดในดินที่ผสมกับปุ๋ยมูลวัวที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 7.5 ในขณะที่ผัก เชื้อมีชีวิตรอดได้นานถึง 2-3 เดือน

ตารางที่ 3 ค่าพีเอช ปริมาณความชื้นและธาตุอาหารในมูลสัตว์และอินทรีย์วัตถุที่จะนำมาทำปุ๋ยคอก

ชนิด มูลสัตว์	ความเป็น กรด-เบส*	ความชื้น (%)*	ร้อยละของธาตุอาหารหลัก**			ร้อยละของธาตุอาหารรอง**			ร้อยละของธาตุอาหารเสริม (ppm)			
			N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn	Cu
มูลวัว (ใหม่)	10.4	47	1.95	1.76	0.43	1.82	0.56	0.07	4,630	670	190	32
มูลวัว (เก่า)	8.7	-	1.73	0.49	0.30	0.55	0.22	0.05	4,630	840	87	29
มูลกระบือ (เก่า)	8.7	10	1.82	1.92	0.12	2.06	0.74	0.51	14,550	722	300	52
มูลสุกร (เก่า)	6.9	30	2.83	16.25	0.11	8.11	2.42	0.14	8,500	970	2,600	1,650
มูลไก่ (เก่า)	8.2	9	2.09	6.07	0.42	11.30	0.86	0.68	1,850	670	1,040	32
กากน้ำตาล	6.1	-	4.02	7.75	0.06	6.23	0.63	0.00	850	120	220	140
มูลค่างคว	7.5	9	3.32	13.95	0.29	18.01	0.48	0.28	22,100	3,800	9,900	4,200

ที่มา: คัดแปลงจาก (ชนวน และคณะ, 2532) *, (กรมวิชาการเกษตร, 2537) **

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การตรวจสอบโดยวิธี PCR ใช้ DNA ของเชื้อ *Salmonella* Rissen เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวก (Positive control)

1.2 การทดลองเรื่องการยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* spp. ใช้เชื้อบริสุทธิ์ *S. Hvitittingfoss* (Group I) และ *S. Augustenborg* (Group C) ถัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตขั้นต้นของโหระพาและผักชี ตามลำดับ ส่วน *E. coli* ได้รับอนุเคราะห์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (Merck Laboratories, Darmstad, Germany)
- 2.2 Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
- 2.3 Petrifilm™ Aerobic Count Plate (3M Microbiology Products, USA)
- 2.4 Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (3M Microbiology Products, USA)
- 2.5 Peptone from meat (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
- 2.6 Di – Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Analytical Univar Reagent, Australia)
- 2.7 Mono – Potassium phosphate (Analytical Univar Reagent, Australia)
- 2.8 Sodium chloride (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
- 2.9 Rappaport-Vassiliadis (RV) Broth (Difco Laboratories, U.S.A.)
- 2.10 Hektoen Enteric (HE) agar (Difco Laboratories, U.S.A.)
- 2.11 Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
- 2.12 Lysine Iron Medium (LIM) (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

2.13 MacConkey agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

3. สารเคมี

- 3.1 Chelex-100 (BIORAD[®], USA)
- 3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) (Invitrogen, Brasil)
- 3.3 Deoxynucleoside triphosphates (dNTP) (Sib Enzyme Co., Ltd.)
- 3.4 เอนไซม์ DNA polymerase (Platinum[®] Taq Polymerase, Invitrogen, Brasil)
- 3.5 DNA Marker (Bio Excellence, Thailand)
- 3.6 IAC (Internal Amplification Control) (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)
- 3.7 ไพร์เมอร์ (Primer): *pinvA* – 139, *pinvA* – 141 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)
- 3.8 Agarose (Bio Excellence, Thailand)
- 3.9 10x PCR Reaction Buffer (Invitrogen, Brasil)
- 3.10 5x TBE buffer (Bio Excellence, Thailand)

4. อุปกรณ์

- 4.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Tomy model MX – 301, USA)
- 4.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Biofuge primo model D-37520 osterode, Germany)
- 4.3 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat box) (Eppendorf[®] model T 3317-1EA, USA)
- 4.4 Electropholysis Chamber (Hoefer model EV 265, USA)
- 4.5 เครื่องพีซีอาร์ (BIORAD model S1000, USA)
- 4.6 เครื่อง UV transilluminator (Geneflow model Gel Doc 2000, UK)
- 4.7 ไมโครปิเปตขนาด 5, 20, 100 และ 1,000 µl (Eppendorf[®] model series 2100, USA)
- 4.8 ไมโครเวฟ (Sharp model R-241, Thailand)
- 4.9 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Memmert model 600 D 06062, Germany)
- 4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy model ES-315, Japan)
- 4.11 เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Sartorius model BA-160, Germany)

- 4.12 เครื่องชั่งทศนิยมชนิดละเอียด (Ohaus model AP 2105, USA)
- 4.13 ตู้ Laminar flow cabinet (Microflow model Advanced biosafety cabinet, UK)
- 4.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบสหรือค่าพีเอช (Jenco model 6071, Taiwan)
- 4.15 เครื่องตีปั่น (Seward Stomacher model BA 7021, Lab Blender, England)
- 4.16 เครื่องผสมสารละลายในหลอด (Vortex mixer model Genie II, USA)
- 4.17 เครื่องวัดอุณหภูมิ (Testo model Mini thermometer, USA)

5. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น

6. ตัวอย่างตัวอย่างผักสดทั้ง 2 ชนิด

โหระพาและผักชีพร้อมส่งออกได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเอกชนผลิตผักสดเพื่อการส่งออก

วิธีการ

1. ตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และปริมาณ *Salmonella* spp. ของผักสด สิ่งแวดล้อมในแปลงเพาะปลูก และบริเวณตัดแต่ง

1.1 การสุ่มตัวอย่าง

ผักสด 2 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวแทนผักสดสวนครัวที่นิยมใช้ในภัตตาคารอาหารไทยในต่างประเทศ และมีรายงานว่าโหระพาและผักชีมีการปนเปื้อน *Salmonella* spp. และ *E. coli* ในปี พ.ศ. 2548 ทำการเก็บตัวอย่าง ดิน น้ำและปุ๋ยจากสิ่งแวดล้อมจากแปลงเพาะปลูกและสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์ ณ ขั้นตอนตัดแต่งที่ส่งผักสดก่อนส่งเข้าโรงงาน รวมทั้งผักสดที่บริษัทส่งออกพร้อมที่จะส่งต่างประเทศ

เมล็ดและสิ่งแวดล้อมบริเวณแปลงเพาะปลูก ได้แก่ สุ่มตัวอย่างเมล็ดโหระพาและผักชีจำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง ดินจากแปลงผักสดทั้ง 2 ชนิด จำนวน 30 จุด แปลงละ 15 จุด ซึ่งดินในแต่ละจุดกำหนดมีระยะห่างกันประมาณ 10 m โดยจุดที่สุ่มควรมีระยะห่างจากขอบแปลงประมาณ 30 cm ในกรณีของปุ๋ยมูลให้สุ่มตัวอย่างจากกองปุ๋ย จากจุดที่มีความลึกลงมาจากผิวหน้าประมาณ 15 cm จากทั้ง 2 แปลงจำนวน 30 จุด และตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างน้ำในแปลงเพาะปลูกแต่ละจุดควรห่างออกจากกันประมาณ 10 m ทั้ง 2 แปลงจำนวน 30 ตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ ง1)

ผักสด ในกรณีของโหระพาทำการเก็บตัวอย่างระหว่างการตัดแต่งเบื้องต้น ได้แก่ ผักก่อนล้าง ผักหลังล้างน้ำและผักก่อนส่งเข้าโรงงานคือ บริเวณหน้าโรงงาน จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างทำนองเดียวกันกับ ผักชี เพียงแต่จำนวนตัวอย่างผักชีเพิ่มขึ้นมา 1 ขั้นตอนคือ ตัวอย่างผักชีหลังมีการขั้ดรากทำความสะอาดจำนวน 5 ตัวอย่าง ผักสดทั้ง 2 ชนิดถูกเก็บจากเชิงบรรจุผักโดยที่แต่ละจุดของการสุ่มจะห่างกันประมาณ 15 cm (ภาพผนวกที่ ง2)

สิ่งแวดล้อมบริเวณขั้นตอนตัดแต่ง ได้แก่ ตัวอย่างถุงมือและมือจากเกษตรกรที่ทำงานขณะตัดแต่งเบื้องต้นของโหระพาและผักชี ชนิดละ 10 ตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ ง3) กรณีถุงมือให้ตัดบริเวณฝ่ามือให้ได้ขนาด $2 \times 5 \text{ cm}^2$ และส่วนการ swab มือเกษตรกรให้นำไม้ swab ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลาย เปปโตนเข้มข้น ร้อยละ 0.1 แล้วนำไปป้ายบริเวณฝ่ามือและหัวแม่มือรวมทั้งนิ้วที่สัมผัส

กับผักให้ได้พื้นที่ $2 \times 5 \text{ cm}^2$ จากนั้นนำไม้ swab จุ่มลงในสารละลายเปปโตเนอซิมเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 ml บรรจุในหลอดที่เตรียมไว้แล้ว ในกรณีการไกรตัดแต่งเฉพาะในแปลงโหระพา จำนวน 10 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างโดย swab บริเวณส่วนที่กรไกรสัมผัสกับผักสดโดยมีพื้นที่ประมาณ $2 \times 5 \text{ cm}^2$ ต่อตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 3)

การเก็บตัวอย่างไต่ตัดแต่ง จากทั้งแปลงโหระพาและผักชีจำนวนแปลงละ 10 ตัวอย่าง โดยวิธีการ swab โดยใช้ไม้ swab ที่ปลอดเชื้อป้ายบริเวณไต่ที่ปฏิบัติงานในพื้นที่ $5 \times 10 \text{ cm}^2$ ต่อตัวอย่างส่วนตัวอย่างง่ามผักสดให้ swab 3 จุด คือ ก้น กลาง และปากง่าม ในง่ามที่พบในการตัดแต่ง ขึ้นต้นของแปลงโหระพาและแปลงผักชี จำนวน 5 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 3) สำหรับผักลุ่มผักจากการส่งโหระพาและผักชีเข้าโรงงาน ให้ตัดส่วนของผักลุ่มที่สัมผัสกับผักสดในระหว่างการขนส่งไปยังโรงงาน ด้วยขนาดพื้นที่ประมาณ $2 \times 5 \text{ cm}^2$ จำนวนชนิดผักละ 5 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 2)

สุดท้ายคือสุ่มตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการล้างผักโดยจะทำการสุ่มตัวอย่างทั้งก่อน หลัง และในระหว่างการล้างโหระพาและผักชี เป็นจำนวน 3 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 2) ตัวอย่างจะถูกเก็บและนำเข้าห้องปฏิบัติการแล้วทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์ภายใน 4 ชั่วโมงดังนี้

- ตัวอย่าง ดิน น้ำ ปุ๋ย เก็บตัวอย่าง ดินและปุ๋ยในถุงปลอดเชื้อ และตัวอย่างน้ำเก็บในขวดแก้วปลอดเชื้อ โดยตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ควบคุมที่อุณหภูมิ 10°C บรรจุในกล่องโฟม ซึ่งมีการเคลือบความเย็นบรรจุอยู่

- ตัวอย่างผักสดบรรจุในถุงพลาสติกถูกเก็บไว้ในกล่องควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิประมาณ 10°C

- ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (จากการ Swab) หลอดบรรจุเปปโตเนอซิมที่อุณหภูมิประมาณ 10°C ในกล่องควบคุมอุณหภูมิ

1.2 ตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

ชั่งตัวอย่าง เมล็ด ดิน ปุ๋ยและผักสดที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 มา 25 g ใส่ในถุงตีปั่นตลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 ml ลงไป ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เมล็ด ดิน ปุ๋ยและผักสดใช้วิธีการตีปั่น เป็นเวลา 60 วินาที ส่วนตัวอย่างถุงมือ ผ้าคลุม ตรวจนับปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิค rinse test ปิเปตสารละลายเปปโตนที่ทำการ rinse หรือตีปั่น 1 ml ในกรณีตัวอย่าง swab test ปิเปตตัวอย่างจากหลอดที่เก็บตัวอย่างโดยตรงหรือตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมีสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 ml เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายดังกล่าว 1 ml เติมลงบนแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ใช้แบบพิมพ์กดบริเวณผิวหน้าอาหารเพื่อให้สารละลายกระจายทั่ว นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 0.2 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีบนแผ่น Petrifilm™ ที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 CFU แต่ละตัวอย่าง ทำการตรวจสอบ 2 ซ้ำ

จำนวนตัวอย่างและปริมาณตัวอย่างที่สุ่ม ได้สรุปและเสนอในตารางที่ 4 ดังนี้

ตารางที่ 4 แหล่งการปนเปื้อนจากตัวอย่าง ผักสด สิ่งแวดล้อมบริเวณแปลงเพาะปลูกและจุดตัดแต่ง

แหล่งการปนเปื้อน	ปริมาณ/ตัวอย่าง g, ml, cm ²	โหลระพา (ตัวอย่าง)	ผักชี (ตัวอย่าง)
ผักก่อนล้าง	400 – 600	10	10
ผักหลังล้าง	400 - 600	10	10
ผักหน้าโรงงาน (ก่อนเข้า)	400 - 600	10	10
ผักหลังขั้ดราก	400 - 600	-	5
ผักส่งออก	400 - 600	15	15
เมล็ด	50 - 100	3	3
ดิน	250	15	15
ปุ๋ย	250	15	15
น้ำในแปลงเพาะปลูก	250	15	15
ถุงมือ/มือ	2×5 (swab)	10	10
โต๊ะตัดแต่ง	5×10 (swab)	10	10

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งการปนเปื้อน	ปริมาณ/ตัวอย่าง g, ml, cm ²	โหระพา (ตัวอย่าง)	ผักชี (ตัวอย่าง)
ภาชนะใส่ผักหลังล้าง	2×5 (swab)	5	10
ผ้าคลุม	2×5	5	8
กรรไกรตัดแต่ง	2×5 (swab)	10	-
น้ำล้างผัก	250	3	10
รวมจำนวนทั้งหมด		136	146

1.3 ตรวจสอบปริมาณของเชื้อราและยีสต์

ซั่งตัวอย่างทำการ rinse test หรือตีปนจากตัวอย่างผักสดและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมตามความเหมาะสมดังได้กล่าวมาแล้วในข้อ 1.2 เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายเปปโตโนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 ml โดยปกติเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าวมา 1 ml ใส่ลงบนแผ่น Petrifilm™ Yeast and mold count plate ใช้แบบพิมพ์กดบริเวณผิวหน้าอาหารเพื่อให้สารละลายกระจายทั่วแล้วนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C เป็นเวลา 3 - 5 วัน ตรวจสอบจำนวนโคโลนีบนแผ่น Petrifilm™ ที่เพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 15-150 CFU แต่ละตัวอย่าง ทำการตรวจสอบ 2 ซ้ำ

1.4 การคัดแยกเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อตรวจหา serotype (ดัดแปลงจากวิธีการมาตรฐานอ้างอิงจาก International Standardization Organization, ISO 6579; 2002)

เตรียมตัวอย่างในทำนองเดียวกันกับข้อ 1.2 หากเป็นตัวอย่างแข็งนำไปซั่ง 25 g ส่วนตัวอย่างเหลวเช่น น้ำ ใช้ปริมาตร 25 ml ใส่ลงใน buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 225 ml นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตตัวอย่างอาหารปริมาตร 0.1 ml ใส่ลงใน rappaport-vassiliadis (RV) Broth แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 ± 0.2 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่อยู่ใน RV broth มา streak ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ xylose lysine desoxycholate (XLD) agar และ hektoen enteric (HE) agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24

ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีสีชมพูเข้มถึงสีดำขนาด 0.5 mm ที่ปรากฏบนอาหาร HE และโคโลนีสีแดงถึงสีดำขนาด 0.5 mm ที่ปรากฏบนอาหาร XLD

เชื้อโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* spp. มา streak และ stab ลงบนอาหาร triple sugar iron agar slant (TSI) และ lysine iron medium (LIM) นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าให้ผลบวกใน TSI ที่ก้น slant จะเป็นสีดำ ช่วงกลาง slant เป็นสีเหลืองและที่ผิวหน้า slant จะมีสีแดง ส่วนใน LIM จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือเป็นสีม่วง จากนั้นเชื้อเชื้อเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar ชนิดเดียว เชื้อละ 1 หลอด ส่งตรวจทางซีโรวิทยาเพื่อหาซีโรไทป์ ที่บริษัท S.A.P. Laboratories จำกัด

1.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี MPN-PCR

1.5.1 การสกัด DNA (Malorny *et al.*, 2003b)

ปีเปิดตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเชื้อด้วย buffer peptone water (BPW) ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข้อที่ 1.4) ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอด micro centrifuge นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติมสารละลาย chelex-100 เข้มข้นร้อยละ 6 ปริมาตร 300 µl เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 15 – 20 นาที เขย่าให้เข้ากัน นำตัวอย่างนั้นมาต้มในหม้อต้มน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำออกมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 13,000 rpm นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1 : 50

1.5.2 การปฏิบัติการ PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Malorny *et al.*, 2003a)

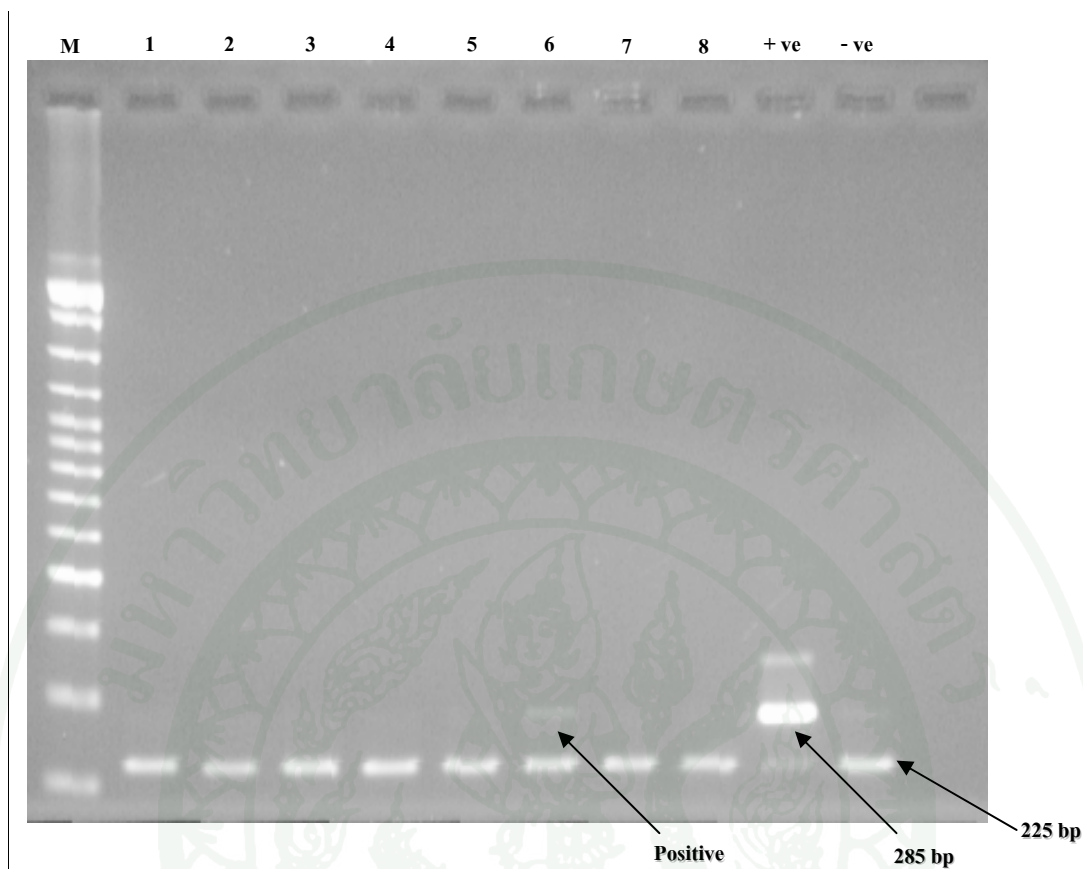
ปีเปิดสารต่างๆ ใส่ลงในหลอด micro centrifuge ในปริมาณที่กำหนดต่อ 1 ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ PCR ดังนี้ Nanopure Water (MQ) ปริมาตร 10.35 µl, 10 x Buffer (MgCl₂ Free) ปริมาตร 2.5 µl, Magnesiumchloride (MgCl₂ 50 mM) ปริมาตร 0.75 µl, dNTPs (2.5 mM) ปริมาตร 2 µl, DNA primer *pinvA* – 139 (5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3') 20 µM ปริมาตร 0.25 µl, DNA primer *pinvA* – 141(5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3') 20 µM ปริมาตร 0.25 µl, IAC (300 coppies/µl) 0.25 µl และปีเปิด Taq DNA Polymerase (Platinum

Taq 5 U/ μ l) ปริมาตร 0.15 μ l เป็นลำดับสุดท้าย ในระหว่างการเตรียมสารละลายเหล่านี้จำเป็นต้องเตรียมในที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาในระหว่างการเตรียมสาร โดยเตรียมสารทั้งหมดในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง ปิเปตสารประกอบของปฏิกิริยาปริมาตร 20 μ l ใส่ลงใน strip tube จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่สกัดด้วย chelex-100 และเจือจางตัวอย่างแล้วปริมาตร 5 μ l ไว้ที่ขอบของ strip tube เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา ปั่นเหวี่ยง strip tube อีกครั้งก่อนนำตัวอย่างลงเครื่อง PCR เพื่อตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในการตรวจเชื้อจำเป็นต้องมีตัวอย่างควบคุมโดยใช้ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ดังเสนอไว้แล้วในหัวข้ออุปกรณ์ (ข้อ 1.1) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็น positive control และ negative control ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

สภาวะในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา PCR จะประกอบไปด้วยช่วงอุณหภูมิต่างๆ คือ ช่วงแรกอุณหภูมิจะเพิ่มจนถึง 95 °C และจะยังคงอุณหภูมินี้เป็นเวลา 1 นาที และเข้าสู่ช่วงอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเป็นช่วงลดอุณหภูมิโดยอุณหภูมิลดลงเป็น 64 °C เป็นเวลา 30 วินาที และกลับเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยช่วงอุณหภูมิและเวลาดังกล่าวจะย้อนกลับมาเช่นนี้เป็นจำนวน 35 รอบ หลังจากนั้นอุณหภูมิจะถูกคงที่ 72 °C เป็นเวลา 4 นาที

1.5.3 การตรวจผล PCR ด้วย Gel Electrophoresis

เตรียม agarose gel เข้มข้นร้อยละ 2 ด้วย 0.5xTBE buffer มีความหนาประมาณ 0.5 cm ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเวลา 1 ชั่วโมง วางเจลลงใน electrophoresis chamber ทำการย้อมสีทั้ง marker และตัวอย่างที่ผ่านปฏิกิริยา PCR แล้วหยด marker และตัวอย่างลงหลุมโดยหยดหลุมละ 1 ตัวอย่าง ปริมาตร 5 μ l ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์สำหรับเจลที่มีความยาว 10 cm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจล มาย้อมด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 μ g/ml เวลา 15 – 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ตรวจผลโดยส่องดูแถบ DNA ด้วย UV transilluminator โดยขนาดของโมเลกุลของเชื้อ *Salmonella* spp. เท่ากับ 285 bp (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การตรวจผล PCR ด้วย gel electrophoresis โดย เลนที่ 1 – 5 และ 7-8 คือตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการล้างผักสดที่ให้ผลลบ เลนที่ 6 ตัวอย่างน้ำล้างผักสดที่ให้ผลบวก เลน + ve คือตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก (285 bp) เลน – ve คือ ตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลลบ (225 bp)

1.5.4 การตรวจนับเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี MPN (Bacteriological Analytical Manual; FDA, 2006)

หลังจากที่ตีปั่นตัวอย่างด้วย peptone water ให้ได้ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เช่น 0.1, 0.01 และ 0.001 ml จากนั้น ปิเปตแต่ละระดับความเข้มข้น ใส่ลงใน buffer peptone water (BPW) ปริมาตร 10 ml ที่ระดับความเข้มข้นละ 3 หลอด เพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเทคนิค MPN แบบ 9 หลอด แต่ละหลอดนำไปตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี PCR บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละระดับความเข้มข้น แล้วประเมินจำนวนแบคทีเรียโดยการอ่านค่าได้จาก ตาราง MPN (ตารางผนวกที่ จ1) รายงานผลในหน่วย MPN/g, ml หรือ cm²

ตัวอย่างเช่น ผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ให้ผลบวกที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ได้เท่ากับ 1 – 1 – 0 นำผลบวกที่ได้ไปอ่านค่าจากตาราง MPN ได้เท่ากับ 7.4 MPN เป็นต้น

2. ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ในปุ๋ยอินทรีย์

2.1 การเตรียมปุ๋ย

ปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยมูลสัตว์ที่ผสมเสร็จแล้วซื้อจากร้านจำหน่ายปุ๋ยในเขตจังหวัดนครปฐม ปุ๋ยมูลสัตว์ผสมแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ ปุ๋ยมูลค่างควา ปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยมูลไก่ ขำเชื้อปุ๋ยทั้ง 4 ชนิดด้วย autoclave sterilizer ที่ อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที โดยบรรจุในถุงพลาสติกชนิด poly propylene มัดปากถุงแน่นป้องกันไม่ให้ไอน้ำเข้าไปในถุง เพื่อรักษาสภาพความชื้นเดิมของปุ๋ย หลังจากขำเชื้อเสร็จทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนสร้างการปนเปื้อนในข้อ 2.5

2.2 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ *Salmonella* spp. และ *E. coli*

แบคทีเรียผสมแบ่งออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 แบคทีเรียผสมระหว่างเชื้อ *E. coli* กับ *S. Hvitittingfoss* และ ชุดที่ 2 เชื้อ *E. coli* ผสมกับ *S. Augustenborg* เตรียมเชื้อบริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อที่เก็บด้วย NA slant ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการถ่ายเชื้อ 1 หลอด ลงใน TSB 10 ml เพาะเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันที่สองจึงทำการถ่ายเชื้อ 1 หลอด จาก TSB หลอดแรกลงใน TSB 10 ml หลอดใหม่ เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันกับ TSB หลอดแรก และวันที่สามจึงถ่ายเชื้อ 1 ml ลงใน TSB 10 ml ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเซลล์ดังวิธีการในข้อ 2.3 จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่มีอายุได้ 18 ชั่วโมง มาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการคือ 10^8 CFU/ml เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ในกล้าเชื้อ

ตรวจนับปริมาณเซลล์เริ่มต้นด้วยวิธี surface plate โดยการปิเปตเชื้อเริ่มต้น 1 ml ใส่หลอดทดลองซึ่งมีสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 ml เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตสารละลายเจือจางของเชื้อปริมาตร 0.1 ml ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD สำหรับวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. และ MacConkey agar สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ XLD และ MacConkey agar ที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 15 - 150 CFU ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. บน XLD คือ โคโลนีสีแดงถึงสีดำ ส่วนลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MacConkey agar คือ โคโลนีกลม สีชมพูแดง คำนวณหาปริมาณเชื้อทั้งหมดในสารละลาย 1 ml ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

2.4 การเตรียมเชื้อผสมระหว่าง *Salmonella* spp. และ *E. coli* เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

หลังจากที่มีการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ปริมาณเซลล์ตั้งต้นประมาณ 10^8 CFU/ml นำสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ใน TSB ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำความสะอาดเซลล์ (Arrus *et al.*, 2006) โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบที่ $2,800 \times g$ เวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $2,800 \times g$ เวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสออกล้างเซลล์และ ทำเช่นนี้อีกครั้งจนครบ 3 ครั้ง แล้วจึงนำเชื้อที่ผ่านการล้างเซลล์แล้วมาผสมกัน ซึ่งในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 ml จะประกอบด้วยเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ชนิดละประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 ml เขย่าให้เข้ากัน

2.5 การสร้างการปนเปื้อนเทียมในปุ๋ยอินทรีย์

ปุ๋ยมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 แต่ละชนิดปุ๋ยแยกซึ่งปุ๋ยแบ่งใส่ขวดแก้วปลอดเชื้อ 12.5 g จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อผสมที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.1 ml เติมใส่ลงในขวดที่ได้ซึ่งปุ๋ยในเบื่องต้น แล้วจึงชั่งปุ๋ยชนิดเดียวกันจำนวน 12.5 g ใส่ทับลงอีกครั้ง ปิดฝาแล้วนำไปเก็บ

ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 (อุณหภูมิห้องปฏิบัติการที่ควบคุมด้วยเครื่องปรับอากาศ) และ 40 ± 2 °C (ภายใต้ตู้เพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนขวดแก้วเพียงพอที่จะเก็บตัวอย่างในเวลา 21 วัน ทำซ้ำในทำนองเดียวกันจนครบปฏัยทั้ง 4 ชนิด

2.6 ศึกษาปริมาณและการรอดชีวิตของเชื้อผสมภายใต้อิทธิพลของอุณหภูมิ ในปฏัยอินทรีย์

โดยวิธีการทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Jiang *et al.*, 2003 นำปฏัยคอกที่ผ่านการปนเปื้อนเทียมจากข้อ 2.5 เก็บรักษาอุณหภูมิ 25 ± 2 และที่ 40 ± 2 °C ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ในปฏัยคอก ในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 ตรวจสอบเซลล์รอดชีวิตด้วยเทคนิค surface plate โดยนำตัวอย่างปฏัยที่เตรียมไว้ใส่ลงในถุงตีปั่นแล้วเทสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 ml ตีปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 ml ในระดับที่เหมาะสม ปิเปิดสารละลายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar แล้วใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจนแห้ง นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณของเชื้อ *E. coli* โดยโคโลนีมีลักษณะเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm

ส่วนการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ละสายพันธุ์ในเชื้อผสมตรวจโดยการปิเปิดสารละลายจากถุงตีปั่นปริมาตร 10 ml ใส่ลงในอาหาร TSB ที่มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD แล้วเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยการปรากฏโคโลนีสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD การตรวจสอบจุลินทรีย์ ตรวจสอบ 2 ซ้ำ วัดค่าพีเอชและปริมาณความชื้น (ภาคผนวก ข) ส่วนอุณหภูมิวัดบริเวณจุดกึ่งกลางของตัวอย่างด้วย Mini thermometer ในกรณีตรวจสอบทิศทางเคมีของปฏัย ตรวจสอบเพียงซ้ำเดียวจากทุกครั้งที่ทำการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ Food safety ตึกอุตสาหกรรมเกษตร 2 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และศูนย์พันธุ
วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนน
พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

2. สถานที่เก็บตัวอย่าง

แปลงเพาะและโรงคัดแต่งเบื้องต้นของโหระพาและผักชีจากอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท วิ.เอส.เฟรชโก จำกัด

3. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 และสิ้นสุดการวิจัยเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552

ผลและวิจารณ์

1. ข้อมูลจากการสำรวจแปลงเพาะปลูก สิ่งแวดล้อมรอบแปลง และการปฏิบัติระหว่างการผลิตขั้นต้นของโหระพาและผักชีเพื่อการส่งออก

1.1 แปลงโหระพา

จากการสำรวจแปลงโหระพาที่ผลิตเพื่อการส่งออก และเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา ในช่วงเดือน พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2551 แปลงผักตั้งอยู่ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีระยะทางห่างจากทางหลวงประมาณ 5 กิโลเมตร โดยรอบแปลงผักมีการปลูกพืชสวนครัวอื่นๆ ด้วย เช่น ตะไคร้และพริกขี้หนู รวมถึงมีการเลี้ยงปลาในร่องน้ำสำหรับใช้รดผัก บริเวณจุดตัดแต่งผักเพื่อส่งโรงงานผลิตตั้งอยู่ด้านหน้าแปลงเพาะปลูก ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับที่พักอาศัยของเกษตรกรโดยมีการต่อเติมเป็นลานปูนและมีหลังคาโดยใช้สังกะสี บริเวณจุดตัดแต่งเป็นพื้นปูนแต่พื้นที่ใช้ล้างผักสดเป็นดิน เกษตรกรมีการรับประทานอาหารในระหว่างปฏิบัติงาน ไม่ได้กินบริเวณจึงมีสุนัขเลี้ยงอยู่บริเวณที่ตัดแต่ง จากการสำรวจบริเวณแปลงเพาะปลูกพบว่า การปลูกโหระพามีการยกแปลงสูงขึ้นจากร่องน้ำรอบแปลง บริเวณรอบแปลงมีร่องน้ำด้านข้างแปลงเพาะปลูก ซึ่งอยู่ติดกับร่องน้ำที่ใช้ในการรดผัก ใกล้แปลงผักมีฟาร์มเป็ดตั้งอยู่ห่างจากแปลงประมาณ 300 เมตร

ในการปลูกโหระพาเป็นแบบการเพาะกล้าย้ายที่ปลูกคือ หว่านและเพาะเมล็ดจากที่หนึ่งและให้ระยะเวลาเจริญจนเป็นต้นกล้าประมาณ 20 - 25 วัน จากนั้นจึงถอนต้นกล้าเพื่อที่จะย้ายลงแปลงที่เตรียมไว้แล้วโดยจะปรับสภาพดินก่อนที่จะมีการปลูก โดยพรวนดินให้ร่วน ผสมปุ๋ยมูลสัตว์และดินให้เข้ากัน ลักษณะของดินในแปลงจะร่วนพร้อมนำต้นกล้าลงแปลง เมื่อนำต้นกล้าลงปลูกในแปลงดังกล่าวแล้วจะรดน้ำด้วยน้ำที่ได้มาจากท้องร่องบริเวณรอบแปลงเพาะปลูก ในระหว่างการเพาะปลูกมีการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อเร่งการเจริญของผัก และฉีดยาฆ่าแมลงก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 2 อาทิตย์ จากนั้นจึงจะสามารถเก็บเกี่ยวโหระพา นับระยะการเก็บเกี่ยวหลังจากนำต้นกล้าลงแปลงได้ประมาณ 30-35 วัน

การเก็บเกี่ยวเริ่มจากใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนต้นและบรรจุโหระพาลงตะกร้าพลาสติกประมาณ 10 กิโลกรัมต่อหนึ่งตะกร้าหลังเก็บเกี่ยวแล้วต้นของโหระพาสามารถแตกกิ่งและ

ใบออกมาได้ผลผลิตอีก จะทำการเก็บเกี่ยวทุกๆ 14 - 15 วัน ได้นานถึง 7-8 เดือน ซึ่งหลังจากเก็บเกี่ยวแล้วนำโหรพาไปตัดแต่ง

เริ่มจากเกษตรกรใส่ถุงมือและชุดใบโหรพาที่แก่และเน่าเสียออก ใช้กรรไกรตัดแต่งกิ่งที่ไม่ต้องการทิ้ง มัดเป็นกำ แล้วจึงนำไปล้างทำความสะอาดเป็นจำนวน 1 ครั้ง ในอ่างพลาสติกที่รองน้ำประปาซึ่งไหลตลอดเวลาจากสายยางที่มีก๊อนหินผูกถ่วงไว้กับขอบอ่างเพื่อป้องกันไม่ให้สายยางหลุดออกจากบริเวณปากอ่าง จากนั้นเขย่าผักให้สะเด็ดน้ำ แล้วบรรจุลงตะกร้าพลาสติก กลุ่มด้วยผ้าขนหนูชุบน้ำหมาดพร้อมส่งไปยังโรงงานขนาคบรรจุประมาณ 10 กิโลกรัมต่อตะกร้า การปฏิบัติในขั้นต้นอ้างอิงตามแผนภูมิ (ภาพที่ 4)

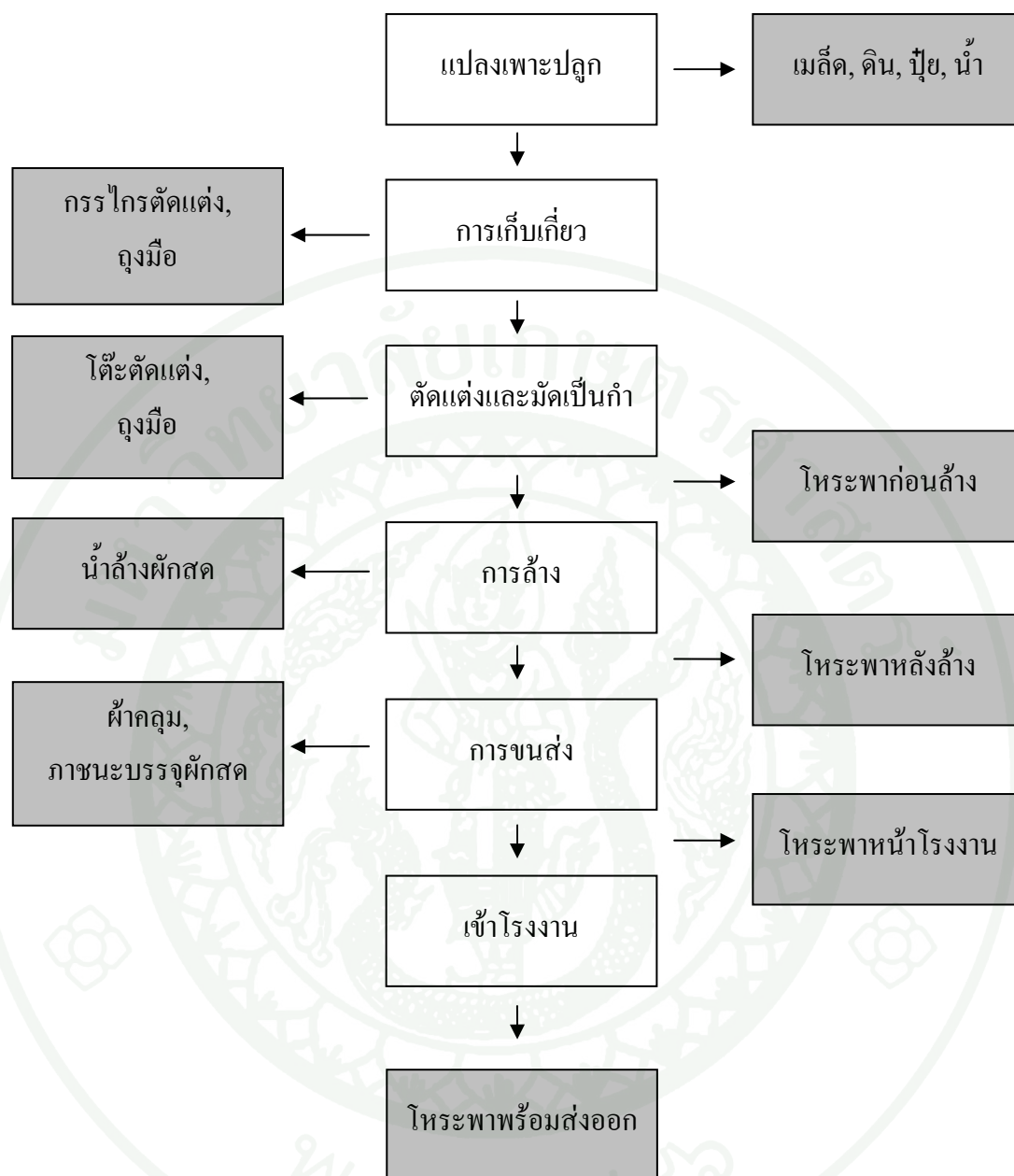
1.2 แปลงผักชี

ในระหว่างเดือน มีนาคม - พฤษภาคม พ.ศ. 2552 ได้เข้าไปสำรวจและเก็บตัวอย่างจากแปลงผักชีที่ผลิตเพื่อการส่งออก ตั้งอยู่ที่อำเภอคอนคม จังหวัดนครปฐม ซึ่งแปลงผักชีอยู่ห่างจากทางหลวงประมาณ 3 กิโลเมตรและใช้เวลาในการเดินทางจากแปลงไปถึงโรงงานผลิตประมาณ 30 นาที จากการสำรวจบริเวณโดยรอบของแปลงเพาะปลูกพบว่า แปลงเพาะปลูกบริเวณใกล้เคียงแปลงปลูกผักชีมีการปลูกผักสวนครัวชนิดต่างๆ เช่นกัน เช่น โหรพาและกระเพรา ประวัติการปลูกจากการสัมภาษณ์พบว่า ปลูกสลับกับการปลูกพืชตระกูลหัวได้แก่ เผือก ซึ่งจุดตัดแต่งจะอยู่ห่างจากแปลงเพาะปลูกประมาณ 500 เมตร ซึ่งเป็นพื้นที่บริเวณเดียวกับที่อยู่อาศัยของเกษตรกร โต๊ะตัดแต่งทำจากไม้ และคลุมด้วยแผ่นสังกะสี มีพื้นที่ประมาณ 2×4 ตารางเมตร ทั้งบริเวณที่ใช้ในการตัดแต่งและล้างผักเป็นพื้นปูนที่อยู่สูงจากพื้นดินประมาณ 10 เซนติเมตร แต่บริเวณดังกล่าวมีการเลี้ยงเป็ดที่มีการกั้นคอกไว้

จากการสังเกตการระหว่างการเก็บตัวอย่างในแปลงเพื่อตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา พบว่า แปลงผักชีมีความแตกต่างจากแปลงโหรพาคือไม่มีร่องน้ำบริเวณรอบแปลงปลูก ลักษณะของแปลงจะยกแปลงขึ้นสูงจากพื้นดินรอบแปลงเล็กน้อยเพื่อป้องกันน้ำท่วมขังสิ่งแวดล้อมบริเวณแปลงเพาะปลูกมีแปลงผักโดยรอบ เกษตรกรมีการปรับสภาพดินโดยการไถดินให้ร่วนร่วมกับการผสมปุ๋ยมูลสัตว์ให้เข้ากัน รดน้ำเพื่อให้ดินชุ่มแล้วจึงทำการหว่านเมล็ดลงแปลง ในระหว่างการเพาะปลูกเกษตรกรจะให้น้ำแก่ผักชีเป็นแบบระบบหัวฉีด (Springer) โดยที่ใช้น้ำบาดาลเป็นแหล่งน้ำในการรดน้ำผัก ในระหว่างการเพาะปลูกเกษตรกรมีการใช้ปุ๋ยเคมีและก่อนทำ

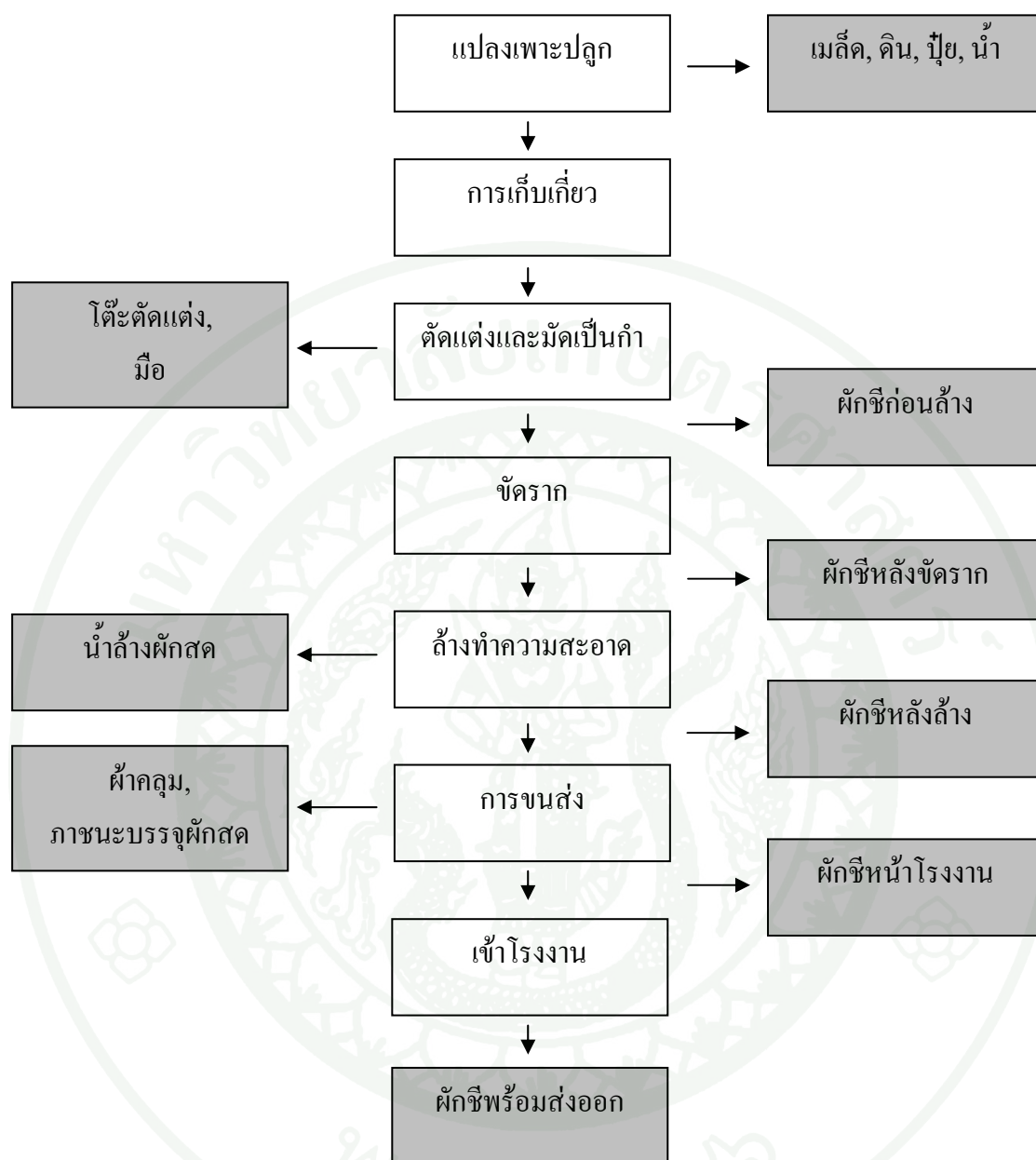
การเก็บเกี่ยวประมาณ 2 อาทิตย์มีการฉีดยาฆ่าแมลงและทำการเก็บเกี่ยวผักชีเมื่อมีอายุประมาณ 30 - 45 วัน (นับจากวันที่หว่านเมล็ดลงแปลง) และเก็บเกี่ยวผักชีทุกๆ 7 - 10 วัน ซึ่งผักชีสามารถเก็บเกี่ยวได้นานประมาณ 30 วันหลังจากที่มีการเก็บเกี่ยววันแรก เนื่องจากผักชีอายุมากหรือแก่ไม่เป็นที่นิยมในการรับประทาน

คนงานจะเก็บเกี่ยวผักชีโดยการใช้มือเปล่าถอนทั้งต้นและราก ซึ่งก่อนการถอนจะรดน้ำให้ทั่วแปลงเพื่อให้ง่ายต่อการถอนและป้องกันไม่ให้รากขาด หลังจากเก็บผักที่ได้จากแปลง เริ่มมีการตัดแต่งผักชีโดยใช้มือเปล่าเด็ดใบเสียออก มัดเป็นกำ นำไปซักราก เกษตรกรจะใช้แปรงที่มีลักษณะคล้ายแปรงขัดผ้าขัดบริเวณรากร่วมกับการใช้สายยางฉีดบริเวณรากเพื่อให้ดินที่ติดมากับรากหลุดออก หลังจากนั้นทำการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาอีกครั้งในอ่างน้ำ แล้วเขย่าเพื่อสะเด็ดน้ำ บรรจุลงแข่งพลาสติก และใช้ผ้าสีขาวเนื้อบางชุบน้ำให้หมาดคลุมผักแล้วนำส่งโรงงาน โดยปฏิบัติในขั้นตอนตามขั้นตอน ทั้งนี้พบว่าไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อใดๆ ในน้ำล้าง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงกระบวนการการผลิตขั้นต้นของโหระพาเพื่อการส่งออก

□ ขั้นตอนการผลิต ■ ชนิดตัวอย่างที่เก็บ



ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงกระบวนการการผลิตขั้นต้นของผ้าชีเพื่อส่งออก

□ ขั้นตอนการผลิต ■ ชนิดตัวอย่างที่เก็บ

2. ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ร่วมกับ Most Probable Number (MPN)

2.1 ปริมาณการปนเปื้อนของ เชื้อ *Salmonella* spp. ในสิ่งแวดล้อมในแปลงเพาะปลูก ระหว่างกระบวนการผลิตเพื่อการส่งออก

จากการเก็บตัวอย่างดิน ปุ๋ย น้ำในแปลงเพาะปลูก เมล็ดโหระพาและผักชี พบว่าปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง ดิน ปุ๋ยและน้ำที่ใช้เพาะปลูก (แปลงโหระพา) จำนวนตัวอย่างละ 15 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างดิน น้ำและปุ๋ย จำนวน 5, 4 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ น้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกใช้ในการรดผักมีจำนวนตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน *Salmonella* spp. มาก คิดเป็นความชุกร้อยละ 53.34 (ตารางที่ 5) แต่ในขณะที่ตัวอย่างดินและปุ๋ยมีความชุกต่ำกว่า คิดเป็นร้อยละ 33.34 และ 26.67 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในดินและปุ๋ยมีปริมาณมากกว่าน้ำ ตัวอย่างทั้งสองชนิดนั้นมีปริมาณ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนในปริมาณที่เท่ากันคือ < 3 ถึง 15 MPN/g พบปริมาณมากเป็นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของเชื้อที่ตรวจพบในน้ำที่ใช้เพาะปลูก ปริมาณเชื้อที่สูงที่สุดพบปนเปื้อนในน้ำเพาะปลูก มีค่าเท่ากับ 7.4 MPN/ml

การที่ความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างดินและปุ๋ยมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ คาดว่าเพราะน้ำเป็นของเหลว หากมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ย่อมแพร่กระจายได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยและดินซึ่งการปนเปื้อนแพร่กระจายได้ยากกว่า สอดคล้องกับค่าความชุกจากการปนเปื้อนตัวอย่างดินและปุ๋ยในแปลงโหระพาตรวจพบน้อยกว่าตัวอย่างน้ำ Foltz 1969 และ Cherry *et al.*, 1972 รายงานว่า น้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. แหล่งน้ำไม่ว่าจะเป็น แม่น้ำ บริเวณริมฝั่งทะเลรวมถึงปากอ่าวพบการปนเปื้อนของเชื้อ จำพวก fecal coliform ซึ่งอาจจะรวมถึงเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ผลการตรวจสอบในที่นี้พบปริมาณการปนเปื้อนในดินและปุ๋ยมีปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. สูงกว่าในน้ำ คาดว่าแหล่งของการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ในดินและปุ๋ยมาจากมูลสัตว์ที่ใช้เป็นปุ๋ย และอาจพบในปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีเชื้อ *Salmonella* spp. โรคชีวิตได้ ในปี ค.ศ. 1986 Jones รายงานว่า เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในดินที่มีปุ๋ยมูลวัวผสมอยู่นานถึง 300 วัน ในขณะที่ เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถเจริญอยู่ได้ในดินนานถึง 968 วัน ดังนั้นหากมีเชื้อ *Salmonella* spp. ในกองปุ๋ยจึงมี

โอกาสการแพร่กระจายในกรณีปฏิมูลสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อใช้ในการเพาะปลูกย่อมทำให้ปนเปื้อนสู่ผักสด

สิ่งแวดล้อมรอบแปลงเพาะปลูกอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากการสำรวจบริเวณโดยรอบของแปลงปลูกโหระพา พบฟาร์มเลี้ยงเป็ดตั้งอยู่ซึ่งระยะห่างจากฟาร์มเป็ดมาถึงแปลงโหระพาไม่ห่างกันนักประมาณ 300 เมตร Pelzer (1989) รายงานว่าเชื้อ *Salmonella* spp. จากมูลและคอกสัตว์มีโอกาสแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำ ในกรณีที่มีฝนตกน้ำไหลสู่ท้องร่อง แต่อย่างไรก็ดี ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าปุ๋ยและดินน่าจะเป็นแหล่งสำคัญในการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในแปลงเพาะปลูก

ในกรณีแปลงผักชีพบว่า ตัวอย่างดินและปุ๋ย มีปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ต่ำกว่าโหระพา คือ ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 15 และ 20 MPN/g ตามลำดับ ความชุกในการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างปุ๋ยที่ใช้ในแปลงผักชีมีปริมาณสูง โดยคิดเป็นร้อยละ 93.34 เป็นที่น่าสังเกตว่าสวนผักชีมีการใช้ปุ๋ยมูลค่างควาซึ่งแตกต่างจากแปลงโหระพาซึ่งใช้ปุ๋ยมูลเป็ด โดยปกติปุ๋ยมูลค่างควาจะผ่านความร้อนในการอัดเป็นเม็ดซึ่งน่าจะช่วยลดปริมาณเชื้อลงได้ แต่ในระหว่างการผลิตปุ๋ยเกษตรกรทราบความรู้ความเข้าใจอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนข้าม ในระหว่างการผลิตจากการใช้กระสอบเดิมซึ่งใส่ปุ๋ยมูล ปุ๋ยอัดเม็ดสำเร็จ ไม่มีการแยกกระสอบปุ๋ย ปุ๋ยอัดเม็ดแม้ผ่านอากาศร้อนแล้วหากถูกบรรจุลงในถุงเดิมที่ใส่มูลค่างควาอาจเป็นเหตุของการเกิดการปนเปื้อนได้ ส่วนตัวอย่างน้ำที่ใช้รดผักในแปลงผักชีพบว่าการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. สูงที่สุดเพียง 0.15 MPN/ml เนื่องจากน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกผักชีได้มาจากแหล่งน้ำบาดาล แหล่งน้ำใต้ดินมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำบนผิวดินเช่น ท้องร่อง ในกรณีของการปลูกโหระพา

ในกรณีที่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ในตัวอย่างดินและปุ๋ยทั้งในแปลงโหระพาและแปลงผักชี พบว่า มีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วงประมาณ 7 – 8 log CFU/g ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างน้ำในแปลงโหระพาและผักชี เท่ากับ 4.16 และ 1.67 log CFU/ml ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของต่างประเทศ พบว่า ในการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างที่ได้จากฟาร์มผลิตผักสด พบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 5 – 7 log CFU/g ในขณะที่ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบนผักสดอยู่ในช่วง 4 – 6 log CFU/g (Ruiz *et al.*, 1987)

2.2 ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมบริเวณจุดตัดแต่งระหว่างการผลิตขึ้นต้น

เก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมขณะตัดแต่งโหระพาและผักชี จำนวน 6 และ 5 จุด ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบความชุกของการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ระหว่างการตัดแต่งโหระพากับผักชี พบว่า ความชุกของการปนเปื้อนที่จุดตัดแต่งของโหระพามีค่าสูงกว่าผักชี โตะตัดแต่งและฝักคลุมโหระพามีความชุกของการปนเปื้อน *Salmonella* spp. สูงถึงร้อยละ 100 มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในฝักคลุมโหระพาและโตะตัดแต่งในระหว่างการขนส่งไปยังหน้าโรงงานสูงที่สุดคือ 4.2 และ 2.4 MPN/cm² ในกรณีผักชีพบความชุกของ *Salmonella* spp. บนโตะตัดแต่งและฝักคลุมมีค่าร้อยละ 90 และ 66.67 ตามลำดับ ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในฝักคลุมมีปริมาณสูงคาดว่าจะเป็นเกิดจากความชื้นของผ้า ในการผลิตผักสดระหว่างการขนส่งจำเป็นต้องควบคุมความชื้นของผัก เกษตรกรใช้ผ้าเปียกน้ำคลุมเพื่อลดปัญหาผักสดเหี่ยวเฉา ฝักคลุมที่สกปรกและชื้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีปริมาณของเชื้อในระดับสูง โดยส่วนใหญ่เกษตรกรขาดความรู้เรื่องการปนเปื้อนมักใช้น้ำล้างผักหุบให้ผ้าเปียกน้ำโดยไม่ได้เคาะน้ำ เชื้อและหากมีการแพร่กระจายของ *Salmonella* spp. จากดินและจากผักแบคทีเรียชนิดนี้ย่อมสะสมในผ้าที่เปียกและเจริญเพิ่มจำนวนได้ ส่วนถุงมือ กรรไกร และเข่งบรรจุผักสดโหระพามีความชุกคิดเป็นร้อยละ 80, 70 และ 60 และพบปริมาณการปนเปื้อนจากเชื้อโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.53, 0.68 และ 0.09 MPN/cm² ตามลำดับ ส่วนน้ำที่ใช้สำหรับล้างผักสดคือโหระพามีความชุกร้อยละ 66.67 และพบการปนเปื้อนสูงสุดเพียง 2.8 MPN/ml ในขณะที่น้ำล้างผักชีมีความชุกร้อยละ 90 ที่ปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยเท่ากับ 7.32 MPN/ml

ในปี ค.ศ. 1992 Madden รายงานว่าการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมามากหลาย ปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ การปนเปื้อนจากน้ำที่ใช้ในแปลงเพาะปลูก การจัดการของเกษตรกรในฟาร์ม การใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ รวมทั้งขั้นตอนการล้างผักหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ดีพอ วิธีการในการทำ ความสะอาดผักสดและการบรรจุลงภาชนะที่ไม่เหมาะสม ปัจจัยต่างๆ ล้วนเป็นเหตุให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนทั้งสิ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Beuchat (1996) ได้กล่าวถึงสาเหตุจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคมามากจากการปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตจนกระทั่งการบรรจุผลิตภัณฑ์ลงภาชนะ จากการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเฉลี่ยพบว่า ถุงมือ กรรไกร โตะตัดแต่ง น้ำล้างผัก ฝักคลุมและเข่งบรรจุผักสด เท่ากับ 7.47, 7.82, 6.83, 7.17, 5.07 และ 7.16 log CFU/cm², ml ตามลำดับ ซึ่งก่อนหน้านี้ Houang *et al.* (1991) พบว่า การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยมากเป็นอีสีดและรา และ

ปริมาณของยีสต์และราที่ตรวจพบในตัวอย่างบริเวณจุดตัดแต่งอยู่ในช่วงประมาณ 2.7 – 4.97 log CFU/cm² หรือ ml

ส่วนผลจุลินทรีย์จากการเก็บตัวอย่างบริเวณจุดตัดแต่งในกระบวนการผลิตผักชีเพื่อการส่งออก พบว่า มีความชุกจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง swab มือ โต๊ะ ตัดแต่ง ผักคลุมผักและเข่งบรรจุผักสด คิดเป็นร้อยละ 70, 90, 66.67 และ 60 ตามลำดับ ถึงแม้ว่าภาพโดยรวมแสดงความชุกของการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ในตัวอย่างจากกระบวนการผลิตผักชีจะน้อยกว่าโหระพา อย่างไรก็ตาม ความชุกโดยเฉลี่ยมีค่าเกินร้อยละ 60 หรือ 2 ใน 3 ตัวอย่างถือได้ว่ามีความชุกค่อนข้างสูง แม้ว่าปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ตัวอย่าง swab มือ โต๊ะ ตัดแต่ง ผักคลุมผักและเข่งบรรจุผักมีปริมาณการปนเปื้อนไม่มากนักคือโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.15, 1.07, 0.7 และ 0.076 MPN/cm² ตามลำดับ

สำหรับปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเฉลี่ยจากตัวอย่างถุงมือและมือที่ได้จากแปลงโหระพาและผักชีมีค่าเท่ากับ 7.47 และ 7.96 log CFU/cm² ตามลำดับ ส่วนปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างถุงมือจากแปลงโหระพาและ swab มือ จากแปลงผักชี มีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 และ 3.49 log CFU/cm² ตามลำดับ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์ราจากการ swab กรรไกรตัดแต่งที่ได้จากแปลงโหระพาโดยเฉลี่ยเท่ากับ 7.82 และ 3.92 log CFU/cm² ตามลำดับ ในการตัดแต่งผักชีไม่มีการใช้กรรไกรตัดแต่งเนื่องจากผักชีมีการส่งออกทั้งราก เกษตรกรจึงไม่ใช้กรรไกรในการตัดแต่งจะใช้การถอนขึ้นมาทั้งราก ในขณะที่ตัวอย่าง swab จากโต๊ะตัดแต่งจากแปลงโหระพาและแปลงผักชีมีปริมาณการปนเปื้อนใกล้เคียงกันคือ 6.73 และ 7.19 log CFU/cm² ตามลำดับ เช่นเดียวกับน้ำล้างผักจากแปลงโหระพาและผักชี พบปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 7.17 และ 7.81 log CFU/ml แต่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างผักคลุมผักสดจากแปลงโหระพาและผักชีโดยเฉลี่ยเพียง 5.07 และ 5.79 log CFU/cm² ส่วนปริมาณการปนเปื้อนของยีสต์และราโดยเฉลี่ยเท่ากับ 3.16 และ 1.91 log CFU/cm² ตามลำดับ และปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมดจากทั้งแปลงโหระพาและผักชีโดยเฉลี่ยเท่ากับ 7 - 8 log CFU/cm² ในขณะที่ ปริมาณของยีสต์และราที่มีการปนเปื้อนประมาณ 3 - 4 log CFU/cm²

2.3 ปริมาณการปนเปื้อนของ เชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดระหว่างกระบวนการผลิตเพื่อการส่งออก

2.3.1 การตรวจสอบโดยวิธี MPN - PCR

จากการเก็บตัวอย่างในผักสดโหระพาและผักชี 5 ขั้นตอน ก่อนล้างน้ำ หลังล้างน้ำ หลังซักราก (กรณีผักชี) ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตขั้นต้น ณ โรงคัดแยกและคัดแต่งรวมทั้งผักชีระหว่างการลำเลียงส่งโรงงานเรียกว่าผักหน้าโรงงานและผักสดที่พร้อมส่งออก ในที่นี้เรียกว่าผักสดส่งออก พบว่าทุกขั้นตอนมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. (ตารางที่ 7) ในกรณีโหระพา ในขั้นตอน ก่อนล้าง หลังล้าง หน้าโรงงาน และส่งออก มีความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. คิดเป็นร้อยละ 40, 100, 60 และ 80 ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละขั้นตอนมีปริมาณการปนเปื้อน *Salmonella* spp. โดยเฉลี่ยแตกต่างกันประมาณระหว่าง น้อยกว่า 3 MPN/g และปริมาณการปนเปื้อนสูงที่สุด เท่ากับ 210 MPN/g ที่น่าสังเกตคือ โหระพาก่อนล้างมีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ค่อนข้างต่ำ ปริมาณการปนเปื้อนสูงที่สุดที่ตรวจพบคือ 6 MPN/g แต่หลังผ่านการล้างทำความสะอาดกลับพบว่าโหระพาหลังล้างมีการปนเปื้อนโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 1.68 MPN/g (โหระพาก่อนล้าง) เป็น 47.80 MPN/g คาดว่าเซลล์ *Salmonella* spp. ในผักที่ผ่านการล้างอาจเพิ่มจำนวนจากน้ำล้าง (Berrang, 1989) การปนเปื้อนยังอาจเพิ่มขึ้นจากวิธีการล้างผักที่ไม่เหมาะสม จากการสังเกตพบว่าในระหว่างการล้างผักสดผู้ปฏิบัติงานเปลี่ยนน้ำที่ใช้ในการล้างบ่อยครั้ง น้ำล้างผักมักถูกล้างซ้ำๆ ทำให้หุ่นจากตะกอนดินเพิ่มขึ้น จากการตรวจสอบปริมาณ *Salmonella* spp. ที่พบในดินจากข้อ 2.1 ก็พบว่ามียูจริง จึงเป็นไปได้ที่จะมีการกระจายตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ในน้ำ และเพิ่มจำนวนขึ้นในผักที่ผ่านน้ำล้าง ทำให้ผักสดบางส่วนที่อาจมีการปนเปื้อนน้อยมาตั้งแต่ขั้นต้นมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นในขั้นตอนนี้

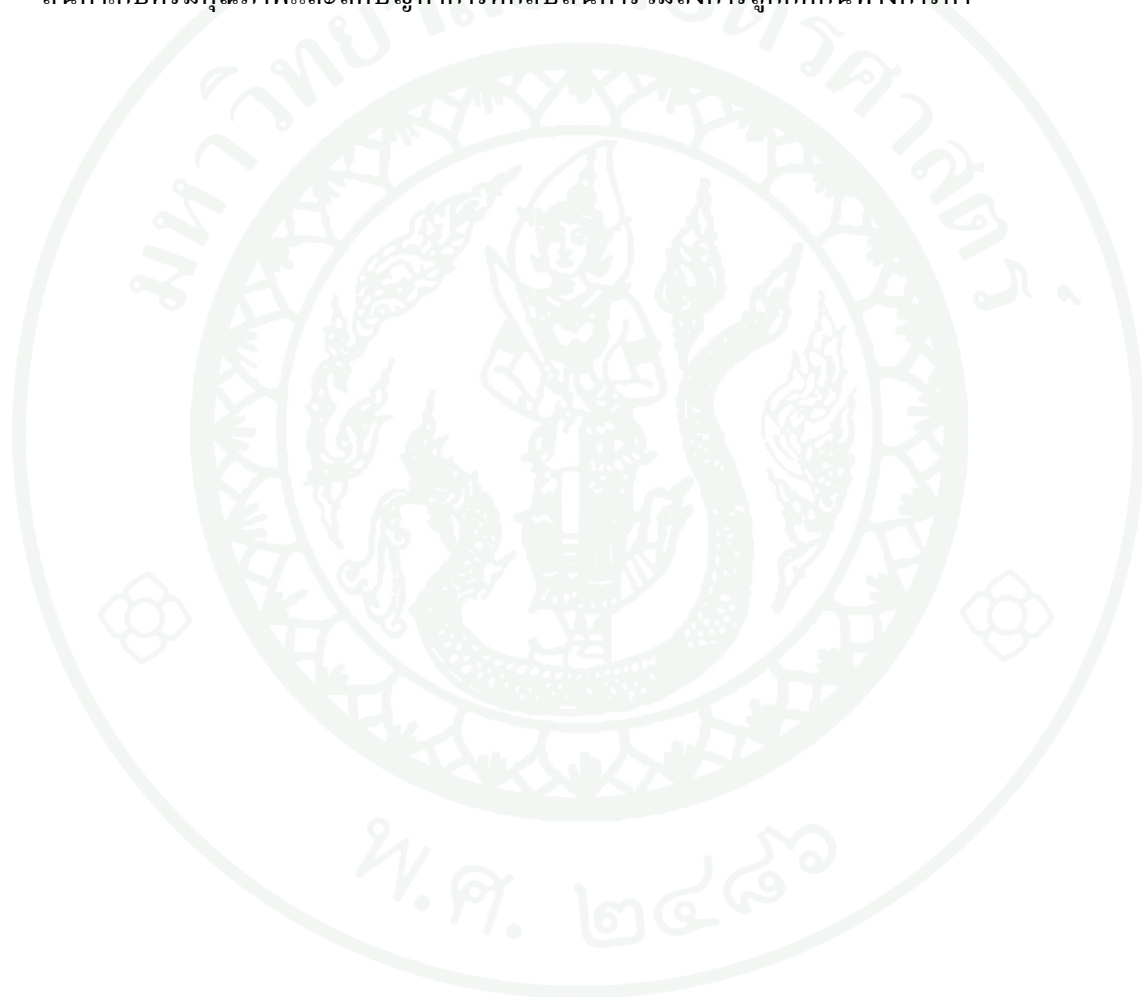
ในปี ค.ศ. 1996 Rushing *et al.* รายงานว่า ชนิดของอาหารเองคือ ผักสดมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. รวมไปถึง จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น *Shigella* และ *E. coli* และพบว่าระหว่างการปฏิบัติขั้นต้นเพิ่มความชุกจากการปนเปื้อนได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งผลการตรวจเชื้อมีแนวโน้มจะบ่งชี้ถึงการขาดสุขลักษณะที่ดีในการปฏิบัติงานเช่นเดียวกัน ผลการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในโหระพาบริเวณหน้าโรงงานและโหระพาพร้อมที่จะส่งออกมีปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดเท่ากันคือ 20 MPN/g แต่ค่าความชุกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 60 (โหระพาก่อนส่งเข้าโรงงาน) เป็นร้อยละ 80 (โหระพาพร้อมส่งออก) ในขณะที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดรวมทั้งปริมาณยีสต์และราลดลงประมาณ 1 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างโหระพาหน้าโรงงาน คาดว่าขั้นตอนปฏิบัติในโรงงานผลิตช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลงได้ส่วนหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า หากมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นไปได้ยากที่จะกำจัดออกได้หมด

ในกรณีกระบวนการผลิตผักซีเพื่อการส่งออกพบว่าความชุกและปริมาณของการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ของผักซีแต่ละขั้นตอนมีค่าโดยเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ ประมาณร้อยละ 70 – 80 ในส่วนขั้นตอนก่อนล้างน้ำ หลังล้างน้ำและหลังซักราก ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดมีค่าเท่ากับ 14, 15 และ 15 MPN/g ตามลำดับ ซึ่งปริมาณการปนเปื้อนดังกล่าวค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผักซีหน้าโรงงานและผักซีส่งออก คือมีค่า 35 และ 44 MPN/g ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจากการปฏิบัติในขั้นตอนจึงมีความเป็นไปได้ว่า ในระหว่างที่มีการขนส่งผักซีไปยังหน้าโรงงาน เชื้อ *Salmonella* spp. อาจมีการเจริญและเพิ่มปริมาณขึ้นจากปัจจัยของความชื้นและการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นในระหว่างการล้างและขนส่ง ประกอบกับปริมาณเชื้ออาจปนเปื้อนเพิ่มขึ้นเกิดจากอุปกรณ์ที่ใช้ระหว่างการขนส่ง

ความชุกของการปนเปื้อนในผักซีหลังซักรากพบว่าเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80 จากร้อยละ 70 จากการสังเกตขั้นตอนการล้างพบว่ายังไม่ถูกสุขลักษณะการผลิตที่ดี การซักราก โดยวางผักกองบนพื้นไถ้ทำคอนงานรวมทั้งไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อในน้ำล้าง ด้วยเหตุนี้ จึงเป็นเรื่องเร่งด่วนที่ทางโรงงานควรให้ความรู้แก่เกษตรกรถึงขั้นตอนและกระบวนการล้างทำความสะอาดที่ถูกวิธี การเสนอร่วมกับการล้างผักด้วยสารฆ่าเชื้อจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ลงได้

ปิยาณี (2542) รายงานว่า การล้างขิงด้วยน้ำประปาที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 ด้วยกรดแลคติกหรือกรดอะซิติกและเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25 - 50 ppm มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์ของ *E. coli* ที่ปนเปื้อนบนขิง 5 log CFU/g ได้ 2.5-3.8 log CFU/g ภายในเวลา 30 นาที โดยไม่ทำให้สีของขิงเปลี่ยนแปลง ต่อมาในปี พ.ศ. 2545 สุดาพร ศึกษาการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์และสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายเชื้อ *E. coli* และ *S. Typhimurium* บนข้าวโพดฝักอ่อน (Baby corn) และหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus*) โดยทำการสร้างการปนเปื้อนของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Typhimurium* มีเชื้อเริ่มต้น ประมาณ 5 - 6 log CFU/ml แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4 ด้วยกรดอะซิติก) ความเข้มข้น 300 ppm เป็นเวลา 0 - 30 นาที สามารถลดเชื้อ *E. coli* และ *S. Typhimurium* ลงได้ 1 - 3 และ 2 - 4 log CFU/g ตามลำดับ ส่วนการใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ในการล้างผักทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที สามารถลดปริมาณของ *E. coli* และ *S. Typhimurium* ลงได้ 2 - 3 log CFU/g สารฆ่าเชื้อเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคได้ในผลิตภัณฑ์ผักสดเหล่านี้

แม้ว่าในปัจจุบันวิทยาการทางด้านอุตสาหกรรมเกษตร กระบวนการผลิตจะก้าวหน้าไปมาก แต่กลับยังคงพบปัญหาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ ซึ่งปัญหาดังกล่าวเป็นปัญหาซ้ำซากที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น เกิดการปนเปื้อนข้าม หรือการปนเปื้อนซ้ำ ทั้งนี้เป็นเรื่องของการจัดการความเสี่ยงที่สามารถแก้ไขได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับผู้ปฏิบัติ เกษตรกรและคนงานผู้สัมผัสอาหาร จึงต้องได้รับการฝึกอบรมให้ทราบถึงหลักการปฏิบัติที่ดีรวมทั้งเสนอแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้สินค้าอาหารโดยเฉพาะสินค้าเกษตรมีคุณภาพและลดปัญหาการติดกลับสินค้ารวมถึงการถูกกีดกันทางการค้า



ตารางที่ 5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อมในแปลงเพาะปลูกระหว่างการผลิตเพื่อการส่งออก

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์ทั้งหมด		ยีสต์และรา		<i>Salmonella</i> spp.		ค่าเฉลี่ย <i>Salmonella</i> $\pm$ SD*		ความชุกของ <i>Salmonella</i> (%)	
	(log CFU/g)		(log CFU/g)		(MPN/g)		(MPN/g)		<i>Salmonella</i> (%)	
	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี
เมล็ด	6.21 $\pm$ 0.25	2.54 $\pm$ 0.14	5.18 $\pm$ 0.09	2.16 $\pm$ 0.78	< 30 – 30	< 30	15 $\pm$ 21.2	< 30	66.7	0
ดิน	7.1 $\pm$ 0.35	7.43 $\pm$ 0.34	4.76 $\pm$ 0.39	4.95 $\pm$ 0.37	< 3 – 15	< 3 – 15	2.94 $\pm$ 4.9	3.84 $\pm$ 4.9	33.34	46.67
ปุ๋ย	8.24 $\pm$ 0.63	7.47 $\pm$ 0.33	6.46 $\pm$ 1.02	3.46 $\pm$ 0.57	< 3 – 15	< 3 – 20	2.63 $\pm$ 4.9	6.27 $\pm$ 5.1	26.67	93.34
น้ำ**	4.16 $\pm$ 0.49	1.67 $\pm$ 1.20	2.06 $\pm$ 1.08	0.1 $\pm$ 0.16	< 3 – 7.4	< 0.03 – 0.15	0.9 $\pm$ 1.95	0.0026 $\pm$ 0.004	53.34	46.67

หมายเหตุ * หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

** หมายถึง น้ำจากแปลงผัก

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อมบริเวณจุดตัดแต่งระหว่างการผลิตเพื่อการส่งออก

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)		ยีสต์และรา (log CFU/g)		<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)		ค่าเฉลี่ย <i>Salmonella</i> ± SD* (MPN/g)		ความชุกของ <i>Salmonella</i> (%)	
	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี
ถุงมือ / มือ	7.47±7.55*	7.96±0.81	4.6±4.76	3.49±0.65	< 0.3 – 1.5	< 0.06 – 0.56	0.53±0.5	0.15±0.2	80	70
กรรไกร	7.82±7.76	NT	3.92±3.9	NT	< 0.3 – 1.6	NT	0.68±0.6	NT	70	NT
โต๊ะตัดแต่ง	6.73±6.38	7.19±1.1	2.7±2.86	3.06±0.81	0.06 – 2.4	< 0.06 – 5.8	0.45±0.7	1.07±1.8	100	90
น้ำล้างผัก	7.17±6.82	7.81±1.57	4.97±4.24	3.92±0.95	< 0.3 – 2.8	< 3 – 35	1.03±1.53	7.32±12.4	66.67	90
ผ้าคลุมผักสด	5.07±4.65	5.79±0.50	3.16±3.36	1.91±0.99	0.06 – 4.2	< 0.3 – 4.3	6.2±8.4	0.7±1.3	100	66.67
แข่งบรรจุ- ผักสด	7.16±6.52	7.63±1.16	3.45±3.6	3.34±0.53	< 0.06 – 0.3	< 0.06 – 0.2	0.09±0.1	0.076± 0.0004	60	60

หมายเหตุ * หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

NT หมายถึง ไม่ได้สุ่มตัวอย่างตรวจปริมาณการปนเปื้อน

ตารางที่ 7 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในผักสดระหว่างการผลิตเพื่อการส่งออก

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)		ยีสต์และรา (log CFU/g)		<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)		ค่าเฉลี่ย <i>Salmonella</i> ± SD* (MPN/g)		ความชุกของ <i>Salmonella</i> (%)	
	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี	โหระพา	ผักชี
ก่อนล้าง	6.26 ± 6.41*	8.49 ± 0.48	5.82 ± 5.77	5.16 ± 0.20	< 3 – 6	< 3 – 14	1.68 ± 2.3	4.3 ± 4.6	40	70
หลังล้าง	5.95 ± 6.26	7.47 ± 0.65	5.57 ± 5.47	4.79 ± 0.43	3.6 – 210	< 3 – 15	47.8 ± 73.8	5.62 ± 5.1	100	70
หลังซักราก	NT	8.35 ± 0.68	NT	5.22 ± 0.34	NT	< 3 – 15	NT	5.88 ± 5.7	NT	80
หน้าโรงงาน ^a	6.25 ± 6.1	7.31 ± 0.44	5.57 ± 5.53	4.73 ± 0.37	< 3 – 20	< 3 – 35	4.12 ± 6.24	5.79 ± 10.5	60	70
ผักสดส่งออก ^b	5.39 ± 0.31	6.25 ± 0.27	4.27 ± 0.43	4.40 ± 0.19	< 3 – 20	< 3 – 44	8.37 ± 7.25	13.99 ± 11.2	80	70

หมายเหตุ * หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

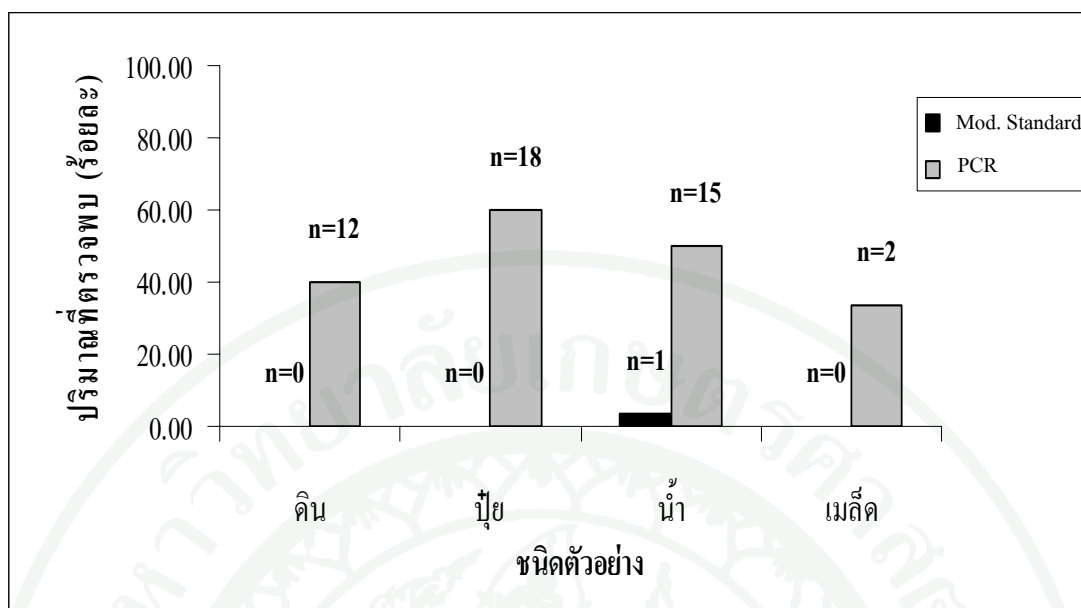
NT หมายถึง ไม่ได้สุ่มตัวอย่างตรวจปริมาณการปนเปื้อน

^a หมายถึง ผักที่ส่งเข้าโรงงานผลิตผักสดเพื่อส่งออก

^b หมายถึง ผักสดพร้อมส่งออก

2.3.2 การตรวจสอบโดยวิธีดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (ISO 6579)

จากการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณแปลงเพาะปลูก (ภาพที่ 6) พบว่า ร้อยละ 40 (12/30), 60 (18/30), 50 (15/30) และ 33.33 (2/6) ของตัวอย่างดิน ปุ๋ย น้ำในแปลงเพาะปลูกและเมล็ดทั้งหมดที่เก็บได้จากแปลงโหระพา และผักชี ตามลำดับ ซึ่งตรวจพบเชื้อแสดงผลบวกได้ด้วยวิธี PCR ในขณะที่การตรวจสอบโดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ตรวจพบการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. ได้เพียง 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.33) คือตัวอย่างน้ำที่ใช้รดผัก ในการทดลองนี้วิธีดัดแปลงจากมาตรฐาน (Modified standard) คือวิธีของ ISO 6579 โดยมีขั้นตอนที่ดัดแปลงคือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด RV broth เป็น selective enrichment media เพียงชนิดเดียว โดยตามวิธีการมาตรฐานจะต้องมีการยืนยันผลด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดในขั้นตอนนี้ เช่น tetrathionate (TT) broth หรือ selenite cystine (SC) broth สาเหตุที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RV broth เพียงชนิดเดียวเนื่องจาก ในปี พ.ศ. 2541 สุธธิพรและคณะได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเปรียบเทียบระหว่าง SC broth, TT broth และ RV broth พบว่า RV broth มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อสูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 11.82 ในขณะที่ TT broth และ SC broth มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ได้เพียงร้อยละ 7.88 และ 5.42 ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า RV broth มีประสิทธิภาพสูงที่สุดข้อจำกัดในเรื่องการปฏิบัติงานผู้วิจัยจึงเลือก RV broth ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด selective enrichment เพียงชนิดเดียวในการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. เนื่องจากเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายเวลาและแรงงาน

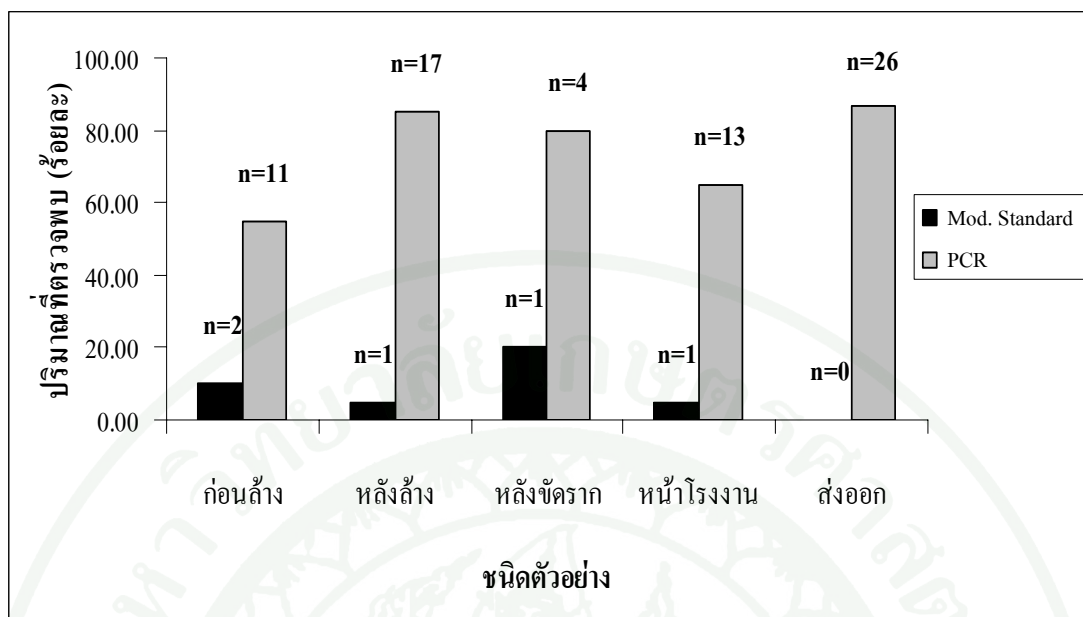


ภาพที่ 6 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. (ค่า n) ด้วยเทคนิค PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีตัดแปลงจากวิธีมาตรฐานในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณเพาะปลูกจากกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก

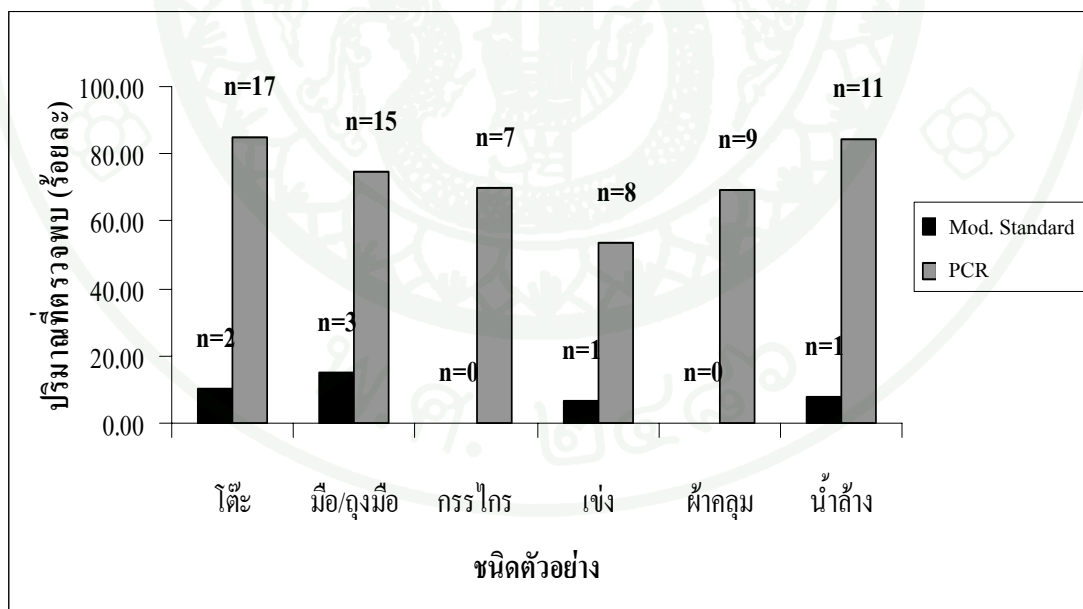
ส่วนการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อด้วยเทคนิค PCR ซึ่งให้ผลบวกในตัวอย่าง ผักสดก่อนล้าง หลังล้าง หลังซักราก หน้าโรงงานรวมทั้งผักสดเพื่อการส่งออก (ภาพที่ 7) คิดเป็น ร้อยละ 55 (11/20), 85 (17/20), 80 (4/5), 65 (13/20) และ 86.66 (26/30) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใน ทำนองเดียวกันกับข้างต้นคือการตรวจพบด้วยวิธีมาตรฐานสามารถตรวจพบในจำนวนผลบวกน้อยกว่าคือ เท่ากับร้อยละ 10 (2/20), 5 (1/20), 20 (1/5) และ 5 (1/20) ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

เช่นเดียวกันกับการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. จากตัวอย่าง สิ่งแวดล้อมบริเวณจุดตัดแต่ง (ภาพที่ 8) ได้แก่ ตัวอย่างที่ swab จากโต๊ะตัดแต่ง มือหรือถุงมือ กรรไกร ภาชนะใส่ผักสด (เข่ง) และตัวอย่างผักคลุมและน้ำล้างผักมีการปนเปื้อนจาก *Salmonella* spp. จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR คิดเป็นร้อยละ 85 (17/20), 75 (15/20), 70 (7/10), 53.33 (8/15), 69.23 (9/13) และ 84.62 (11/13) แต่ ในขณะที่การตรวจการปนเปื้อนด้วยวิธีที่ตัดแปลงจากวิธี มาตรฐานสามารถตรวจพบการปนเปื้อนจากเชื้อได้เท่ากับร้อยละ 10 (2/20), 15 (3/20), 0 (0/10), 6.66 (1/15), 0 (0/13) และ 7.69 (1/13) ตามลำดับ

ผลการตรวจปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างดินและปุ๋ยด้วยเทคนิค PCR ที่ให้ผลบวก ซึ่งไม่สามารถคัดแยกเชื้อจากการตรวจด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน สอดคล้องกับรายงานของ Turpin *et al* ในปี 1993 ได้อธิบายว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น ในภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระหรือสารอาหารไม่เพียงพอ ซึ่งเชื้ออยู่ในสภาวะดังกล่าวมักไม่มีการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์แม้มีอาหารที่สมบูรณ์ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบเพื่อตรวจนับปริมาณ (Quantitative test) จึงเป็นวิธีที่สำคัญอย่างยิ่งที่สามารถฟื้นเซลล์ให้เจริญและตรวจนับปริมาณได้ แม้ว่าในปัจจุบันมาตรฐานคุณภาพจุลินทรีย์ในการค้าระหว่างประเทศยังนิยมใช้วิธีดั้งเดิม (Conventional method) โดยเฉพาะการตรวจสอบ *Salmonella* spp. เนื่องจากมาตรฐานกำหนดว่าต้องตรวจไม่พบในอาหารนั้นๆ โดยไม่กำหนดปริมาณต่ำสุดในอาหาร ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องใช้วิธีตรวจนับปริมาณ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดั้งเดิมมีข้อเสียหลายประการคือ สิ้นเปลืองทั้งค่าใช้จ่ายห้องปฏิบัติการ (อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี) ใช้เวลาประมาณ 4 - 6 วัน และยังต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจสอบ โดยวิธีตรวจสอบจากระดับโมเลกุล (Molecular method) ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค PCR เป็นวิธีที่ตรวจเร็วมีความจำเพาะและแม่นยำทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกันทั้งยังประยุกต์กับวิธี MPN ซึ่งจะช่วยให้ทราบปริมาณจะได้นำมาใช้ประโยชน์อื่นๆ ได้เป็นอีกวิธีที่น่าจะมีแนวโน้มมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตกลงทางการค้าในอนาคต แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังมีข้อด้อยในเรื่องของความชำนาญของผู้วิเคราะห์และสารเคมีเฉพาะเช่น เอนไซม์ มีราคาแพง



ภาพที่ 7 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. (ค่า n) ด้วยเทคนิค PCR เมื่อเทียบกับวิธีคัดแปลงจากวิธีมาตรฐานในตัวอย่างผักสดจากระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก



ภาพที่ 8 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. (ค่า n) ด้วยเทคนิค PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีคัดแปลงจากวิธีมาตรฐานในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณจุดตัดแต่งจากระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก

3. จำแนก serotype ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากบางขั้นตอนของกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก

3.1 สายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตโหระพาเพื่อการส่งออก

จากการเก็บตัวอย่างในระหว่างการผลิตผักโหระพาส่งออก เพื่อทำการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. แล้วได้ทำการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อควบคู่ไปด้วย พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมดได้จำนวน 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) คัดแยกได้ *Salmonella* Hvittingfoss (Group I) จากตัวอย่างโหระพาก่อนล้าง ซึ่งจากผลการตรวจ MPN ร่วมกับ PCR พบว่าตัวอย่างโหระพาก่อนล้างที่คัดแยกเชื้อได้นั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ก่อนล้างสูงในช่วงปริมาณการปนเปื้อนเท่ากับ 6 MPN/g (ตารางผนวกที่ ๑) ส่วน *Salmonella* Aberdeen (Group F) และ *Salmonella* Bovismorbificans (Group C) คัดแยกได้จากตัวอย่างถุงมือและโต๊ะตัดแต่ง โดยตัวอย่างถุงมือนั้นมีช่วงปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างที่คัดแยกได้เท่ากับ 3.6 MPN/10 cm² และ 7.5 MPN/50 cm² ขณะที่ตัวอย่างโต๊ะตัดแต่งบางตัวอย่างสามารถแยกเชื้อได้มีปริมาณการปนเปื้อนสูงถึง 120 MPN/50 cm² จากผลการคัดแยกเชื้อพบว่าถุงมือและโต๊ะตัดแต่งมีการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. สายพันธุ์ที่มีความสอดคล้องกัน เป็นไปได้ว่าเชื้อที่ตรวจพบเกิดการปนเปื้อนข้ามกันระหว่าง ถุงมือและโต๊ะตัดแต่งและในขณะเดียวกันพบว่าสายพันธุ์ที่จำแนกได้นั้นสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่พบว่าปนเปื้อนในผักส่งออกที่ทำให้เกิดปัญหาการกักกันและตีกลับในปี พ.ศ. 2548 ในขณะที่เข่งบรรจุผักสามารถคัดแยก *Salmonella* II 17 : g, t:- (O: 17) (Group J)

ตารางที่ 8 สายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตโหระพาเพื่อการส่งออก

ตัวอย่าง (จำนวนไอโซเลต)	ช่วงปริมาณการปนเปื้อน	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. (Group, จำนวน)
ผักสดก่อนล้าง (3)	< 3 - 6 MPN/g	Hvittingfoss (Group I, 3)
ถุงมือ (6)	< 3.0 – 15.0 MPN/10cm ²	Aberdeen (Group F, 1) และ Bovismorbificans (Group C, 5)
โต๊ะตัดแต่ง (3)	3.0 – 120 MPN/50cm ²	Aberdeen (Group F, 2) และ Bovismorbificans (Group C, 1)
เข่งบรรจุผักสด (1)	< 3.0 – 15.0 MPN/10cm ²	II 17 : g, t:- (O: 17) (Group J, 1)

3.2 สายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตผักชีเพื่อการส่งออก

ในทำนองเดียวกันจากการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. จากกระบวนการผลิตผักชีเพื่อการส่งออก พบ *Salmonella* Augustenborg (Group C) และ *Salmonella* III: 48: 1, V: 1, 5, 7 (O: 48) จากตัวอย่างผักชีก่อนล้างที่มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งตรวจโดยวิธี MPN - PCR เท่ากับ 7.3 MPN/g พบ *Salmonella* Augustenborg (Group C) ได้จากผักชีหลังชำระล้างหน้าโรงงานและน้ำที่ใช้ล้าง ตัวอย่างเหล่านี้ได้มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ เท่ากับ 10, 3 MPN/g และ 34 MPN/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าทั้งผักสดก่อนล้าง หลังชำระล้าง รวมถึงน้ำล้างผักมีการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์เดียวกัน เป็นไปได้ว่าเชื้อมีการปนเปื้อนมากับตัวอย่างผักหลังการชำระล้าง และมีโอกาสรอดชีวิตไปจนถึงกระบวนการส่งผักไปยังหน้าโรงงานเช่นเดียวกันกับโต๊ะตัดแต่ง พบเชื้อ *Salmonella* III: 48: 1, V: 1, 5, 7 (O: 48) ซึ่งสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีความสอดคล้องกับผักสดก่อนล้างและคาดว่ามีการปนเปื้อนข้ามจากผักสดก่อนล้างไปยังโต๊ะตัดแต่งด้วยเช่นกัน นอกจากนี้สามารถคัดแยก *Salmonella* Newport (Group C) และ *Salmonella* Albany (Group C) ได้จากผักชีหลังล้างและน้ำที่ใช้ในแปลงเพาะปลูก ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 สายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตผักชีเพื่อการส่งออก

ตัวอย่าง (จำนวนไอโซเลต)	ช่วงปริมาณการปนเปื้อน	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. (Group, จำนวน)
ผักสดก่อนล้าง (2)	< 3.0 – 14.0 MPN/g	Augustenborg (Group C, 1) และ IIIb : 48 : 1, V : 1, 5, 7 (O: 48) (1)
ผักสดหลังซักราก (4)	< 3.0 – 15.0 MPN/g	Augustenborg (Group C, 4)
ผักสดหลังล้าง (3)	< 3.0 – 15.0 MPN/g	Newport (Group C, 3)
ผักสดหน้าโรงงาน (1)	< 3.0 – 35.0 MPN/g	Augustenborg (Group C, 1)
น้ำในแปลงเพาะปลูก (2)	< 0.3 MPN/ml	Albany (Group C, 2)
น้ำล้างผักสด (1)	< 3.0 – 35.0 MPN/ml	Augustenborg (Group C, 1)
โต๊ะตัดแต่ง (4)	< 3.0 – 290.0 MPN/50 cm ²	IIIb : 48 : 1, V : 1, 5, 7 (O: 48) (4)

3.3 สายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากผักสดเพื่อการส่งออก

หลังจากผักสดออกจากโรงงานเพื่อนำไปส่งออกต่างประเทศ ทำการคัดแยกเชื้อ (ตารางที่ 10) โดยพบสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ ในโหระพาสดส่งออก คือ Singapore (Group C) และ Weltevreden (Group E) ซึ่งสายพันธุ์ที่ได้มีรายงานการวิจัยของ Jerngklinchan and Saitanu ในปี ค.ศ. 1993 โดยคัดแยกเชื้อ *S. Weltevreden* ได้จากถั่วงอกสดที่เก็บตัวอย่างมาจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร และ ต่อมาในปี 2003 Salleh *et al.* ได้ทำการสำรวจและคัดแยก *Salmonella Weltevreden* ได้จากผักสดเช่นกัน ส่วนสายพันธุ์นี้ Aggarwal *et al.* (1985) ได้รายงานไว้ว่า *Salmonella Weltevreden* เป็นสายพันธุ์ที่เคยเกิดอุบัติการณ์ของโรคซัลโมเนลโลซิสในประเทศมาเลเซียและประเทศข้างเคียง

ตารางที่ 10 สายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากผักสดเพื่อการส่งออก

ตัวอย่าง (จำนวนไอโซเลต)	ช่วงปริมาณการปนเปื้อน	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. (Group, จำนวน)
โหระพาสดส่งออก (6)	< 3.0 – 20.0 MPN/g	Singapore (Group C, 5) Weltevreden (Group E, 1)
ผักชีสดส่งออก (5)	< 3.0 – 44.0 MPN/g	Singapore (Group C, 5)

สรุปได้ว่าการคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างผักสด ทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 7 และ 8) พบว่าคัดแยกเชื้อได้ต่างสายพันธุ์ ทั้งนี้คาดว่าขึ้นอยู่กับพื้นที่แปลงปลูกต่างกัน ดิน ปุ๋ย น้ำ สิ่งแวดล้อมที่ต่างกันน่าจะมีผลปนเปื้อนในผักต่างชนิดกัน ตัวอย่างเช่น พบสายพันธุ์ Hvittingfoss ในโหระพาอ่อนล้าง ส่วนสายพันธุ์ Augustenborg พบในผักชี ในประเด็นที่สองคือบางสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากผักสดทั้ง 2 ชนิด มีความสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่ตรวจพบในผักสดที่ส่งออกไปยังประเทศนอร์เวย์ และ ฟินแลนด์ (ตารางที่ 1) แสดงว่านอกจากสภาพแวดล้อมของการเพาะปลูกผักสดที่มีการปนเปื้อนของดิน น้ำ ปุ๋ยที่ใช้ในการเกษตรดังที่กล่าวแล้ว ขั้นตอนอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติขั้นต้นได้แก่ อุปกรณ์/เครื่องใช้ภาชนะบรรจุในขั้นตอนการตัดแต่ง สุนัขลักษณะของโรงงานที่สัมผัสสัมผัสระหว่างการตัดแต่ง ตลอดจนวิธีการล้างผักสด การลำเลียง เกือบทุกขั้นตอนเป็นสาเหตุการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ผู้ผักได้

ซึ่งขั้นตอนที่ต้องเน้นอย่างยิ่งในการจัดการสุขลักษณะให้ถูกวิธีคือ ขั้นตอนการล้าง เนื่องจากมีการพบว่าทำให้เกิดการกระจายแพร่ของเชื้อได้ ทำให้ความชุกของการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น ซึ่งต้องมีวิธีการแนะนำการล้างด้วยน้ำสะอาด การหมุนเวียนใช้น้ำ และการเติมสารฆ่าเชื้อในน้ำ จะช่วยลดการปนเปื้อนได้ เช่นเดียวกับการใช้อุปกรณ์/เครื่องมือที่สะอาด เน้นการทำความสะอาดที่ถูกวิธีและควรทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ ไม่เพียงแต่การทำความสะอาดเพียงอย่างเดียว และที่สำคัญของวิธีปฏิบัติและสุขลักษณะของโรงงานสัมผัสผักสดจำเป็นต้องมีการฝึกอบรมให้ความรู้ด้านสุขลักษณะเข้าใจการปนเปื้อนและแหล่งการปนเปื้อนเพื่อควบคุมป้องกันไม่ให้มีการเพิ่มจำนวนและปริมาณเพราะท้ายที่สุด หากมีการปนเปื้อนในผักสดแต่แรกไม่ว่าผ่านกระบวนการผลิตในโรงงานก็อาจไม่สามารถขจัดไม่ให้ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนได้ในผักสด

4. ศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *Salmonella* 2 ซีโรวาร์ และ *E. coli* ในปุ๋ยอินทรีย์ประเภทปุ๋ยมูลสัตว์เชิงการค้า

4.1 ความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *Salmonella* 2 ซีโรวาร์ ในปุ๋ยมูลค่างควา

จากการศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *Salmonella* Hvittingfoss (เชื้อผสมสูตรที่ 1) และ *E. coli* กับ *Salmonella* Augustenborg (เชื้อผสมสูตรที่ 2) พบว่า ปริมาณ *E. coli* เริ่มต้น (วันที่ 0) ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C มีค่าเท่ากับ $5.17 \log \text{CFU/g}$ (ภาพที่ 9A) ส่วน อุณหภูมิ พิเศษและปริมาณความชื้นมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 26.30 °C , 7.62 และร้อยละ

8.22 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 13, 14 และ 15) จากการติดตามการรอดชีวิตของเชื้อผสมทั้งสอง ในตัวอย่างปุ๋ยระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่าปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* ที่ผสมกับ เชื้อ *S. Hvittingfoss* ในปุ๋ยมูลค่างความีแนวโน้มลดลง พบว่าในวันที่ 1 และ 9 เชื้อ *E. coli* มีจำนวน ลดลงเท่ากับ 4.22 และ 1.76 log CFU/g ในขณะที่เชื้อ *Salmonella* ทั้งสองซีโรวาร์ จากปริมาณเชื้อ เริ่มต้นคือ 4-5 log CFU/g มีความสามารถในการรอดชีวิตได้ดีกว่า ตรวจพบผลบวกแม้ว่าจะเก็บปุ๋ย ดังกล่าวเป็นเวลา 21 วัน (ตารางผนวกที่ 10) เช่นเดียวกันกับการตรวจสอบปริมาณและ ความสามารถในการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Augustenborg* พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* มีแนวโน้มลดลงในวันที่ 1 และ 9 เท่ากับ 4.51 และ 1.13 log CFU/g ตามลำดับ และตรวจไม่พบในวันที่ 12 ในขณะที่ *Salmonella* ทั้งสองซีโรวาร์ยังคงมีชีวิต รอดอยู่ถึงวันที่ 21

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *S. Hvittingfoss* และ *E. coli* กับ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลค่างควาที่อุณหภูมิสูงขึ้นคือ 40±2 °C อุณหภูมินี้เลียนแบบกองปุ๋ยที่ตากภายใต้แสงแดด (ภาพที่ 9A) พบว่า ในวันที่ 0 วัดอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 36.70 °C , 7.38 และร้อยละ 8.45 ตามลำดับ ปริมาณของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 5.05 – 5.72 log CFU/g เมื่อเก็บรักษาเพียง 1 วัน ปริมาณเชื้อ *E. coli* จะลดลงรวดเร็ว เหลือเท่ากับ 3.07 - 3.15 log CFU/g ไม่สามารถหาปริมาณการรอดชีวิตได้ในปุ๋ยมูลค่างควาที่มีเชื้อ ผสมระหว่าง *E. coli* กับ *S. Hvittingfoss* ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาที่ 40 °C แต่ยังตรวจพบ *E. coli* ในเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *S. Augustenborg* ได้เท่ากับ 0.59 log CFU/g และไม่พบในวันที่ 6 ส่วน *Salmonella* ทั้งสองซีโรวาร์คือ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* พบว่ามีความสามารถ ในการรอดชีวิตได้เพียงแค่ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C

4.2 ความสามารถในการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในปุ๋ยมูลสุกร

การเจริญและรอดชีวิตของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *S. Hvittingfoss* และ *E. coli* กับ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลสุกร (ภาพที่ 9B) พบว่า ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ปริมาณการเจริญและการ รอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลสุกรที่มีเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Hvittingfoss* มีค่าเท่ากับ 4.84 และ 3.02 log CFU/g ในวันที่ 0 และ 3 ตามลำดับ และพบว่า ในวันที่ 9 เซลล์เหลืออยู่เพียง 0.5 log CFU/g ในกรณีเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* ที่ผสมกับเชื้อ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลสุกรมีปริมาณ *E. coli* การเจริญของเชื้อเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 4.71 log CFU/g และในทำนองเดียวกันการรอด

ชีวิตมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 6 เท่ากับ $1.99 \log \text{CFU/g}$ ตรวจไม่พบปริมาณ *E. coli* ในวันที่ 9 ส่วนเชื้อ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* รอดชีวิตได้ดีกว่าคือ ยังพบผลบวกในวันที่ 21 และ 15 ของการเก็บรักษา จากการตรวจวัด อุณหภูมิ พีเอชและปริมาณความชื้นเฉลี่ยของปุ๋ยมูลสุกร มีค่าเท่ากับ 26°C , 6.66 และร้อยละ 17.92 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 13, 14 และ 15) และมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนักตลอดระยะเวลาการเก็บ 21 วัน

ในกรณีของการศึกษาการเจริญและรอดชีวิตของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* กับ *S. Hvittingfoss* หรือ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลสุกรที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ภาพที่ 9B) พบว่าเชื้อ *E. coli* รอดได้เพียง 1 วันเท่านั้นคือ ปริมาณของเชื้อลดลงจากเริ่มต้นเท่ากับ 5.26 และ $4.68 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ โดยที่ อุณหภูมิ พีเอชและปริมาณความชื้น ในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 35.2°C , 6.82 และร้อยละ 30.50 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 13, 14 และ 15) แต่ในขณะที่เชื้อ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลสุกรสามารถอยู่รอดที่ 40°C ได้เพียงวันที่ 3 และตรวจไม่พบในวันที่ 6 (ภาพที่ 10) ผลของข้อ 4.1 ในขณะที่ *Salmonella* spp. ยังสามารถอยู่รอดได้ในปุ๋ยมูลค่างควาในวันที่ 6

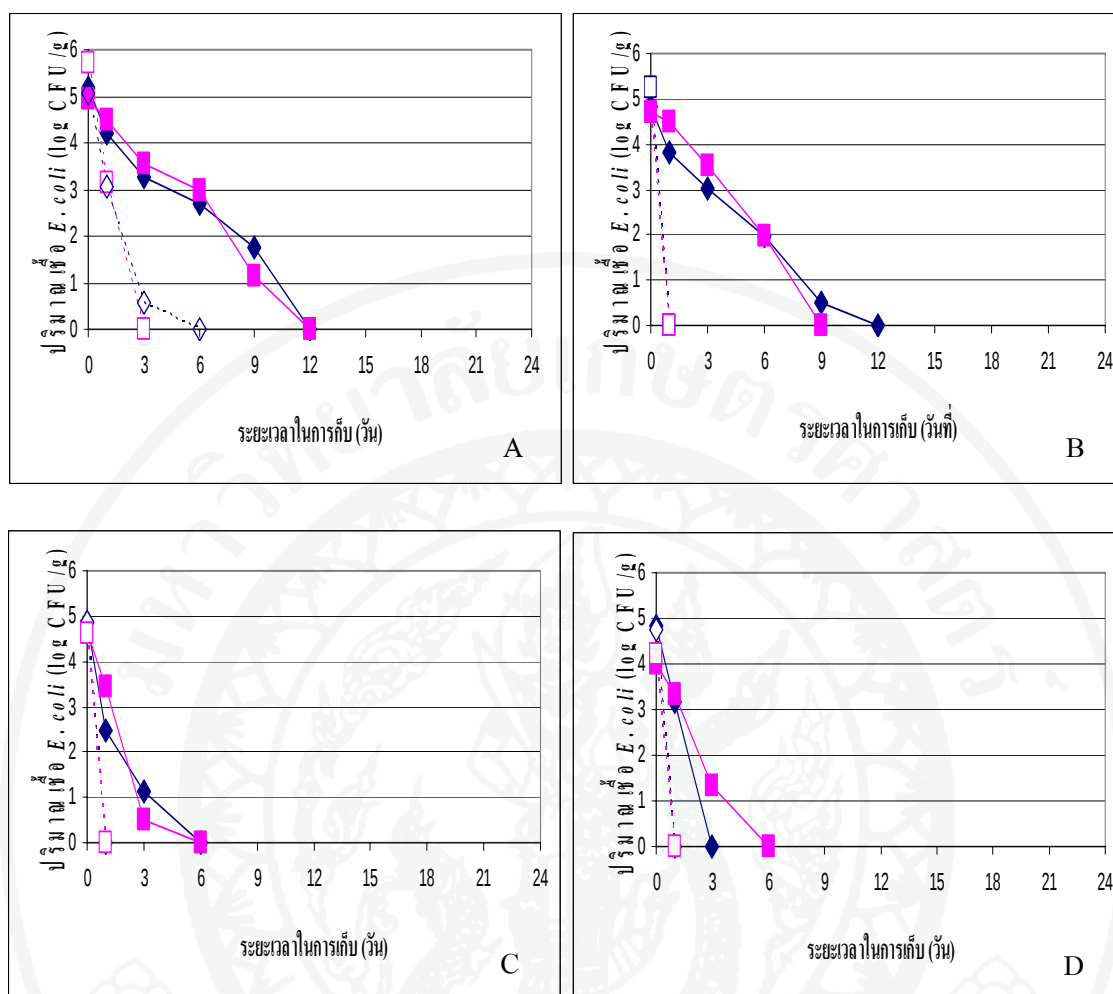
4.3 ความสามารถในการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในปุ๋ยมูลวัว

จากการตรวจวัดอุณหภูมิ พีเอชและปริมาณความชื้นในปุ๋ยมูลวัวเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 26.20°C , 8.76 และร้อยละ 10.12 ตามลำดับ ซึ่งค่าความชื้นมีค่าต่ำกว่าปุ๋ยมูลสุกรอย่างมาก (ตารางผนวกที่ 13, 14 และ 15) ดังนั้นจึงพบว่าปริมาณในการรอดชีวิตของเชื้อผสมที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ พบเชื้อ *E. coli* ที่ผสมกับเชื้อ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 4.85 และ $4.66 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 9C) หลังจากเก็บรักษาปุ๋ยมูลสุกรที่มีเชื้อ *E. coli* ที่ผสมกับเชื้อ *S. Hvittingfoss* วันที่ 1 และ 3 พบว่าเชื้อมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วเท่ากับ 2.49 และ $1.15 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับปริมาณของเชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลวัวที่ผสมกับ *S. Augustenborg* โดยพบว่าการรอดชีวิตลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่ วันที่ 1 และ 3 เท่ากับ 3.40 และ $0.5 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ และตรวจไม่พบปริมาณในวันที่ 6 ส่วนการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* spp. ในปุ๋ยมูลวัวทั้งสองสายพันธุ์คือ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลวัวเก็บที่ 25°C พบว่า เชื้อสามารถอยู่รอดได้จนถึงวันที่ 18 และ 15 ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

ในขณะที่การศึกษาปริมาณการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อผสมในปฏิกูลวัวที่อุณหภูมิ 40 ± 2 °C พบเชื้อ *E. coli* อยู่รอดได้เพียงแค่ 1 วันเท่านั้นคือ จากจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ $4.60 - 5.26 \log \text{CFU/g}$ และค่าอุณหภูมิ พีเอชและปริมาณความชื้นเท่ากับ 38.50 °C, 8.53 และร้อยละ 10.95 ตามลำดับ หลังจากเก็บเป็นเวลา 1 วัน ตรวจไม่พบเซลล์ *E. coli* (ตารางผนวกที่ 13, 14 และ 15) เช่นเดียวกับเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ ตรวจไม่พบในวันที่ 6 ทั้งใน 2 ซิโรวาร์ (ภาพที่ 10)

4.4 ความสามารถในการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในปฏิกูลไก่

จากการตรวจวัดอุณหภูมิ พีเอชและปริมาณความชื้นของปฏิกูลไก่เริ่มต้นในวันที่ 0 ที่อุณหภูมิห้อง มีค่าเท่ากับ 26.3 °C, 6.39 และร้อยละ 16.52 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 13, 14 และ 15) และปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ผสมกับ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* เริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 3.99 และ $4.84 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ โดยปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ผสมกับ *S. Hvittingfoss* มีการเจริญและรอดชีวิตได้ในวันที่ 1 เท่ากับ $3.15 \log \text{CFU/g}$ และไม่สามารถตรวจนับปริมาณของ *E. coli* ได้ในวันที่ 3 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ ปริมาณของเชื้อ *E. coli* ที่ผสมกับเชื้อ *S. Augustenborg* มีแนวโน้มลดลงในวันที่ 1 และ 3 เท่ากับ 3.32 และ $1.35 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ปริมาณของเชื้อ *E. coli* ในปฏิกูลที่ผสมกับ *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* ไม่สามารถตรวจได้ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ในขณะที่ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *S. Hvittingfoss* มากกว่า *E. coli* หลายเท่าสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึงวันที่ 15 (ตารางที่ 11) ส่วนเชื้อ *S. Augustenborg* มีความสามารถในการรอดชีวิตได้ถึงวันที่ 9 แต่ตรวจไม่พบในวันที่ 18 (ตารางที่ 12)



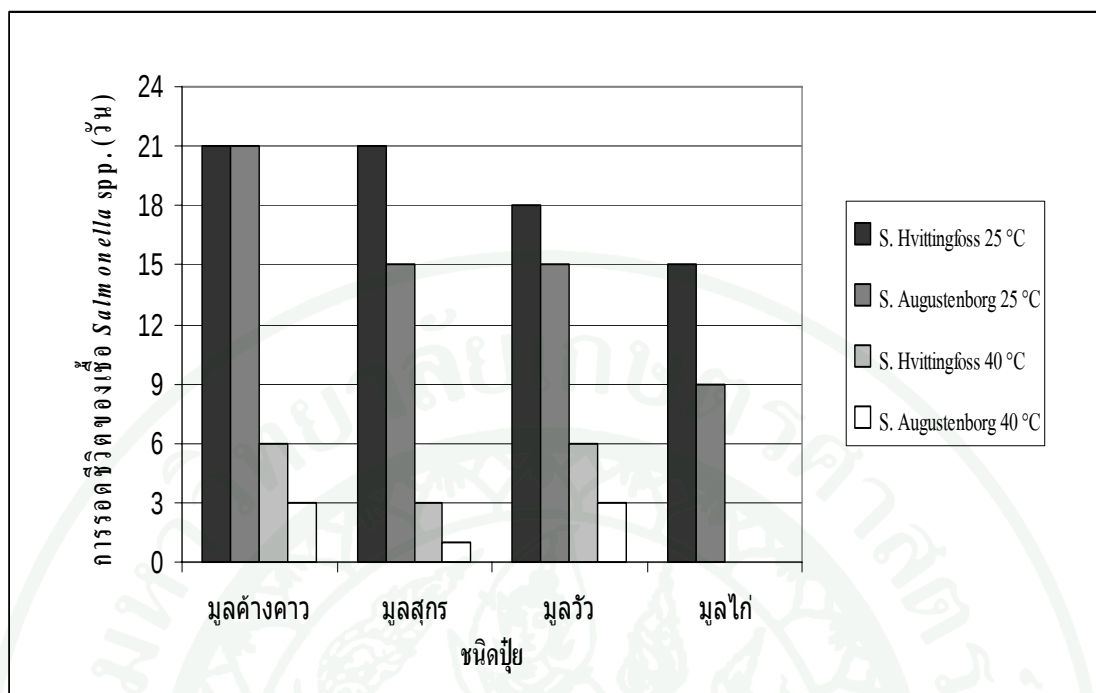
ภาพที่ 9 ปริมาณการรอดชีวิตและการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลค้างคาว (A) ปุ๋ยมูลสุกร (B) ปุ๋ยมูลวัว (C) ปุ๋ยมูลไก่ (D) โดยที่

- ◆—◆ คือ ปริมาณสายพันธุ์ผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Hvittingfoss* ที่ 25 ± 2 °C,
- ◇—◇ คือ ปริมาณสายพันธุ์ผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Hvittingfoss* ที่ 40 ± 2 °C,
- คือ ปริมาณสายพันธุ์ผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Augustenborg* ที่ 25 ± 2 °C,
- คือ ปริมาณสายพันธุ์ผสมระหว่าง *E. coli* และ *S. Augustenborg* ที่ 40 ± 2 °C

การศึกษาการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลไก่ที่อุณหภูมิ 40 ± 2 °C พบว่า จากปริมาณ *E. coli* เริ่มต้นผสมระหว่าง *S. Hvittingfoss* และ *S. Augustenborg* ในวันที่ 0 เท่ากับ 4.75 และ 4.20 log CFU/g ตามลำดับ ตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อดังกล่าวในวันที่ 1 (ตารางผนวกที่ 10) เช่นเดียวกันกับการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 ซีโรวาร์ ไม่พบการอยู่รอดของเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 เป็นต้นไป (ภาพที่ 10)

จากการศึกษาการรอดชีวิตและการเจริญโดยรวมของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. จำนวนสองซีโรวาร์คือ Hvittingfoss และ Augustenborg พบว่า ชนิดของปุ๋ยเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลค่างควาและปุ๋ยมูลสุกรมีการรอดชีวิตที่สอดคล้องกันคือ เชื้อสามารถตรวจนับการรอดชีวิตได้ก่อนถึงวันที่ 12 แต่ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลวัวและมูลไก่สามารถตรวจนับปริมาณได้ก่อนวันที่ 6 ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ปัจจัยต่อมาที่มีผลอย่างมากคืออุณหภูมิ เชื้อผสมทั้ง 2 ชนิดคือ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิ 40°C ได้ในปุ๋ยทั้ง 4 ชนิด เมื่อเก็บไว้เป็นเวลาเกิน 6 วัน จากรายงานพบว่า *Salmonella* spp. สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงสุดคือ 62°C (อรุณและคณะ, 2540; Doyle and Mazzotta, 2000) แต่ในการทดลองนี้เซลล์ไม่สามารถรอดชีวิตแม้ว่าอุณหภูมิจะไม่สูงมากนักเป็นเพราะปัจจัยของความชื้นและปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ย สังเกตได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีชีวิตรอดได้ในปุ๋ยมูลไก่ได้น้อยกว่าปุ๋ยชนิดอื่นๆ (Ottoson *et al.*, 2008)

เนื่องจากปุ๋ยที่นำมาทำการวิจัยในครั้งนี้เป็นปุ๋ยคอกซึ่งเป็นปุ๋ยมูลสัตว์ไม่ทราบข้อมูลส่วนผสมเบื้องต้นตลอดจนในการหมักปุ๋ยดังกล่าว แต่อย่างไรก็ดี จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถทำให้ทราบได้ว่าหากมีเชื้อ *E. coli* หรือ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่กำลังเป็นปัญหาในการปนเปื้อนผักสดเพื่อการส่งออกที่รอดชีวิตหากผ่านการหมักที่สมบูรณ์และป้องกันการปนเปื้อนซ้ำ การตากปุ๋ยมูลสัตว์บริเวณกลางแจ้งแดดซึ่งอุณหภูมิจะสูงประมาณ 40 °C จะช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนและลดจำนวน *Salmonella* spp. ได้ จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเก็บปุ๋ยมูลสัตว์ที่อุณหภูมิ 40 ± 2 °C เป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์สามารถลดปริมาณและการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ทั้งสองซีโรวาร์ลงได้ทั้งในปุ๋ยมูลค่างควา ปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยมูลไก่ (ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตาม ในกรณีปุ๋ยมูลค่างควาเป็นที่น่าสนใจกว่า *Salmonella* spp. รอดชีวิตได้ที่ 25 ± 2 °C นานที่สุด ดังนั้น ควรควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญช่วยลดการเจริญของเชื้อที่ปนเปื้อนมาได้



ภาพที่ 10 ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *S. Hvitittingfoss* และ *S. Augustenborg* ในปุ๋ยมูลค่างควา ปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยไก่ ที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C

ปี ค.ศ. 1997 Pell รายงานว่าเชื้อ *Salmonella* Typhimurium สามารถรอดชีวิตอยู่ในปุ๋ยมูลวัวได้นานกว่าเชื้อ *E. coli* O157: H7 ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 2005 Franz *et al.* พบว่า ปริมาณเส้นใยจากอาหารในปุ๋ยมูลสัตว์ และค่าพีเอชมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยปริมาณของเส้นใยถ้ายังมีในปริมาณมากจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อไม่สามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในรูปเส้นใยได้ จึงสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า เชื้อสามารถรอดชีวิตในปุ๋ยมูลไก่และมูลวัวในช่วงเวลาสั้นทั้งที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C ในขณะที่ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ ทั้ง 2 ชนิด คือ *Salmonella* สองซีโรวาร์ และ *E. coli* ในปุ๋ยมูลค่างควารอดชีวิตได้นานที่สุดถึง 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ปุ๋ยมูลไก่ที่ใช้ในการทดลอง มีส่วนประกอบของฟางและแกลบเป็นจำนวนมากที่สุด ในขณะที่ ปุ๋ยมูลวัว ปุ๋ยมูลสุกรและปุ๋ยมูลค่างควา มีเส้นใยต่ำกว่ามีเศษใบไม้และดินปนอยู่มาก ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการวัดค่าพีเอชและปริมาณความชื้นควบคู่ไปด้วย

ตารางที่ 11 ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *S. Hvittingfoss* ในปุ๋ยมูลสัตว์ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ 40 ± 2 °C ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน

ชนิดปุ๋ยและ สภาวะการเก็บ (°C)		วันที่เก็บตัวอย่าง																	
		0		1		3		6		9		12		15		18		21	
		1 [*]	2 [*]	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
ปุ๋ยมูลค่างคว	25±2	3/3 ^a	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	40±2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3 ^b	0/3 ^c	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ปุ๋ยมูลสุกร	25±2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	1/3	0/3
	40±2	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ปุ๋ยมูลวัว	25±2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	1/3	0/3	0/3
	40±2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ปุ๋ยมูลไก่	25±2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	40±2	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

หมายเหตุ^{*} หมายถึง ผลการทดลองในซ้ำที่ 1 และ 2

^a หมายถึง ให้ผลบวก 3 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

^b หมายถึง ให้ผลบวก 1 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

^c หมายถึง ให้ผลบวก 0 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

ตารางที่ 12 ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *S. Augustenborg* ในปฏิกูลสัตว์ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 และ $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ระหว่างการเก็บรักษา 21 วัน

ชนิดปฏิกูลและ สภาวะการเก็บ ($^{\circ}\text{C}$)		วันที่เก็บตัวอย่าง																	
		0		1		3		6		9		12		15		18		21	
		1 [*]	2 [*]	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
ปฏิกูลค้างคาว	25 ± 2	3/3 ^a	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	40 ± 2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3 ^d	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ปฏิกูลสุกร	25 ± 2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	40 ± 2	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	2/3 ^c	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ปฏิกูลวัว	25 ± 2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3 ^b	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	40 ± 2	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ปฏิกูลไก่	25 ± 2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	40 ± 2	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

หมายเหตุ^{*} หมายถึง ผลการทดลองในซ้ำที่ 1 และ 2

^a หมายถึง ให้ผลบวก 3 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

^b หมายถึง ให้ผลบวก 1 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

^c หมายถึง ให้ผลบวก 2 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

^d หมายถึง ให้ผลบวก 3 ใน 3 ซ้ำจากการทดสอบ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การตรวจปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค MPN - PCR ในตัวอย่างดิน ปุ๋ยและน้ำ พบว่า ดินและปุ๋ยมีปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนเป็นปริมาณมากที่สุด คือ 15 MPN/g ซึ่งการปนเปื้อนของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมีความชุกประมาณร้อยละ 33.33 แตกต่างจากปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในน้ำที่ทำการเพาะปลูกคือพบปริมาณการปนเปื้อนที่สูงที่สุดเท่ากับ 7.4 MPN/ml แต่จำนวนตัวอย่างที่มีความชุกสูงคิดเป็นร้อยละ 53.33 ปริมาณความชุกของน้ำที่มีการปนเปื้อนจึงอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp. ผู้ฝึกได้ในช่วงการเพาะปลูกสูงกว่าการใช้ปุ๋ยและการปนเปื้อนจากดิน พบว่าหากแหล่งน้ำสะอาด เช่น ในกรณีแปลงผักที่มีแหล่งน้ำที่ใช้เป็นน้ำบาดาล ปริมาณการปนเปื้อนและความชุกของตัวอย่างน้ำที่รดผักปนเปื้อนน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด ในกรณีของผักสดซึ่งรวมทั้งโหระพาและผักที่ปนเปื้อนในขั้นตอนก่อนล้างจนกระทั่งถึงขั้นตอนการส่งออก พบว่าความชุกและปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการปนเปื้อนที่เพิ่มขึ้นของโหระพาและผักที่เพิ่มจากขั้นตอนล้างจนถึงออกจากโรงงานโดยเฉลี่ยเท่ากับ 6.69 และ 9.69 MPN/g ตามลำดับ ซึ่งปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อที่เพิ่มขึ้นนั้นปัจจัยสำคัญคือ ขั้นตอนการล้างและการตัดแต่งที่ปนเปื้อนเพิ่มจากอุปกรณ์ ผู้สัมผัสผัก โดยปริมาณความชุกน้ำที่ใช้ล้างผักทั้ง 2 ชนิดพบการปนเปื้อนได้มากถึงร้อยละ 50

2. จากการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. จากกระบวนการผลิตโหระพาเพื่อการส่งออก รวม 11 ไอโซเลต พบ *S. Aberdeen* (Group F) และ *S. Bovismorbifican* (Group C) จากตัวอย่างถุงมือและโต๊ะตัดแต่ง นอกจากนี้ *S. Hvittingfoss* (Group I) และ *S. II17: g, t: - (O: 17)* (Group J) ถูกคัดแยกได้จากโหระพาก่อนล้างและแบ่งบรรจุผักสด ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างจากกระบวนการผลิตผักเพื่อการส่งออกสามารถคัดแยก *S. Augustenborg* (Group C) ได้จากตัวอย่างผักก่อนล้าง หลังซักรากและคัดแยก *S. III: 48: 1, v: 1, 5, 7 (O: 48)* ได้จากตัวอย่างผักที่ก่อนล้างและโต๊ะตัดแต่ง ซึ่งผลการคัดแยกชี้ให้เห็นว่าขั้นตอนของการล้างและการตัดแต่งมีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบ *S. Newport* (Group C) และ *S. Albany* (Group C) จากตัวอย่างผักที่หลังล้างและน้ำที่ใช้ในแปลงเพาะปลูกอีกด้วย ในกรณีผักสดส่งออกคัดแยกเชื้อ *S. Singapore* (Group C) ได้จากทั้งโหระพาและผักที่พร้อมส่งออกและ *S. Weltevreden*

(Group E) ได้จากโหระพาพร้อมส่งออก สายพันธุ์ที่ตรวจพบสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่ระบุว่าเป็นตัวอย่างผักสดส่งออกและทำให้เกิดปัญหาในช่วงปี 2005 - 2008 คือ สายพันธุ์ Augustenborg และ Weltevrede

3. จากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อผสมระหว่าง *E. coli* และ *Salmonella* spp. 2 ซีโรไทป์ คือ Hvittefoss และ Augustenborg ซึ่งเป็นตัวแทนจากแปลงโหระพาและแปลงผักชี ตามลำดับ พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลค้างคาวและปุ๋ยมูลสุกรมีชีวิตรอดได้นานถึงวันที่ 12 แต่ในขณะที่ ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยมูลไก่พบการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* สั้นกว่า เชลล์มีชีวิตรอดได้ถึงวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ส่วนการศึกษาที่อุณหภูมิ 40 ± 2 °C พบว่า เชื้อ *E. coli* ในปุ๋ยมูลค้างคาวสามารถพบการรอดชีวิตได้ในวันที่ 6 แต่ในปุ๋ยมูลสุกร ปุ๋ยมูลวัว และปุ๋ยมูลไก่ ตรวจไม่พบการรอดชีวิตหลังจากวันที่ 1 ของการเก็บรักษา ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* ให้ผลสอดคล้องกับเชื้อ *Salmonella* spp. โดยพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C *Salmonella* spp. ในปุ๋ยมูลค้างคาวและปุ๋ยมูลสุกรมีชีวิตรอดได้นานถึงวันที่ 21 ในขณะที่ปุ๋ยมูลวัวและปุ๋ยมูลไก่ เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ถึงวันที่ 18 และ 15 ตามลำดับ จากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 40 ± 2 °C พบว่า ปุ๋ยมูลค้างคาวและปุ๋ยมูลวัวสามารถตรวจการรอดชีวิตได้ถึงวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ในกรณีของปุ๋ยมูลไก่ไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 2 ซีโรวาร์ ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเก็บรักษา สรุปได้ว่า อุณหภูมิของการเก็บรักษาปุ๋ยเป็นปัจจัยหลักในการอยู่รอดของเชื้อก่อโรคได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในปุ๋ยมูลสัตว์ ปัจจัยรองลงมาคือ ชนิดของปุ๋ย โดยเฉพาะชนิดมูลสัตว์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของปุ๋ยคอก โอกาสในการอยู่รอดของเชื้อจะลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนของการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี PCR (Polymerase chain reaction) ควรระมัดระวังปัญหาการปนเปื้อนจาก DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยต้องการควบคุมสภาพปลอดเชื้อเป็นอย่างดี เนื่องจาก DNA อาจมีการปนเปื้อนลงสู่ส่วนประกอบของปฏิกิริยาเช่น ไพร์เมอร์ หรือ เอนไซม์ DNA polymerase เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากสารต่างๆ ในปฏิกิริยามีราคาก่อนข้างสูงการผิดพลาดของเทคนิคปฏิบัติทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ในระหว่างทำการทดลองควรควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำอยู่เสมอ (4 °C) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาก่อนนำเข้าเครื่อง PCR และทำให้พบปัญหาแถบ DNA ไม่แสดงผลบ่อยครั้ง ซึ่งปัญหาส่วนมากเกิดจากการขาดการระมัดระวังในขั้นตอนเปิดตัวอย่างจากหลอดที่มีสาร Chelex ติดมากับตัวอย่าง ซึ่งสารดังกล่าวมีผลไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวคือ พยายามเปิดตัวอย่างบริเวณผิวหน้าตัวอย่างเพื่อไม่ให้สารละลายฟุ้งกระจาย

2. วิธีการมาตรฐานในการตรวจ เชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อต้องการที่จะทราบผลว่าตรวจพบหรือไม่พบในสินค้าที่ต้องการส่งออกไปยังต่างประเทศ ซึ่ง ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 4 – 6 วัน จึงจะทราบผล ในกรณีของอาหารที่มีอายุการเก็บการเก็บสั้นเช่น ผักสดมีความจำเป็นต้องทราบผลการตรวจในระยะเวลาสั้นและแน่นอนเพื่อที่จะส่งออกได้โดยไม่มีปัญหาการติดกลับของสินค้า เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ได้ผลได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำมากกว่าการตรวจเชื้อด้วยวิธีการมาตรฐาน โดยใช้เวลาประมาณ 1 วันครึ่งในการตรวจเพื่อที่จะทราบผลว่าให้ผลเป็นบวกหรือลบ เทคนิคนี้ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในแถบประเทศที่มีการพัฒนา และคาดว่าในอีกไม่นานนักประเทศไทยมีแนวโน้มยอมรับและปรับให้เป็นวิธีตรวจสอบ เพื่อใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อที่ต้องการทราบผลในระยะเวลาสั้น

3. อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้แม้จะได้ดำเนินการตามวิธีมาตรฐานแต่ขั้นตอนวิธีการในการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในกระบวนการผลิตผักสดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RV broth เพียงชนิดเดียว หากสามารถเพิ่มชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเช่น ทดสอบ ร่วมกับ Tetrathionate (TT) broth หรือ Selenite cystine (SC) broth เชื่อว่าจะคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี PCR ให้ได้มากยิ่งขึ้น

4. จากการศึกษาความสามารถในการเจริญและรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในครั้งนี้มีข้อจำกัดในเรื่องเวลาจึงใช้เวลาในการศึกษาก่อนข้างสั้น ซึ่งกำหนดอายุการเก็บ 21 วัน คาดว่าหากสามารถทดสอบได้มากกว่านี้จะสามารถตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ในปฏิกูลสัตว์ ที่ 25 ± 2 °C เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้ควรกำหนดปัจจัยในการอยู่รอดอื่นๆ ร่วมด้วย นอกเหนือจากอุณหภูมิ เช่น ความชื้น พีเอช เป็นต้น



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2537. คุณค่าทางอาหารของปุยคอก

แหล่งที่มา : <http://www2.doae.go.th/www/work/web/kannika/page1.htm>, 19 ตุลาคม 2551.

กรมวิชาการเกษตร. 2549. สถิติการส่งออกผักสด: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. เอกสารวิชาการ.

ชนวน รัตนวราหะ และ ประเวศ แสงเพชร. 2532. ตารางธาตุอาหารของปุยคอก

แหล่งที่มา : <http://www.panmai.com/Tip/Tip03/Tip03.shtml>, 23 ตุลาคม 2551

นิรนาม. 2551. ปุยคอก แหล่งที่มา: <http://www.doae.go.th/spp/biofertilizer/or9.htm>,

23 ตุลาคม 2551

ปิยาณี จันทปัญญาศิลป์. 2542. ประสิทธิภาพของสารประกอบคลอรีนร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลดปริมาณ *Escherichia coli* ในผักสด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดาพร เทียบจัตุรัส. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโซเดียมคลอไรด์และคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* บนข้าวโพดฝักอ่อนและหน่อไม้ฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุคสาย ศรีวานิช และ สายพิน ทานัชนาลัย. 2546. การประยุกต์ใช้ PCR และ Biosensor สำหรับการตรวจสอบอันตรายในอาหาร. สุทธิสารการพิมพ์. กรุงเทพฯ.

สุทธิพร พิริยานน, เกศยา ศรีอำไพ และ กำธร ศิลปนรเศรษฐ์. 2541. การศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์เชื้อ ซาลโมเนลลาในอาหารสัตว์โดยวิธี MSRV และวิธีการเพาะเชื้อ, น. 439-447. ใน รายงานประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมนหา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
กรุงเทพฯ.

อรุณ ปางตระกูลนนท์, นพรัตน์ หมานริม และ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์. 2540. การตรวจเชื้อ
Salmonella ในอาหารและผลิตภัณฑ์: ผลการสำรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในประเทศไทย, น.
1-60. ใน รายงานการสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าในการตรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ, 14
ตุลาคม 2540. โรงแรมเซ็นทรัลพลาซ่า, กรุงเทพฯ.

A.A.C.C. 2000. **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**. 10th
ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

A.O.A.C. 2000. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical
Chemist**. 11th ed., The Association of Official Analytical Chemists: Washington, D.C.

Aggarwal, P., S. M. Singh and M. M. Bhattaharya. 1985. An outbreak of food poisoning in a
family due to *Salmonella* Weltevreden at Delhi. **J. of Diarrhoeal Diseases Research**. 3:
224-225.

Arrus, K. M., R. A. Holley, K. H. Ominski, M. Tenuta and G. Blank. 2006. Influence of
temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature
profiles in farm manure storage reservoirs. **J. of Livestock Sci**. 102: 226 – 236.

Banwart, G.J. 1981. **Basic Food Microbiology**. AVI Publishing Company, Inc. 781p.

Guthrie, R. K. 1991. *Salmonella*. CRC Press. N.W. Boca Raton, Florida.

Berrang, M. E., R. E. Brackett and L. R. Beuchat. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on
fresh vegetable stored under controlled atmosphere. **J. Food Prot**. 52: 702-705.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **J.
Food Prot**. 59 (2): 204-216.

- Brackett, R.E. 2000. **Safe Handling of Fruits and Vegetables**. In: Farber, J.M., and E.C.D. Todd. (Editors), *Safe Handling of Foods*. New York; Marcel Dekker, Inc. 79-103 p.
- Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News**. 62:118-119.
- Cheasty, T. and B. Rowe. 1983. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152 and O164 and *Shigella* O antigens. **J. Clin. Microbiol.** 17: 681 – 684.
- Cherry, W. B., J. B. Hank, B. M. Thomason, A. M. Murlin, J. W. Biddle and J. M. Croom. 1972. Salmonellae as an index of pollution of surface waters. **J. of Appl. Microbiol.** 24: 334 – 340.
- Clover, O. D. and M. P. Doyle. 1990. **Foodborne Disease**. Academic Press, Inc. New York.
- Doyle M. E. and A. S. Mazzotta. 2000. Review of studies on the thermal resistance of Salmonellae. **J. Food Prot.** 63: 779-795.
- FDA-BAM. 2001. **Bacteriological Analytical Manual**. Food and Drug Administration. Published and Distributed by MPN table. MD, USA.
- FDA-BAM. 2006. **Bacteriological Analytical Manual**. Food and Drug Administration. Published and Distributed by AOAC International. MD, USA.

- Franz, E., A. D. van Diepeningen, O. J. de Vos and A. H. C. van Bruggen. 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil and lettuce. **Appl. and Environ. Microbiol.** 71(10): 6165-6174.
- Foltz, V. D. 1969. *Salmonella* ecology. **J. of A. O. C. S.** 46: 222-224.
- Guan, T. Y. and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness. **Rev. in Environmental Quality.** 32: 383-392.
- Guthrie, R. K. 1991. **Salmonella**. CRC Press. N.W. Boca Raton, Florida.
- Houang, E., P. Bodnaruk and Z. Ahmet. 1991. Hospital green salads and the effects of washing them. **J. Hosp. Infect.** 17: 125-131.
- ICMSF. 1996. **Micro-organisms in Foods: Vol. 5 Microbiological Specifications of Food Pathogens.** 1st ed. Blackie Academic and Professional, London.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrot and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Applied Environ Microbiol.** 70 (4): 2497-2502
- ISO. 2002. **International Standard ISO 6579.** Microbiology – guidance on method for the detection of *Salmonella*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Jerngklinchan, J. and K. Saitanu. 1993. The occurrence of Salmonellae in bean sprouts in Thailand. **Southeast Asian J. of Tropical Medicine and Public Health.** 24: 114-118.

- Jones, P. W. 1986. Sewage sludge as a vector of Salmonellosis. In J. C. Block, A.H. Haielaar, L' Hermite, (eds.), **Epidemiological studies of risks associated with, the agricultural use of sewage sludge**. Elsevier, London, pp. 21 – 33.
- Jiang, X., J. Morgan and M. P. Doyle. 2003. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cow manure compost. **J. Food Prot.** 66 (10): 1771-1777.
- Johnston, L.M., L.A. Jaykus, D. Moll, M.C. Martinez, J. Anciso, B. Mora and C. L. Moe. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. **J. Food Prot.** 68: 1840-1847.
- Liu, T., K. Olojebjelke, E. Bartlett, C. Hofacre, S. Sanchez and J.J. Maurer. 2002. Application of nested Polymerase Chain Reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. **J. Food Prot.** 65: 1227-1232.
- Madden, J. P. 1992. Microbial pathogens in fresh produce the regulatory perspective. **J. Food Prot.** 55: 821-823.
- Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge and R. Helmuth. 2003a. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. **Appl. Environ. Microbiol.** 69(1): 290-296.
- Malorny, B., J. Hoorfar, M. Hugas, A. Heuvelink, P. Fach, L. Ellerbroek, C. Bunge, C. Dorn and R. Helmuth. 2003b. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR – based method. **J. of Food Microbiol.** 89: 241 – 249.
- Natvig, E.E., S.C. Ingham, B.H. Ingham, L.R. Cooperband and T.R. Roper. 2002. *Salmonella enterica* serovars Typhimurim and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 2737-2744.

Oliveira, S.D., L.R. Santos, D.M.T. Schuch, A.B. Silva, C.T.P. Salle and C.W. Canal. 2002.

Detection and identification of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR. **Vet.**

Microbiol. 87 : 25-35.

Ottoson, J., A. Nordin, D. Von Rosen and B. Vinneras. 2008. *Salmonella* reduction in manure by the addition of urea and ammonia. **J. Bioresource Technology.** 99: 1610-1615.

Pell, A. N. 1997. Manure and microbes: Public and animal health problem. **J. Dairy Sci.** 80: 2673-2681.

Pelzer, K. D. 1989. Salmonellosis. **J. of Veterinary Medical Association.** 195: 456 – 463.

RASFF. 2009. **Rapid alert System for Food and Feed.** Alert Notifications. Available Source: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/archive_en.htm; Aug 2, 2009.

Roberts, T. A., A. C. B. Parker and R. B. Tompkin. 1996. **Micro-organisms in Food 5: Microbiological Specification of Food Pathogen.** Blakie Academic & Professional, London.

Robinson, R. K., C. A. Balt and P. D. Patel. 2000. **Encyclopedia of Food Microbiology.** Academic Press. New York.

Ruiz, B. G. V., R. G. Vargas and R. G. Villanova. 1987. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. **Int. J. Food Microbiol.** 4: 285-291.

Rushing, J. W., F.J. Angulo, and L. R. Beuchat. 1996. Implementation of a HACCP program in a commercial fresh-market tomato packinghouse: a model for the industry. **Dairy Food Environ. Sanit.** 9: 549-553.

Salleh, N. A., G. Rusul, Z. Hassan, A. Reezal, S. H. Isa, M. Nishibuchi and S. Radu. 2003.

Incidence of *Salmonella* spp. In raw vegetables in selangor, Malaysia. **J. Food Control**. 14: 475-479.

Singh, N., R.K. Singh, A.K. Bhunia. and R.L. Stroshine. 2002. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Eshcerichia coli* O157:H7. **J. Food Microbiol**. 19: 183-193.

Tauxe, R. V. 1991. *Salmonella* : A postmodern pathogen. **J. Food Prot**. 54 (7): 563-568.

Turpin, P. E., K. A. Maycoft, C. L. Rowlands and W. E. Mott. 1993. Viable but non culturable Salmonellas in soil. **J. of Appl. Bact**. 74: 421-427.

Varnam, A. H. and M. G. Evans. 1991. **Foodborne Pathogens : An Illustrated Text**. Wolfe, London. 557 p.

Vierstraete, A. 1999. **Principle of the PCR**.

Available Souce : <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, November 8, 1999.

Yasin, R. M., M. M., Jegathesan, and C. C., Tiew. 1997. *Salmonella* serotypes isolated in Malasia over the ten-year period. **Asia Pacific J. of Public Health**. 9: 1-5.

Yen, L. H., L. C. Chai, S. Y. Tang, S. Jinap, F. M. Ghazali, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi and R. Son. 2009. Application of MPN-PCR in biosafety of *Bacillus cereus s.l.* for ready-to-eat cereals. **Food Control**. 20: 1068-1071.

Ziprin, R. L. 1994. *Salmonella*. In Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murrel and D. O. Cliver(eds). **Foodborne Disease Handbook Vol 1. Diseases caused by bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.





ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase soy broth (TSB, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	17.0	กรัม
Peptone from soymeal	3.0	กรัม
D (+) Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

2. Diluent (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from meat	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นให้เข้ากัน ใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

3. สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Sodium chloride	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

4. Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, Difco Laboratories, USA)

Yeast extract	3.0	กรัม
L-Lysine	5.0	กรัม
Xylose	3.5	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Saccharose	7.5	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง ห้าม
นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อให้หนาพอประมาณ

5. Rappaport - Vassiliadis (RV) Broth (Difco Laboratories, U.S.A.)

Pancreatic digest of casein	4.54	กรัม
Sodium chloride	7.2	กรัม
Monopotassium phosphate	1.45	กรัม
Magnesium chloride (anhydrous)	13.4	กรัม
Malachite green oxalate	0.036	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นให้เข้ากัน ใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
ที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 15 นาที

6. Hektoen Enteric (HE) agar (Difco Laboratories, U.S.A.)

Proteose peptone	12.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Bile salt No. 3	9.0	กรัม
Lactose	12.0	กรัม
Saccharose	12.0	กรัม
Salicin	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulfate	5.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	1.5	กรัม
Agar	14.0	กรัม
Bromthymol blue	0.065	กรัม
Acid fuchsin	0.1	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง ห้าม
นำเข้าหม้อน้ำมาเชื้อ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อให้หนาพอประมาณ

7. Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone	2.0	กรัม
Glucose	0.1	กรัม
Lactose	1.0	กรัม
Sucrose	1.0	กรัม
Ferrous ammonium phosphate	0.02	กรัม
Sodium chloride	0.5	กรัม
Phenol red	0.0025	กรัม
Agar	1.5	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

8. Lysine Iron Medium (LIM) (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from meat	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
D (+) glucose	1.0	กรัม
L – lysine monohydrochloride	10.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.04	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	0.5	กรัม
Bromocresol purple	0.02	กรัม
Agar	12.5	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

9. MacConkey agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	17.0	กรัม
Peptone from meat	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bile salt mixture	1.5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	13.5	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

10. Nutrient agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที



ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของปฏิมูลสัตว์

1. การวิเคราะห์ความเป็นกรดเบสหรือค่าพีเอช (AOAC, 2000)

วิธีตรวจสอบพีเอช ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 5 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml เติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้ววัดด้วย Jenco model 6071 ทำการวัดพีเอชของปฏิมูลสัตว์เริ่มต้นของการเก็บรักษา (วันที่ 0) และระหว่างการเก็บรักษาในวันที่ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21

2. การหาปริมาณความชื้น (AACC, 2000)

เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

2.1.2 ภาชนะใส่ตัวอย่าง (Moisture can)

2.1.3 เดซิเคเตอร์ (Desiccator)

วิธีการวิเคราะห์

ทำแห้งภาชนะใส่ตัวอย่างพร้อมฝา ในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็นลงแล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

ชั่งตัวอย่างปฏิมูลสัตว์ลงในภาชนะใส่ตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 – 3 g นำไปใส่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปิดฝาภาชนะไว้ เมื่อครบเวลาแล้ว นำออกจากตู้อบลมร้อน ปิดฝาแล้วนำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ทันที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง (ปกติ 45 – 60 นาที) แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป โดยที่ A เป็น น้ำหนักที่หายไป (กรัม) และ B เป็น น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (g) ดังนี้

$$\text{ร้อยละของความชื้น (moisture)} = (A/B) \times 100$$



ภาคผนวก ค
วิธีการเตรียมสารในปฏิกิริยา PCR

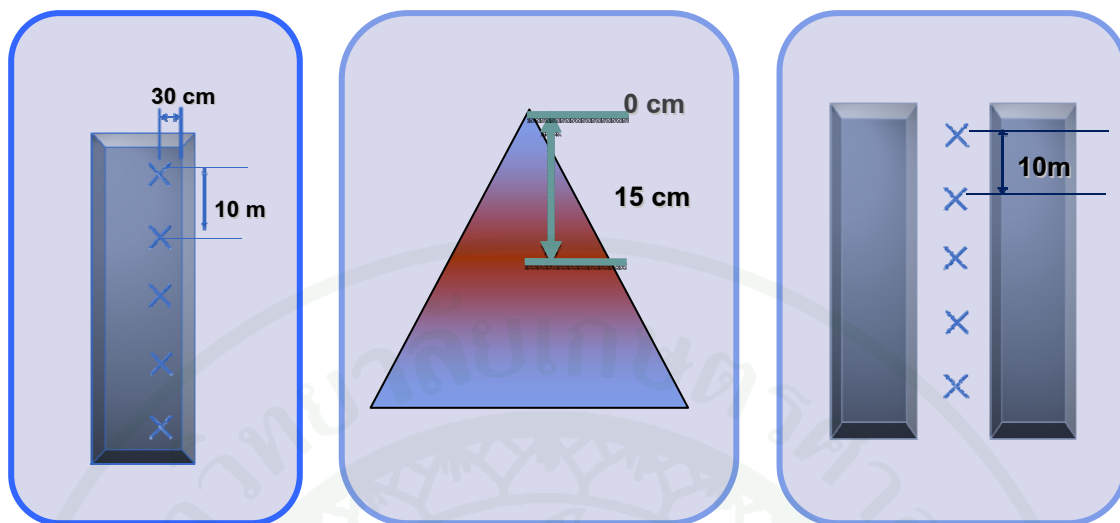
สูตรและวิธีการเตรียมสารในปฏิกิริยา PCR

ตารางผนวกที่ ค1 ปริมาณและความเข้มข้นของส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR

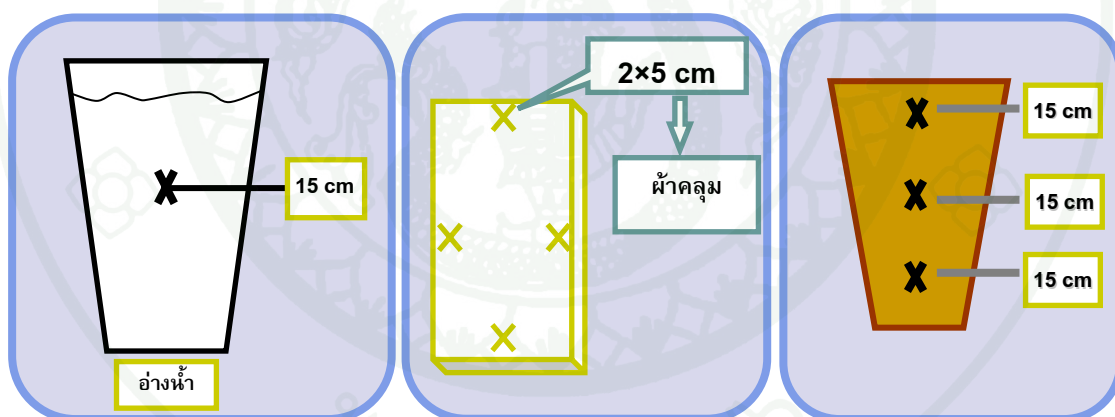
ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาณสาร (μl) / 1 ปฏิกิริยา
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	13.85
10×Buffer (MgCl ₂ free)	2.5
Magnesium chloride (MgCl ₂) 50 mM	0.75
Deoxynucleotidetriphosphate (dNTP 2.5 mM)	2
Primer <i>invA</i> -139 (20 μM)	0.25
Primer <i>invA</i> -141 (20 μM)	0.25
IAC (300 copies/μl)	0.25
Platinum Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.15
รวมปริมาตร	20
ปริมาตร DNA	5
ปริมาตรทั้งหมด	25

ปิเปตส่วนผสมของสารแต่ละชนิดลงในหลอด microcentrifuge โดยปิเปต DNA polymerase เป็นส่วนประกอบสุดท้ายและสารละลายต้องเตรียมในอุณหภูมิต่ำในกล่องน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ปิเปตส่วนประกอบที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลอด PCR strip tube ปริมาตร 20 μl หลังจากนั้นปิเปตตัวอย่าง DNA ต้นแบบปริมาตร 5 μl ลงบริเวณขอบ strip tube และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ DNA ต้นแบบลงไปรวมกับสารที่เตรียมไว้ก่อนนำตัวอย่างลงเครื่อง PCR





ภาพผนวกที่ ง1 การเก็บตัวอย่าง ดิน ปุ๋ย น้ำในแปลงเพาะปลูก



ภาพผนวกที่ ง2 การเก็บตัวอย่าง น้ำล้างผัก ผักคลุมผักและผักสดจากภาชนะ



ภาพผนวกที่ 3 การเก็บตัวอย่างจากถุงมือ/มือ กรรไกรตัดแต่ง ภาชนะบรรจุผักสด

การเตรียมตัวอย่าง

ดิน: เก็บตัวอย่างดินจากแปลงเพาะปลูก (ก่อนหว่านเมล็ด) จุกละ 100 g เป็นจำนวน 10 จุก โดยแต่ละจุกที่เก็บควรมีระยะห่างจากกันประมาณ 10 m ผสมดินทั้ง 10 จุก เข้าด้วยกันแล้วสุ่มเก็บตัวอย่างอีกครั้งประมาณ 250 g ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อแล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ

ปุ๋ย: เก็บตัวอย่างปุ๋ยมูลสัตว์จากกอง โดยเก็บตัวอย่างปุ๋ยที่มีความลึกจากผิวน้ำกองประมาณ 15 cm ประมาณ 10 จุก จุกละ 10 g แล้วผสมให้เข้ากันจากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อประมาณ 250 g เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ

น้ำที่ใช้ในแปลงเพาะปลูก: เก็บตัวอย่างน้ำจากท้องร่องในกรณีของแปลงโรหะพา โดยที่แต่ละจุกที่เก็บตัวอย่างควรมีระยะห่างกันประมาณ 10 m เป็นจำนวนจุกละ 250 ml

ผักสด: เก็บตัวอย่างผักสดก่อนล้างน้ำ หลังล้างน้ำ หลังซัดราก (กรณีผักชี) และหน้าโรงงานจากภาชนะบรรจุผักจุกละ 1 - 2 กำ (น้ำหนักประมาณ 400-600 g) แต่ละจุกที่เก็บตัวอย่างห่างกันประมาณ 15 cm ใส่ตัวอย่างผักสดลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อและส่งตัวอย่างตรวจที่ห้องปฏิบัติการ



ตารางผนวกที่ จ1 ตาราง most probable number (MPN) ต่อกรัมของตัวอย่าง ใช้ชุดละ 3 หลอด แต่ละหลอด dilution มีเนื้อตัวอย่างหลอดละ 0.1, 0.01 และ 0.001 g/ml ตามลำดับ

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1 g/ml	0.01 g/ml	0.001 g/ml	MPN/g, ml
0	0	0	<3.0
0	0	1	3.0
0	0	2	6.0
0	0	3	9.0
0	1	0	3.0
0	1	1	6.1
0	1	2	9.2
0	1	3	12.0
0	2	0	6.2
0	2	1	9.3
0	2	2	12.0
0	2	3	16.0
0	3	0	9.4
0	3	1	13.0
0	3	2	16.0
0	3	3	19.0
1	0	0	3.6
1	0	1	7.2
1	0	2	11.0
1	0	3	15.0
1	1	0	7.3
1	1	1	11.0
1	1	2	15.0
1	1	3	19.0

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1 g/ml	0.01 g/ml	0.001 g/ml	MPN/g, ml
1	2	0	11.0
1	2	1	15.0
1	2	2	20.0
1	2	3	24.0
1	3	0	16.0
1	3	1	20.0
1	3	2	24.0
1	3	3	29.0
2	0	0	9.1
2	0	1	14.0
2	0	2	20.0
2	0	3	26.0
2	1	0	15.0
2	1	1	20.0
2	1	2	27.0
2	1	3	34.0
2	2	0	21.0
2	2	1	28.0
2	2	2	35.0
2	2	3	42.0
2	3	0	29.0
2	3	1	36.0
2	3	2	44.0
2	3	3	53.0
3	0	0	23.0
3	0	1	39.0

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			
0.1 g/ml	0.01 g/ml	0.001 g/ml	MPN/g, ml
3	0	2	64.0
3	0	3	95.0
3	1	0	43.0
3	1	1	75.0
3	1	2	120.0
3	1	3	160.0
3	2	0	93.0
3	2	1	150.0
3	2	2	210.0
3	2	3	290.0
3	3	0	240.0
3	3	1	460.0
3	3	2	1100.0
3	3	3	>1100.0

ที่มา: FDA-BAM (2001)



ตารางผนวกที่ ๑๑ ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดิน ปุ๋ย และน้ำจากแปลงเพาะปลูกโหระพา

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในดิน			ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ย			ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/ml)	ยีสต์และรา (log CFU/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/ml)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/ml)	ยีสต์และรา (log CFU/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/ml)
1	7.19	5.11	< 3.0	7.88	5.96	< 3.0	4.24	1.53	<0.3
2	7.76	4.95	7.2	7.80	6.30	< 3.0	4.50	1.19	<0.3
3	7.61	4.15	3.6	8.48	5.06	11	5.17	1.31	0.36
4	7.19	4.74	< 3.0	8.28	6.52	< 3.0	4.98	1.88	<0.3
5	7.20	5.06	11	8.40	6.13	< 3.0	4.71	1.70	0.61
6	7.72	4.88	15	9.64	6.88	< 3.0	3.30	1.30	<0.3
7	7.03	4.88	< 3.0	8.16	6.10	15	3.97	2.19	1.1
8	6.93	5.20	7.4	7.84	5.86	< 3.0	3.89	1.48	0.3
9	6.93	5.06	< 3.0	8.20	5.46	7.4	3.77	2.26	<0.3
10	6.61	4.65	< 3.0	8.14	8.14	< 3.0	4.04	4.04	0.61
11	6.86	5.06	< 3.0	8.64	8.64	< 3.0	4.02	4.02	<0.3
12	6.93	3.95	< 3.0	6.89	7.89	6.1	4.08	4.08	0.3
13	6.80	4.24	< 3.0	7.71	6.28	< 3.0	3.94	1.36	3
14	7.01	5.04	< 3.0	8.54	5.78	< 3.0	3.95	1.34	7.4
15	6.75	4.41	< 3.0	9.01	5.89	< 3.0	3.89	1.19	<3

ตารางผนวกที่ ๑๒ ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างโหระพาในกระบวนการผลิต

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในผักก่อนล้าง			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักหลังล้าง			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักหน้าโรงงาน		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)
1	6.92	5.05	< 3.0	5.96	5.29	7.2	6.21	5.00	20.0
2	5.79	5.18	< 3.0	5.08	4.90	15.0	6.29	5.17	9.2
3	6.00	4.94	< 3.0	4.73	4.85	9.1	5.97	5.07	3.0
4	6.34	5.23	3.6	4.96	4.88	35.0	6.24	4.98	3.0
5	5.72	4.61	3.6	5.47	4.98	160.0	6.28	5.00	< 3.0
6	5.53	6.15	3.6	5.89	5.73	7.3	5.93	5.11	< 3.0
7	5.94	6.06	< 3.0	4.67	5.73	20.0	6.59	5.83	< 3.0
8	5.69	6.05	< 3.0	4.75	5.82	3.6	5.81	5.97	3.0
9	6.59	6.06	< 3.0	6.75	5.88	11.0	6.59	5.88	3.0
10	5.11	6.10	6.0	6.00	5.86	210.0	5.43	5.81	< 3.0

ตารางผนวกที่ ๓3 ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างอุปกรณ์บริเวณตัดแต่งโพระพา

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในถุงมือ			ปริมาณจุลินทรีย์ในโต๊ะตัดแต่ง			ปริมาณจุลินทรีย์ในกรรไกร		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/10 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/10 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/10 cm ²)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/50 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/50 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/50 cm ²)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/10 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/10 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/10 cm ²)
1	6.29	3.24	<3.0	3.75	1.35	15	7.34	3.68	<3
2	6.57	3.48	3	4.64	2.42	11	7.33	3.77	16
3	6.84	3.42	3.6	3.57	1.11	11	7.15	3.38	<3
4	6.06	2.81	3	3.79	1.32	3	7.06	3.62	11
5	4.15	2.49	3.6	4.23	2.57	3	7.36	3.80	7.2
6	7.84	4.83	3.6	6.06	2.33	29	8.03	2.69	<3
7	7.62	4.68	7.2	7.19	3.09	7.2	8.04	4.45	3
8	7.57	5.24	15	7.10	3.33	12	8.09	4.07	6.1
9	7.41	4.95	14	7.11	2.30	12	8.23	3.85	11
10	8.03	4.11	<3	7.07	2.69	120	7.79	4.07	14

ตารางผนวกที่ ๓4 ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำล้างและการขนส่งโหระพา

ตัวอย่าง ที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำล้างผัก			ปริมาณจุลินทรีย์ในผ้าคลุม			ปริมาณจุลินทรีย์ในแข็ง		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/ml)	ยีสต์และรา (log CFU/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/10 ml)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/50 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/50 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/50 cm ²)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/10 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/10 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/10 cm ²)
1	6.83	4.87	2.8	5.27	3.74	28	7.18	3.13	<3
2	7.24	5.01	0.3	5.03	2.74	3	7.21	3.20	<3
3	7.31	5.02	<0.3	5.00	2.57	34	7.24	3.44	<3
4	NT	NT	NT	4.83	2.61	35	7.00	3.00	3
5	NT	NT	NT	4.93	2.53	210	7.18	4.02	6.1

หมายเหตุ NT หมายถึงไม่ได้ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ

ตารางผนวกที่ ๕ ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดิน ปุ๋ย และน้ำจากแปลงเพาะปลูกผักชี

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในดิน			ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ย			ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/ml)	ยีสต์และรา (log CFU/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/ml)
1	7.26	5.16	11	7.29	3.10	6.1	0	0	<0.3
2	6.83	4.48	<3.0	7.27	4.93	3	0	0	<0.3
3	7.00	4.70	<3.0	7.16	4.29	20	0	0	<0.3
4	8.14	4.93	<3.0	8.59	2.88	15	1.70	0	<0.3
5	7.54	5.45	7.3	7.54	3.23	7.2	4.25	0.40	<0.3
6	7.40	5.20	<3.0	7.38	2.88	3	1.13	0.30	<0.3
7	7.13	4.81	6.2	7.45	4.10	3	1.92	0.30	<0.3
8	7.42	5.18	15	7.45	3.24	6	2.32	0	<0.3
9	7.16	4.88	<3.0	7.48	3.02	7.3	2.16	0.30	<0.3
10	7.75	5.55	3.6	7.35	3.63	3.6	1.73	0	<0.3
11	7.61	5.47	<3.0	7.22	3.22	3.6	1.24	0.30	<0.3
12	7.43	4.81	7.3	7.65	3.31	7.3	0.78	0	<0.3
13	7.28	4.50	<3.0	7.37	3.41	6	2.46	0	<0.3
14	7.76	4.56	<3.0	7.40	3.40	<3.0	2.29	0	<0.3
15	7.69	4.52	7.2	7.50	3.28	3	3.18	0	<0.3

ตารางผนวกที่ ๑๖ ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างผักชีในกระบวนการผลิต

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในผักก่อนล้าง			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักหลังล้าง			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักหน้าโรงงาน		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)
1	7.95	5.10	7.3	6.88	4.06	3	6.82	4.60	7.3
2	7.83	5.20	3	6.89	4.89	<3.0	6.91	4.70	3
3	8.82	5.30	<3.0	6.89	4.48	7.2	6.88	4.42	35
4	8.43	4.70	3	6.82	4.30	15	7.50	5.24	<3.0
5	8.65	4.90	3	7.05	4.61	9	7.05	4.79	<3.0
6	8.08	5.24	14	7.66	4.96	3.6	7.34	4.37	3
7	8.92	5.31	3.6	7.81	4.89	9.3	7.26	4.82	<3.0
8	8.74	5.35	9.1	7.90	5.06	<3.0	7.36	4.27	3
9	8.15	5.19	<3.0	8.19	5.15	<3.0	7.77	4.73	3.6
10	9.29	5.26	<3.0	8.64	5.54	9.1	8.21	5.45	3

ตารางผนวกที่ ๗ ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างอุปกรณ์บริเวณตัดแต่งและขีดรากลักชี

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในมือ			ปริมาณจุลินทรีย์ในโต๊ะตัดแต่ง			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักชีหลังขัด		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/10 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/10 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/10 cm ²)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/50 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/50 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/50 cm ²)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)
1	6.24	2.22	3	4.95	1.84	3	7.67	5.61	7.2
2	8.14	4.03	<3.0	8.20	3.77	<3.0	8.01	5.16	3.6
3	8.20	3.86	3	6.91	2.61	3	9.26	5.35	15
4	7.94	3.62	<3.0	7.53	3.20	<3.0	8.88	4.68	3.6
5	8.06	3.79	6	5.90	2.57	6	7.95	5.28	<3.0
6	7.54	2.34	<3.0	6.75	1.96	<3.0	NT	NT	NT
7	8.88	3.68	3	7.54	4.26	3	NT	NT	NT
8	8.60	3.74	28	7.96	2.95	28	NT	NT	NT
9	8.86	3.72	27	8.60	3.75	27	NT	NT	NT
10	7.16	3.95	7.3	7.56	3.67	7.3	NT	NT	NT

หมายเหตุ NT หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ

ตารางผนวกที่ ๘ ปริมาณจุลินทรีย์ในกระบวนการล้างและขนส่งผักชี

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำล้างผัก			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักคลุม			ปริมาณจุลินทรีย์ในแข็ง		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/50 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/50 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/50 cm ²)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/50 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/50 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/50 cm ²)
1	6.80	3.37	0.36	5.57	2.02	43	2.95	5.11	11
2	8.67	4.02	0.9	5.61	2.49	<3.0	3.79	7.33	<3.0
3	6.56	3.23	0.72	5.62	2.87	<3.0	3.78	7.47	11
4	7.44	4.38	1.5	5.71	2.76	<3.0	2.70	7.54	7.3
5	7.49	4.58	1.5	5.65	2.82	<3.0	2.37	7.49	<3.0
6	4.56	1.73	34	6.93	1.18	6.1	3.14	8.32	6
7	8.43	4.58	27	5.99	0.90	3	3.65	8.40	6.1
8	9.41	3.73	3.6	5.26	0.30	15	3.65	9.39	<3.0
9	9.06	4.65	<3.0	NT	NT	NT	3.97	6.76	7.3
10	9.64	4.95	3.6	NT	NT	NT	3.43	8.44	<3.0

หมายเหตุ NT หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ

ตารางผนวกที่ ๑๑ ปริมาณจุลินทรีย์ในโหระพาและผักชีส่งออก

ตัวอย่างที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในโหระพา			ปริมาณจุลินทรีย์ในผักชี		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	ยีสต์และรา (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/50 cm ²)	ยีสต์และรา (log CFU/50 cm ²)	<i>Salmonella</i> spp. (MPN/50 cm ²)
1	5.55	3.64	6.1	5.95	4.10	20
2	5.21	3.77	7.2	5.88	4.08	7.3
3	5.81	4.00	19	6.07	4.15	44
4	4.78	4.32	20	6.06	4.38	28
5	5.07	3.54	6.2	5.93	4.33	20
6	5.50	4.53	<3.0	6.58	4.54	11
7	4.92	4.70	<3.0	6.53	4.30	20
8	5.26	4.48	15	6.47	4.41	15
9	5.45	4.07	7.2	6.42	4.42	11
10	5.47	3.85	3	6.16	4.45	11
11	5.48	4.69	7.3	6.63	4.49	6.1
12	5.67	4.57	15	5.92	4.52	7.3
13	5.81	4.35	9.3	6.26	4.64	6.2
14	5.70	4.69	3.6	6.45	4.72	3
15	5.19	4.88	<3.0	6.47	4.48	<3.0

ตารางผนวกที่ ๑10 จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่เจริญและรอดชีวิตในปุ๋ยมูลค้างคาวและปุ๋ยมูลสุกรที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C

ชนิดปุ๋ย	เชื้อผสม	อุณหภูมิ ในการ เก็บ (°C)	จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> (log CFU/g) ^a								
			เวลา (วันที่)								
			0	1	3	6	9	12	15	18	21
ปุ๋ยมูลค้างคาว	<i>E. coli</i> +	25±2	5.17 ± 0.52	4.22 ± 0.34	3.25 ± 0.21	2.7 ± 0.42	1.76 ± 0.73	0.35 ± 0.49	ND	ND	NT
	<i>S. Hvitvingfoss</i>	40±2	5.72 ± 0.17	3.15 ± 0.05	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>E. coli</i> +	25±2	4.93 ± 0.11	4.51 ± 0.21	3.55 ± 0.07	2.99 ± 0.30	1.13 ± 0.05	0.19 ± 0.27	ND	ND	NT
	<i>S. Augustenborg</i>	40±2	5.05 ± 0.47	3.07 ± 0.15	0.59 ± 0.82	ND	ND	NT	NT	NT	NT
ปุ๋ยมูลสุกร	<i>E. coli</i> +	25±2	4.84 ± 0.22	3.81 ± 0.33	3.02 ± 0.35	1.97 ± 0.37	0.5 ± 0.7	ND	ND	NT	NT
	<i>S. Hvitvingfoss</i>	40±2	5.26 ± 0.39	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>E. coli</i> +	25±2	4.71 ± 0.05	4.48 ± 0.09	3.53 ± 0.36	1.99 ± 0.16	ND	ND	NT	NT	NT
	<i>S. Augustenborg</i>	40±2	4.68 ± 0.27	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT

หมายเหตุ ^a หมายถึง ตรวจปริมาณ *E. coli* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MacConkey Agar

^b หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

ND หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli*

NT หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ *E. coli*

ตารางผนวกที่ ๑11 จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่เจริญและรอดชีวิตในปุ๋ยมูลวัว และปุ๋ยมูลไก่ที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C

ชนิดปุ๋ย	เชื้อผสม	อุณหภูมิในการเก็บ (°C)	จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> (log CFU/g) ^a									
			เวลา (วันที่)									
			0	1	3	6	9	12	15	18	21	
ปุ๋ยมูลวัว	<i>E. coli</i> +	25±2	4.85 ± 0.22 ^b	2.49 ± 0.23	1.15 ± 0.21	ND	ND	NT	NT	NT	NT	
	<i>S. Hvittingfoss</i>	40±2	5.26 ± 0.39	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	<i>E. coli</i> +	25±2	4.66 ± 0.03	3.4 ± 0.07	0.5 ± 0.71	ND	ND	NT	NT	NT	NT	
	<i>S. Augustenborg</i>	40±2	4.60 ± 0.00	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
ปุ๋ยมูลไก่	<i>E. coli</i> +	25±2	4.84 ± 0.23 ^b	3.15 ± 0.21	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	
	<i>S. Hvittingfoss</i>	40±2	4.75 ± 0.35	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	<i>E. coli</i> +	25±2	3.99 ± 0.13	3.32 ± 0.33	1.35 ± 0.06	ND	ND	NT	NT	NT	NT	
	<i>S. Augustenborg</i>	40±2	4.2 ± 0.32	ND	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT	

หมายเหตุ ^a หมายถึง ตรวจปริมาณ *E. coli* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MacConkey Agar

^b หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

ND หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli*

NT หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ *E. coli*

ตารางผนวกที่ ๑๑ ค่าพีเอชในปุ๋ยมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิดในวันต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C

ชนิดปุ๋ยและ		ค่าพีเอช / วันที่เก็บตัวอย่าง									ค่าเฉลี่ย
สภาวะการเก็บ (°C)		0	1	3	6	9	12	15	18	21	(°C)
ปุ๋ยมูลค่างาว	25±2	7.62	7.50	6.78	6.90	6.97	6.62	6.86	6.67	6.73	6.96±0.36 ^a
	40±2	7.38	6.96	6.80	6.90	7.05	6.73	6.71	6.77	6.81	6.90±0.21
ปุ๋ยมูลสุกร	25±2	6.67	6.76	6.48	6.64	6.64	6.69	6.77	6.69	6.58	6.66±0.09
	40±2	6.82	6.68	6.49	6.67	6.62	6.62	6.63	6.38	6.65	6.62±0.12
ปุ๋ยมูลวัว	25±2	8.76	8.43	8.49	8.67	8.75	8.51	8.72	8.65	8.78	8.64±0.13
	40±2	8.53	8.61	8.54	8.59	8.68	8.55	8.47	8.77	8.54	8.59±0.09
ปุ๋ยมูลไก่	25±2	6.39	6.43	6.80	6.94	6.98	7.00	6.98	6.32	6.46	6.70±0.29
	40±2	6.46	6.68	6.71	7.00	6.90	6.84	6.94	6.51	6.25	6.70±0.25

หมายเหตุ ตรวจสอบค่าพีเอชจากตัวอย่างซ้ำเดียว

^a หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

ตารางผนวกที่ ๑13 ปริมาณความชื้นในปฏิมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิดในวันต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C

ชนิดปฏิมูลและ		ปริมาณความชื้น / วันที่									ค่าเฉลี่ย
สภาวะการเก็บ (°C)		0	1	3	6	9	12	15	18	21	(°C)
ปฏิมูลค่างคาว	25±2	8.22	9.31	12.15	14.09	14.52	14.34	10.62	10.15	10.83	11.58±2.37 ^a
	40±2	8.45	13.24	6.81	11.66	8.54	7.58	6.52	5.56	5.52	8.21±2.67
ปฏิมูลสุกร	25±2	30.76	30.59	15.66	11.86	16.03	16.69	16.31	12.23	11.11	17.92±7.53
	40±2	30.50	50.01	10.63	11.57	8.13	6.75	4.80	4.62	4.80	14.65±15.52
ปฏิมูลวัว	25±2	10.12	10.85	19.07	11.17	12.35	12.69	10.71	7.76	7.58	11.37±3.39
	40±2	10.95	11.30	15.12	8.81	8.81	6.09	2.71	2.15	2.53	7.61±4.55
ปฏิมูลไก่	25±2	16.52	16.28	15.28	13.59	16.57	14.81	14.53	12.53	12.15	14.69±1.66
	40±2	16.27	16.55	12.62	10.00	9.66	5.15	3.29	2.98	3.21	8.86±5.49

หมายเหตุ ตรวจวัดปริมาณความชื้นจากตัวอย่างซ้ำเดียว

^a หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

ตารางผนวกที่ ๑๑ อุณหภูมิในปฏิกิริยาตัวตั้ง 4 ชนิดในวันต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 และ 40±2 °C

ชนิดปฏิกิริยาและ		อุณหภูมิ / วันที่									ค่าเฉลี่ย
สภาวะการเก็บ (°C)		0	1	3	6	9	12	15	18	21	(°C)
ปฏิกิริยาคลอไรด์	25±2	26.30	27.30	25.40	26.50	28.10	24.50	24.00	25.50	25.60	25.91±1.29 ^a
	40±2	36.70	40.00	39.70	39.00	41.00	38.00	39.50	39.80	39.90	39.29±1.26
ปฏิกิริยาซัลเฟต	25±2	27.60	26.80	27.20	25.60	26.00	24.10	25.30	25.30	26.10	26.00±1.08
	40±2	35.20	40.00	38.10	39.80	40.00	38.50	38.40	40.20	40.20	38.93±1.63
ปฏิกิริยาไนเตรต	25±2	26.20	26.20	27.80	26.70	25.00	24.20	25.70	24.90	25.20	25.77±1.09
	40±2	38.50	40.50	40.40	39.30	41.40	38.40	39.90	40.80	38.70	39.77±1.09
ปฏิกิริยาไฮดรอกไซด์	25±2	26.30	26.80	26.40	26.80	25.10	24.10	24.80	25.50	26.30	25.79±0.96
	40±2	34.20	39.40	39.60	39.10	39.60	38.00	38.70	40.20	41.10	38.88±1.96

หมายเหตุ ตรวจสอบอุณหภูมิจากตัวอย่างซ้ำเดียว

^a หมายถึง ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (average and standard deviation)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาววิภาวดี อ้นท้วม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	18 เมษายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จ. สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิตบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานวิจัย	- ด้นฉบับได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Asian Journal of Food and Agro Industry ฉบับที่ 3 เรื่อง Risk Evaluation of Favourite Ready-to-Eat Foods Sold in Bangkok (อยู่ในระหว่างดำเนินการ คาดว่าสามารถตีพิมพ์ได้ในปี 2010) - เสนอผลงานทางวิชาการ ภาคบรรยาย เรื่อง การตรวจการปนเปื้อน <i>Salmonella</i> spp. ด้วย เทคนิค PCR และคัดแยกสายพันธุ์ในกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก ในการสัมมนาทางวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ระหว่างวันที่ 19-20 สิงหาคม 2552 ณ โรงแรมอวานีวิลล่ารีสอร์ท อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ ด้นฉบับได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร วิทยาศาสตร์การเกษตร (Proceeding) - เสนอผลงานทางวิชาการ ภาคโปสเตอร์ เรื่อง ผลของอุณหภูมิเก็บรักษาต่อการรอดชีวิต ของ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Salmonellae</i> ในปฏิมูลสัตว์ การเสนอผลงานจะจัดให้มีขึ้นในการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 ระหว่างวันที่ 3 - 6 กุมภาพันธ์ 2553 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน