ผลของน้ำหมักชีวภาพในการลดจำนวน *Salmonella* ในผักสด

Effect of Fermented Plant Beverage on Reduction of *Salmonella* on Vegetables

นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต

Nawarat Rattanadilok Na Phuket

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของน้ำหมักชีวภาพในการลดจำนวน *Salmonella* ในผักสด
ผู้เขียน นางสาวนวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..……
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ
(ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของน้ำหมักชีวภาพในการลดจำนวน *Salmonella* ในผักสด

ผู้เขียน นางสาวนวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* บนผักสดนอกจากจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคแล้ว ยังมีผลกระทบต่อการส่งออกไปต่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจ การใช้สารเคมีในการล้างผักเพื่อลดจำนวนเชื้อก่อโรคอาจทำให้เกิดผลเสียต่อตัวผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการนำน้ำหมักชีวภาพซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาใช้ในการลดเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนบนผักสด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่หมักไว้ 75 วัน มีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 1.36 % ค่า pH เท่ากับ 3.50 ค่าการนำไฟฟ้า เท่ากับ 2,425 µS/cm ธาตุอาหาร โซเดียม และ โพแทสเซียม เท่ากับ 88.30 และ 1,115 mg/L ตามลำดับ ปริมาณเอทานอล เมทานอล อะเซทอลดีไฮด์ กรดแลกติก และกรดแอซิติก เท่ากับ 36.20 0.25 0.39 5.56 และ 1.6 g/L ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบผักสดจากตลาดจำนวน 40 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* บนผักจำนวน 10 ตัวอย่าง รวม 6 ซีโรวาร์ คือ *S*. Hvittingfoss *S*. Weltevreden *S*. Agona *S*. Rubislaw *S*. Corvalis และ *S*. Amsterdam var.15+ เมื่อนำน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% ไปทำการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 6 ซีโรวาร์ และเชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 จำนวน 7 log CFU/mL ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% สามารถลดเชื้อได้ 99.999-100% ในระยะเวลาการสัมผัส 5 นาที เมื่อทดลองใช้เชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 ใน 3 ระดับ คือ 7 และ 5 2 log CFU/mL พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% สามารถลดเชื้อได้ทั้ง 3 ระดับ ที่ระยะสัมผัส 5 นาที ส่วนน้ำหมักเข้มข้น 50% ต้องใช้เวลาสัมผัส 10 และ 10 5 นาที ตามลำดับ ส่วนการลดจำนวนเชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 ที่ทำการปนเปื้อนผัก 4 ชนิด ได้แก่ ผักบุ้ง ผักชี ผักสะระแหน่ ผักกาดหอม พบว่ากรณีที่มีเชื้อปริมาณสูง (4.85-6.34 log CFU/g) การแช่ผักในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% สามารถลดเชื้อลงได้ 84.37-99.95% ในระยะเวลาสัมผัสนาน 1-30 นาที ขึ้นกับชนิดผัก ในขณะที่การในแช่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อลดลงได้เพียง 38.67-47.22% เท่านั้น และเมื่อมีเชื้อปริมาณต่ำ (1.3-2.2 log CFU/g) น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 50% สามารถลดเชื้อได้ 100% ในระยะเวลาสัมผัสนาน 1 นาที ในขณะที่แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลดลงได้เพียง 45-50% ในระยะเวลาสัมผัสนาน 1-30 นาทีขึ้นกับชนิดผัก และ

เมื่อนำผักสะระแหน่ที่จำหน่ายในท้องตลาดที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* มาแช่ด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ขณะที่ยังตรวจพบ เชื้อ *Salmonella* ได้หลังการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในเวลาที่เท่ากัน

การศึกษาการเจริญและรอดชีวิตของเชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 บนผักสดทั้ง 4 ชนิด พบว่าการแช่ผักในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{O}C เป็นเวลา 7 วัน เชื้อมีจำนวนลดลง 1.23-1.93 log CFU/g ในขณะที่การแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลดลงได้เพียง 0.61-1.07 log CFU/g ส่วนผักที่แช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium เพิ่มจำนวนขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ แต่ยังมีจำนวนต่ำกว่าการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในผักต่างๆ ได้เป็นอย่างดี

Thesis Title	Effect of Fermented Plant Beverage on Reduction of *Salmonella* on Vegetables.
Author	Miss Nawarat Rattanadilok Na Phuket
Major Program	Microbiology
Academic Year	2551

Abstract

Contamination of fresh vegetables with *Salmonella* causes not only an outbreak of food poisoning to the consumers but also to a severe economic loss to the seller. Decontamination of the contaminated vegetables with chemical agents could also be harmful to the consumers if some chemical residues remained. Therefore, it would be of interest if a natural product, such as fermented banana beverage (FBB), could be used to eliminate *Salmonella* contaminants from fresh vegetables. After being fermented for 75 days, the chemical characteristics of a FBB were: 1.36% total acidity, pH at 3.50, 2,425 µS/cm electrical conductivity, Na^+ at 88.30 and K^+ at 1115 mg/mL, ethanol, methanol, acetaldehyde, lactic acid, and acetic acid at 36.20, 0.25, 0.39, 5.56, and 1.6 g/L, respectively.

Salmonella were detected in 10 out of 40 samples of fresh vegetables purchased from local markets. Among the isolates a total of six serovars were identified: *S*. Hvittingfoss, *S*. Weltevreden, *S*. Agona, *S.* Rubislaw, *S.* Corvalis, and *S.* Amsterdam var. 15+. Undiluted (100%) FBB was used against all six serovars and *S.* Typhimurium ATCC 13311 in the pure cultures that contained *Salmonella* at approximately 7 log CFU /mL. After a 5 min exposure time the 100% FBB reduced *Salmonella* by 99.999-100%. Subsequently, three concentrations of *S.* Typhimurium ATCC 13311 (7, 2, and 5 log CFU/mL) were subjected to three concentrations of FBB (100, 50, and 25%). Within a 5 min exposure time all three concentrations of *S*. Typhimurium ATCC 13311 were completely killed by 100% FBB. With 50% FBB, the three concentrations of *S*. Typhimurium ATCC 13311 were killed at 10, 10, and 5 min exposure times, respectively.

Four kinds of fresh vegetables (swamp morning-glory, parsley, peppermint, and lettuce) were artificially contaminated with *S*. Typhimurium ATCC

13311 then soaked with 50% FBB. The 50% FBB reduced an initial count of 4.85-6.34 log CFU/g of *S*. Typhimurium ATCC 13311 by 84.37-99.95% using a 1-30 min soaking time, that was dependent on the vegetable types. In the controls that were soaked with sterile distilled water (DW) the reduction in *Salmonella* was between 38.67-47.22%. With a lower contamination by *Salmonella* of between 1.3-2.2 log CFU/g, a 50% FBB preparation completely killed *S*. Typhimurium ATCC 13311 after a 1 min soaking time whereas a 45-50% reduction occurred when soaked with sterile DW for between 1-30 min. Peppermints from local markets that had been naturally contaminated with *Salmonella* were also soaked with 50% FBB or sterile DW for 20 min. *Salmonella* were not detected when soaked with FBB but were detected after being soaked with sterile DW.

To examine the growth and survival of *S*. Typhimurium ATCC 13311 on fresh vegetables, swamp morning-glory, parsley, peppermint, and lettuce were artificially contaminated, soaked with 50% FBB or sterile DW for 20 minutes, then kept at either 4°C or 30°C for 7 days. The numbers of *S*. Typhimurium ATCC 13311 in vegetables kept at 4°C, decreased by 1.23-1.93 log CFU/g when soaked with 50% FBB compared to a decrease by 0.61-1.07 log CFU/g when soaked with sterile DW and FBB vegetables showed no signs of spoilage. In vegetables kept at 30°C, the numbers of *S*. Typhimurium ATCC 13311 increased during storage times. Nonetheless, the increase was less with those soaked with 50% FBB than those soaked with sterile DW.

The results of this study showed that FBB is highly effective on reduction of *Salmonella* contaminated on fresh vegetables.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	28
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	29
อุปกรณ์	30
วิธีการ	30
3. ผลการทดลอง	39
4. วิจารณ์	60
5. สรุป	69
เอกสารอ้างอิง	72
ภาคผนวก ก	81
ภาคผนวก ข	89
ประวัติผู้เขียน	92

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แนวโน้มการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ระหว่างกระบวนการผลิต	7
2.	*Salmonella* ที่มีระบาดในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ	8
3.	ปริมาณของกรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์และ อะเซทอลดีไฮด์ ในน้ำหมักพืชในภาคใต้ของประเทศไทย	13
4.	เปรียบเทียบสมบัติทางเคมี-กายภาพ และธาตุอาหารหลักที่ได้จากน้ำหมักชีวภาพที่จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ	14
5.	เปรียบเทียบธาตุอาหารรองที่ได้จากน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ	15
6.	ปริมาณของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักและจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะในน้ำหมักพืชในภาคใต้ของประเทศไทย	17
7.	กลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช	20
8.	กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่พบในน้ำหมักชีวภาพ	22
9.	การยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ของกรดแอซีติก	23
10.	ความเข้มข้นของอิออนบวกที่กระตุ้นและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	27
11.	ความเข้มข้นของโลหะหนักที่จะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	27
12.	สมบัติบางประการของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า	40
13.	ชนิดผักสดที่ตรวจพบ *Salmonella*	41
14.	*Salmonella* ซีโรวาร์ ต่างๆที่พบในผักสด	41
15.	การลดลงของเชื้อ *Salmonella* spp. หลังการสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100 % ที่เวลา 1, 5, 10, 20, และ 30 นาที ในหลอดทดลอง	42
16.	การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 หลังสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ในหลอดทดลอง	44
17.	การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium (log reduction CFU/g) บนผักต่างๆ ที่ผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C	53
18.	จำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium บนผักต่างๆ หลังการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าหรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C	55
19.	ตาราง MPN/100 mL แบบ 10 หลอด และค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	89

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. โอกาสที่จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจากแหล่งต่าง ๆ ปนเปื้อนสู่ผักและผลไม้	7
2. น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่อายุการหมัก 75 วัน	34
3. แผนภูมิแสดงการปนเปื้อนบนผักสดชนิดต่าง ๆ ด้วยเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 1331 พื่อใช้ศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า	37
4. การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311ที่ปนเปื้อนบนผักบุ้งไทย หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	47
5. การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311ที่ปนเปื้อนบนผักชี หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	48
6. การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311ที่ปนเปื้อนบนผักสาระแหน่ หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	49
7. การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311ที่ปนเปื้อนบนผักกาดหอม หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	50
8. ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ATCC 11311 หลังผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที บรรจุลงในถุงโพลีเอทีลีนขนาด 11x12 นิ้ว พร้อมสำหรับการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4^{O}C และ 30^{O}C	52
9. ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{O}C เป็นเวลา 1วัน	54
10. ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{O}C เป็นเวลา 7วัน	55
11. ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C เป็นเวลา 1วัน	58
12. ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.*Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C เป็นเวลาต่าง ๆ	59

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	Percentage
μm	=	Micrometer
μS	=	Microsiemens
CFU/g	=	Colony forming unit per gram
CFU/mL	=	Colony forming unit per milliliter
cm	=	Centimeter
dS	=	Decisiemens
EC	=	Electrical conductivity
g	=	Gram
kg	=	Kilogram
L	=	Liter
mL	=	Milliter
mol %	=	Mole Percentage
mS	=	Millisiemens
^{o}C	=	Degree Celsius
ppm	=	Part per million

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาให้ความสนใจและต้องการที่จะบริโภคอาหารที่ดีต่อสุขภาพและมาจากธรรมชาติ ทำให้การบริโภคผักสดเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (Heaton and Jones, 2008) นอกจากผักที่ผลิตในประเทศแล้วยังมีผักที่นำเข้าจากต่างประเทศอีกด้วย ซึ่งในผลิตผลทางการเกษตรมักมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียต่างๆที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ โดยการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนต่างๆ ระหว่างการผลิต ตั้งแต่ การเพาะปลูก การใช้ปุ๋ย ดินและน้ำ เครื่องมือ การเก็บผลผลิต การขนส่ง ไปจนถึงพฤติกรรมการบริโภคและการปรุงอาหาร (Beuchat, 2002)

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษและมักพบว่าปนเปื้อนมากับผักและผลไม้พร้อมบริโภคคือเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 *Listeria monocytogenes* *Shigella* *Salmonella* และไวรัสตับอักเสบ เอ (Singh *et al*., 2002) มีรายงานของการระบาดของ Salmonellosis เนื่องจากมีจุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด *Salmonella* ปนเปื้อนในผักและผลไม้มาตลอด ตั้งแต่ปี ค.ศ.1950 (Tamplin, 1997) จนปัจจุบันยังมีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษโดยการบริโภคผักและผลไม้สดอยู่เสมอและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (Dipersio, *et al*., 2007) สาเหตุสำคัญที่ทำให้ตรวจพบจุลินทรีย์ดังกล่าวในผักส่วนหนึ่งเป็นเพราะปัจจุบันเกษตรกรหันมาใช้ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก แทนการใช้ปุ๋ยเคมีมากขึ้น ซึ่งปุ๋ยคอกเป็นแหล่งให้เชื้อโรคสามารถรอดชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน (Tauxe, 1991; Brackett, 1999) จากรายงานของ Viswanathan and Kaur (2001) ตรวจพบเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารบนผักสดและผลไม้ที่ขายตามร้านค้าริมถนนซึ่งง่ายต่อการซื้อมารับประทาน นอกจากนี้การเก็บผักในตู้เย็นเชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถที่เจริญอยู่รอดได้ในเวลาต่างๆ กัน เช่น เชื้อ *L. monocytogenes* จะเพิ่มจำนวนขึ้นได้ในอุณหภูมิต่ำ (Behrsing *et al*., 2003) และเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถรอดชีวิตบนผักและผลไม้ได้ที่อุณหภูมิ 10°C เช่น เชื้อ *Salmonella* (Penteado and Leitão, 2004)

นอกจากความปลอดภัยของผู้บริโภคในประเทศแล้วยังมีการตรวจพบเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในผักส่งออกไปต่างประเทศทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ เช่น ในรายงานการส่งออกผักไปประเทศ ไอร์แลนด์ สหภาพยุโรป และนอร์เวย์ ได้ตรวจพบเชื้อ *E.coli* และ *Salmonella* ปนเปื้อนในสินค้าผักสดและสมุนไพรจากประเทศไทย โดยตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในผักจากประเทศไทย จำนวน 23 ชนิด ได้แก่ ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ชะอม ใบกระ

เพรา ใบโหระพา ผักแขยง ใบสะระแหน่ ต้นหอม ผักคื่นไช่ ใบกุยไช่ ดอกกุยไช่ ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขมแดง ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง พริกขี้หนู และผักปลัง ทำให้สั่งห้ามนำเข้าสินค้าผักสดจากประเทศไทยเป็นการชั่วคราว (กรมการค้าต่างประเทศ, 2549)

ดังนั้น เรื่องความปลอดภัยในการบริโภคผักผลไม้สด ขั้นตอนการล้างจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการจะลดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมาได้ ซึ่งนอกจากจะทำให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคในประเทศแล้วยังทำให้สินค้าผักของไทยมีโอกาสส่งออกได้มากขึ้น สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในขั้นตอนการล้างเพื่อลดและทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนผักผลไม้โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มความปลอดภัยของผู้บริโภค ได้แก่ กรดแอซิติก สารประกอบของกรดแอซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คลอรีนและสารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ หรือคลอรีนไดออกไซด์ ซึ่งสารเคมีที่ใช้ล้างผักหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ และส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภทคลอรีน โดยเฉพาะไฮเปอร์คลอไรท์ ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลไม้ เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (Park *et al*., 1991) สารเคมีประเภทคลอรีนเหล่านี้สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี แต่คลอรีนมีข้อจำกัดบางประการ คือประสิทธิภาพจะลดลงในสภาวะที่เป็นเบส การใช้คลอรีนในปริมาณที่มากเกินไปหรือในปริมาณที่ไม่เหมาะสมคลอรีนจะรวมตัวกับสารอินทรีย์ สารประกอบเอมีนในอาหารทำให้เกิดสารไตรแฮโลมีเทน ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นสารก่อมะเร็งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู่บริโภคผักได้ (Lin *et al*., 1996) และสารคลอรีนที่ความเข้มข้นไม่เหมาะสมทำให้เกิดกลิ่น ดังนั้นคลอรีนที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Ames, 1979)

จึงได้มีการวิจัยสารล้างผักไม่ว่าจะเติมกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อลดค่า pH ของสารละลายที่ผสมสารฆ่าเชื้อหรือใช้สารฆ่าเชื้อร่วมกับสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยในการแทรกของสารฆ่าเชื้อเข้าไปทำลายเชื้อโรคบนผิวผักได้ดียิ่งขึ้น การใช้สารที่สลายตัวได้ดีทำให้ไม่มีปริมาณสารตกค้าง เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับอุตสาหกรรมน้ำผลไม้เพื่อลดการใช้คลอรีน ในปัจจุบันได้มีการนำน้ำหมักชีวภาพซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากการหมัก พืช ผัก ผลไม้ กับ น้ำตาล โดยมีแบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมัก (Kantachote and Charernjiratrakul 2008b) มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การบริโภค การใช้เป็นปุ๋ย การใช้เป็นสารทำความสะอาด เป็นต้น รวมทั้งมีการศึกษาวิจัยพบว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซททิล และ แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษเช่น *Salmonella* Typhimurium *Vibrio parahaemolyticus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี (Kantachote *et al*., 2008) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะลองนำน้ำหมักมาใช้ในการล้างทำความสะอาดผักสดเพื่อลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* เพราะนอกจากจะเกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคในด้านการลดเชื้อโรคอาหารเป็นพิษแล้ว ยังช่วยลดอันตรายจากการใช้สารเคมีในการล้างผักอีกด้วย

การตรวจเอกสาร

1. เชื้อ*Salmonella*

1.1 ลักษณะโดยทั่วไปและลักษณะทางเซรุ่มวิทยา

1.1.1 ลักษณะโดยทั่วไป

เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับ *E. coli* ส่วนใหญ่ใช้ซิเตรตเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้แลกโตส (Reinmann and Byran, 1979) สมาชิกในจีนัสนี้เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) (Holt *et al*., 1996) สามารถเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลารอบตัว (peritricous flagella) และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ทุกตัวสามารถทำให้เกิดโรคในคนได้

เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 5-45^{O}C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของ *Salmonella* ได้แก่ 35^{O}C และสามารถทำลายเชื้อนี้ได้ที่อุณหภูมิ 61.5^{O}C *Salmonella* สามารถเจริญได้ในช่วงที่ pH กว้าง ประมาณ 4.5 – 9.0. แต่ที่เจริญได้ดีคือ pH 6.6 – 8.2 ซึ่ง Stokes and Bayne (1957) กล่าวว่า *Salmonella* ไม่เจริญที่ความเป็นกรดต่ำกว่า 5.0 และถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะที่มี pH ต่ำกว่า 4.5 แต่ต่อมา Chung and Goepfert (1970)ได้พบว่าค่า pH ต่ำสุดที่ *Salmonella* เจริญได้ เป็น 4.5 แต่ถึงไม่เจริญใน pH ต่ำ แต่ *Salmonella* อาจยังอยู่รอดได้ Parish *et al*. (1997) ได้ทดลองนำ *Salmonella* มาเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH ต่างๆกัน พบว่า *S*. Gaminara, *S*. Hartford, *S.* Rubislaw และ *S*. Typhimurium สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้แต่ไม่เจริญใน pH 3.5 เป็นเวลา 27 วัน และ pH 4.1 เป็นเวลา 60 วัน

ปัจจุปันแบ่งออกเป็น 2 สปีชีส์ (species) คือ *S. enterica* และ *S. bongori* โดยสปีชีส์ *S. enterica* แบ่งออกเป็นสปีชีส์ย่อย (subspecies) ได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม I (*S. enterica* subsp. *enterica*) กลุ่ม II (*S. enterica* subsp. *salamea*), กลุ่ม IIIA (*S. enterica* subsp. *arizonae*), กลุ่ม IIIB (*S. enterica* subsp. *diarizonae*), กลุ่ม IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), กลุ่ม VI (*S. enterica* subsp. *indica*). ส่วนสปีชีส์ย่อยของสปีชีส์ *S. bongori*. จะอยู่ใน กลุ่ม V (*S.bongori*. subsp. *bongori*.), ปัจจุบัน จีนัส *Salmonella* มีมากกว่า 2300 ซีโรวาร์ อาทิ *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium นิยมเขียนเพียงสั้นๆ ว่า *S.* Typhimurium (Jay, 2000)

1.1.2 ลักษณะทางเซรุ่มวิทยา

การจัดซีโรวาร์ของ *Salmonella* ขึ้นอยู่กับลักษณะของแอนติเจนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ O แอนติเจน H แอนติเจน และ Vi แอนติเจน (Doyle *et al*., 1997; Jay, 2000)

O แอนติเจน เป็นแอนติเจนที่อยู่บนผนังเซลล์ชั้นนอก ประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ มีคุณสมบัติทนต่อ ความร้อน (100^{O}C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที) แอลกอฮอล์ และกรด การจัดกลุ่ม O แอนติเจน โดยใช้อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ A B C D เรียงลำดับต่อกันไป ปัจจุบันมี O แอนติเจน ถึงกลุ่ม O-67 การให้ชื่อ O แอนติเจนจะเรียงลำดับตามเลขอาราบิกจาก 1 2 3 4 เรียงลำดับต่อกันไป *Salmonella* ซีโรวาร์หนึ่งๆอาจมี O แอนติเจน มากกว่า 1 ชนิด เช่น *S*. Hirschfeldii *S*. Choleraesuis *S*. Oranienberg และ *S*. Montevidio จัดอยู่ในกลุ่ม C_1 เพราะ มี O แอนติเจน 6 และ 7 ส่วน *S*. Newport อยู่ในกลุ่ม C_2 เพราะมี O แอนติเจน 6 และ 8 ซึ่งวิธีการตรวจสอบ O แอนติเจนเพื่อหากลุ่ม *Salmonella* ทำได้โดยวิธีจับกลุ่มตกตะกอน (agglutination) กับ O แอนติบอดี (ภาคผนวก ข) เมื่อทราบชนิดของ O แอนติเจน จึงตรวจหา H แอนติเจน ต่อไปเพื่อการระบุซีโรวาร์

H แอนติเจน เป็นแอนติเจนที่อยู่บนแฟลกเจลลา เป็นสารประกอบโปรตีนที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วย ความร้อน แอลกอฮอล์ และกรด H แอนติเจนประกอบด้วย 2 เฟส คือ เฟส 1 หรือ เฟสจำเพาะ ใช้อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก a b c ถึง z และเฟส 2 หรือ เฟสไม่จำเพาะ ใช้ตัวเลขอาราบิก 1 2 3 4 ต่อไปเรื่อยๆ H แอนติเจนจะถูกใช้ในการระบุซีโรวาร์หลังจากทราบ O แอนติเจนแล้ว *Salmonella* ซีโรวาร์ หนึ่งๆ อาจมีแอนติเจน H ได้มากกว่า 1 ชนิด อาทิ *S*. Choleraesuis ซึ่งมี O แอนติเจน 2 ชนิด คือ 6 และ 7 และมี H แอนติเจน 3 ชนิดคือ c 1 และ 5

Vi แอนติเจน (Virulence or Capsular antigen) เป็นแอนติเจนของแคปซูล ประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ ถูกทำลายได้โดย ความร้อน กรด และฟีนอล มีเพียง 3 ซีโรวาร์เท่านั้นที่มี Vi แอนติเจน คือ *S*. Typhi *S*. Paratyphi C และ *S*. Dublin เชื้อที่มี Vi แอนติเจน มักทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มี Vi แอนติเจน

1.2 แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ

เชื้อ *Salmonella* แบ่งตามแหล่งที่อยูได้ 3 แบบคือ

1.2.1 *Salmonella* ที่ใช้คนเป็นโฮสต์ เชื้อกลุ่มนี้จะติดต่อในคนเท่านั้นได้แก่ *S*. Typhi ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์เป็นชนิดที่ทำให้เกิดความรุนแรงมากที่สุด ส่วน *S*. Paratyphi A *S*. Paratyphi B *S*. Paratyphi C ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย ซึ่งมีอาการคล้ายอาการของโรคไข้ไทฟอยด์แต่ความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่า *S*. Typhi

1.2.2 *Salmonella* ที่ปรับตัวตามโฮสต์ เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่แพร่จากสัตว์ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะมาสู่คนเช่น *S*. Gallinarum และ *S*. Pullorum ซึ่งอาศัยเป็ดไก่เป็นโฮสต์ *S*. Dublin อาศัยโคเป็นโฮสต์ *S*. Abortus–ovis อาศัยแกะเป็นโฮสต์ *S*. Choleraesuis อาศัยสุกรเป็นโฮสต์ และ *S*. Enteritidis อาศัยในไข่และสัตว์ปีก

1.2.3 *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสต์ เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่สามารถแพร่กระจายจากคนไปสัตว์ อาหาร น้ำ ดินและสิ่งแวดล้อม เชื้อในกลุ่มนี้เรียกว่า Non–Typhoidal Salmonellosis ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการทางลำไส้และมีบาง ซีโรวาร์ ที่สามารถบุกรุกเข้ากระแสเลือดและทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆ (Jay, 2000)

1.3 สมบัติในการก่อโรคของเชื้อ *Salmonella*

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* เรียกโดยรวมว่า Salmonellosis แต่เดิมแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่และก่อโรคในสัตว์ แต่ในปัจจุบัน *Salmonella* จากสัตว์หลายๆชนิดทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและเป็นพาหะ (Carrier) ของเชื้อได้เป็นเวลานาน ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องควบคุมและป้องกันไม่ให้ *Salmonella* แพร่กระจายไปในอาหารและสิ่งแวดล้อมต่างๆเพิ่มขึ้น โรค Salmonellosis ที่เกิดขึ้นมีรายงานมากที่สุดเนื่องจากได้รับเชื้อ *S.* Enteritidis, *S*. Typhimurium และ *S.* Hidelberg (Altekruse *et al*., 1997)

ปัจจัยจากเชื้อ *Salmonella* ที่ทำให้เกิดโรคได้แก่

1.3.1 ความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของเชื้อ *Salmonella* โดยมี Pili เป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้ตัวเชื้อสามารถเกาะติดกับผนังลำไส้ แล้วเชื้อ *Salmonella* จึงแบ่งตัวเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

1.3.2 ความสามารถในการสร้าง Toxin ซึ่งมีเอนโดท็อกซินและเอ็นเทอโรท็อกซิน

1.3.3 ความสามารถในการบุกรุกของเชื้อ *Salmonella* (Invasiveness) เข้าไปในผนังลำไส้ได้ ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับ O-antigen และ Vi-antigen

1.4 โรคที่เกิดจากเชื้อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella*

แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามอาการที่ทำให้เกิดโรคในคน

1.4.1 กลุ่ม Enteric fever เชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ *S.* Typhi ซึ่งทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ *S*. Paratyphi A *S*. Paratyphi C และ *S*. Sendai

1.4.2 กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารอักเสบ (Gastrointeritis) Salmonellosis เรียกว่า Non enteric group ได้แก่ *Salmonella* สายพันธุ์อื่น ๆ ยกเว้น Typhoidal *Salmonella*

1.5 อาการของผู้ป่วยที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella*

แบ่งตามอาการจำแนกออกเป็น 3 แบบได้แก่

1.5.1 อาการของระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) โดยทั่วไป *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสต์ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ช่วงระยะเวลาฟักตัวของโรคอยู่ระหว่าง 5 ชั่วโมงถึง 5 วัน ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเดินคลื่นไส้ไข้สูงปานกลาง หนาวสั่น ปวดท้อง ท้องร่วง ซึ่งจะรุนแรงต่างกันตามลักษณะการถ่ายอุจจาระ (Doyle *et al*., 1997)

1.5.2 อาการของไข้ไทฟอยด์ (Enteric fever) ระยะเวลาฟักตัวของไข้ไทฟอยด์อยู่ระหว่าง 7-28 วัน ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะ ไข้ขึ้นสูงมาก ปวดท้องและปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย ถ่ายอุจจาระเหลว คลื่นไส้อาเจียน มีเหงื่อออก หนาวสั่นและเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามตัว ท้องบวมน้ำ บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้องหรือจมูก (Doyle *et al*., 1997)

1.5.3 อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Septicemia) เกิดจากการที่เชื้อเข้าไปในกระแสเลือด สืบเนื่องจากเชื้อฟักตัวในลำไส้แล้วเข้าสู่กระแสโลหิตผู้ป่วยจะมีอาการ ไข้สูง ปวดหลัง ปวดท้อง เจ็บหน้าอก หนาวสั่น เหงื่อออกตามตัว เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการอาจเกิดแบบสั้นๆหรือเป็นเรื้อรังก็ได้ เชื้อที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S*. Typhi *S*. Choleraesuis และ *S*. Bublin (Doyle *et al*., 1997)

1.6 การรักษาโรค Salmonellosis

ถ้าอาการไม่มากส่วนใหญ่อาการจะหายเอง ถ้ามีอาการท้องเสียมากแพทย์จะให้เกลือแร่และนอนพักที่โรงพยาบาลแต่แพทย์ไม่แนะนำให้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* มักมีการดื้อยาทำให้การรักษายากขึ้น เคยมีรายงานการดื้อยาของ *S*. Typhimurium DT104 ดื้อยา Ampicillin Chloramphenicol Streptomycin Sulfonamides และ Tetracycline (CDC, 2001)

1.7 การระบาดและการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผักสด

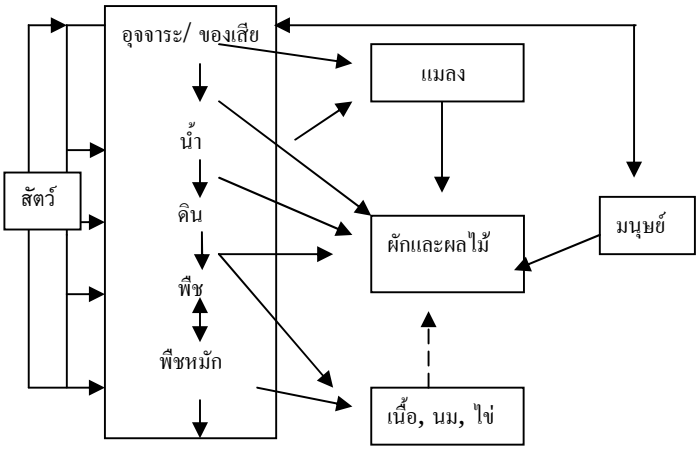
แหล่งของการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักผลไม้ มีรายงานว่ามีการปนเปื้อนตั้งแต่ในแปลงการเพาะปลูก ระหว่างหรือหลังการเก็บเกี่ยว กระบวนการผลิต การขนส่ง จนกระทั่งถึงระหว่างการจัดจำหน่าย หรือการเตรียมอาหารในครัวเรือน แนวโน้มของการปนเปื้อนจุลินทรีย์มาจากแหล่งต่าง ๆ ตามตารางที่ 1 แหล่งของการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* พบได้ในทางเดินอาหารของสัตว์พวกนก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Lacey, 1993) ปนเปื้อนสู่น้ำที่ใช้ในระหว่างการกระบวนการผลิต เป็นสาเหตุให้เกิดความเสี่ยงจากจุลินทรีย์ก่อโรค (Beuchat,1996; Beuchat and Ryu, 1997; Wells and Butterfield, 1997)

ตารางที่ 1 แนวโน้มการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ระหว่างกระบวนการผลิต

ขั้นตอน	แหล่งของการปนเปื้อน
การเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยว เช่น การปลูก การเก็บและการมัดแบ่งเป็นกำ	น้ำ มูลสัตว์ การขาดสุขลักษณะที่ดีในการจัดการ
กระบวนการผลิตขั้นต้น เช่น การล้าง การเคลือบไข การคัด และ การบรรจุ	น้ำล้าง การจับต้องของพนักงานและภาชนะ
กระบวนการผลิตขั้นสุดท้าย เช่น การหั่น การคั้นน้ำ การปอก	น้ำล้าง การจับต้องของพนักงาน การปนเปื้อนข้าม
การขนส่ง เช่น การขนส่งโดยใช้รถบรรทุก	รถบรรทุกไม่สะอาด น้ำแข็งที่ใช้

ที่มา : Tauxe (1997)

เชื้อ *Salmonella* สามารถปนเปื้อนสู่ผักและผลไม้ได้ตั้งแต่การเพาะปลูกในแปลงผัก ระหว่างการเก็บเกี่ยว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว ระหว่างการแปรรูป ดังแสดงในรูปที่ 1 แหล่งน้ำ ของเสีย สัตว์ มนุษย์ ตลอดจนแมลงเป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและปนเปื้อนข้ามไปสู่ผักและผลไม้ การทำเกษตรกรรมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ อาจทำให้เชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนไปในแหล่งต่างๆ ได้และนำไปสู่การระบาด ซึ่งมีรายงานการระบาดจากการรับประทานผักผลไม้เสมอ (Jay, 2000)



รูปที่1 โอกาสที่จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจากแหล่งต่างๆ ปนเปื้อนสู่ผักและผลไม้
ที่มาดัดแปลงจาก: Beuchat (1995)

1.8 การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผักและผลไม้

เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่พบว่ามีการปนเปื้อนในผักและผลไม้ ในปัจจุปันมีรายงานการปนเปื้อน *Salmonella* ในผักและผลไม้เพิ่มมากขึ้นและมีรายงานการระบาดเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากมีความนิยมในการบริโภคผักและผลไม้เพิ่มขึ้น (Wells and Butterfield, 1997)

ในสหรัฐอเมริกามีรายงานการระบาดโรคลำไส้อักเสบจาก *Salmonella* สาเหตุของการป่วยจากการได้รับเชื้อ 9-10 cells/g (infective dose) ซึ่งถึงแม้ว่าเป็นจำนวนที่น้อยมาก แต่ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Bean and Griffin, 1990) การเจ็บป่วยจากการบริโภคผักผลไม้ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* มีถึง 48% ในปี 1973-1997 ในสหรัฐ จำนวน 41% ในปี 1992-2000 ในอังกฤษและระหว่างปี 2006 เป็นต้นมาพบเชื้อ *Salmonella* 23.2% ระบาดในมะเขือเทศบ่อยๆ ข้อมูลการระบาดของ *Salmonella* ที่พบในผัก มีดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 *Salmonella* ที่มีระบาดในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ

ปี (ค.ศ.)	*Salmonella* spp.	ชนิดผักและผลไม้
1950	*S.* Bareilly	แตง
1954	*S.* Miami	แตงโม
1974	*S.* Typhimurium	แอปเปิ้ลไซเดอร์
1979	*S.* Oranienburg	แตงโม
1988	*S.* Saint-Paul	ถั่วงอก
1989-90	*S.* Chester	แคนตาลูป
1990	*S.* Javiana	มะเขือเทศ
1991	*S.* Poona	แคนตาลูป
1993	*S.* Montevidio	มะเขือเทศ
1994	*S.* Bovismorbifican	อัลฟาฟ่า
1995	*S.* Hartford/ Rubislaw /Gaminara	น้ำส้ม
1995	*S.* Stanlay	อัลฟาฟ่า
1996	*S.* Montevideo/Meleagridis	อัลฟาฟ่า
1997	*S.* Enteritidis	ดอกกระหล่ำ
1997	*S.* Enteritidis	พริกหวาน

ตารางที่ 2 *Salmonella* ที่มีระบาดในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ปี (ค.ศ.)	*Salmonella spp.*	ชนิดผักและผลไม้
1997	*S.* Meleagridis	เมล็ดอัลฟาฟ่า
1997	*S.* Infantis / *S.* Anatum	เมล็ดอัลฟาฟ่า
1997	*S.* Saphra	แคนตาลูป
1997-98	*S.* Senftenberg	เมล็ดอัลฟาฟ่า
1998	*S.* Havana / *S.* Cubana / *S.* Tennessee	เมล็ดอัลฟาฟ่า
1998	*S.* Oranienburg	แคนตาลูป
1998	*S.* Typhi	ละมุด
1998-99	*S.* Baildon	มะเขือเทศ
1999	*S.* Muenchen	น้ำส้มคั้น
1999	*S.* paratyphi B var.Java	เมล็ดอัลฟาฟ่า
1999	*S.* Thompson	ผักชี
1999	*S.* Mbandaka	อัลฟาฟ่า
2000	*S.* Enteritidis	น้ำส้ม (citrus) คั้น
2000	*S.* Poona	แคนตาลูป
2000	*S.* Typhimurium	ผักกาดหอม
2000	*S.* Typhimurium DT104	ผักกาดหอม
2000	*S.* Typhimurium DT204B	ผักกาดหอม
2000	*S.* Enteritidis 11b	ถั่วงอก
2001	*S.* Kottbus	เมล็ดอัลฟาฟ่า
2001	*S.* Newport	ผักสลัด
2001	*S.* Virchow	ผักสลัด
2001	*S.* Poona	แคนตาลูป
2001	*S.* Enteritidis	ถั่วงอก
2002	*S.* Javiana	มะเขือเทศ

ตารางที่ 2. *Salmonella* ที่มีระบาดในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ปี (ค.ศ.)	*Salmonella spp.*	ชนิดผักและผลไม้
2002	*S.* Poona	แคนตาลูป
2003-04	*S.* Enteritidis	อัลม่อน
2004	*S.* Newport	ผักกาดหอม
2004	*S.* Thompson	ผักกาด rocket
2004	*S.* Braenderup	มะเขือเทศ
2004	*S.* Javiana	มะเขือเทศ
2005	*S.* Typhimurium DT104	ผักขม
2005	*S.* Typhimurium DT104	ผักกาดหอม
2005	*S.* Enteritidis	ต้นถั่ว
2006	*S.* Newport	มะเขือเทศ
2006	*S.* Typhimurium	มะเขือเทศ
2007	*S.* Senftenberg	กระเพรา
2008	*S.* Saintpaul	มะเขือเทศ

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tamplin (1997); Beuchat (2002); Heaton and Jones (2008) และ CDC (2008)

2. น้ำหมักชีวภาพ

2.1 ความหมายของน้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพ หรือ น้ำสกัดชีวภาพ เป็นเทคโนโลยีชีวภาพพื้นบ้านที่ได้จากการหมักพวกพืช ผักผลไม้ วัชพืช สัตว์ และเศษอาหาร กับน้ำตาลหรือกากน้ำตาล เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนของจุลินทรีย์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ จุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียแลกติกและยีสต์ รา จะย่อยธาตุอาหารต่างๆเปลี่ยนให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ฮอร์โมน เอนไซม์ วิตามิน ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่มากับวัตถุดิบที่มาจากพืชหรือสัตว์ และสภาพแวดล้อมในการหมัก ซึ่งธาตุอาหารเหล่านี้พืชนำไปใช้ในการเจริญได้ (อานัฐ, 2546)

2.2 ประเภทของน้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพหมักได้มาจากการหมักเศษพืชและสัตว์ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งประเภทน้ำหมักชีวภาพ ตามวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1.1 น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากพืช

การทำน้ำหมักชีวภาพโดยการหมักเศษพืชสด นำเศษผักมาผสมกับน้ำตาล โดยสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ จัดเรียงพืชผักเป็นชั้นๆ โรยน้ำตาลทับสลับกันกับพืชผัก อัตราส่วนของน้ำตาลต่อเศษผักเท่ากับ 1:3 หมักในสภาพไม่มีอากาศโดยการอัดผักใส่ภาชนะให้แน่น เมื่อบรรจุผักลงภาชนะเรียบร้อยแล้ว ปิดฝาภาชนะนำไปตั้งทิ้งไว้ในที่ร่ม ปล่อยให้หมักต่อไปประมาณ 7-10 วัน จะเกิดของเหลวข้นสีน้ำตาล ของเหลวนี้เป็นน้ำสกัดจากเซลล์พืชผักประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรท โปรตีน กรดอะมิโน ฮอร์โมน เอนไซม์ และอื่นๆ (สุนันทา, 2546)

2.1.2 น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากสัตว์

ปุ๋ยปลาเป็นน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จาการย่อยสลายเศษอวัยวะปลา ได้แก่ หัวปลา ก้างปลา หางปลา พุงปลา และเลือด ผ่านกระบวนการหมักโดยใช้เอนไซม์ ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หลังจากหมักจนได้ที่แล้วจะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม ธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และกำมะถัน ธาตุอาหารเสริม ได้แก่ เหล็ก ทองแดง และแมงกานีส โปรตีนและกรดอะมิโน ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีนในตัวปลา (สุนันทา, 2546)

2.3 สมบัติทั่วไปของน้ำหมักชีวภาพ

2.3.1 สมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักชีวภาพ

ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของน้ำหมักชีวภาพอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาของ สุนันทา (2546) ได้พบว่าคุณสมบัติทั่วไปของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยใช้ผลไม้เป็นวัตถุดิบ มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.5-5.3 ความเข้มข้นของสารละลายสูง โดยค่าของการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity, EC) อยู่ระหว่าง 1.05- 9.02 ds/m ปริมาณกรดฮิวมิกละลายอยู่ในน้ำหมักชีวภาพพบที่ผลิตจากผลไม้ 0.03-1.00% คิดเป็น 86% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด ปริมาณธาตุอาหารพืชธาตุอาหารหลักได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) จะมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอสำหรับพืชที่จะเอาไปใช้ได้ ซึ่งพบไนโตรเจน 0.07-1.91% ฟอสฟอรัส 42% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ 0.05-1.84% ธาตุอาหารรองได้แก่ แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และกำมะถัน (S) มีปริมาณน้อย แคลเซียม พบ 0.09-06% แมกนีเซียม 0.026-0.35% กำมะถัน 0.008-0.54% พบ 86% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด ธาตุอาหารเสริมมีเกือบครบทุกธาตุในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก พบ 35-410 mg/L แมงกานีส 10-150 mg/L พบ 67% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด สังกะสี 15-58 mg/L โบรอน 1-166 mg/L พบ 75% ของปริมาณตัวอย่างที่

วิเคราะห์ทั้งหมด ทองแดง 1-20 mg/L พบ 44% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด คลอรีน พบ 0.09-1.14% โซเดียม พบ 0.01-0.13% ส่วนโมลิบดินัม ไม่พบ

2.3.2 ปริมาณฮอร์โมนพืชที่ได้จากน้ำหมักชีวภาพแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

2.3.2.1 กลุ่ม Auxin (Indole acetic acid: IAA) วิเคราะห์พบ 79 % ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด พบ 0.13-1.40 mg/L

2.3.2.2 กลุ่ม Gibberellins (Gibberellic acid: GA3) วิเคราะห์พบ 63 % ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด พบ 5.19-215.51 mg/L

2.3.2.3 กลุ่ม Cytokinins (Zeatin และ Kinetin) Zeatin วิเคราะห์พบ 80% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด พบ 1.50-64.5 mg/L ส่วน Kinetin วิเคราะห์พบ 68% ของปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด พบ 1.56-55.62 mg/L

ดวงพรและคณะ (2548) ได้ศึกษาลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่ามีค่า pH อยู่ในช่วง 3.31-5.04 ค่าการนำไฟฟ้า(EC) 0.24-14.47 mS/cm ปริมาณธาตุอาหารพืชธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มีค่าเท่ากับ 0.01-1.91, 0.00-1.06 และ 0.25-11.2 ตามลำดับ และปริมาณกรดอินทรีย์ แลกติกและแอซีติกแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับผักผลไม้ที่นำมาหมัก (ตารางที่ 3) ค่าเอทานอลอยู่ระหว่าง 0.03-3.32% เมทานอล 0.02-0.03% อะเซทอลดีไฮด์ 0.01-0.09% คล้ายกันกับการศึกษาของกาญจนา (2551) ซึ่งได้ศึกษาลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากลูกยอ พบว่ามีค่า pH 3.66 ค่า EC 14.47 mS/cm (ตารางที่ 4) และได้ศึกษาธาตุอาหารเพื่อนำไปเป็นปุ๋ยน้ำพบว่าแร่ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส และ สังกะสี มีค่าเท่ากับ 693 536 6.09 และ 1.69 mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ปริมาณของกรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ และอะเซทอลดีไฮด์ ในน้ำหมักพืชในภาคใต้ของประเทศไทย

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (g/100 mL) ± standard deviation				
	กรดแลกติก	กรดแอซิติก	เอทานอล	อะเซทอลดีไฮด์	เมทานอล
บัวบก	4.30±0.13	1.21±0.02	1.85±0.03	0.048±0.00	0.038±0.001
เสาวรส	0.34±0.06	0.04±0.003	3.32±0.14	0.088±0.01	0.084±0.006
กล้วยน้ำว้า	2.72±0.05	1.95±0.01	0.57±0.09	0.027±0.004	0.04 ±0.005
ลูกยอ	2.78±0.15	1.42±0.03	0.03±0.00	0.022±0.00	0.033±0.001
ลูกยอป่า	1.94±0.13	1.91±0.01	0.05±0.00	0.007±0.001	0.019±0.00
ถั่วเหลือง	0.76±0.07	0.68±0.02	2.87±0.13	0.024±0.001	0.049±0.004
สาหร่ายเขียวสกัด	0.32±0.003	0.55±0.02	2.27±0.09	0.023±0.001	0.035±0.001
ชะมวง	0.09±0.007	0.09±0.004	1.35±0.05	0.02±0.001	0.039±0.002
ข้าวกล้อง	0.62±0.03	1.61±0.02	3.00±0.02	0.025±0.00	0.041±0.001
เปลือมังคุด	1.95±0.02	1.66±0.08	0.49±0.02	0.025±0.001	0.048±0.001

ที่มา: Kantachote *et al*. (2008)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบสมบัติทางเคมี-กายภาพ และธาตุอาหารหลัก ที่ได้จากน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ

วัตถุดิบ	pH	EC (mS/cm)	N (%)	P (%)	K (%)
กล้วย	3.79-4.14	0.24-4.96	0.015-0.15	0.01-0.04	0.6-4.07
ลำไย	3.54-4.18	3.01-6.22	0.093-0.16	0.03-0.06	0.89
สับปะรด	3.84	2.04	0.04	0.02	1.13
ลิ้นจี่	3.85	1.76	0.08	0.02	11.24
ฝรั่ง	3.31	1.68	0.03	0.01	1.09
ลูกหม่อน	4.59	1.38	0.01	0.002	0.34
มะละกอ	3.59	6.6	0.15	0.02	1.45
ผักบุ้ง	3.48-4.13	1.83-9.64	0.05-0.18	0.02-0.05	0.94-11.27
เห็ดหอม	5.04	3.31	0.33	0.14	3.26
ผักกาด	3.83	10.11	0.2	0.04	2.15
หอยเชอรี่	4.49-5.16	0.80-1.56	0.23-0.35	0.01-0.02	0.25
ปลา	4.11	1.09	0.61	0.17	2.69
น้ำหมักชีวภาพจากพืช	3.5-5.6	3-7.9	0.03-1.91	0.00- 1.06	0.05-2.0
ลูกยอป่า	3.66	14.47	0.063	0.14	0.44

ที่มา: กาญจนา (2551)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบธาตุอาหารรองที่ได้จากน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ

วัตถุดิบ	แร่ธาตุ (mg/L)					
	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn
กล้วย	22-60	152-555	9-26	0	14-33	5-9
ลำไย	30	204-280	2-25	0	10-19	5-10
สับปะรด	44	176	9	0	12	8
ลิ้นจี่	51	268	15	0	11	9
ฝรั่ง	40	140	15	0	14	5
ลูกหม่อน	22	12	21	0	10	5
มะละกอ	60	312	24	0	11	6
ผักบุ้ง	28-39	165-312	8-59	0	14-21	6-9
เห็ดหอม	40	376	34	0	21	15
ผักกาด	47	249	33	0	19	129
หอยเชอรี่	180-2751	274-329	19	1-5	52-56	9-10
ปลา	1224	690	51	0	29	10
น้ำหมักชีวภาพจากพืช	43-1190	95-350	ไม่พบ-850	ไม่พบ-100	ไม่พบ-150	2-58
ลูกยอป่า	693	536	-	-	6.09	1.69

ที่มา: กาญจนา (2551)

2.4 จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพมีหลายประเภท แต่จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา โดยมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ และเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ (อานัฐ, 2546) จุลินทรีย์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพหรือน้ำหมักชีวภาพ มีทั้งที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน ปริมาณจุลินทรีย์และชนิดจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้หมัก จุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนแปลงและตายไปเนื่องจากสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา ซึ่งภายหลังจากการหมักจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เริ่มต้น และเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพบางชนิดจะมีจุลินทรีย์เหลืออยู่ ดังแสดงในตารางที่ 6

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักได้แก่

2.4.1 ยีสต์และเชื้อรา ราที่มีบทบาทในกระบวนการหมักในน้ำหมักชีวภาพ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่มีรูปร่างเป็นเส้นใย ได้แก่ *Aspergillus niger Pennicillium* และ *Rhizopus* ยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces* sp. และ *Canida* sp. ยีสต์มีรูปร่างกลมหรือรี สามารถสืบพันธุ์ได้โดยการแตกหน่อ (Budding) ซึ่งเป็นแบบไม่อาศัยเพศ ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีค่า pH ระหว่าง 4.0-6.5 และอยู่ได้สภาวะที่มีค่า pH ระหว่าง 1.5-3.5 ในกระบวนการหมักผักและผลไม้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะใช้กระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas pathway เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอททิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์

2.4.2 แบคทีเรียที่พบในน้ำหมักชีวภาพหลายสายพันธุ์มีบทบาทในการย่อยสลายวัสดุที่ใช้ในการผลิต วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพเป็นวัสดุอินทรีย์มาจากสิ่งที่มีชีวิตทั้งจากพืชและสัตว์ แบคทีเรียจะย่อยสลายสารอินทรีย์ทำให้สารประกอบโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลงและปลดปล่อยธาตุอาหารออกมาในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แบคทีเรียที่พบและมีบทบาทในน้ำหมักชีวภาพส่วนใหญ่เป็นพวก *Bacillus* spp. *Lactobacillus* spp. (อานัฐ, 2546; ดวงพรและคณะ, 2548)

ตารางที่ 6 ปริมาณของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักและจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะในน้ำหมักพืชในภาคใต้ของประเทศไทย

ชนิดผัก	อายุการหมัก	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/mL)					
		TPC	LAB	Yeast	Mold	Coliforms	*E. coli*
บัวบก	2 ปี	$1.8x10^2$	34	$5.3x10^2$	0	ND	ND
เชอรี่	2 ปี	0	0	0	0	ND	ND
สะระแหน่	2 ปี	0	0	0	0	ND	ND
เสาวรส	2 ปี	$1.4x10^3$	$2.4x10^3$	$4.7x10^2$	0	ND	ND
หางจระเข้	2 ปี	0	0	0	0	ND	ND
กล้วยน้ำว้า	3 ปี	0	0	0	0	ND	ND
ลูกยอ	3-6 เดือน	0	0	0	0	ND	ND
ลูกยอป่า	6 เดือน	0	0	0	0	ND	ND
ผลไม้รวม	6 เดือน	0	0	0	0	ND	ND
ยูคาลิปตัส	3-6 เดือน	0	0	0	0	ND	ND
ถั่วเหลือง	3-6 เดือน	0	0	$1.7x10^4$	0	ND	ND
ตะไคร้	3-6 เดือน	0	0	0	$4.0x10^2$	ND	ND
สาหร่ายเขียวสกัด	3-6 เดือน	0	0	$1.0x10^3$	15	ND	ND
ชะมวง	< 3 เดือน	0	$2.7x10^3$	$1.3x10^5$	0	ND	ND
บอระเพ็ด	3-6 เดือน	0	0	6	2	ND	ND
ข้าวกล้อง	3-6 เดือน	0	0	$3.4x10^2$	3	ND	ND
ลูกจันทร์	< 3 เดือน	0	$1.4x10^4$	$1.5x10^4$	7	ND	ND
ทำมัง	3-6 เดือน	0	0	0	0	ND	ND
เปลืองมังคุด	3-6 เดือน	0	$3.6x10^2$	$2.1x10^2$	3	ND	ND

ที่มา: ดวงพรและคณะ (2548)

2.5 การประยุกต์ใช้น้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่นด้านเกษตรอินทรีย์ เพื่อทดแทนสารเคมีในปุ๋ย ยากำจัดศัตรูพืช ฮอร์โมนบำรุงพืช และด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมโดยเข้าไปช่วยย่อยสลายสิ่งปฏิกูล ลดการเน่าเสีย กลิ่นเหม็น ในระบบบำบัดน้ำเสีย ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดในครัวเรือน เช่น น้ำยาถูบ้าน น้ำยาซักผ้า น้ำยาล้างผักผลไม้ นอกจากนั้นยังใช้บริโภคได้เพื่อส่งเสริมสุขภาพ (ไชยวัฒน์, 2550)

ประโยชน์ของน้ำหมักแบ่งได้เป็น ดังนี้

2.5.1 ใช้ในด้านปศุสัตว์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหาร เจือจางในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 1000 ส่วน ให้สัตว์ปีกและสุกรกินในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 1000 ส่วน ทำให้สัตว์ย่อยหญ้าสดได้ดีขึ้นเป็นการประหยัดอาหารนอกจากนี้เพิ่มความต้านทานโรคสัตว์ สัตว์จะมีภูมิต้านทานเพิ่มขึ้นและฉีดล้างคอกจะกำจัดกลิ่นเหม็นคอกสัตว์ ลดปัญหาเรื่องแมลงวันและยุง

2.5.2 ใช้เพื่อสิ่งแวดล้อม ทำความสะอาดโรงฆ่าสัตว์ เจือจางในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 200 ส่วน ดับกลิ่นท่อระบายน้ำ บ่อน้ำทิ้ง รดน้ำสนามหญ้าเจือจางในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 1000 ส่วน การบำบัดน้ำเสีย ลดการอุดตันของท่อระบายน้ำเจือจางในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 500 ส่วน

2.5.3 ใช้ในครัวเรือน ชำระล้างเจือจาง ทำความสะอาดเจือจางในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน ล้างสารพิษตกค้างในผักผลไม้เจือจางในอัตรา 1 ส่วนต่อน้ำ 100 ส่วน แช่นาน 45 นาที

2.5.4 ใช้ด้านการเกษตรใช้เป็นปุ๋ยน้ำโดยช่วยให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เจริญและตรึงไนโตรเจนได้ดี สร้างสารอาหารให้พืช

2.5.5 ใช้สำหรับบริโภคเป็นเครื่องดื่มเพื่อส่งเสริมสุขภาพจะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

3. แบคทีเรียแลกติก

3.1 ลักษณะโดยทั่วไป

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือท่อนยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสารไซโตโครม (cytochromes) และฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์คะทะเลส และมีค่า GC content น้อยกว่า 55 mol% เจริญได้ในสภาวะที่มี pH ต่ำกว่า 5 ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (Carr, 2002) แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในกระบวนการหมัก พบอยู่ทั่วไปตามชิ้นส่วนของพืช โดยจะเพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการหมักพืช โดยทั่วไปแบคทีเรียแลกติกจะมีประมาณ 0.15-1.5% ของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมด ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลกติกแบ่งออกได้เป็น 12 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc Pediococcus Streptococcus Lactococcus*

*Enterococcus Carnobacterium Arococcus Oenococcus Tetragen*ococcus *Vagococcus* และ *Weissella* (Jay, 2000) แบคทีเรียแลกติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) มีการนำไปใช้ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมการหมัก เจริญง่ายสามารถใช้สารตั้งต้นราคาถูกในการเจริญเช่นนม โปรตีนนม พืช ของเหลือจากการเกษตรในการเจริญ นอกจากนี้การเจริญของแบคทีเรียแลกติก สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เสื่อมเสียและก่อโรคอื่นๆที่ปนเปื้อนระหว่างการผลิตได้ (Choi *et al*., 2005)

3.2 กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อสร้างพลังงานและกรดอินทรีย์จากกระบวนการหมัก แบ่งกระบวนการหมักได้เป็น 3 ลักษณะ (De vuyst and Vandamme, 1994; Wood and Holzapfel, 1995; Litchfield, 1996; Adam and Moss, 2000) คือ

3.2.1 Obligate homofermenter หมายถึง กระบวนการหมักที่แบคทีเรียแลกติกหมักน้ำตาลกูลโคส แล้วได้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้มีเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) แต่ไม่มีเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโตสได้ กลไกการเกิดกรดแลกติกเป็นไปตาม Embden-Meyerhof-Parnas pathway เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นแลกเตท (lactate) แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้จะผลิตกรดแลกติกชนิด D และชนิด L ได้มากกว่า 85% ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus ruminis* และ *Lactobacillus delbrueckii* และที่มีรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus lactis* และ *Enterococcus faecalis* เป็นต้น

3.2.2 Facultative heterofermenter หมายถึง กระบวนการหมักที่แบคทีเรียแลกติกหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล แล้วได้กรดแลกติก 1 โมเลกุล กรดแอซีติกหรือเอทานอล 1 โมเลกุล และก๊าซคาร์บอนได้ออกไซด์อีก 1 โมเลกุล แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้มีทั้งเอนไซม์อัลโดเลส และเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส สามารถหมักน้ำตาลอื่นๆ ที่ไม่ใช่กลูโคสได้ เช่น ฟรุคโตส อาราบิโนส ไรโบส และ ไซโรส เป็นต้น กลไกการหมักน้ำตาลผ่านได้ทั้งทาง Phosphoketolase และ Embden-Meyerhof-Parnas pathway ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus plantalum*

3.2.3 Obligate heterofermenter หมายถึง กระบวนการหมักที่แบคทีเรียแลกติกหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติก 1 โมเลกุล กรดแอซิติกหรือเอทานอล 1 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ อีก 1 โมเลกุล แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้มีแต่เอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเท่านั้น และสามารถหมักน้ำตาลอื่นๆ ที่ไม่ใช่กลูโคสได้ เช่น เพนโตส ซึ่งจากน้ำตาลเพนโตสจะได้ผลผลิตเป็น กรดแลกติก และ กรดแอซิติก กลไกการผ่านทาง

phosphoketolase pathway ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc paramesenteroide Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillu buchneri* เป็นต้น

แบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชทั้ง 3 กลุ่ม แสดงในตาราง ที่ 7

ตารางที่ 7 กลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช

Homofermenter	Facultative homofermenter	Obligate heterofermenter
Enterococcus faecium	*Lactobacillus bavaricus*	*Lactobacillus brevis*
Enterococcus faecalis	*Lactobacillus casei*	*Lactobacillus buchneri*
Lactobacillus acidophilus	*Lactobacillus coryniformis*	*Lactobacillus cellobiosus*
Lactobacillus lactis	*Lactobacillus curvatus*	*Lactobacillus confuses*
Lactobacillus delbrueckii	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus coprophilus*
Lactobacillus leichmannii	*Lactobacillus sake*	*Lactobacillus fermentatum*
Lactobacillus salivarius		*Lactobacillus sanfrancisco*
Streptococcus bovis		*Leuconostoc dextranicum*
Streptococcus thermophilus		*Leuconostoc mesenteroides*
Pediococcus acidilactici		*Leuconostoc paramesenteroides*
Pedicoccus damnosus		
Pediococcus pentocacus		

ที่มา: Beuchat (1995)

3.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทในผลิตภัณฑ์อาหารหมักนอกจากทำให้อาหารหมักเกิดกลิ่นเฉพาะตัวแล้วยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษา และทำให้ความเสี่ยงในการเกิดโรคระบาดลดลง ในกระบวนการหมัก คาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นสารโมเลกุลเล็กลง ซึ่งสารโมเลกุลเล็กเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น กรดแลกติก กรดแอซิติก และ กรดโพรพิโอนิก (Ouwehand, 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสามารถสร้างสารอื่นๆ เช่น เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดแอซีทิล คาร์บอนไดออกไซด์และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น สารอาหารเหล่านี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียทีก่อโรคในอาหารได้ ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างได้แก่

3.3.1 กรดอินทรีย์

เป็นพวกโมโนคาร์บอกซิลิก มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี สามารถรวมกับน้ำ แอลกอฮอล์และกลีเซอรีนได้ดี มีกลิ่นฉุน สารละลายกรดแอซิติกเป็นสารเจือปนอาหาร ที่ยอมรับว่าปลอดภัยในปริมาณและการใช้ที่กำหนด (generally recognized as safe: GRAS) ตัวอย่างกรดที่ยอมรับให้ใช้ได้ในอาหารสำหรับบริโภค ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ กรดแลกติก กรดแอซิติก (Doores, 1993) กรดซิตริก ฟิวมาลิก ซัคซินิก ทาร์ทาริก มาลิก ฟอสฟอริก (ไชยวัฒน์, 2550)

Chung และ Goepfert (1970) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ของกรด พบว่าจะขึ้นอยู่กับโมเลกุลของกรด และแบ่งประเภทของกรดได้เป็น 3 กลุ่ม ตามประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ ดังนี้

3.3.1.1 กรดที่มีประสิทธิภาพการทำลายเชื้อต่ำ ได้แก่ กรดทาร์ทาริก กรดซิตริก

3.3.1.2 กรดที่มีประสิทธิภาพการทำลายเชื้อปานกลาง ได้แก่ กรดฟูมาริก กรดมาลิก กรดกลูโคนิก กรดกลูตาริก กรดแลกติก และกรดซัคซีนิค

3.3.1.3 กรดที่มีประสิทธิภาพการทำลายเชื้อสูง ได้แก่ กรดอะดิปิก กรดไพมิลิก กรดไขมันที่มีสายโมเลกุลสั้น กรดแอซีติก และกรดโพรพิโอนิก

Eklund (1990) กล่าวว่า ในอาหารที่มีกรดหลายชนิด กรดอาจจะออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อร่วมกัน (synergistic antimicrobial) เช่น จะมีกรดแลกติก แอซิติก และโพรพิโอนิก ยับยั้งเชื้อร่วมกัน ประสิทธิภาพของกรดในการทำลายเชื้อจากมากไปหาน้อยได้ คือกรดโพรพิ-โอนิก กรดแอซิติก กรดฟอร์มิก กรดแลกติกและกรดซิตริก ตามลำดับ การนำกรดมาใช้ในการทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในผักผลไม้ได้ผลดี เช่นในการศึกษาของ Escudero *et al.* (2003) รายงานว่ากรดแลกติกหรือกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5% สามารถทำลาย *E. coli* O157:H7 ที่อยู่บนผิวแอปเปิ้ลได้ 3.35 log CFU/mLได้ และสามารถใช้กรดในปริมาณสูงขึ้นสำหรับอาหารประเภทเนื้อสัตว์ เช่น ในรายงานของ Castillo *et al*. (2001) รายงานว่าใช้กรด

แลกติกความเข้มข้น 2% สามารถทำลาย *S.* Typhimurium ที่อยู่บนผิวไก่ได้ 5.2 log CFU/mL ในเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 55°C ตัวอย่างกรดอินทรีย์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพเป็นกรดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ที่พบในน้ำหมักชีวภาพ

ชนิดกรดอินทรีย์	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	จำนวนตัวอย่างที่พบ (ตัวอย่าง)	จำนวนตัวอย่างที่พบปริมาณต่ำกว่า Limit of detection (ตัวอย่าง)
ทาทาริก	0.018-0.241	34	8
มาลิก	0.015-0.389	17	4
แลกติก	0.028-1.255	58	5
แอซิติก	0.052-0.550	53	1
ซิตริก	0.024-0.267	8	5
ซอร์บิก	0.049-0.373	6	1
ฟูมาริก	0.025-0.980	12	5
โพรพิโอนิก	0.310	1	1
แอสคอบิก	ต่ำกว่า Limit of detection	0	1
ชิกิมิก	ไม่พบ	0	0

ที่มา: ไชยวัฒน์ (2550)

กลไกของกรดในการยับยั้งจุลินทรีย์ Savard *et al*. (2002) กล่าวไว้ว่า การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลกติก เกิดขึ้นจากโมเลกุลของกรดที่ไม่แตกตัว และการรักษาสมดุลของ pH และการผลิตพลังงานของเซลล์จุลินทรีย์ โดยปกติเซลล์จุลินทรีย์จะพยายามรักษาสมดุลของ pH ภายในเซลล์ ให้ pH ใกล้เคียงความเป็นกลางมากที่สุด ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับค่าคงที่การแตกตัวของกรด (pKa) ประสิทธิภาพในการทำลายของกรดจะเพิ่มขึ้นเมื่อมี pH ต่ำเพราะ pH ที่ต่ำลงทำให้ปริมาณกรดไม่แตกตัวมากขึ้น เช่นการที่สารละลายมี pH ระหว่าง 3-4 จะทำให้โมเลกุลกรดอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว กรดที่อ่อนกว่าจะแตกตัวได้น้อยกว่าเช่นค่า pK กรดแอซิติก (pKa 4.75) ซึ่งเป็นกรดอ่อนกว่ากรดแลกติก (pKa 3.86) จึงแตกตัวได้น้อยกว่า ทำให้มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อสูงกว่ากรดแลกติก เพราะกรดที่ไม่แตกตัว

มีความสามารถในการผ่านเข้าเซลแมมเบรนได้ดีกว่า กรดเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ปล่อยโปรตอนจับกับเบส ทำให้ขัดขวางแรงขับเคลื่อนโปรตอนของผนังเซลล์ ทำให้ไม่สามารถสร้างพลังงาน ขัดขวางการส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์ ผลจากการที่เซลล์ต้องใช้พลังงานมากเพื่อรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ให้สมดุลกับสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้พลังงานในเซลล์เหลือน้อยและยับยั้งการเจริญในที่สุด นอกจากนี้กรดยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์ โปรตีน กรดนิวคลีอิกและฟอสโฟไลปิด ตัวอย่างกรดแอซีติกมีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิดแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ของกรดแอซีติก

ชนิดจุลินทรีย์	pH ของสารละลาย	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งเซลล์ (%)
Salmonella Aertryke	4.9	0.04
Staphylococcus aureus	5.0	0.03
Bacillus cereus	4.9	0.04
Aspergiilus glaucum	3.5	1.00

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุดาพร (2545)

3.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ จะออกซิไดซ์หมู่ซัลไฮดริลของโปรตีนและไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ได้เป็นไฮโปรไทโอไซยาไนท์และไฮโปรไทโอไซยาไนท์ ซึ่งจะไปทำลายโครงสร้างและเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลและขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส การขนถ่ายกลูโคส รวมทั้งทำลายเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ปกติ (Ouwehand, 1998)

3.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์

ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลกติกแบบ heterofermentation ของเฮกโซส ช่วยในการยั้งยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ กลไกการยับยั้งของคาร์บอนไดออกไซด์ยังไม่แน่ชัด สันนิษฐานว่าเกิดจากการรวมกลุ่มของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ชั้นไบเลเยอร์ของไขมันทำให้การผ่านเข้าออกของเซลล์ผิดปกติ (Ouwehand, 1998)

3.3.4 ไดแอซีทิล

ไดแอซีทิลเกิดจากการเมทาบอลิซึมของไพรูเวตของแบคทีเรียแลกติกสกุล *Lactobacillus Leuconostoc Pediococcus* และ *Streptococcus* จะสามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ pH น้อยกว่า 7 สามารถทำลายยีสต์และเชื้อราได้เล็กน้อย แต่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ดีมากกว่าแกรมบวก กลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์คาดว่า ไดแอซีทิลจะไปขัดขวางการใช้กรดแอมิโนอาร์จีนีน ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จีนีน

3.3.5 รอยเทอริน

เป็นสารที่สร้างจาก *Lactobacillus reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ รอยเทอรินมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีมีค่า pH เป็นกลาง รอยเทอรินจะถูกสร้างในสภาวะที่ไม่มีอากาศ กลไกการทำลายจุลินทรีย์จับกับเซลเป้าหมาย

3.3.6 แบคเทอริโอซิน

เป็นโพลีเพปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียกรดแลกติกปล่อยออกมานอกเซลล์ และมีคุณสมบัติทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษได้ แต่แบคเทอริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ไนซิน จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิดแต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ นอกจากมีสารที่มาทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบก่อน แบคเทอริโอซินก็จะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก มีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันโดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ไนซินจะมีโมเลกุลเป็นประจุบวก จะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic ส่วนที่ขั้วที่ไม่ชอบน้ำจะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH ซึ่งเป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและการสลายตัวของ ATP ทำให้ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ จึงทำให้เซลล์ตายในที่สุด

4.ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารฆ่าเชื้อในการล้างผักผลไม้

4.1 ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ

ปริมาณของสารฆ่าเชื้อในน้ำหมักชีวภาพ ขึ้นอยู่กับผักผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบกับเชื้อที่ใช้ในการหมักผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย เช่น กรดชนิดต่างๆในปริมาณต่างๆกัน ถ้าความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อมากก็จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อมากขึ้น Liao *et al*. (2003) ได้ศึกษาผลของกรดแอซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* บนผิวแอปเปิ้ลหั่น เมื่อนำแอปเปิ้ลที่ปนเปื้อนเชื้อไปล้างน้ำก่อนแล้วมาแช่กรดแอซิตริก 2.4% พบว่าเชื้อลดลงไป 1.28 log CFU/mL เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอซีตริก 5% เชื้อลดลงไปได้มากกว่าคือ

1.67 log CFU/mL ในเวลาเท่ากัน เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Chang and Fang (2007) ได้ทดลองใช้น้ำส้มสายชู 0.05 0.5 และ 5% เพื่อลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ปริมาณ 7 log CFU/g ที่ปนเปื้อนบนผักกาดหอมสับพบว่าน้ำส้มสายชู 5% ลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ลงได้ 3 log CFU/g ในเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C ในขณะที่น้ำส้มสายชู 0.05 และ 0.5% ไม่สามารถทำลาย *E. coli* O157:H7 ได้ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารฆ่าเชื้อที่มีความเป็นกรดเมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อมากขึ้นและเมื่อกรดมีความเข้มข้นน้อยจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ลดลงหรือไม่ยับยั้งเชื้อเลย

4.2 ระยะเวลาสัมผัส

เวลาในการสัมผัสนานขึ้นการทำลายเชื้อจุลินทรีย์จะมีแนวโน้มมากขึ้น แต่สารฆ่าเชื้อบางชนิดจะยับยั้งเชื้อได้ในเวลาหนึ่งแล้วประสิทธิภาพจะไม่เพิ่มขึ้น

Segun and Karapinar (2005) ได้ทดลองใช้น้ำมะนาวกับน้ำส้มสายชูในอัตราส่วน 1:1 ในการลดเชื้อ *S*. Thypimurium ที่ปนเปื้อนบนผักกาด rocket และหัวหอมในระยะเวลาต่างๆกัน 0, 15, 30, และ 60 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาการฆ่าเชื้อ *S*. Thypimurium ปริมาณ 7 log CFU/g จะลดจำนวนลงตั้งแต่เวลา 0 และลดจำนวนมากขึ้นเมื่อทิ้งไว้ 15 นาที แต่ไม่มีความแตกต่างของการฆ่าเชื้อที่เวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงให้เห็นว่าถ้าจุลินทรีย์สัมผัสสารฆ่าเชื้อนานขึ้น จะทำให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลงได้มากขึ้นในช่วงเวลาหนึ่ง

4.3 ปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์

ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นกับปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น ถ้าจุลินทรีย์เริ่มต้นมีมากจะใช้เวลาในการทำลายจุลินทรีย์นานขึ้น จากการศึกษาของ Singh *et al*. (2002) ได้ปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนผักกาดหอมปริมาณที่ต่างกัน 7.82 5.95 และ 3.71 log CFU/g เมื่อล้างด้วย คลอรีนไดออกไซด์เชื้อ *E. coli* O157:H7 ลดลง 1.55 1.60 และ 1.93 log CFU/g ตามลำดับ เชื้อที่มีปริมาณต่ำจะลดลงมากสุด

4.4 ชนิดจุลินทรีย์

ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะแตกต่างกัน จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์จะทนต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่า ต้องใช้สารฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นสูงและระยะเวลานานกว่า จากรายงานของ Cords and Dychdala (1993) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายไฮโปคลอไรท์ทำลายเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่มีสปอร์จะต้องใช้ปริมาณ 100 ppm. เป็นเวลา 60 นาที ในขณะที่ใช้สารละลายไฮโปคลอไรท์ทำลาย *Salmonella* Paratyphi B ที่เป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่ไม่สร้างสปอร์ปริมาณ 0.02 ppm.เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นปริมาณสารฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าในการยับยั้งจุลินทรีย์

4.5 ชนิดผัก

ผักแต่ละชนิดมีโครงสร้างต่างกันทำให้จุลินทรีย์ยึดเกาะต่างกัน ได้มีการทดลองความสามารถในการเกาะติดของเชื้อ โดยปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 กับเชื้อ *Salmonella*

บนต้นอ่อนอัลฟาฟ่าในห้องทดลองเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Salmonella* จะมีความสามารถในการเกาะติดต้นอ่อนอัลฟาฟ่าได้แน่นมากกว่าและจะหลุดไปกับการล้างได้ยากกว่า *E. coli* O157:H7 (Barax *et al*., 2002) นอกจากนี้โครงสร้างของผักผลไม้ เช่น การม้วนงอของใบ ผิวขรุขระ ผิวเป็นรู ผิวบอบช้ำง่าย หรือผิวผักผลไม้ที่มีแวกซ์ มันวาว จะทำให้ยากแก่การล้างด้วยสารฆ่าเชื้อ (Zhan, 1996; Doyle and Erickson, 2008)

4.6 แหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์

ตำแหน่งที่อยู่ของจุลินทรีย์มีผลต่อการทำลายของเชื้อ เช่น บริเวณที่สารเข้าไปไม่ถึง อยู่ผิวใบหรือขอบใบ บริเวณขั้วของผักผลไม้ และการเกิดไบโอฟิลม์ที่ผิวของผักผลไม้มี dextran หรือ pectin จะเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างไบโอฟิลม์ซึ่งเป็นสาร exopolysaccharide เชื้อจุลินทรีย์เกาะกลุ่มกันทำให้ยากต่อการฆ่าเชื้อ (Barax *el at*., 2002; Warner *et al*., 2008) จากการศึกษาของ Beuchart (2002) ได้ทำการทดลองใช้คลอรีนอิสระ 500 ppm. ซึ่งเกินมาตรฐานที่ใช้ในผักผลไม้คือ 200 ppm. มาล้างผักที่ปนเปื้อนด้วย *L. monocytogenes* พบว่าไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* ที่สร้างไบโอฟิล์มบนผิวผัก

4.7 ระยะเวลาในการอยู่บนผิวผัก เวลาการเกาะติดของจุลินทรีย์

ปัจจัยหลายๆอย่าง ได้แก่ ปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ผักจะมีจุลินทรีย์ติดมาในระยะต่างๆกัน ตั้งแต่เพาะปลูกมีการปนเปื้อนมาจากสถานที่ในการเพาะปลูกหรือเก็บเกี่ยวหรือปนเปื้อนภายหลัง ทำให้ผักแต่ละชนิดจะมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นแตกต่างกัน บางชนิดมีสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี ปัจจัยภายใน เช่น โครงสร้างของผักผลไม้ pH ของเนื้อผักผลไม้ การอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียกับเชื้อโรคอาหารเป็นพิษจะมีผลต่อการเจริญและการเข้าทำลายของสารฆ่าเชื้อ (Beuchart, 2002)

4.8 โลหะปนเปื้อนและอิออนบวก

ในสารอาหารต่างๆที่มีโลหะปนเปื้อนและไอออนบวกในสารละลาย ซึ่งจะกระทบกับการทำงานของแบคทีเรีย ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้ไม่ดี Nies (1999) กล่าวถึงแร่ธาตุทองแดงที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อยเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ แต่ถ้าปริมาณมากกว่า 250 ppm สามารถทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บและตายได้

กลไกการเกิดพิษของโลหะหนักและไอออนบวก โดยเกิดการแทนที่ไอออนที่จำเป็นต่อเซลล์ ขัดขวางการทำงานของโปรตีนทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนั้นทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อิสระ ทำให้เซลล์แมมเบรนเกิดการเปลี่ยนแปลง (Nies,1999) ช่วงค่าที่อาจเกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนสารพิษกลุ่มโลหะหนัก ช่วงค่าที่มีผลต่อแบคทีเรียภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ได้แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นของอิออนบวกที่กระตุ้นและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ชนิดของอิออนบวก	ความเข้มข้น (mg/L)		
	กระตุ้น	ยับยั้งปานกลาง	ยับยั้งมาก
โซเดียม (Na^+)	100-200	3,500-5,500	>8,000
โพแทสเซียม (K^+)	200-400	2,500-4,500	>12,000
แคลเซียม (Ca^{2+})	100-200	2,500-4,500	>8,000
แมกนีเซียม (Mg^{2+})	75-150	1,000-1,500	>3,000

ที่มา : McCarty (1964)

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของโลหะหนักที่จะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

โลหะหนัก	ความเข้มข้น (mg/L)
อาร์ซินิก (As)	0.5 - 1.0
แคดเมียม (Cd)	0.01 - 0.02
โครเมียม (Cr)	1.0 - 1.5
ทองแดง (Cu)	0.5 - 1.0
นิกเกิล (Ni)	1.0 - 2.0
สังกะสี (Zn)	0.5 - 1.0

ที่มา : Mignone (2005)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ใช้ในการล้างเพื่อลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในผักสด

2. เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผักสดชนิดต่างๆ

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในหลอดทดลอง

4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ที่ทำการปนเปื้อนในผักสด และผักสดที่จำหน่ายในท้องตลาด

5. ศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* ในผักสดหลังแช่ด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C และ 30 ^{O}C

บทที่2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อบริสุทธิ์ *S.* Typhimurium ATCC 13311 (จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมจุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

1.2 เชื้อ *Lactobacillus plantarum* DW44 (จากงานวิจัยของ รศ.ดร. ดวงพร คันธโชติ และคณะ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (ภาคผนวก ก)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
De Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS)	Difco
Potato Dextrose Agar (PDA)	Merck
Plate Count Agar (PCA)	Merck
Buffer Pepton Water (BPW)	Merck
Eosin Methylene Blue Agar (EMB)	Merck
Lauryl Tryptose Broth (LST)	Difco
Tryptic soy agar (TSA)	Difco
Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD)	Difco
Tetrathionate Broth (TT)	Difco
Rappaport-Vassiliadis medium (RV)	Difco
Triple Sugar Iron Agar (TSI)	Difco
Lysine Indole Motile Agar (LIM)	Difco

3. สารเคมี (ภาคผนวก ก)

สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH	BDH
สารละลาย เปปโตน 0.1%	Merck
NaCl 0.85%	

4. อุปกรณ์

รายการ	ผู้ผลิต
ตู้บ่มเชื้อ 35^{O}C	Gallenkamp, U.K.
ตู้บ่มเชื้อ 30^{O}C	Sunyo, Japan รุ่น MIR 253
ตู้บ่มเชื้อ 25^{O}C	Sunyo, Japan รุ่น MIR 253
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Tomy, Japan รุ่น SX 700, SS325
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Metro, Switzerland
เครื่องชั่งชนิดหยาบ	Denver Instrument Company, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Brinkman Instrument, Inc USA รุ่น 5415
อ่างควบคุมน้ำร้อน	Sheldon Manufacturing, Inc USA รุ่น 1235
อ่างควบคุมน้ำร้อน 44.5-45.5^{O}C	Precision รุ่น 253
ตู้เย็น	Electrolux รุ่น EBE 5100SB
ชุดกรองน้ำ	Millipore
ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)	Faster BHA 72
เครื่องตีบดอาหาร	IUL Masticator
ไมโครปิเปต	Socolex
จานเพาะเชื้อ	Pyrex
เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ที่จำเป็น	
ถุงพลาสติกโพลีเอทีลีน 11X12 นิ้ว	
กระดาษกรอง เบอร์ 1	Whatman
กระดาษกรอง 0.45 μm (sterile)	Millipore รุ่น EZ pak 103

5. วัสดุในการเตรียมน้ำหมักชีวภาพ

กล้วยน้ำว้าสุก	6 kg
น้ำตาลทราย	2 kg
น้ำกลั่น	20 L

วิธีการ

1. การเตรียมน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

เตรียมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DW44 เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก (inoculum) โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS borth จำนวน 400 mL บ่มที่อุณหภูมิ 35^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเชื้อด้วยสารละลาย NaCl 0.85% จากนั้นนำมาปรับปริมาตรเป็น 100 mLด้วย

NaCl 0.85% (มีความเข้มข้นของเชื้อ ประมาณ $6x10^8$ CFU/mL เทียบกับ 2 McFarland) เทลงไปในส่วนผสม ได้แก่ กล้วยน้ำว้าสุกปอกเปลือกและหั่นตามขวาง 6 kg น้ำตาลทราย 2 kg น้ำกลั่น 20 L แล้วผสมให้เข้ากัน ปิดทับหน้าน้ำหมักด้วยถุงพลาสติกบรรจุน้ำเพื่อไล่อากาศ แล้วปิดฝาถัง (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008) หมักตัวอย่างเป็นเวลา 75 วัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8^{O}C

2. การตรวจสอบสมบัติบางประการของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

2.1 สมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

นำน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 30 mL มาตรวจวัด pH โดยใช้ pH meter ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity, EC) โดยใช้เครื่องวัด conductivity และนำน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 30 mL วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยวิธีไตเตรต (AOAC, 2002) นำน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 100 mL ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อตรวจหาปริมาณ อะเซทอลดีไฮด์ เมทานอล เอทานอล กรดแลกติก และ กรดแอซิติก โดยวิธี Gas chromatography ที่วันเริ่มต้นการหมัก และวันที่ 75 ของการหมัก

2.2 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

นำน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้ามาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียแลกติก ปริมาณยีสต์และเชื้อราและ MPN Coliforms ที่วันเริ่มต้นการหมักและที่วันที่ 75 ดังนี้

2.2.1 การตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด

ใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 50 mL เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 450 mL แล้วเจือจางโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 9 mL ให้ได้ปริมาณเชื้อในระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตมา 1 mL ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Plate Count Agar (PCA) นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 48 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี (APHA, 2001)

2.2.2 ปริมาณแบคทีเรียแลกติก

ใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่เจือจางในระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปต 1 mL ใส่ในจานเพาะเชื้อ pour plate ด้วยอาหาร de Man Rogosa and Sharp (MRS) นำไปบ่มที่ 30^{O}C นาน 72 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 15-300 โคโลนี (ISO 15214, 1998)

2.2.3 ปริมาณยีสต์และเชื้อรา

ใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่เจือจางในระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตมา 1 mL ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่เติมกรดทาร์ทาริก

10% สัดส่วน 1mL ต่อ PDA 400 mL นำไปบ่มที่ 25 เซลเซียส 72 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 10-150 โคโลนี (Knight *et al*., 2001)

2.2.4 MPN Coliforms

ปิเปตน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ปริมาตร 10 mL ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 10 mL ทำจำนวน 10 หลอด นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 48 ชั่วโมง นำมาตรวจดูแก๊สในหลอดดักแก๊ส (Durham) ถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีแก๊ส ปริมาณ 1 ลูปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Bile Broth 2% (BG) นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 48 ชั่วโมง นำมาตรวจดูแก๊สในหลอดดักแก๊ส นำหลอดที่มีแก๊สไปอ่านค่า MPN Coliforms/100 mL ตามตารางที่ 19 (ภาคผนวก ข) (APHA, 2005)

3. การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดชนิดต่าง ๆ

ผักสดซื้อจากตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และ เขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยเลือกผักสดชนิดต่างๆที่ส่วนมากบริโภคสด เช่น แตงกวา มะเขือเทศ ผักชี ผักกาดหอม ผักบุ้งไทย กะหล่ำปลี ถั่วฝักยาว ใบสะระแหน่ เป็นต้น จำนวนรวม 40 ตัวอย่าง มาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธีมาตรฐานตาม Internationnal Organization for Standardization (ISO 6579, 2002) โดยชั่งตัวอย่างผักสด 25 g ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW 225 mL นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 mL ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate (TT) 9 mL และปิเปต 0.1 mL ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis medium (RV) ปริมาตร 10 mL บ่ม TT ในตู้บ่มเชื้อที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมงและบ่ม RV ในอ่างน้ำร้อนที่ 41.5 $\pm$ 1^{O}C นาน 24 ชั่วโมง นำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 35^{O}C 24 ชั่วโมง ไปตรวจทางชีวเคมี โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron Agar (TSI) และ Lysine Indole Motile Agar (LIM) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบทางเซรุ่มวิทยาเพื่อยืนยันผล และบ่งชี้ชื่อโดยส่งศูนย์ *Salmonella* และ *Shigella* แห่งประเทศไทย (WHO) เก็บเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้ ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

4. การทดสอบผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ในหลอดทดลอง

4.1 การเตรียมเชื้อ *Salmonella*

นำเชื้อ *Salmonella* จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW 10 mL เพาะเลี้ยงที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อทดสอบ

ความบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเชื้อใน TSA slant ที่อุณหภูมิ 4-5^{O}C เก็บเป็นเชื้อ Stock-culture ถ่ายเชื้อเดือนละครั้ง

ในการทดลองแต่ละครั้ง นำเชื้อ *Salmonella* จำนวน 1 ลูปมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW 10 mL เพาะเลี้ยงที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อ 1 mL ลงใน BPW 100 mL เพาะเลี้ยงที่ 35^{O}C นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standards แล้วเจือจางโดยใช้สารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 mL แบบลดลง 10 เท่า จนได้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ *Salmonella* ที่ต้องการนำไปทดลอง

4.2 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Salmonella*

ปิเปตเชื้อ *Salmonella* 0.1mL ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการจากข้อ 4.1 ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PCA ที่ทำให้ผิวหน้าแห้งพอดี ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วทิ้งไว้ 5 นาที นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี

4.3 เตรียมน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าโดยกรองด้วยกระดาษกรอง No. 1 เพื่อแยกตะกอนหยาบออก นำส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 μm เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ (รูปที่ 2) ได้เป็นน้ำหมักความเข้มข้น 100% เตรียมน้ำหมักความเข้มข้น 50% และ 25 % โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมด โดยวิธีไตเตรต แล้วนำไปใช้ทันที

(2A) ก่อนการกรอง (2B) หลังการกรอง

รูปที่ 2 น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่อายุการหมัก 75 วัน (2A) ก่อนการกรอง (2B) หลังการกรอง

4.4 ทดสอบผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ในหลอดทดลอง

นำเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 และ *Salmonella* spp.ที่ตรวจพบจากผัก ดังข้อ 3 มาเตรียมเชื้อตามข้อ 4.1 และ 4.2 ปิเปตเชื้อ 1 mL ลงในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ความเข้มข้น 100% (undiluted) 9 mL เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 7 log CFU/mL (เทียบกับ 0.5 McFarland) ตรวจสอบเชื้อที่เหลือรอดในระยะเวลา 1 5 10 20 และ 30 นาที เทียบกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุม ที่แต่ละเวลานำตัวอย่างออกมาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 mL ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ นับปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร PCA นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น คำนวณ % การลดลงของเชื้อโดยใช้สูตร

$$\% \text{ จำนวนลดลงของเชื้อ} = \left(\frac{\text{จำนวนแบคทีเรียกลุ่มควบคุม - จำนวนแบคทีเรียกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนแบคทีเรียกลุ่มควบคุม}} \right) \times 100$$

4.5 ทดสอบผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ในหลอดทดลอง

นำเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับคือ ประมาณ 7 5 และ 2 log CFU/mL โดยใส่เชื้อ 1 mL ลงในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้น 100% 50% และ 25% ปริมาตร 9 mL ตรวจสอบเชื้อที่เหลือรอดแต่ละระดับความเข้มข้นในระยะเวลา 1 5 10 20 และ 30 นาที เทียบกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุม โดยแต่ละเวลานำตัวอย่างออกมาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 mL ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ปิเปต 0.1mL ลงบน PCA เกลี่ยเชื้อด้วยวิธี spread plate นำไปบ่มที่ 35^{O}C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนับปริมาณเชื้อบนอาหาร PCA ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น คำนวณ % การลดลงของเชื้อดังสูตรในข้อ 4.4

5. การทดสอบผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าในการลดจำนวนของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ในผักสด

5.1 เตรียมเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 อายุ 18 ชั่วโมง ตามข้อ 4.1 เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

5.2 การเตรียมตัวอย่างผักสด

ซื้อผักสดตัวอย่าง จากตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และเขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพมหานคร ใช้ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และ ผักกาดหอม เป็นตัวแทนผักสดที่มักพบการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Salmonella* โดยเลือกผักบุ้งไทย ให้มีขนาดใกล้เคียงกันคือเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.5 cm ตัดออกให้ยาวประมาณ 15 cm เลือกผักชีใบตรงและตัดยอดครั้งละสามใบ มีความยาว 2-3 cm เด็ดใบผักสะระแหน่ขนาดใบยาว 2-3 cm ลอกใบผักกาดหอมข้างนอกทิ้ง และตัดส่วนปลายออก 2.5 cm แล้วเลือกขนาดใบให้ใกล้กัน

5.3 การวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสด

ก่อนเริ่มการทดลอง ล้างผักสดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำประปานาน 2 นาที เพื่อชะล้างดินและสิ่งสกปรกที่ติดมากับผัก จากนั้นตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ที่อาจจะติดมากับผักด้วยวิธีมาตรฐาน ISO 6579 ตามข้อ 3

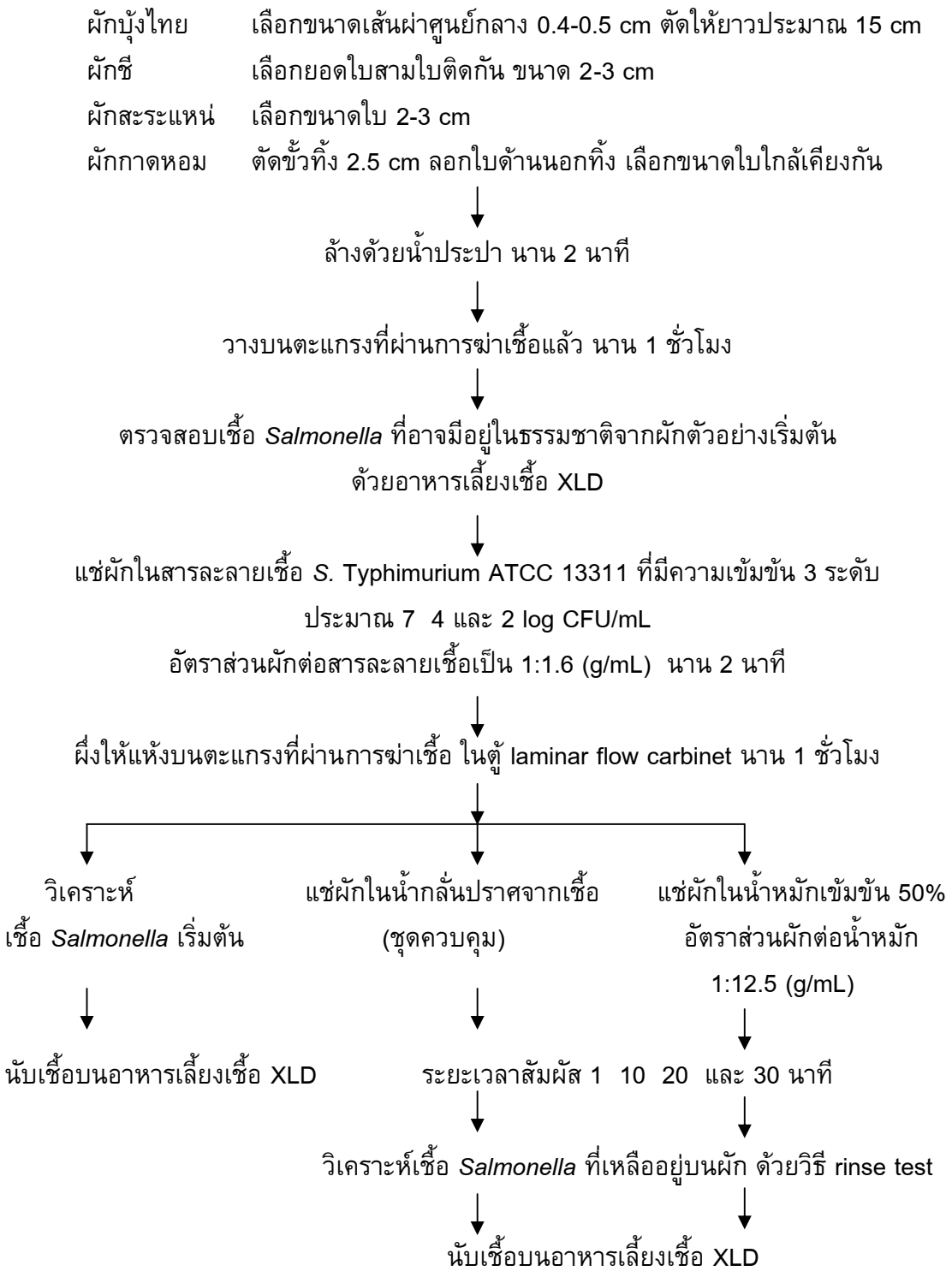
5.4 การเติมเชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 บนผักสด

นำผักสดตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* มาปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium ความเข้มข้น 3 ระดับคือ ประมาณ 7 5 และ 2 log CFU/mL ที่เตรียมตามข้อ 4.1 ใช้อัตราส่วนผักต่อเชื้อ *S*. Typhimurium เป็น 1:1.6 (g/mL) (สุดาพร, 2545) แช่ผักต่างๆ ในสารละลายเชื้อนาน 2 นาทีในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งบนตะแกรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อในตู้ laminar flow carbinet ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

5.5 ทดสอบผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อเชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 ที่ทำการปนเปื้อนในผักสด

นำผักที่ทำการปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium ตามข้อ 5.4 ปริมาณ 100 g ล้างผักตัวอย่าง โดยการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 1.25 L ด้วยอัตราส่วนผักต่อน้ำหมักชีวภาพ 1:12.5 (g/mL) (สุดาพร, 2545) ให้สัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที เทียบกับผักที่แช่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เมื่อครบแต่ละช่วงเวลา เก็บตัวอย่างผักมา 25 g วิเคราะห์เชื้อ *S*. Typhimurium ที่เหลือรอดในผักด้วยวิธี rinse test โดยนำผักที่สัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้ามาใส่สารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 225 mL เขย่าเบาๆ 2 นาที เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ปิเปต 0.1 mL ลงจานเพาะเชื้อ XLD เกลี่ยเชื้อให้ทั่วอาหารด้วยวิธี spread plate นำไปบ่มที่ 35°C นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 10-150 โคโลนี ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น คำนวณ % การลดลงของเชื้อใช้สูตรในข้อ 4.4

การเตรียมการปนเปื้อนผักสด ด้วยเชื้อ *S*. Typhimurium ATCC 13311 เพื่อใช้ศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ดังแผนผังการเตรียมที่แสดงไว้ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงการปนเปื้อนผักสดชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เพื่อใช้ศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

6.ทดสอบผลของการใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อการลดจำนวน *Salmonella* บนผักสดที่จำหน่ายในท้องตลาด

ซื้อ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และ ผักกาดหอม จากตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และ เขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพมหานคร มาชนิดละ 4 ตัวอย่าง นำผักสดตัวอย่างละ 100 g มาล้างโดยการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% ปริมาตร 1.25 L นาน 20 นาที เทน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าทิ้ง เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1.25 L เขย่าเบาๆ แล้วเทน้ำกลั่นทิ้ง เปรียบเทียบกับผักตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน จากนั้นชั่งผักตัวอย่างผักชนิดละ 25 g เพื่อตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ตามข้อ 3 ต่อไป

7. ศึกษาการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อ *S*. Typhimurium บนผักสดหลังการล้างด้วยน้ำหมักชีวภาพแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{o}C และ 30^{o}C

นำ ผักบุ้งไทย ผักชี สะระแหน่ และ ผักกาดหอม ที่เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 5.2 ล้างผักตัวอย่าง โดยการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ใช้ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมจากผลการทดลอง ข้อ 5 ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุม จากนั้นเทน้ำหมักชีวภาพทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่อัตราส่วนเท่ากัน นำผักไปวางบนตะแกรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อในตู้ laminar flow carbinet นาน 1 ชั่วโมง นำผักตัวอย่างไปใส่ลงในถุงโพลีเอทีลีนชนิดปากซิป ขนาด 11x12 นิ้ว เจาะรูระบายอากาศเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm จำนวน 10 รู แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^{o}C และ 30^{o}C สุ่มตัวอย่างผักสดแต่ละชนิดมาตรวจนับจำนวน *S*. Typhimurium หลังแช่น้ำหมักชีวภาพ เป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบสมบัติบางประการของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

จากการตรวจสอบสมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า พบว่า ปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ที่วันที่ 0 มีค่าน้อยกว่า 0.1% ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.97 ค่าการนำไฟฟ้า (EC) เท่ากับ 453 µS/cm ธาตุอาหาร โซเดียม และ โพแทสเซียม มีค่าเท่ากับ 24.34 และ 79.08 mg/L ตามลำดับ ปริมาณเอทานอล เมทานอล อะเซทอลดีไฮด์ กรดแลกติก และ กรดแอซิติก มีค่า น้อยกว่า 0.002 0.003 0.01 0.01 และ 0.3 g/L ตามลำดับ เมื่อหมักน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้านาน 75 วัน พบว่า มีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 1.36 % ค่า pH เท่ากับ 3.50 ค่าการนำไฟฟ้า เท่ากับ 2425 µS/cm ธาตุอาหาร โซเดียม และ โพแทสเซียม เท่ากับ 88.30 และ 1,115 mg/L ตามลำดับ ปริมาณเอทานอล เมทานอล อะเซทอลดีไฮด์ กรดแลกติก และ กรดแอซิติก เท่ากับ 36.20$\pm$0.00 0.25$\pm$0.01 0.39$\pm$0.00 5.56$\pm$0.20 และ 1.6$\pm$0.06 g/L ตามลำดับ

เชื้อจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ที่วันที่ 0 มีปริมาณดังนี้ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 6.2 x 10^6 CFU/mL จำนวนแบคทีเรียแลกติก 7.2 x 10^5 CFU/mL จำนวนยีสต์ 2 x 10^2 CFU/mL จำนวนเชื้อรา น้อยกว่า 10 CFU/mL และ MPN Coliforms /100 mL น้อยกว่า 1.1 เมื่อหมักน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้านาน 75 วัน พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 60 CFU/mL จำนวนแบคทีเรียแลกติก น้อยกว่า 10 CFU/mL จำนวนยีสต์ 10 CFU/mL จำนวนเชื้อรา น้อยกว่า 10 CFU/mL และ MPN Coliforms/100mL น้อยกว่า 1.1 (ตารางที่12)

ตารางที่ 12 สมบัติบางประการของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

สมบัติ	วันที่ 0	วันที่ 75
ปริมาณกรดทั้งหมด (%)	น้อยกว่า 0.1	1.36
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4.97	3.50
ค่าการนำไฟฟ้า (µs/ms)	453	2,425
โซเดียม (mg/L)	24.34	88.30
โพแทสเซียม (mg/L)	79.08	1,115
เอทานอล (g/L)	น้อยกว่า 0.002	36.20 $\pm$ 0.50
เมทานอล (g/L)	น้อยกว่า 0.003	0.25 $\pm$ 0.01
อะเซทอลดีไฮด์ (g/L)	น้อยกว่า 0.010	0.39 $\pm$ 0.00
กรดแลกติก (g/L)	น้อยกว่า 0.010	5.56 $\pm$ 0.20
กรดแอซิติก (g/L)	น้อยกว่า 0.30	1.60 $\pm$ 0.06
ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/mL)	6.2×10^6	60
ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (CFU/mL)	7.2×10^5	น้อยกว่า 10
ปริมาณยีสต์ (CFU/mL)	2×10^2	10
ปริมาณเชื้อรา (CFU/mL)	น้อยกว่า 10	น้อยกว่า 10
MPN. Coliforms (CFU/100 mL)	น้อยกว่า 1.1	น้อยกว่า 1.1

2. การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella spp.* ในผักสดชนิดต่าง ๆ

จากผักสดที่ซื้อจากตลาดสดจำนวน 40 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 25 % (ตารางที่ 13) โดยตรวจพบใน สะระแหน่ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักกาดหอม อย่างละ 2 ตัวอย่าง ผักกาดขาวและผักชีฝรั่ง อย่างละ 1 ตัวอย่าง ส่วนผักอื่นๆ ตรวจไม่พบ และส่งเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบไป WHO National *Salmonella & Shigella* Center (NSSC) กระทรวงสาธารณสุข เพื่อระบุชื่อซีโรวาร์ ของ *Salmonella* ได้ *Salmonella* รวม 6 ซีโรวาร์ ดังนี้ *S*. Hvittingfoss *S*. Weltevreden *S*. Agona *S*. Rubislaw *S*. Corvalis และ *S*. Amsterdam var.15+ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ชนิดผักสดที่ตรวจพบ *Salmonella*

ตัวอย่างผักสด	จำนวนที่ตรวจ	จำนวนที่พบ
ผักกาดขาว	3	1
โหระพา	3	0
ผักชีฝรั่ง	3	1
ถั่วพู	3	0
สะระแหน่	3	2
ผักบุ้งไทย	4	2
ผักชี	4	2
แตงกวา	4	0
ผักกระเฉด	2	0
ผักกาดหอม	4	2
ใบบัวบก	1	0
ผักกาดเขียว	1	0
คื่นไช่	2	0
คะน้า	1	0
กระเพรา	2	0
รวม	40	10

ตารางที่ 14 *Salmonella* ซีโรวาร์ ต่างๆ ที่พบในผักสด

ตัวอย่างผักสด	*Salmonella*	
ผักกาดหอม	group C	*S*. Corvalis
ผักกาดหอม	group I	*S*. Hvittingfoss
ผักกาดขาว	group B	*S*. Agona
สะระแหน่	group B	*S*. Agona
สะระแหน่	group C	*S*. Corvalis
ผักบุ้งไทย	group E	*S*. Weltevreden
ผักบุ้งไทย	group E	*S*. Amsterdam var. 15+
ผักชี	group C	*S*. Corvalis
ผักชี	group F	*S*. Rubislaw
ผักชีฝรั่ง	group C	*S*. Corvalis

3. ผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% (undiluted) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* 6 ซีโรวาร์ ที่แยกได้จากการสุ่มตรวจผักสดจากข้อ 2 และเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 โดยมีระยะเวลาสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 1 5 10 20 และ 30 นาที ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 100% สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ปริมาณเริ่มต้น 7.49-7.61 log CFU/mL โดยมีเปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *Salmonella* เท่ากับ 90.67-94.17% ที่ 1 นาที ตรวจไม่พบเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 และ *S.* Hvittingfoss บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ 5 นาทีของการสัมผัสน้ำหมัก และตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เมื่อเพิ่มเวลาสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้านาน 20 นาที คิดเป็นการลดลงของเชื้อได้ 100% (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 การลดลงของเชื้อ *Salmonella* spp. หลังการสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% ที่เวลา 1 5 10 20 และ 30 นาที ในหลอดทดลอง

ชนิดของเชื้อ	เชื้อเริ่มต้น (log CFU/mL)	การลดลงของเชื้อ *Salmonella* (%)				
	0 นาที	1 นาที	5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
S. Corvalis	7.52±0.01	91.83±0.07	99.999	99.999	100	100
S. Weltevreden	7.49±0.02	91.46±0.35	99.999	99.999	100	100
S. Rubislaw	7.54±0.01	94.17±1.28	99.999	99.999	100	100
S. Hvittingfoss	7.53±0.02	92.25±0.31	100	100	100	100
S. Agona	7.61±0.01	90.67±0.17	99.999	99.999	100	100
S. Amsterdam var. 15+	7.54±0.03	91.63±1.15	99.999	99.999	100	100
S. Typhimurium ATCC 13311	7.53±0.01	91.45±0.15	100	100	100	100

4. ผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ในหลอดทดลอง

เมื่อใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆกันคือ 100 50 และ 25% มาทดสอบกับเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 7 5 และ 2 log CFU/mL เป็นเวลา 1 5 10 20 และ 30 นาที พบว่าที่ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 7.35 log CFU/mL หลังสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 100% จำนวนเชื้อลดลงไป 97.90 และ 100% ที่ 1 และ 5 นาที ตามลำดับ เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเป็น 50% พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ลดลงไป 91.96 98.36 และ 100% ที่ 1 5 และ 10 นาที ตามลำดับ ส่วนน้ำหมักความเข้มข้น 25% เชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ลดลงไป 47.50 93.93 92.99 99.93 และ 99.99% ที่เวลา 1 5 10 20 และ 30 นาที ตามลำดับ

ที่ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 5.38 log CFU/mL น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 100% สามารถลดเชื้อลงไป 98.62 และ 100 % ที่ 1 และ 5 นาที ตามลำดับ เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำหมักเป็น 50% พบว่าสามารถลดเชื้อลงไป 97.90 99.94 และ 100% ที่ 1 5 และ 10 นาที ตามลำดับ และเมื่อใช้น้ำหมักความเข้มข้น 25% สามารถลดเชื้อลงไป 97.55 99.94 99.99 และ 100% ที่เวลา 1 5 10 และ 20 นาที ตามลำดับ

ที่ปริมาณเชื้อ *S* .Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 2.15 log CFU/mL น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 100% สามารถลดเชื้อลงไป 98.75 และ 100 % ที่ 1 และ 5 นาที ตามลำดับ เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำหมักเป็น 50% พบว่าสามารถลดเชื้อลงไป 97.25 และ 100% ที่ 1 และ 5 นาที ตามลำดับ และน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 25% สามารถลดเชื้อลงไป 97.25 และ 100 % ที่เวลา 1 และ 5 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 หลังสัมผัสน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ในหลอดทดลอง

เชื้อเริ่มต้น (logCFU/mL)	เวลา (นาที)	การลดลงของ *S.* Typhimurium ATCC 13311 (%)		
		น้ำหมักเข้มข้น100%	น้ำหมักเข้มข้น 50%	น้ำหมักเข้มข้น 25%
7.35 ± 0.08	1	97.90 ± 0.52	91.96 ± 0.92	47.50 ± 5.24
	5	100	98.36 ± 1.13	93.93 ± 0.66
	10	100	100	92.99 ± 0.82
	20	100	100	99.93 ± 0.02
	30	100	100	99.99 ± 0.01
5.38 ± 0.03	1	98.62 ± 0.17	97.90 ± 0.74	97.55 ± 0.90
	5	100	99.94 ± 0.02	99.94 ± 0.01
	10	100	100	99.99 ± 0.02
	20	100	100	100
	30	100	100	100
2.15 ± 0.00	1	98.75 ± 2.50	97.25 ± 2.89	97.25 ± 2.89
	5	100	100	100
	10	100	100	100
	20	100	100	100
	30	100	100	100

5. ผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่ทำการปนเปื้อนบนผักสดต่าง ๆ

ผักบุ้งไทย

เมื่อนำตัวอย่างผักบุ้งไทยที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* มาปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 7.32 log CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักบุ้งไทยในปริมาณ 4.85 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ลดลงไป 89.77 94.05 97.65 และ 98.08% ตามลำดับ ในขณะที่ผักบุ้งไทยที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อลดลงไป 42.74 38.67 44.33 และ 45.23% ตามลำดับ (รูปที่ 4A)

เมื่อปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 4.45 log CFU/mL บนผักบุ้งไทย พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักบุ้งไทยในปริมาณ 1.3 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าตรวจไม่พบเชื้อ *S*. Typhimurium ได้ตั้งแต่ 1 นาทีเป็นต้นไป คิดเป็นการลดลงไป 100% ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อลดลงไป 50% ตลอด 1-30 นาที (รูปที่ 4B)

ผักชี

เมื่อนำตัวอย่างผักชีที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* มาปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 7.30 log CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักชีในปริมาณ 5.25 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ลดลงไป 88.88 98.27 99.93 และ 99.95% ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างผักชีที่แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 10, 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อลดลงไป 44.44 45.55 47.22 และ 47.22% ตามลำดับ (รูปที่ 5A)

เมื่อปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 4.0 log CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักชีในปริมาณ 2.0 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าตรวจไม่พบเชื้อ *S*. Typhimurium ตั้งแต่ 1 นาที คิดเป็นการลดลง 100 % ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อลดลงไป 45.00 46.00 50.00 และ 50.00% ที่ 1 10 20 และ 30 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 5B)

ผักสะระแหน่

เมื่อนำตัวอย่างผักสะระแหน่ที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* มาปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 7.30 log CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักสะระแหน่ในปริมาณ 5.0 log CFU/g หลังจากแช่ในหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ลดลงไป 84.37 94.81 98.13 และ 98.63 %

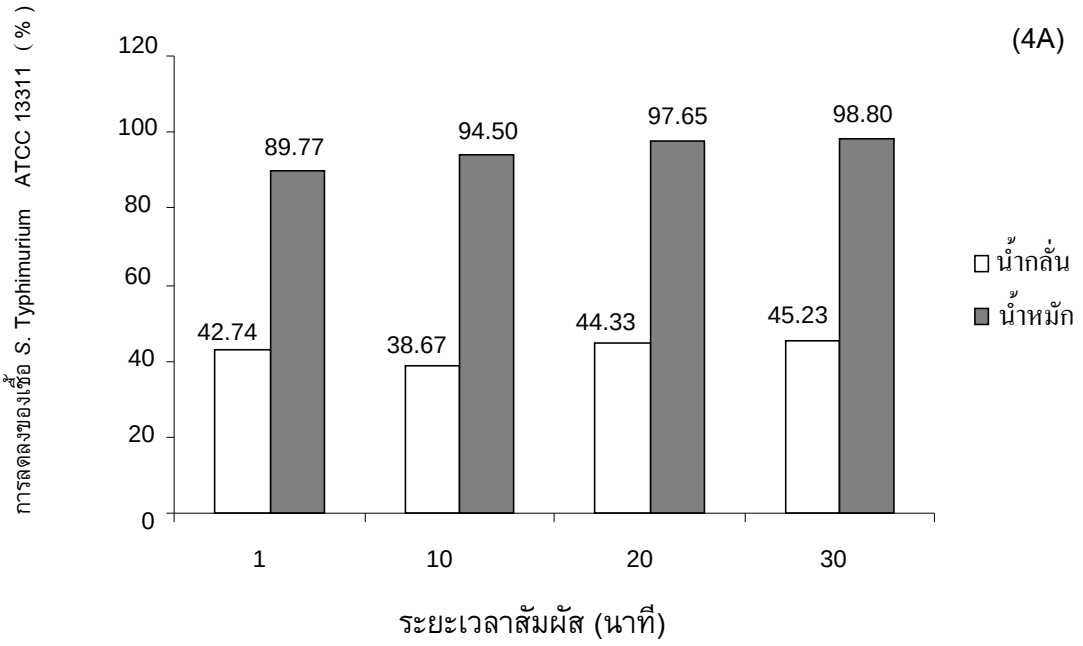
ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างผักสะระแหน่ที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อลดลงไป 40.62 42.18 45.37 และ 45.62% ตามลำดับ (ภาพที่ 6A)

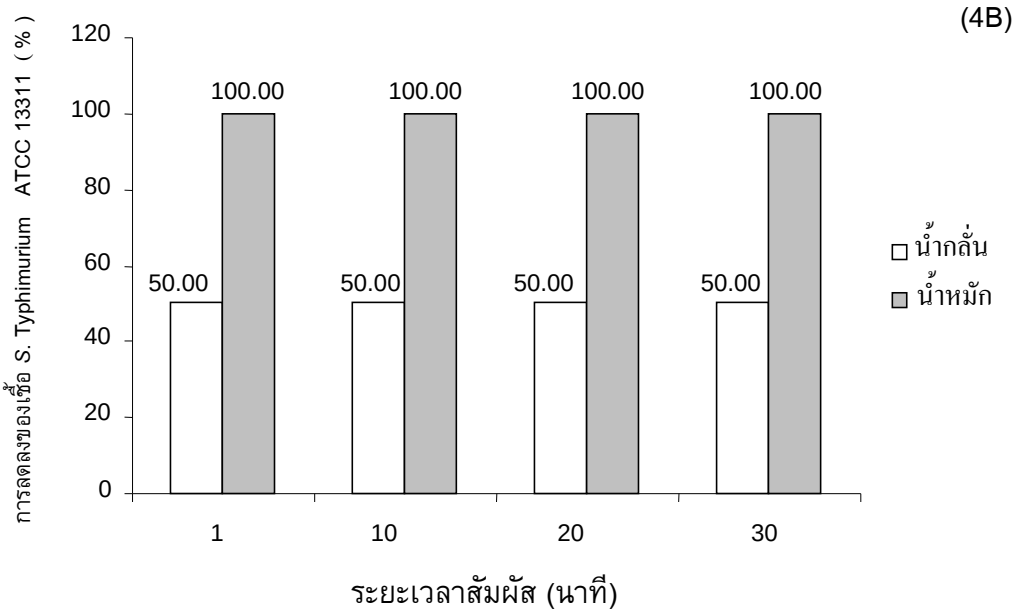
เมื่อปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 4.0 log CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักสาระแหน่ในปริมาณ 2.0 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S*. Typhimurium ตั้งแต่ 1 นาที คิดเป็นการลดลง 100% ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อลดลงไป 46.00 46.50 48.75 และ 49.0% ที่ 1 10 20 และ 30 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 6B)

ผักกาดหอม

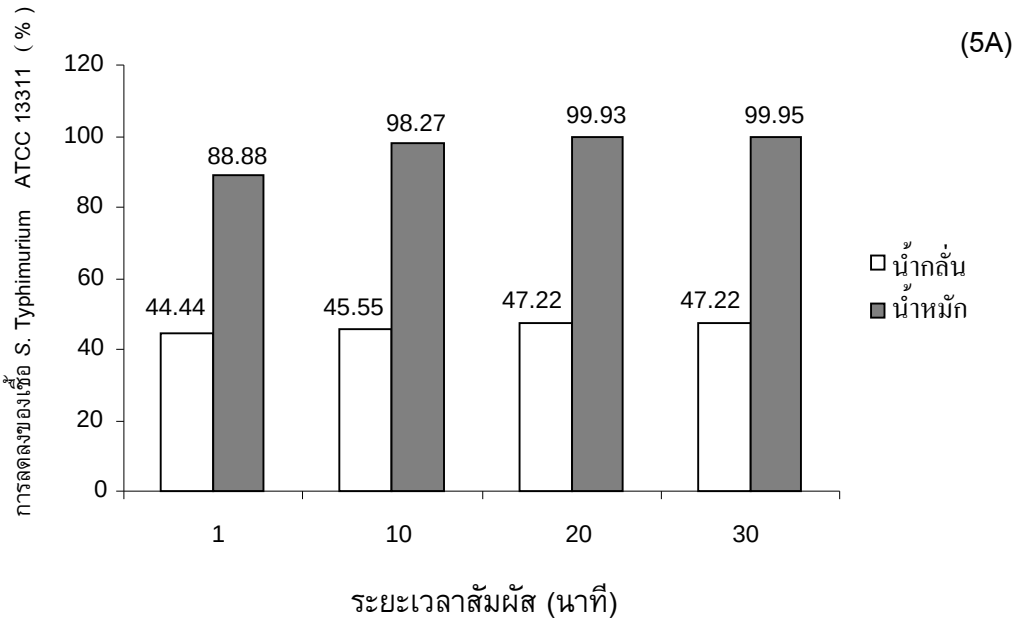
เมื่อนำตัวอย่างผักกาดหอมที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* มาปนเปื้อนเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 7.41 CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักกาดหอมในปริมาณ 6.34 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ลดลงไป 86.36 95.68 99.05 และ 99.45% ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างผักกาดหอมที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าเชื้อลดลงไป 46.00 47.20 47.22 และ 47.22% ตามลำดับ (ภาพที่ 7A)

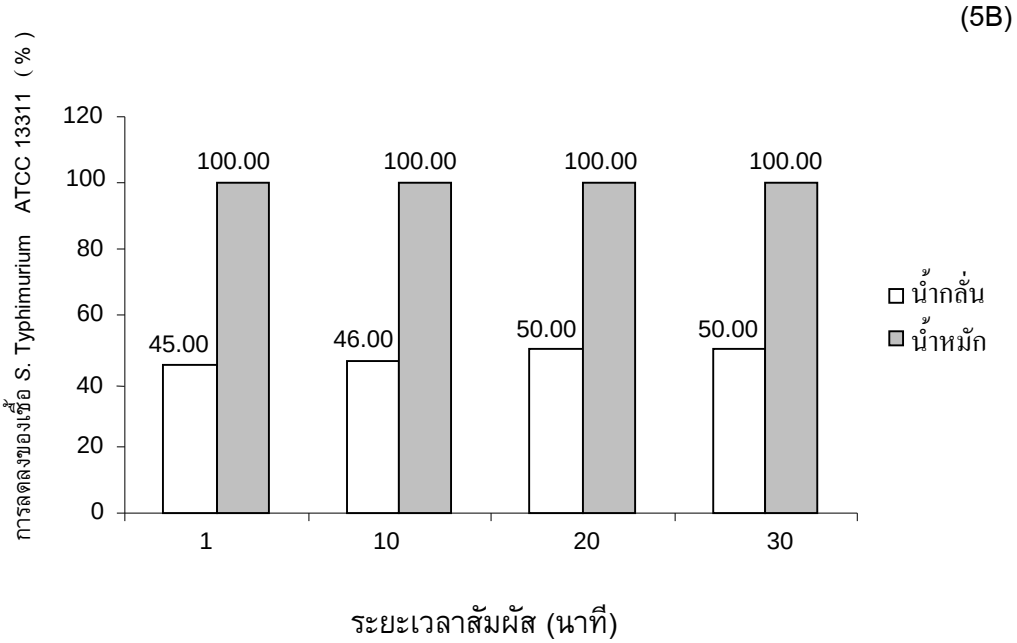
เมื่อปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S*. Typhimurium เข้มข้น 4.0 log CFU/mL พบว่าเชื้อ *S*. Typhimurium ติดบนผักกาดหอมในปริมาณ 2.2 log CFU/g หลังจากแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 10 20 และ 30 นาที พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S*. Typhimurium ตั้งแต่ 1 นาที คิดเป็นการลดลง 100% ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อลดลงไป 50.0% ตลอดช่วง 1-30 นาที (ภาพที่ 7B)





รูปที่ 4 การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่ปนเปื้อนบนผักบุ้งไทย หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
(4A) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 4.85 log CFU/g
(4B) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 1.30 log CFU/g

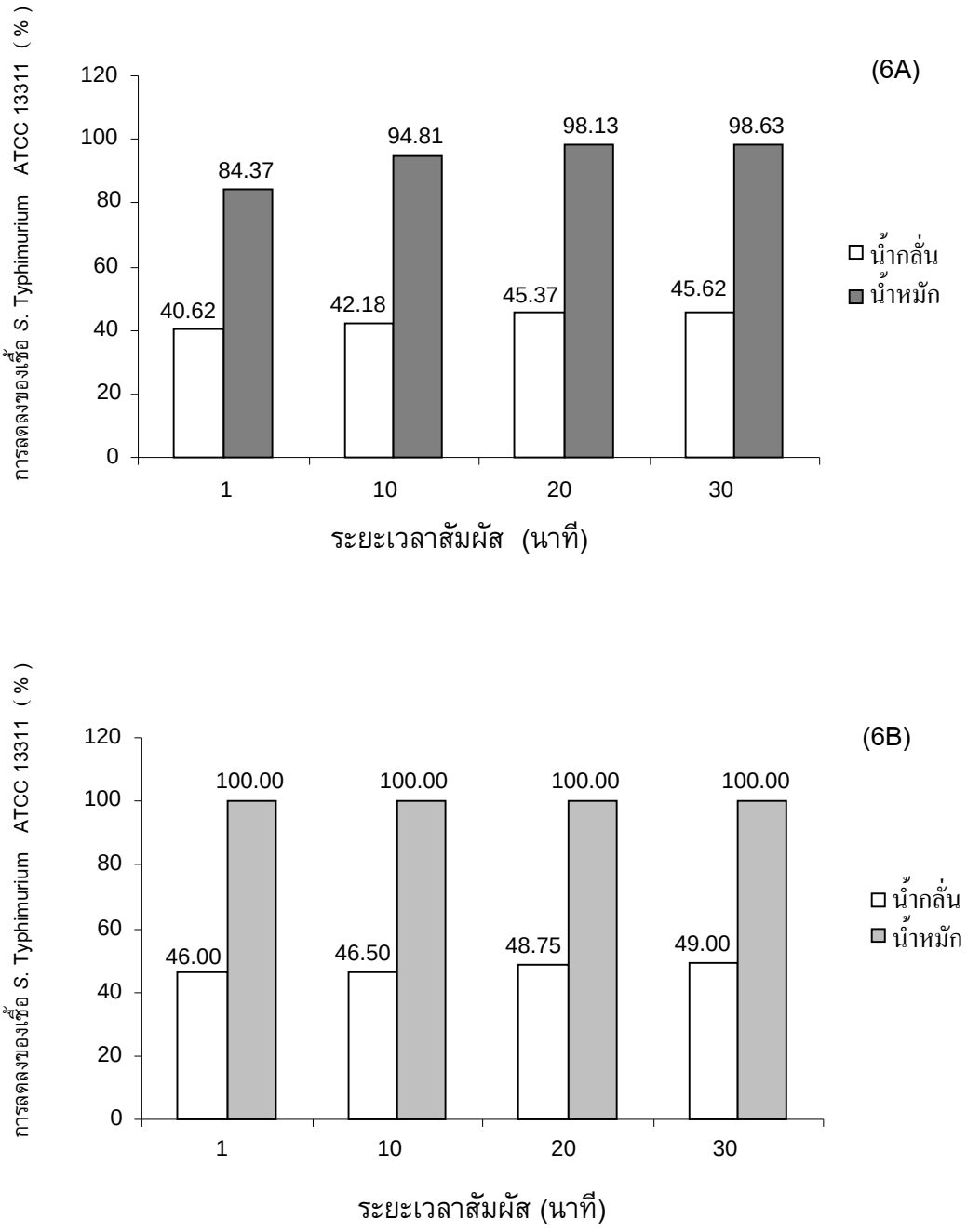




รูปที่ 5 การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่ปนเปื้อนบนผักชี หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

(5A) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 5.25 log CFU/g

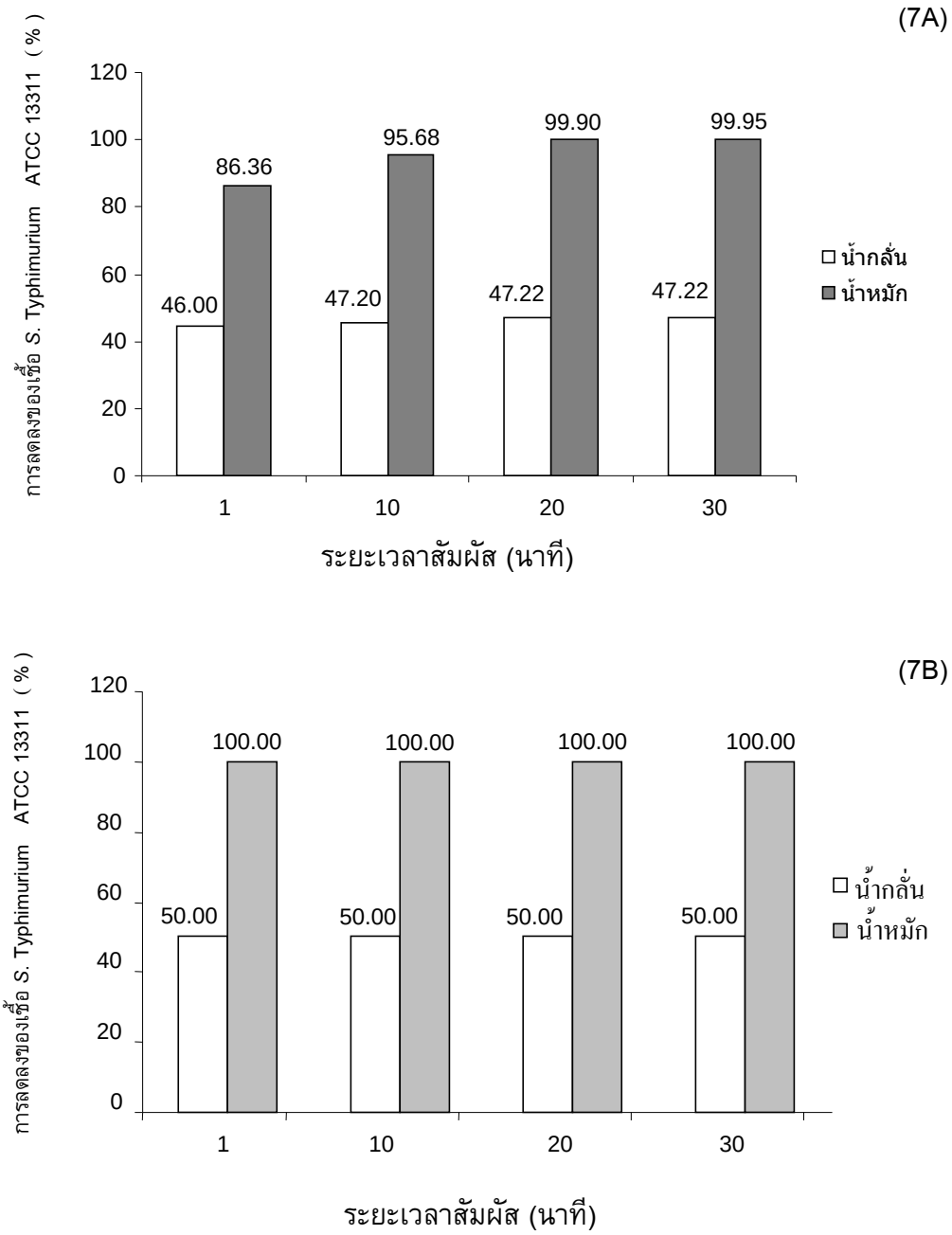
(5B) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 2.0 log CFU/g



รูปที่ 6 การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่ปนเปื้อนบนผักสะระแหน่หลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

(6A) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 5.0 log CFU/g

(6B) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 2.0 log CFU/g



รูปที่ 7 การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ที่ปนเปื้อนบนผักกาดหอมหลังแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

(7A) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 6.34 log CFU/g

(7B) ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 เริ่มต้น 2.20 log CFU/g

6. ผลทดสอบการล้างผักสดที่จำหน่ายในท้องตลาดด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50 %

เมื่อตรวจ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และ ผักกาดหอม อย่างละ 4 ตัวอย่าง รวม 16 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 1 ตัวอย่าง ในผักสะระแหน่ เมื่อแช่ในน้ำหมักกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้หลังแช่ในน้ำหมักกล้วยน้ำว้า ขณะที่ยังคงพบ *Salmonella* ได้ภายหลังการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

7.การเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Typhimurium บนผักสดหลังการล้างด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า แล้วนำไปเก็บรักษาที่ 4^{O}C และ 30^{O}C (รูปที่ 8)

7.1 การเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Typhimurium บนผักสดหลังการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 50% เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาที่ 4 ^{O}C ได้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 17

ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ ผักกาดหอม หลังการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4^{O}C มีจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงไป 0.93-1.32 log CFU/g ในวันแรกของการเก็บ และเมื่อครบ 7 วัน จำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงไปทั้งสิ้น 1.23-1.93 log CFU/g ในผักตัวอย่างทุกชนิดที่ถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 1-7 วัน ไม่พบลักษณะการเน่าเสีย (รูปที่ 9 และ 10)

เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4^{O}C พบว่ามีจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงเพียง 0.05-0.68 log CFU/g ในวันแรกของการเก็บ และเมื่อครบ 7 วัน จำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงไปทั้งสิ้น 0.61-1.07 log CFU/g และไม่พบลักษณะการเน่าเสียในผักเช่นเดียวกันกับน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

(8A)

(8B)

(8C)

(8D)

รูปที่ 8 ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ATCC 11311 หลังผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที บรรจุลงในถุงโพลีเอทีลีนขนาด 11x 12 นิ้ว พร้อมสำหรับการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4^{O}C และ 30^{O}C

(8A) ผักกาดหอม (8B) ผักชี

(8C) ผักสาระแหน่ (8D) ผักบุ้งไทย

ตารางที่ 17 การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium (log reduction CFU/g) บนผักต่างๆ ที่ผ่านการแช่ในหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{O}C

ชนิดผัก	สภาวะการล้าง	จำนวน *S.* Typhimurium (log CFU/g)		การลดลงของ *S.* Typhimurium หลังการเก็บรักษา (log CFU/g)			
		เริ่มต้น	หลังล้าง	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
ผักบุ้งไทย	น้ำหมัก	4.72 ± 0.90	3.07 ± 0.90	0.93	1.14	1.15	1.35
	น้ำกลั่น	4.72 ± 0.90	4.46 ± 0.20	0.16	0.21	0.29	0.61
ผักชี	น้ำหมัก	5.20 ± 0.55	3.04 ± 0.13	0.97	1.06	1.13	1.23
	น้ำกลั่น	5.20±0.55	4.97 ± 0.7	0.05	0.37	0.67	1.00
สะระแหน่	น้ำหมัก	5.20 ± 0.60	3.41 ± 0.49	0.98	1.61	1.68	1.77
	น้ำกลั่น	5.20 ± 0.60	4.93 ± 0.44	0.68	0.76	0.94	0.86
ผักกาดหอม	น้ำหมัก	6.20 ± 0.60	4.32 ± 0.20	1.32	1.42	1.44	1.93
	น้ำกลั่น	6.20 ± 0.60	6.07 ± 0.55	0.38	0.8	0.82	1.07

น้ำหมัก = น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50%
น้ำกลั่น = น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

(9A)

(9B)

(9C)

(9D)

รูปที่ 9 ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 1วัน

(9A) ผักบุ้งไทย (9B) ผักชี

(9C) ผักสาระแหน่ (9D) ผักกาดหอม

(10A)

(10B)

(10C)

(10D)

รูปที่ 10 ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.*Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 7 วัน

(10A) ผักบุ้งไทย (10B) ผักชี

(10C) ผักสาระแหน่ (10D) ผักกาดหอม

7.2 การเจริญและการอยู่รอดของ *S.* Typhimurium บนผักบุ้งไทย ผักกาดหอม ผักชี หลังการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นาน 20 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C ได้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 18

หลังการแช่ผักบุ้งไทยในน้ำหมักเข้มข้น 50% นาน 20 นาที พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 3.07 log CFU/g หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 30^{O}C นาน 1 3 5 และ 7 วัน พบว่าเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 3.97 4.39 4.66 และ 4.69 log CFU/g ตามลำดับ ขณะที่หลังการแช่ผักในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 4.46 log CFU/g หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน พบว่าเชื้อเพิ่มเป็น 5.41 5.25 5.39 และ 5.26 log CFU/g ตามลำดับ

หลังการแช่ผักชีในน้ำหมัก พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 3.04 log CFU/g หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 30^{O}C นาน1 และ 3 วัน พบว่าเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 3.60 และ 4.59 logCFU/g ตามลำดับ และผักเน่าเสียตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป ขณะที่หลังการแช่ผักในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่ามีเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 4.97 log CFU/g และหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน พบว่า เชื้อเพิ่มเป็น 5.29 log CFU/g และผักเน่าเสียตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป

หลังการแช่ผักสะระแหนในน้ำหมัก พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 3.41 log CFU/g หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 30^{O}C นาน 1 และ 3 วันพบว่าเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 3.60 และ 4.25 log CFU/g ตามลำดับ และผักเน่าเสียตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป ขณะที่หลังการแช่ผักในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 4.93 log CFU/g หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 และ 3 วัน พบว่า เชื้อเพิ่มเป็น 5.77 และ 5.79 log CFU/g ตามลำดับ และผักเน่าเสียตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป

หลังการแช่ผักกาดหอมในน้ำหมัก พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 4.32 log CFU/g หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 30^{O}C นาน 1 และ 3 วัน พบว่าเชื้อเพิ่มเป็น 4.30 และ 5.25 log CFU/g ตามลำดับ และผักเน่าเสียตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป ขณะที่หลังการแช่ผักในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium เหลืออยู่ 6.07 log CFU/g และหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 และ 3 วัน พบว่า เชื้อเพิ่มขึ้น 6.30 และ 6.57 log CFU/g ตามลำดับ และผักเน่าเสียตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป

ผักแต่ละชนิดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30^{O}C ในวันแรกของการเก็บรักษา ผักตัวอย่างยังมีลักษณะปกติ (ภาพที่ 11) แต่ผักแต่ละชนิดมีเวลาการเสื่อมเสียไม่เท่ากัน กล่าวคือ ผักบุ้งไทย เมื่อเก็บได้ 7 วัน มีลักษณะทางกายภาพ นิ่ม เหลือง ใบดำ แต่ผักชีเน่าเสียใน 3 วัน ส่วนผักสะระแหน่ และผักกาดหอม เน่าเสียใน 5 วันหลังการเก็บ ดังภาพที่ 12

ตารางที่ 18 จำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium บนผักต่างๆ หลังการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C

ชนิดผัก	สภาวะการล้าง	จำนวน *S.* Typhimurium (log CFU/g)					
		เริ่มต้น	หลังล้าง	หลังเก็บการรักษาเป็นเวลาต่างๆ			
				1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
ผักบุ้งไทย	น้ำหมัก	4.72 ± 0.90	3.07 ± 0.90	3.97 ± 0.3	4.39 ± 0.09	4.66 ± 0.18	4.69 ± 0.28
	น้ำกลั่น	4.72 ± 0.90	4.46 ± 0.20	5.41 ± 0.49	5.25 ± 0.52	5.39 ± 0.7	5.26 ± 0.07
ผักชี	น้ำหมัก	5.20 ± 0.55	3.04 ± 0.13	3.60 ± 0.20	4.59 ± 0.10	เน่าเสีย	เน่าเสีย
	น้ำกลั่น	5.20 ± 0.55	4.97 ± 0.7	5.29 ± 0.03	เน่าเสีย	เน่าเสีย	เน่าเสีย
สะระแหน่	น้ำหมัก	5.20 ± 0.60	3.41 ± 0.49	3.60 ± 0.20	4.25 ± 0.52	เน่าเสีย	เน่าเสีย
	น้ำกลั่น	5.20 ± 0.60	4.93 ± 0.44	5.77 ± 0.80	5.79 ± 0.23	เน่าเสีย	เน่าเสีย
ผักกาดหอม	น้ำหมัก	6.20 ± 0.60	4.32 ± 0.20	4.30 ± 0.10	5.25 ± 0.50	เน่าเสีย	เน่าเสีย
	น้ำกลั่น	6.20 ± 0.60	6.07 ± 0.55	6.30 ± 0.10	6.57 ± 0.09	เน่าเสีย	เน่าเสีย

น้ำหมัก = น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50%
น้ำกลั่น = น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

(11A)

(11B)

11C)

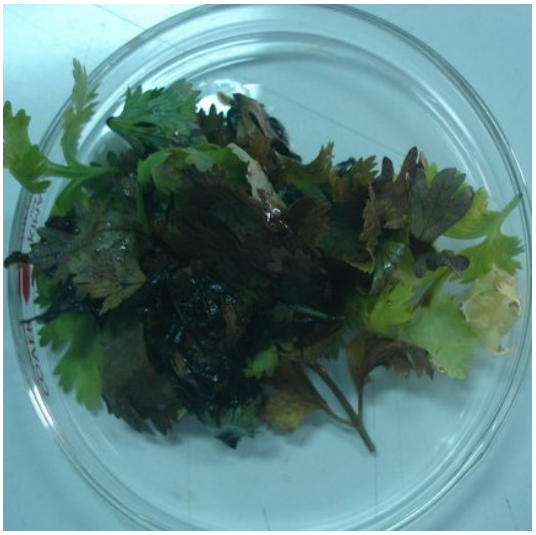
(11D)

รูปที่ 11 ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.*Typhimurium ATCC 11311 ผ่านแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C เป็นเวลา 1วัน

(11A) ผักบุ้งไทย (11B) ผักชี

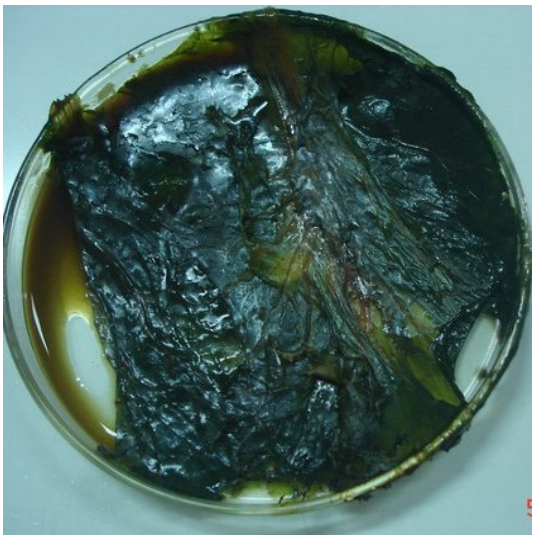
(11C) ผักสาระแหน่ (11D) ผักกาดหอม

(12A)



(12B)

(12C)



(12D)

รูปที่ 12. ผักที่ปนเปื้อนด้วย *S.*Typhimurium ATCC 11311 ผ่านการแช่น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30^{O}C เป็นเวลาต่างๆ

(12A) ผักบุ้งไทย นาน 7 วัน (12B) ผักชี นาน 3 วัน

(12C) ผักสาระแหน่ นาน 5 วัน (12D)ผักกาดหอม นาน 5 วัน

บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. การตรวจสอบคุณสมบัติบางประการน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า

จากการทดลองมีการเติมแบคทีเรียแลกติก ปริมาณสูงถึง $7.2x10^5$ CFU/mL ทำให้แบคทีเรียแลกติก เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักของการหมัก ซึ่งในการเจริญของแบคทีเรียแลกติก *L plantarum* DW44 ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า มีกระบวนการหมักกลูโคสแบบ Facultative heterofermentation ซึ่งสามารถใช้น้ำตาล C5 และ C6 ได้ ระหว่างการหมักแบคทีเรียแลกติกมีการผลิตกรดอินทรีย์ เอทานอล และบางชนิดผลิตแบคเทอริโอซิน ทำให้แบคทีเรียที่มีอยู่มากในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าลดจำนวนลง (กรมวิชาการเกษตร, 2548) เมื่อหมักเป็นระยะเวลานาน 75 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า Rallu *et al*. (2000) กล่าวว่ากรดที่เกิดจากแบคทีเรียแลกติกทำให้สภาวะที่อยู่มี pH ต่ำลงจึงเกิดกระบวนการยับยั้งตัวเอง (self limiting process) เซลล์จึงใช้สารอาหารในการเจริญน้อยลง และเมื่อมีการสะสมสารยับยั้งการเจริญเพิ่มขึ้น แบคทีเรียบางส่วนก็หยุดการเจริญและตายไป จึงตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติกและเชื้อ *Salmonella* ส่วน Coliforms อยู่ในเกณฑ์กำหนด ในวันที่ 75 ส่วนเชื้อที่ปรับตัวอยู่ได้อาจรอดชีวิตจากการบาดเจ็บและคงอยู่ในน้ำหมักได้

Mante *et al*. (2003) รายงานไว้ว่าแบคทีเรียแลกติก ยีสต์และ *Bacillus* sp. เกี่ยวข้องกับการหมักแป้งมันสำปะหลัง (cassava dough) ให้เป็น agbelima ซึ่งในกระบวนการหมักสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจาก agbelima ได้ 10 Isolate พบว่าแบคทีเรียแลกติกยับยั้ง *B. subtilis* ได้ทั้ง 10 Isolate และตรวจไม่พบ *B. subtilis* หลังกระบวนการหมักเสร็จสิ้น แต่แบคทีเรียแลกติกไม่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ นอกจากนี้ผลผลิตของแบคทีเรียแลกติกทำให้ pH ต่ำลง จึงตรวจไม่พบ *V. Cholerae* C-230 *S.* Typhimurium 9 หรือ *S.* Enteritidis 226 ใน 10 g หลังหมักได้ 4 ชั่วโมง และตรวจไม่พบ *E. coli* D2188 และ *Shigella dysenteriae* 226 ใน 10 g หลังหมักได้ 48 ชั่วโมง

จากการศึกษาของ Prachyakij *et al*. (2007) พบว่ายีสต์ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายผมนางและน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า ได้แก่ *L. plantarum* DW1 DW3 และ DW4 โดยยีสต์ถูกยับยั้งด้วยสารที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นมา ทำให้ปริมาณลดลงจากวันเริ่มต้น เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าจำนวนยีสต์ลดลงจากเริ่มต้นที่มี 2×10^2 CFU/g เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 75 จำนวนยีสต์ลดลงเหลือ 10 CFU/g

สารที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักผ่านทาง Phosphoketolase pathway พบกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ ได้แก่ กรดแลกติก กรดแอซิติก นอกจากนี้ยังพบ เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ในน้ำหมักชีวภาพต่างๆ จะมีปริมาณสารที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นมากน้อยไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับพืชที่ใช้หมักและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้หมักและสภาวะการหมัก (ดวงพรและวิลาวัณย์, 2547) เช่น การทดลองของ Prachyakij *et al*. (2008) ทดลองหมักน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายผมนาง โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* DW3 ได้กรดแลกติก 7.48 g/L และกรดแอซิติก 2.24 g/L เอทานอล 1.57 g/L และ ไม่พบ เมทานอล ส่วนการหมักน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าในการทดลองนี้ได้ กรดแลกติก 5.56 g/L และกรดแอซิติก 1.6 g/L มีค่าอะเซทอลดีไฮด์ เอทานอล และ เมทานอล 0.39 36.20 และ 0.25 g/L ตามลำดับ

เมื่อดูค่า EC มีค่าเริ่มต้น เท่ากับ 453 µs/cm ก่อนการหมัก และเพิ่มเป็น 2,425 µS/cm ในวันที่ 75 ค่าที่ได้บ่งบอกถึงปริมาณแร่ธาตุในรูปไอออนนำไฟฟ้าที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก และจากการที่แบคทีเรียแลกติกย่อยสลายอาหาร และมีการสกัดธาตุอาหารให้อยู่ในรูปไอออนบวกที่ละลายอยู่ในน้ำหมักชีวภาพ อาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย (Kantachote *et al*., 2008)

2. การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดชนิดต่าง ๆ

จากการสุ่มตรวจผักสดที่ซื้อจากตลาดสด มาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* จำนวน 40 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* จำนวนรวม 6 ซีโรวาร์ ดังนี้ *S*. Hvittingfoss *S*. Weltevreden *S*. Agona *S*. Rubislaw *S*. Corvalis และ *S*. Amsterdam var.15+

การพบเชื้อ *Salmonella* ในผักสดแสดงให้เห็นว่า การผักสดที่จำหน่ายอยู่ในประเทศยังไม่ถูกสุขลักษณะ จึงมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ อย่างเช่น *Salmonella* ซึ่งผักส่วนใหญ่มักมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มาจากสิ่งแวดล้อม ตั้งแต่การเพาะปลูก ดิน ปุ๋ย คอก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง ตลอดจนการแปรรูปผัก จากรายงานของ อดิศรและปรีชา (2538) ที่ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และ *Listeria* ในผักที่จำหน่ายในตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 80 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2537 พบว่าเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนจำนวน 7 ตัวอย่าง หรือเท่ากับ 8.8% โดยพบว่าใบสะระแหน่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* สูงที่สุด และซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* ที่ถูกตรวจพบมาก คือ *S*. Weltevreden ในการศึกษาครั้งนี้ในผักสะระแหน่ถูกตรวจพบ *S*. Agona และ *S*. Corvalis ส่วน S. Weltevreden ถูกตรวจพบในยอดผักบุ้งไทย การศึกษาในครั้งนี้ตรวจพบ *Salmonella* รวมถึง 25% และพบในผักหลายชนิด

รายงานการสำรวจการปนเปื้อนของผักสดส่งออกต่างประเทศ โดย อรุณ และคณะ (2549) ได้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และ *E. coli* ในผักสดส่งออก ได้แก่ ผักชี ต้นหอม สะระแหน่ กะเพรา พริก จำนวนรวม 567 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 46 ตัวอย่าง ซึ่ง

การส่งออกผักที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* อาจมีผลทำให้ถูกระงับการซื้อสินค้าจนเกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจได้

3. ผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 100% (undiluted) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากผักสดจากตัวอย่างข้างต้น และ *S.* Typhimurium ATCC 13311 พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 7.53-7.67 log CFU/mL ได้มากกว่า 90% ใน 1 นาทีแรก และยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ 100% ที่ 5-20 นาที อาจเนื่องจากว่าน้ำหมักจำพวกพืชมีกรดอินทรีย์เกิดขึ้นหลายชนิด ซึ่งเป็นกรดที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้การที่มีกรดอินทรีย์อยู่รวมกันมากกว่า 1 ชนิด เช่น กรดแลกติกและกรดแอซิติก หรือบางครั้งอาจมีโพไพโอนิก ซึ่งกรดอิทรีย์เหล่านี้สามารถออกฤทธิ์เสริมกันได้ (synergistic antimicrobial) (Eklund,1990)

บทบาทหลักในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* อย่างรวดเร็ว เชื่อว่าเกิดจากกรดอินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ซึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 1.36% จากการศึกษาของ Mufandaedza *et al.* (2006) ได้รายงานว่า การยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S.* Enteritidis ของแบคทีเรียแลกติก เกิดเนื่องจากการที่อาหารถูกเปลี่ยนสภาพเป็นกรดอย่างรวดเร็ว และการที่ *Salmonella* spp. ถูกทำให้เปลี่ยนสภาวะทันทีในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด (acid shock) มีผลทำให้เชื้อตายลงเป็นจำนวนมากทันที (Arvizu-Medrano *et al*., 2005)

แบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการหมักกล้วยน้ำว้าในครั้งนี้ คือเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DW44 ซึ่ง ดวงพรและวิลาวัณย์ (2547) ได้วิจัยพบว่าเชื้อ *L. plantarum* ไอโซเลท DW44 ที่ใช้หมักน้ำหมักชีวภาพเป็นเวลา 90 วัน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่เชื้อ *S.* Typhimurium *V. parahaemolyticus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี การที่เชื้อ *L. plantarum* DW44 สามารถยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษได้เนื่องจากเชื้อ *L. plantarum* DW44 ผลิตกรดอินทรีย์ แลกติกและแอซิติก และสารอื่น อาทิ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และหรือแบคเทอริโอซิน ช่วยส่งเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ

Park *et al.* (2004) ได้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ LCCM ที่มี 2.0% กลูโคส 4.0% แลกโตส และ 3.0% เคซีน และมี Trypic soy broth (TS) เป็นหลอดควบคุมบวกและลบ ที่ 37°C ในสภาพไร้อากาศ พบว่าหลังบ่มเชื้อนาน 8 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อ LCCM มีค่า pH 4.03-4.19 ซึ่งแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารยับยั้ง *S.* Enteritidis ได้ต่ำกว่า 5 log CFU/g แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TS ที่ pH 4 ยับยั้ง *S.* Enteritidis ได้น้อยกว่าอาหาร LCCM อาจเป็นเพราะในแบคทีเรียแลกติกที่เจริญในอาหาร LCCM สามารถผลิตสารอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน จึงช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ ศศิธร (2548) ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำหมักชีวภาพ

จากพืช อายุช่วงการหมัก 30 วัน พบว่ากรดแลกติกและเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 90028 และงานวิจัยของ Ibrahim *et al*. (2008) ได้ศึกษาผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของกรดแลกติก และ copper sulfate ในการลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 และเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และน้ำแครอท พบว่าการใช้กรดแลกติกและ copper sulfate ร่วมกัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว

4. ผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ในหลอดทดลอง

น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 100% ใช้เวลาในการทำลาย *S.* Typhimurium ประมาณ 2-7 log CFU/mL ได้เร็วที่สุดและทำลายได้หมด 100% เมื่อเทียบกับน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า 50% ซึ่งใช้เวลานานกว่าในการทำลายเชื้อ *S.* Typhimurium ให้หมด และถ้าลดความเข้มข้นของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าลงเป็น 25% พบว่าไม่สามารถทำลายเชื้อประมาณ 7 log CFU/mL ได้หมดภายใน 30 นาที เนื่องจากเชื้อมีปริมาณสูงและสารออกฤทธิ์ได้ถูกเจือจางลงไป ทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลงไปด้วย แต่เมื่อมีปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium อยู่ในระดับที่ต่ำลง คือประมาณ 5 และ 2 log CFU/mL น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% สามารถลดเชื้อ *S.* Typhimurium ลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tolonen *et al*. (2004) ได้รายงานไว้ว่าสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติกหลายๆ สายพันธุ์จากการหมักกระหล่ำปลี (sauerkraut) ที่ความเข้มข้น 1:1 1:5 และ 1:10 ทดสอบกับเชื้อ *E. coli L. monocytogenes* และ *C. lambican* พบว่าสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งเชื้อได้หมดทุกชนิด ในขณะที่สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเจือจาง 1:10 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้

ในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยนี้ น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นน้อยใช้เวลาทำลายเชื้อ *S.* Typhimurium นานกว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นสูง การลดความเข้มข้นของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าลงไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลงตามไปด้วย จึงใช้เวลาในการทำลายเชื้อนานขึ้น ดังนั้นในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ปริมาณของเชื้อ *S.* Typhimurium ที่มากขึ้น จึงต้องใช้เวลาในการทำลายเชื้อนานขึ้น

5. ผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าต่อเชื้อ S. Typhimurium ATCC 13311 ที่ทำการปนเปื้อนบนผัก

เมื่อศึกษาการปนเปื้อนในผัก 4 ชนิด ได้แก่ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และผักกาดหอม ซึ่งเป็นชนิดผักที่ตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* จากการศึกษาในข้อ 2 โดยการสร้างการปนเปื้อนเชื้อ *S.* Typhimurium ในระดับเริ่มต้นประมาณ 7 และ 4 log CFU/mL จากผลการทดลองพบว่า เชื้อในปริมาณที่ใส่บนผักไม่สามารถเกาะติดบนผักได้ทั้งหมด โดยเชื้อ *S.* Typhimurium ในระดับเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/mL เกาะติดบนผิวเพียง 4-6 log CFU/g และเชื้อ *S.* Typhimurium ประมาณ 4 log CFU/mL เกาะติดบนผิวเพียง 1.3-2.2 log CFU/g ซึ่งอธิบายได้ว่า บริเวณที่เหมาะสมกับการเกาะอาจมีไม่เพียงพอ เนื่องจากอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่มาก่อนแล้ว ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในภายหลังต้องหาทางแข่งขันเพื่อเกาะติด เมื่อเชื้อไม่สามารถเกาะติดแน่นได้มากเพียงพอในเวลาที่จำกัด จึงทำให้หลุดออกไปกับการล้างน้ำ (Raiden *et al*. 2003) การศึกษานี้พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium ติดบนผักกาดหอมมากสุด คือเท่ากับ 6.34 log CFU/g ตามด้วยผักชี ผักสะระแหน่ และบนผักบุ้งไทยน้อยสุด คือเท่ากับ 4.85 logCFU/g เป็นไปได้ว่าผักประเภทใบเป็นผักที่มีโอกาสในการปนเปื้อนสูงที่สุด เนื่องจากมีพื้นผิวสัมผัสมากทำให้ง่ายต่อการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2546) Beuchart (1998) เพิ่มเติมว่าผักที่มีพื้นผิวมากและมีผิวขรุขระ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีโอกาสยึดเกาะมากกว่า และปริมาณการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นสัดส่วนกับเนื้อเยื่อที่ฉีกขาดและเสียหายด้วย ซึ่งผักที่ฉีกขาดง่ายจะมีเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าผักที่มีโครงสร้างแข็งแรง คล้ายกันกับงานวิจัยของ Takeuchi and Frank (2000) ได้ทำการวิจัยและรายงานไว้ว่าเชื้อ *E. coli* O157: H7 ระดับปริมาณเชื้อตั้งต้นสูงสามารถแทรกซึมเข้าไปในบริเวณรอยตัดของผักกาดแก้วและยึดเกาะได้ดีกว่าระดับความเข้มข้นต่ำ ด้วยเหตุนี้ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ในผักแต่ละชนิดจึงมีมากน้อยแตกต่างกัน และมีผลต่อการล้างต่างกันไป

จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่า แม้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% และ 25 % แต่ถ้ามีเชื้อ *Salmonella* เริ่มต้น ประมาณ 5 log CFU/mL น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% ยังคงมีประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้ผลดี เนื่องจากการศึกษานี้พบว่าปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ที่ติดอยู่บนผัก มีประมาณ 4-6 log CFU/g จึงได้เลือกใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้น 50% ทดลองล้างผักต่างๆที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 และพบว่าในหลอดทดลอง น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำลายเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ประมาณ 5-7 log CFU/mL ได้ 100% ที่เวลา 10 นาที แต่เมื่อนำมาลดเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนบนผักสดในจำนวน 4.85-6.38 log CFU/g กลับพบว่าน้ำหมักชีวภาพ

กล้วยน้ำว้าเชื้อ 50% สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 บนผักได้เพียง 97.65-99.9% ที่เวลา 20 นาที และเมื่อใช้เวลานานถึง 30 นาที ก็ยังไม่สามารถลดเชื้อได้หมด 100% การที่เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ในการล้างผักน้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างผักมีความซับซ้อน เช่น ใบม้วนพับ การทับซ้อนกัน ทำให้ปกป้องการทำปฏิกริยากับน้ำหมักชีวภาพ (Buck *et al.,* 2002)

Mikołajczyk and Radkowski (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* จากซากไก่ โดยใช้เชื้อ *S.* Enteritidis 1.8 x 10^8 CFU/g *S.* Anatum 1.1 x 10^8 CFU/g และ *S.* Typhimurium 2.3 x 10^8 CFU/g พบว่า กรดแลกติกเข้มข้น 0.1% ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ได้หมดทุกชนิด เมื่อลดความเข้มข้นของกรดแลกติกเป็น 0.05% พบว่าเชื้อ *Salmonella* ถูกลดลงไป 2 log CFU/g และเมื่อลดความเข้มข้นของกรดแลกติกเป็น 0.03% เชื้อ *Salmonella* ได้ลดลงไปเพียง 1 log CFU/g แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ลดลงอย่างชัดเจนในการยับยั้งเชื้อบนซากไก่ การจุ่มซากไก่ที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Salmonella* ปริมาณ 10^1 CFU/g ลงในสารละลาย 1% หรือ 2% กรดแลกติก ทำให้เชื้อ *Salmonella* ลดลงหมดใน 1 นาทีแรกของการสัมผัสสารละลาย เมื่อเพิ่มระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis เป็น 10^2 CFU/g สารละลาย 2% กรดแลกติก ใช้เวลา 15 นาที ในการทำให้เชื้อ *Salmonella* ลดลงหมด และถ้าเพิ่มเชื้อ *S.* Enteritidis เป็น 10^3 CFU/g สารละลาย 2% กรดแลกติก ไม่สามารถลดเชื้อ *Salmonella* ให้หมดได้

เมื่อผักสดมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในปริมาณที่ต่ำ (1.3-2.2 log CFU/g) พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% สามารถลดเชื้อลงได้ 100% ในเวลาสัมผัสสาร 1 นาที ขณะที่การแช่ผักในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม) ลดจำนวนเชื้อลงได้เพียงประมาณ 40-50% เท่านั้น ดังนั้นผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าสามารถทำลาย *S.* Typhimurium ATCC 13311 บนผักได้ แต่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นน้ำบริสุทธิ์ไม่มีสารที่จะทำลายเชื้อได้ การลดลงของชุดควบคุมน้อยกว่า 50% จึงน่าจะเป็นการหลุดออกไปของเชื้อที่อยู่บนผักเท่านั้น

สุริยา (2549) ศึกษาการใช้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าและกรดอินทรีย์ เพื่อลดเชื้อ *S.* Typhi ที่ปนเปื้อนในไก่ดิบ พบว่าในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าเข้มข้น 100% มีกรดแอซิติก 0.33% สามารถทำให้เชื้อ *S.* Typhimurium เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/g ลดลงไป 2.82 log CFU/g ซึ่งต่ำกว่าการใช้สารละลายกรดแอซิติก 0.3% เล็กน้อย ซึ่งทำให้เชื้อลดลงไป 3.17 log CFU/g ไสว (2550) ศึกษาการใช้น้ำหมักชีวภาพสับปะรดและกรดอินทรีย์ เพื่อลดเชื้อ *S.* Typhi สายพันธุ์ 0034 ที่ปนเปื้อนในไก่ดิบ พบว่าน้ำหมักชีวภาพสับปะรดเข้มข้น 100% 50% และ 25% สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhi ปริมาณเริ่มต้น 8 log CFU/g ได้น้อยกว่าสารละลายกรดอินทรีย์ เนื่องจากในการทดลองนั้นสารละลายกรดแลกติกและกรดแอซิติกที่ใช้คือ 0.88% 0.44% 0.26% และ 1% 0.5% 0.3% ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าระดับของกรดแลก

ติกและกรดแอซิติกที่มีอยู่ในน้ำหมักสับประรดเข้มข้น 100% 50% และ 25% คือ 0.36% 0.18% และ 0.09% ตามลำดับ และ 0.2% 0.1% และ 0.05% ตามลำดับ โดยสารละลายกรดแลกติกทั้ง 3 ระดับ ลดเชื้อได้ 2.6 2.45 และ 2.16 log CFU/g และสารละลายกรดแอซิติกทั้ง 3 ระดับ ลดเชื้อได้ 2.12 1.88 และ 1.78 log CFU/g ขณะที่น้ำหมักทั้ง 3 ความเข้มข้น ลดเชื้อได้ 2.0 1.91 และ 1.71 log CFU/g ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำหมักชีวภาพสับประรดสามารถลดเชื้อได้ใกล้เคียงกับสารละลายกรดแอซิติก

การทดลองต่อไปได้เลือกใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% ระยะเวลาสัมผัสสารนาน 20 นาที สำหรับการทดลองเก็บรักษาผักในอุณหภูมิต่างๆ เนื่องจากการแช่ผักในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที มีเปอร์เซต์การลดลงของ *S.* Typhimurium ใกล้เคียงกับการแช่ผักในน้ำหมักนาน 30 นาที หากแต่การแช่ผักในสารฆ่าเชื้อจำพวกกรดอินทรีย์นานเกินไป อาจมีผลเสียต่อลักษณะทางกายภาพของผักได้ เนื่องจากสารฆ่าเชื้ออาจซึมเข้าทางรอยฉีกขาดหรือรอยตัดของผัก ซึ่งอาจมีผลให้เกิดการเน่าเสียได้ง่ายขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้ต่อไป และถ้าเชื้อที่อยู่บนผักในธรรมชาติมีปริมาณน้อยกว่า 2-4 log CFU/g การแช่ผักในน้ำหมักเข้มข้น 50% นาน 20 นาที ก็เพียงพอที่จะทำลายเชื้อได้หมด

6. ผลทดสอบทำการล้างผักสดจากท้องตลาดด้วย น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 50% ระยะเวลาสัมผัส นาน 20 นาที

ผักสะระแหน่จากตลาดจำนวน 1 ตัวอย่างที่ถูกตรวจพบเชื้อ *Salmonella* หลังจากนำไปแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที พบว่าตรวจไม่พบ *Salmonella* ขณะที่ยังคงพบเชื้อ *Salmonella* ได้ภายหลังแช่ในน้ำกลั่น Ukuku *et al*. (2007) กล่าวไว้ว่า ผักส่วนใหญ่มักมีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ประมาณ 3-7.5 log CFU/g ซึ่งมักเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย เช่นพวก *Pseudomonas* และ *Erwina* spp. ส่วนยีสต์และรา มักเป็นพวก *Aspergillus flavus* *Rhodotorula* spp. และ *Byssochlamys* spp. ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Roberts *et al*., 1998) ขณะที่เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ อาทิ *Salmonella* มักพบได้ในจำนวนที่น้อยลงไป จึงมีผลให้การล้างด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% สามารถลดเชื้อ *Salmonella* ได้หมด

7. การเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 บนผักหลังการล้างด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที แล้วเก็บรักษาที่ 4°C และ 30°C

การศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Typhimurium โดยทำการปนเปื้อนเชื้อ บนผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และ ผักกาดหอม ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.7-6.2

log CFU/g พบว่าหลังแช่ในหมักกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที เชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงไป 1.65-2.16 log CFU/g และเมื่อนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4°C นาน1 3 5 และ 7 วัน พบว่า ในวันแรกของการเก็บรักษาที่ 4°C เชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงไปอีก 0.93-1.32 log CFU/g และไม่เพิ่มจำนวนขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ทำให้วันสุดท้ายของการเก็บรักษาเชื้อ *S.* Typhimurium ลงลงไปรวมทั้งสิ้น 1.23-1.93 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าเชื้อ *Salmonella* ลดลงไปเพียง 0.13-0.27 log CFU/g จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น และพบว่าที่วันสุดท้ายของการเก็บรักษา เชื้อ *S.* Typhimurium ลงลงไปรวมทั้งสิ้น 0.61-1.07 log CFU/g เท่านั้น

การที่เชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงในระหว่างการเก็บรักษา เชื่อว่าเป็นเพราะการแช่ผักด้วยน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ทำให้เชื้อ *S.* Typhimurium เกิดการบาดเจ็บ เชื้อจึงจำเป็นต้องอาศัยเวลาในการซ่อมแซม ดังนั้นระยะ lag phase ของเชื้อ *S.* Typhimurium จึงนานขึ้น เมื่อกระบวนการซ่อมแซมเสร็จสมบูรณ์เชื้อจึงจะเจริญได้ ดังนั้นเมื่อนำผักที่มีการปนเปื้อนและผ่านการแช่ในน้ำหมัก ไปตรวจบนอาหาร XLD ซึ่งเป็น selective media เชื้อ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บอยู่จึงไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ภายในตู้เย็นมีอุณหภูมิ และความชื้นต่ำ (ความชื้นสัมพัทธ์ 12-18%) มีผลทำให้เชื้อ *S.* Typhimurium ขาดน้ำ หยุดการเจริญ และอาจต้องต่อสู้กับเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น จึงมีผลชะลอการเจริญของ *S.* Typhimurium บนผิวผัก และทำให้มีจำนวนลดลง (Brackett, 1999) ดังนั้น ปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ที่ถูกตรวจพบในวันที่ 7 จึงไม่แตกต่างไปจากปริมาณเชื้อที่ถูกตรวจพบในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา และผักยังอยู่ในสภาพที่สด การที่ผักยังคงสภาพความสดได้เนื่องจากอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม mesophile ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นอุณหภูมิต่ำ การแข่งขันของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียมีอยู่จำนวนน้อย ทำให้ผักไม่เน่าเสียง่ายที่อุณหภูมิต่ำ (Jaexsens *et al*., 2001)

เมื่อเก็บรักษาผักที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าที่วันแรกของการเก็บรักษา เชื้อ *S.* Typhimurium มีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.0-0.9 log CFU/g และเพิ่มจำนวนขึ้นอีกระหว่างการเก็บรักษาผัก ทำให้ที่วันสุดท้ายของการเก็บรักษาผักที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อ *S.* Typhimurium มีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.84-1.62 log CFU/g ตามแต่ชนิดผัก อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับการแช่ผักในน้ำกลั่น การแช่ผักในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า ยังคงมีจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium โดยรวมน้อยกว่าการแช่ผักในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากงานวิจัยของ Golden *et al*. (1993) พบว่าเชื้อ *Salmonella* สามารถอาศัยอยู่บนผิวแตงและเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง Zhaung *et al*. (1995) พบว่าเชื้อ *Salmonella* สามารถเจริญบนผิวมะเขือเทศได้ เมื่อเก็บไว้ที่ 20-30°C

การที่เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากการเก็บผักไว้ในถุงทำให้ผักคายน้ำออกมาทำให้มีความชื้นสูงเหมาะแก่การเจริญของเชื้อ (Ukuku *et al*., 2004) รวมทั้งการเก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญเติบโตของ *Salmonella* นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 30°C

ยังเหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Koseki and Itoh, 2001) ผักแต่ละชนิดมีการเน่าเสียภายในระยะเวลาต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างผักและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย ในการทดลองครั้งนี้ ผักชีเน่าเสียเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30^{O}C เป็นเวลา 3 วัน ขณะที่สะระแหน่ และผักกาดหอม เน่าเสียที่ 5 วัน ส่วนผักบุ้งไทย เน่าบางส่วนและเก็บได้ 7 วัน

บทที่ 1
บทที่ 5

สรุป

1. น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้ามีสมบัติดังนี้ ปริมาณกรดทั้งหมด 1.36% ค่า pH เท่ากับ 3.50 ค่าการนำไฟฟ้า เท่ากับ 2,425 µS/cm ธาตุอาหาร โซเดียม และ โปแทสซียม เท่ากับ 88.30 และ 1,115 mg/L ตามลำดับ ปริมาณ เอทานอล เมทานอล อะเซทอลดีไฮด์ กรดแลกติก และ กรดแอซิติก เท่ากับ 36.20±0.00 0.25±0.01 0.39±0.00 5.56±0.20 และ 1.6±0.06 g/L ตามลำดับ มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 60 CFU/mL จำนวนแบคทีเรียแลกติก น้อยกว่า 10 CFU/mL จำนวนยีสต์ 10 CFU/mL จำนวนเชื้อรา น้อยกว่า 10 CFU/mL และ MPN Coliforms/100 mL น้อยกว่า 1.1

2. การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดชนิดต่างๆ จำนวน 40 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 10 ตัวอย่าง รวม 6 ซีโรวาร์ คือ *S.* Hvittingfoss *S.* Weltevreden *S.* Agona *S.* Rubislaw *S.* Corvalis และ *S.* Amsterdam var.15+ โดยผักสดที่ถูกตรวจพบได้แก่ สะระแหน่ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักกาดหอม จำนวนอย่างละ 2 ตัวอย่าง ผักกาดขาว และผักชีฝรั่ง จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง ส่วนผักอื่นๆ ตรวจไม่พบ

3. การศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% (undiluted) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 6 ซีโรวาร์ที่แยกได้จากผักสดข้างต้น และเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำหมักเข้มข้น 100% สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ปริมาณเริ่มต้น 7.53-7.67 log CFU/mL โดยมีเปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *Salmonella* spp. เท่ากับ 90.67-94.17% ที่ 1 นาที และ 99.999-100% ที่ 5 นาที

4. เมื่อใช้น้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100 50 และ 25% กับเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 ประมาณ 7 5 และ 2 log CFU/mL ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 100% มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ กล่าวคือ สามารถลดเชื้อได้หมด 100% ในทุกระดับเชื้อที่ระยะเวลาการสัมผัส 5 นาที ส่วนน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 50% ใช้เวลามากขึ้นในการลดเชื้อให้หมด 100% คือ 10 10 และ 5 นาที สำหรับเชื้อ 7 5 และ 2 log CFU/mL ตามลำดับ และน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 25% ใช้เวลาในการลดเชื้อ 5 และ 2

logCFU/mL ให้หมด 100% ที่ 10 และ 5 นาที ตามลำดับ แต่ไม่สามารถลดเชื้อ 7 log CFU/mL ได้หมด 100% ในเวลา 30 นาที

5. จากการปนเปื้อน ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และผักกาดหอม ด้วยเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 พบว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% สามารถลดเชื้อ *S.* Typhimurium บนผักปริมาณ 4.85-6.34 log CFU/g ได้ 84.37–99.5% ในเวลา 30 นาที ในขณะที่ผักตัวอย่างที่แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เวลาเท่ากัน พบว่าเชื้อลดลงเพียงครึ่งของการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า (40.62-47.22%) และเมื่อปนเปื้อนเชื้อ *S.* Typhimurium ในปริมาณ 1.3-2.2 log CFU/mL พบว่า การแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% สามารถลดเชื้อ *S.* Typhimurium ได้หมด 100% ที่ระยะเวลา 1 นาที ในขณะที่ผักตัวอย่างที่ผ่านการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ มีจำนวนเชื้อลดลงเพียงครึ่งหนึ่งของการแช่ในหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า (45-50%) และเมื่อแช่ผักสดที่จำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งถูกตรวจพบเชื้อ *Salmonella* พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้หลังการแช่ผักในน้ำหมักกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที ขณะที่ยังคงพบเชื้อ *Salmonella* ได้ภายหลังการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

6. การเก็บรักษาผักสด ได้แก่ ผักบุ้งไทย ผักชี ผักสะระแหน่ และ ผักกาดหอม ที่ทำการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S.* Typhimurium ATCC 13311 แล้วผ่านการแช่ในน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้าเข้มข้น 50% นาน 20 นาที ทำให้เชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงมากกว่าการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 7 วัน และผักยังมีลักษณะปกติ ส่วนการเก็บที่ 30 ^{O}C เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บ แต่มีจำนวนต่ำกว่าการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และผักมีลักษณะเน่าเสียเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าน้ำหมักชีวภาพกล้วยน้ำว้า มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในผักต่างๆ ได้เป็นอย่างดี

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ ที่อาจมีต้นทุนต่ำกว่า หรือมีปริมาณสารประกอบทางเคมีที่สามารถลดเชื้อได้ดีกว่า

2. ควรมีการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำหมักชีวภาพที่มีผลต่อการลดเชื้อจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดว่าจะมีสารอื่นที่ลดจุลินทรีย์ได้ดีกว่าหรือไม่ เช่น การใช้แบคทีเรียแลกติกที่สร้าง แบคเทอริโอซินได้ มาทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกที่ปนเปื้อนในผัก

3. ควรมีการเลือกใช้ผัก หรือผลไม้ชนิดต่างๆกันไป เพื่อดูประสิทธิภาพการลดเชื้อ เนื่องจากโครงสร้างผัก ผลไม้แต่ละชนิดแตกต่างกัน อาจทำให้การลดเชื้อต่างกัน

4. ควรมีการทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory test) ของผักหลังการแช่ในน้ำหมักชีวภาพว่ามีผลทำให้รสชาติและกลิ่นผิดปกติไปหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ. 2549. การส่งออกผักและผลไม้ที่จะต้องมีหนังสือรับรองการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* และ *Salmonella* ในการส่งออก http://otp.moc.go.th/index_gen.php?page=news_detail&news_id=36 (สืบค้น 17 เม.ย. 2552)

กรมวิชาการเกษตร. 2548. น้ำหมักชีวภาพ : การศึกษาชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่พบ เกษตรกรรมธรรมชาติ. 3: 42-44

กาญจนา ขาวผ่อง. 2551. ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) และผลต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2550. น้ำหมักชีวภาพเทคโนโลยีเพื่อความพอเพียงสู่นวัตกรรมเพื่อสุขภาพชุมชนที่ยั่งยืน.127 หน้า. กรุงเทพฯ. งานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อชนบทและชุมชน ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ดวงพร คันธโชติ และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. คุณลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชและบทบาทของจุลินทรีย์ในขบวนการหมัก. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เสนอสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ดวงพร คันธโชติ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ. 2548. ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27(3): 602-615.

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. 2546. การควบคุมการปนเปื้อน จุลินทรีย์ในผักและผลไม้ http://www.phtnet.org/article/view-article.asp?aID=13 (สืบค้น 3 ม.ค. 2551)

สุดาพร เทียบจัตุรัส. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโซเดียมคลอไรท์และคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายเชื้อบนข้าวโพดฝักอ่อนและหน่อไม้ฝรั่งวิทยานิพนธ์ฝรั่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

สุนันทา ชมพูนิช. 2546. ฮอร์โมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพ.134 หน้า. กรุงเทพฯ. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักงานพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

สุริยา ลิ้มสุวรรณ. 2549. การลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Thyphimurium ในเนื้อไก่ดิบ ด้วยน้ำหมักลูกยอป่า และกรดอินทรีย์ โครงงานทางจุลชีววิทยาวิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

ไสว บัวแก้ว. 2550. การลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Thyphi สายพันธ์ 0034 ในเนื้อไก่ดิบ ด้วยน้ำหมักสับประรด และกรดอินทรีย์ โครงงานทางจุลชีววิทยาวิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

ศศิธร ศิริลุน. 2548. จลนพลศาสตร์ของการหมักลูกยอและฤทธิการยับยั้งจุลชีพของผลิตภัณฑ์ที่ได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่

อดิศร เสวตวัฒน์ และปรีชา จึงสมานุกูล. ซาโมเนลลา และลิสทีเรียในผักสด. 2538. ว. อาหาร. 25(3): 185-189.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์ ทายาท ศรียาภัย ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ พัจนา สุภาสูรย์ วฤษณี ขาวเขียว. 2549. ประสิทธิภาพของ DMSc Salm Media – 1 ในการตรวจหาเชื้อ Salmonella จากผักสดส่งออก และและจำหน่ายในประเทศ. ว. การประชุมทางวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 14 หน้า 57

อานัฐ ตันโช. 2546. แนวคิด หลักการ เทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย เกษตรธรรมชาติ ประยุกต์ พิมพ์ครั้งที่ 2. 371 หน้า เชียงใหม่ บริษัท ทรีโอ แอดเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ มีเดีย

Adams, M. R. and Hall, C.J. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. J. Food Sci. technol. 23(3): 287-292.

Adams, M.R. and Moss, M.O. 2000. Food microbiology 2nd ed. ,Athernaeun press,The royal society of chemistry. Cambridge. UK.

Altekruse, S. F., Cohen, M.L., and Swerdlow, D.L. 1997. Emerging Foodborne Disease. Em. Inf. Dis. 3(3). http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no3/cohen.htm. (accessed September 20, 2008)

Ames B.N. 1979. Identifying Environmental chemicals causing mutations and cancer. Sci, 204(4393): 587-593.

AOAC. 2002. Official method of analysis of the Association of official Analytical Chemist. 15th ed. Vol II. The Association of official Analytical Chemist, Inc. USA.

APHA. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; 4th ed. American Public Health Association, Washington D.C.

APHA. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. American Public Health Association, Washington D.C.

Arvizu-Medrano, S.M., and Escartín, E.F. 2005. Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in acidified media. J. Food Protect. 68(7): 2047-2053

Barak, J.D., Whitehand, L.C. and Charkowski, A.O. 2002. Differences in attachment of *Salmonella* enterica serovars and Escherichia coli O157:H7 to alfalfa sprouts. J. Appl. Environ. Microbiol. 68(10): 4758-63.

Bean, N.H. and Griffin, P.M. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. J. Food Prot. 53(9): 804-817.

Behrsing, J., Jaeger, J., Horlock, F., Kita, N., Franz, P. and Premier, R. 2003. Survival of *Listeria* innocua, *Salmonella* Salford and *Escherichia* coli on the surface of fruit with in edible skins . J. Postharvest Biol. Technol. 29(3): 249-256.

Beuchat, L.R. 1995. Application of biotechnology to fermented foods. Food Technol. 49(1): 97-99.

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

Beuchat, L.R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. a review. Microbes Infect. 4(4): 413-423.

Beuchat, L.R. and Ryu, J.-H. 1997. Producing handling and processing practices. Emerg. Infect. Dis. 3: 459-465.

Brackett, R.E. 1999. Incidence, contributing factors and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biol. Technol. 15: 305-311.

Buck, J.W., Walcott, R., and Beuchat, L.R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. http://www.apsnet.org/online/feature/safety/ (accessed January 17, 2009)

Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survay. Crit. Rev. Microbiol. 28(4): 281-370

Castillo, A., Lucia, L.M., Roberson, D.B., Stevenson, T.H., Mercado, I. and Acuff, G.R., 2001. Lactic acid aprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. J. Food Prot. 64(1): 58–62

CDC. 2001. Outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium associated with veterinary facilities---Idaho, http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5033a1.htm (accessed Febuary 8, 2009)

CDC. 2008. Investigation of Outbreak of Infections caused by *Salmonella* Saintpaul, update August 22, 2008 - Case count information as of 9 pm EDT, August 21, 2008 http://www.cdc.gov/Salmonella/saintpaul/archive/082208.html (accessed Febuary 8, 2009)

Chang, J.M. and Fang, T.J. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E.coli* O157:H7. J. Food Microbiol. 24: 745-751

Choi, S.S., Kang, B.Y., Chung, M.J., Kim, S.D., Park, S.H., Kim, J.S., Kang, C.Y. and Ha, N.J. 2005. Safety assessment of potential lactic acid bacteria *Bifidobacterium* longum PM1205 isolated from healthy Koreans. 43(6): 493-8.

Chung, K.C., and Goepfert, J.M. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. J. Food Sci. 35: 326-328.

Cords, B.R. and Dychdala, G.R. 1993. Sanitizer : halogens, surface-active agents, and peroxide, pp.469-537. Antimicrobials in Foods. 2nd ed. Marcel Dekker, New York.

De Vuyst, L and Vandamme E. 1994. Bacteriocins of Lactic acid bacteria. The alden press, Oxford. UK.

DiPersio, P.A., Kendall, P.A., Yoon, Y. and Sofos, J.N. 2007. Influence of modified blanching treatments on inactivation of *Salmonella* during drying and storage of carrot slices. Food Microbiol. 24(5): 500-507.

Doores, S. 1993. Organic acids. In: Antimicrobials in foods, 2nd ed. Ch. 4, pp. 95-136. Marcel Dekker, Inc., New York.

Doyle. M.P, Beuchat, L.R and Montville. 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, ASM press, Washington D.C.

Doyle, M.P. and Erickson, M.C. 2008. Summer meeting 2007 - the problems with fresh produce: an overview. a review. J. Appl. Microbiol. 105(2): 317-30.

Eklund, T. 1990. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. J. Appl. Bacteriol. 48: 423.

Escudero, M.E., Velázquez, L., Favier, G. and de Guzmán, A.M. 2003. Effectiveness of chlorine, organic acids and UV treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on apples. Cent. Eur. J. Public Health. 11(2): 68-72.

Golden, D.A., Rhodehamel, E.J. and Kautter, D.A. 1993. Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon and honeydew melons. J. Food Prot. 56(3): 194-196.

Heaton, J.C. and Jones, K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. J. Appl. Micro. 104(3): 613-26.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. and Williams S.T. 1996. Bergey's 10th ed. Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Ibrahim, A.S., Yang, H. and Seo, W.C. 2008. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. Food Chem. 109(1): 137-143.

ISO 15214. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C.

ISO 6579. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.

Jacxsens, L., Devlieghere, F., Van der Steen, C. and Debevere, J. 2001. Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. Int. J. Food Microbiol. 71(2-3): 197-210.

Jay, J.M. 2000. Modern food microbiology. Aspen publications. Gaithersburg. Maryland.

Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W. 2008a. Effects of initial air removal methods on microorganisms and characteristics of fermented plant beverages. Pak. J. Biol. Sci. 11(2): 173-80

Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W. 2008b. Selection of lactic acid bacteria from fermented plant beverages to use as inoculants for improving the quality of the finished product. Pak. J. Biol. Sci. 11(22): 2545-52.

Kantachote, D., Charernjiratrakul, W. and Umsakol, K. 2008. Antimicrobial activity of fermented plant beverages collected in southern of Thailand. J. Biol. Sci. 8(8): 1280-1288

Knight, M.T., Newman, M.C., Benzinger, M.J., Neufang Jr, K.L. and Agen, J.R. 1997. Comparison of the Petrifilm dry rehydratable film and conventional culture methods for enumeration of yeasts and molds in foods: collaborative study. J. AOAC. Int. 80(4): 806-824.

Koseki, S. and Itoh, K. 2001. Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature condition. J.Food Prot. 64(12): 1935-1934

Lacey, R.W. 1993. Food-borne bacterial infections. J. Parasit. 107(Supp): 75-93.

Liao, C.H., Shollenberger, L.M. and Phikkips, J.G. 2003. Lethal and Sublethal Action of Acetic Acid on Salmonella In Vitro and on Cut Surfaces of Apple Slices. J. Food Sci. 68(9): 2793-2798.

Lin, W., Huang, T., Cornell, J.A., Lin, C. and Wei, C. 1996. Bactericidal activity of aqueous chlorine and chlorine dioxide solutions in fish model system. J. Food Sci. 61(5): 1030-1034.

Mante, E.S., Sakyi-Dawson, E. and Amoa-Awua, W.K. 2003. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. Int. J. Food Microbiol. 89(1): 41-50

McCarty, P.L. 1964. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals, J. Public Works. 9 (10): 107-112.

Mignone, N.A. 2005. Biological Inhibition / Toxicity Control In Municipal Anaerobic Digestion Facilities. http://www.awpca.net/Biological Inhibition.pdf (accessed Febuary 20, 2008)

Mikołajczyk, A. and Radkowski, M. 2002. Elimination of *Salmonella* spp. by lactic acid. Pol. J. Vet. Sci. 5(3): 139-43.

Mufandaedza, J., Viljoen, B.C., Feresu, S.B. and Gadaga, T.H. 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic Escherichia coli and Salmonella enteritidis strains. Int J. Food Microbiol. 108(1): 147-52.

Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51(6): 730-50.

Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. p139–160. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Parish, M.E., Narciso, J.A., Friedich, L. M. 1997. Survival of *Salmonella* in orange juice. J. Food Safety. 17: 273 – 281.

Park, D.L., Rua, S.M. and Acker, R.F. 1991. Direct application of a new hypochlorite sanitizer for reducing bacterial contamination on foods. J. Food Prot. 54(12): 960-965.

Park, J.H., Seok, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Chung, M.J., Kim, S.D., Hong, U.P and Park J.H. 2005. Antimicrobial effect of lactic acid producing bacteria culturecondensate mixture (LCCM) against *Salmonella* enteritidis. Int. J. Food Microbiol. 101: 111–117

Penteado, A.L., Leitão, M.F., 2004. Growth of *Salmonella* Enteritidis in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures, J. Food Control. 15(5): 369-373

Popoff, M.Y. and Le Minor, L. 2001. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars.8th ed. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institue Pasteur, Paris, France.

Prachyakit, P., Schurer, J., Charernjiratrakul, W. and Kantachote, D. 2007. Selection and Identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plate beverages. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29(Suppl 2): 211-218

Prachyakit, P., Charernjiratrakul, W. and Kantachote, D. 2008. Imporvment in the quality of a fermented seaweed beverage using and antiyeast starter of *Lactobacillus plantarum* DW3 and partial sterilization. World. J. Micro. Biotecnol. 24: 1713-1720.

Raiden, R.M., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Pierson, M.D. 2003. Efficacy of detergents in removing *Salmonella* and *Shigella* spp. from the surface of fresh produce. J Food Prot. 66(12): 2210-2215.

Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S.D. and Maguin, E. 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* : identification of intracellular stress signals. Mol Microbiol. 35(3): 517-28

Reinmann, H. and Byran F. L. 1979. Food-Borne Infections and Intoxications 2nd ed. Academic Press. New York.

Roberts, T.A., Pitt, J.I., Farkas, J. and Grau, F.H. 1998. Microorganisms in foods 6:microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, New York.

Savard, T., Beaulieu, C., Gardner, N. and Champagne, C.P. 2002. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and Inhibition by lactic, acetic and propionic acids. J. Food Microbiol. 19: 363-373.

Segun, I.Y. and Karapinar,M.2005.effectiveness of house hold natural sanitizers in the elimination of Salmonella typhimurium on rocket (Erucasativa Miller) and spring onion (Alliumcepa L.). Int. J. Food Microbiol. 9: 8319-323.

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

Stokes, J.L., Bayne, H.G. 1957. Growth rates of *Salmonella* Colonies. J. Bacteriol. 74(2): 200–206.

Takeuchi, K. and Frank, J.F. 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. J. Food Prot. 63: 434–440.

Tamplin, M. 1997. Salmonella and cantaloupes. Dairy Food and Env. San. 17 (5): 284-286.

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

Tauxe, R.V.1997. Emerging foodborne diseases:an evolving public health challenge. Special issue : Emerg. Infect. Dis. 3: 425-434.

Tolonen, M., Rajaniemi, S., Pihlava, J.M., Johansson, T., Saris, P.E.J., Ryh anen, E.L. 2004. Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. Food Microbiol. 21: 167–17.

Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., Badosa, E. 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. Int Microbiol. 11(4): 231-236.

Ukuku, D.O.and Sapers, G.M. 2007. Effect of time before storage and storage temperature on survival of *Salmonella* inoculated on fresh-cut melons. Food Microbiol. 24(3): 288-295.

Ukuku, DO., Pilizota, V. and Sapers, G.M. 2004. Effect of hot water and hydrogen peroxide treatments on survival of *Salmonella* and microbial quality of whole and fresh-cut cantaloupe. Food Prot. 67(3): 432-437.

Viswanathan, P. and Kaur, R., 2001. Prevalence and growth of pathogens 1 on salad vegeteables, 2 fruits and sprouts. Int. J. Hyg. Environ. Health. 203: 205-213.

Warner, J.C., Rothwell, S.D., Keevil, C.W. 2008. Use of episcopic differential interference contrast microscopy to identify bacterial biofilms on salad leaves and track colonization by *Salmonella* Thompson. Environ Microbiol. 10(4): 918-925.

Wells, J.M. and Butterfield, J.E. 1997. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. Plant Disease. 81: 867-872.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of lactic acid bacteria.398 pp. London. Blackie Academic.

Zhan, S. and Farber, J.M. 1996. The effect of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh cut vegetable. J. Food microbial. 13: 311-321.

Zhaung, R.Y., Beuchat, L.R. and Angulo, F.J. 1995. Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. App. Env. Micro. 61(6): 2127–2131.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยา

1.อาหารเลี้ยงเชื้อ

Brilliant Green Lactose Bile Broth

Peptone	10	g
Lactose	10	g
Oxgall	20	g
Brilliant green	0.0133	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH 7.0-7.5. ปิเปต 10 ml ใส่หลอดทดสอบขนาด 20 x 150 mm ที่มีหลอดดักแก๊ส นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที ปรับ pH สุดท้ายให้ได้ 7.2 ± 0.1.

Buffered Peptone Water

Peptone	10.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Disodium phosphate	3.5	g
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย pH, 7.2 ± 0.2.

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

Enzymatic digest of casein	10.0	g
Meat extract	10.0	g
Yeast extract	4.0	g
Triammonium citrate	2.0	g

Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate heptahydrate	2.0	g
Manganese sulfate tetrahydrate	0.05	g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	g
Glucose	20.0	g
Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80)	1.08	g
Agar	12 ถึง 18	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย 5.7 + 0.1

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Enzymatic digest of casein	10.0	g
Meat extract	10.0	g
Yeast extract	4.0	g
Triammonium citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate heptahydrate	2.0	g
Manganese sulfate tetrahydrate	0.05	g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	g
Glucose	20.0	g
Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80)	1.08	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย 5.7 + 0.1

Levine's Eosin-Methylene Blue (L-EMB) Agar

Peptone	10	g
Lactose	10	g
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g
Agar	15	g

Eosin Y	0.4	g
Methylene blue	0.065	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย pH, 7.1 ± 0.2.

Lauryl Sulfate Tryptose (LST) Broth

Tryptose or trypticase	20	g
Lactose	5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.75	g
Potassium dihydrogen phosphate	2.75	g
Sodium chloride	5	g
Sodium lauryl sulfate	0.1	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ปิเปต 10 ml ใส่หลอดทดสอบขนาด 20 x 150 mm ที่มีหลอดดักแก๊ส นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที ปรับ pH สุดท้ายให้ได้ 6.8 ± 0.2

Lysine Indole Motility Medium

Peptone	10.0	g
Tryptone	10.0	g
Yeast extract	3.0	g
L-Lysine hydrochloride	10.0	g
Dextrose	1.0	g
Ferric ammonium citrate	0.5	g
Bromcresol purple	0.02	g
Agar	2.0	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ต้มจนส่วนประกอบละลายเข้าด้วยกัน ปรับ pH 6.6 $\pm$ 0.2 แบ่งใส่หลอด 13×100 mm หลอดละ 4 mL นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย pH, 7.2 ± 0.2

Plate Count Agar

Tryptone	5.0	g
Glucose	1.0	g
Yeast extract	2.5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย pH 7.0 $\pm$ 0.2.

Potato Dextrose Agar

Potato starch	4.0	g
Dextrose	2.0	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้ายปรับ pH 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริก10%

Tetrathionate Broth

Tetrathionate broth base

Polypeptone	5.0	g
Bile salts	1.0	g
Calcium carbonate	10.0	g
Sodium thiosulfate. 5H2O	30.0	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ต้มเดือดแล้วทิ้งให้เย็น 45^{O}C นำไปเก็บที่ 5-8 ^{O}C pH สุดท้าย 8.4 $\pm$ 0.2

Triple Sugar Iron Agar

Beef extract	3.0	g
Yeast extract	3.0	g
Peptone	15.0	g
Proteose peptone	5.0	g
Glucose	1.0	g
Lactose	10.0	g
Sucrose	10.0	g
Ferrous sulfate	0.2	g
Sodium chloride	5.0	g
Sodium thiosulfate	0.3	g
Phenol red (0.2% solution)	12.0	mL
Agar	12.0	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ต้มจนส่วนประกอบละลายเข้าด้วยกัน แบ่งใส่หลอด 13x100 mm หลอดละ 3.5 mL pH สุดท้าย pH, 7.4 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้ววางเอียงเป็น slant

Tryptic Soy Agar

Peptone from casine	15	g
Peptone from soymeal	5.0	g
Sodium chloride	15	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1,000	mL

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ปรับ pH ฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที pH สุดท้าย pH, 7.2 ± 0.2.

Rappaport-Vassiliadis Medium

Broth base

Tryptone	5.0	g
Sodium chloride	8.0	g
Potassium dihydrogen phosphate	1.6	g
น้ำกลั่น	1,000	mL

Magnesium chloride solution

Magnesium chloride. $6H_2O$	400	g
น้ำกลั่น	1,000	mL

Malachite green oxalate solution

Malachite green oxalate	0.4	g
น้ำกลั่น	100	mL

เตรียมสารละลายโดยใช้ broth base 1000 mL magnesium chloride solution 100 mL และ malachite green oxalate solution 10 mL (ปริมาตรเป็น 1110 mL) แล้วปิเปต 10 mL ใส่หลอด 18x150 mm นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 115 ^{O}C 15 นาที ปรับ pH สุดท้ายให้ได้ 5.5 ± 0.1. แล้วนำไปเก็บที่ 4 ^{O}C ได้ 1 เดือน

Xylose Lysine Desoxycholate Agar

Yeast extract	3.0	g
L-lysine	5.0	g
Xylose	3.75	g
Lactose	7.5	g
Sucrose	7.5	g
Sodium desoxycholate	2.5	g
Ferric ammonium citrate	0.8	g
Sodium thiosulfate	6.8	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	15.0	g
Phenol red 0.2 % solution	4.0	mL
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ต้มจนส่วนประกอบละลายเข้าด้วยกัน ระวังไม่ให้เดือดนาน ปล่อยให้เย็น 50 ^{O}C pH สุดท้ายเป็น 7.4 ± 0.2 แล้วเทใส่ plate นำไปเก็บที่ 4 ^{O}C

2. สารเคมี

Brilliant green solution

Brilliant green solution dye	0.1	g
น้ำกลั่น	100	mL

ละลาย Brilliant green solution dye ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 mL

Iodine-Potassium Iodide (I_2-KI) solution

Potassium iodide	5.0	g
Iodine, resublimed	6.0	g
น้ำกลั่น	20.0	mL

ละลาย potassium iodide ในน้ำกลั่น 5 mL เติม iodine และคนให้ละลาย เติมน้ำจนครบ 20 mL

.

Kovacs ' Reagent

Paradimethylaminobenzaldehyde	5.0	g
Isoamyl (or normal amyl) alcohol	75	mL
Hydrochloric acid (concentrated)	25	mL

ละลาย benzaldehyde ใน isoamyl alcohol และเติม hydrochloric acid.

Sodium chloride (NaCl 0.85%)

Sodium chloride	85	g
น้ำกลั่น	1, 000	mL

ละลาย potassium iodide ในน้ำกลั่น 5 mL เติม iodine และคนให้ละลาย เติมน้ำจนครบ 20 mL

Sterile distill water

น้ำกลั่น	1000	mL

นำน้ำกลั่นไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 ^{O}C 15 นาที

McFarland

ผสมสารละลาย 1% Barium chloride กับสารละลาย 1% Sulfuric acid ตามตารางดังนี้

No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
1% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx. cell density ($\times 10^8$/ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ใส่หลอดทดสอบชนิดฝาเกลียวเก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด โดยวิธี Titration method (AOAC, 2002)

สารเคมี

1. น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (น้ำกลั่นต้มเดือด 20 นาที ใส่ soda lime เล็กน้อย)
2. สารละลาย 0.1N NaOH (NaOH 4 g เติมน้ำให้ครบ 1 L) เก็บใส่ขวดแก้วที่ ทนกรดด่างและกันคาร์บอนไดออกไซด์ ก่อนนำมาใช้หาความเข้มข้นมาตรฐาน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH

Acid potassium phthalate ($KHC_8H_4O_4$) อบ 2 ชั่วโมง ที่ 120° C แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่ง 0.3 g ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 mL เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ให้ครบ 100 mL เมื่อ Acid potassium phthalate ละลายจึงเติม phenolphthalein (ชั่งสาร 1 g ละลายในแอลกอฮอล์ 95 % 100 mL) 3 หยด แล้วไตเตรตด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐาน

$$\text{คำนวณได้จากสูตร (N)} = \frac{\text{g } KHC_8H_4O_4 \times 1000}{\text{mL ของ 0.1 N NaOH} \times 204.229}$$

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 1 mL เจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เติมสารละลาย phenolphthalein 3 หยด แล้วไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนๆ ปริมาณกรดคำนวณได้จากสูตร

$$\text{กรดทั้งหมด (g/100 mL)} = \frac{NxVx100}{1000X1}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH

V = จำนวน mLของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

2. การอ่านค่า MPN Cloiforms แบบ 10 หลอด

ตารางที่ 19 ตาราง MPN/100 mL แบบ 10 หลอด และค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

หลอดให้ผลบวก (positive)	MPN/100mL	ค่าระดับความเชื่อมั่น 95%	
		ต่ำ	สูง
0	<1.1	-	3.3
1	1.1	.05	5.9
2	2.2	.37	8.1
3	3.6	.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	-

ที่มา: APHA (2005)

3. วิธีทดสอบ serological test ของ *Salmonella*

โดยเขี่ยเชื้อจาก หลอด TSI ที่ให้ผลชีวเคมีตรงตามลักษณะของ *Salmonella* มาทดสอบการตกตะกอน(Slide agglutination กับ แอนติซีรั่มของ *Salmonella* ชนิด OMA OMB OMC OMD OME OMF และ OMG โดยเริ่มจาก *Salmonella* polyvalent OMA OMB OMC ก่อน ให้ทดสอบเพิ่มกับ *Salmonella* polyvalent กลุ่มอื่น ได้แก่ OMD OME OMF และ OMG ถ้ามีการตกตะกอนอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งของการทดสอบแสดงว่าเชื้อจัดอยู่ใน ซีโรวาร์ชนิดนั้น ถ้าให้ผลลบคือไม่ตกตะกอน และใช้น้ำเกลือ 0.85% เป็นตัวเปรียบเทียบ ในน้ำเกลือ 0.85% ต้องไม่ตกตะกอน จากนั้นส่ง ซีโรวาร์ไปที่จำแนกได้ไปเพื่อตรวจสอบซีโรไทป์ของ *Salmonella* ที่ WHO National *Salmonella* and Shigella Center กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร (Popoff and Le Minor , 2001)

Polyvalent-O แอนติซีรั่ม .ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วย *Salmonella* กลุ่มย่อยดังนี้

Polyvalent-O	Group
OMA	A, B, D, E, L
OMB	C, F, G, H
OMC	I, J, K, M, N, O, P
OMD	Q, R, S, T, U, V, W
OME	X, Y, Z
OMF	0:54 ถึง 0:59
OMG	0:60 ถึง 0:67

ประวัติผู้เขียน

ชื่อสกุล นางสาวนวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4822035

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จ
การศึกษา		
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2533
ประกาศนียบัตรบัณฑิต (การประกันคุณภาพสินค้าอุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2538

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ ฝ่ายจุลชีววิทยา สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Rattanadilok na phuket, N., Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W. 2008. Effect of fermented banana juice on reduction of *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 on fresh vegetable. The 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University , Bangsaen, Chonburi, Thailand.