คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน ในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี

Microbiological Quality of Sugar Syrup Packed in Cartoon-Shaped Plastic Contains in Nongmon and Chonburi Markets.

ห้องสมุด
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

02397

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

นางสาวพรเพ็ญ อติรัตน์

ปัญหาทางจุลชีววิทยานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2545

ลิขสิทธิ์เป็นของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์สุดสายชล หอมทอง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

( )

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(อาจารย์สุดสายชล หอมทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิรดี ปิลันธนภาคย์)

..... กรรมการ

(อาจารย์นิสา บุตรดา)

ภาควิชาจุลชีววิทยาอนุมัติให้รับปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา

..... หัวหน้าภาควิชา

(ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณประการ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์สุดสายชล หอมทอง ที่เป็นที่ปรึกษาและได้ให้คำแนะนำรวมทั้งแนะแนวทางในการทำปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา และสนับสนุนในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิรดี ปิลันธนภาคย์ และอาจารย์นิสา บุตรดา ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณคุณปกิจพงษ์ ชลันธร คุณอภิลักษณ์ ลอยล่อง และคุณหลิม ชะอุ่มใบ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกเอื้อเฟื้อเครื่องมือปฏิบัติงาน ทำให้งานวิจัยสะดวกและรวดเร็วขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และพี่สาว ที่ให้ความรัก อบรมเลี้ยงดู สนับสนุนด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจให้เสมอ

ขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจและอำนวยความสะดวกในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

คณประโยชน์และความดีของปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้ ขอมอบแด่ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง รวมทั้งคณาจารย์ที่เคยอบรมสั่งสอนและประสาทวิชาทุกท่าน

พรเพ็ญ อติรัตน์

กุมภาพันธ์ 2545

วันที่ลงทะเบียน 18 มี.ค. 2546
เลขทะเบียน 02397
เลขหมู่หนังสือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของการศึกษา	3
ความสำคัญของาการศึกษา	3
สมมติฐานของการศึกษา	3
ขอบเขตของการศึกษา	3
สถานที่ทำการทดลอง	3
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	4
รายละเอียดและวิธีการผลิตน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน	4
แบคทีเรียโคลิฟอร์ม	4
Escherichia coli	5
Clostridium perfringens	7
Staphylococcus aureus	10
Salmonella	11
รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	25
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	37
สรุปผลการทดลอง	37
อภิปรายผลการทดลอง	37
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	45

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ก..... 46
ภาคผนวก ข..... 58
ภาคผนวก ค..... 60
ภาคผนวก ง..... 63

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของ *E. coli*.....	7
2	แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดคัดเลือกและลักษณะโคโลนีของ *C. perfringens*.....	9
3	แสดงการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนก *C. perfringens*.....	9
4	ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก.....	11
5	แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดคัดเลือกและลักษณะโคโลนีของ *Salmonalla*.....	13
6	การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจำแนก *Salmonalla*.....	14
7	การทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมสำหรับจำแนก *Salmonalla*.....	15
8	การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรีครั้งที่ 1 ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544.....	27
9	การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรีครั้งที่ 2 ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2544.....	29

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 การเปรียบเทียบร้อยละการตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* และ *C. perfringens* ในตัวอย่างทั้งสองประเภท (ก) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และ (ข) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 33

2 การเปรียบเทียบร้อยละการตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* และ *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำหวานที่แสดงและไม่แสดงฉลากของเครื่องดื่มของการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 34

3 จำนวนร้อยละของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนที่เข้าและไม่เข้ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) (ก) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และ (ข) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 37

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อวิจัย คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี

ชื่อผู้วิจัย นางสาวพรเพ็ญ อติรัตน์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

จากการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 พบตัวอย่างไม่เข้ามาตรฐานแบ่งเป็น ตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากและไม่แสดงฉลากของเครื่องดื่มคิดเป็นร้อยละ 30 และ 60 ตามลำดับ โดยพบการปนเปื้อนของยีสต์คิดเป็นร้อยละ 33.3 ส่วนรา โคลิฟอร์ม และ *E. coli* พบการปนเปื้อนในตัวอย่างอัตราเท่ากันคิดเป็นร้อยละ 13.3 และพบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด *S. aureus* และ *C. perfringens* คิดเป็นอัตราเท่ากันคือ ร้อยละ 6.67 ในตัวอย่างทั้งสองประเภท สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 พบตัวอย่างไม่เข้ามาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 50 และ 60 ของตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากและไม่แสดงฉลากของเครื่องดื่มตามลำดับ โดยพบการปนเปื้อนของยีสต์ รา โคลิฟอร์ม *E. coli* และ *C. perfringens* คิดเป็นร้อยละ 53.33, 6.67, 33.33, 6.67 และ 6.67 ตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ในทุกตัวอย่าง

คำสำคัญ : น้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน คุณภาพทางจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Title Microbiological Quality of Sugar Syrup Packed in Cartoon-shaped Plastic Contains in Nongmon and Chonburi Markets.

Name Miss Pornpen Atirat

Department Microbiology

Academic Year 2001

ABSTRACT

Microbiological quality of sugar syrup packed in cartoon-shaped plastic contains was investigated in Nongmon and Chonburi markets, 2001. Fifteen samples, including labeled and non-labeled forms, were collected from Nongmon and Chonburi markets. Results obtained from the first analysis demonstrated that 30% and 60% of labeled and non-labeled samples, respectively, were substandard. Contamination of yeasts found in 33.3% of samples. Moreover, 13.3% analyzed samples were showed to be contaminated with molds, coliform bacteria, and *E. coli*. *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens*, which are food-poisoning bacteria, were detected in 6.67% of the samples. Similarly, the second analysis reported substandard samples of labeled and non-labeled formed as 50% and 60%, respectively, 53.3% of samples were showed the contamination of yeasts while detection of molds was revealed in samples of 6.67%. In addition, 33.3%, 6.67% and 6.67% of samples were contaminated with coliform bacteria, *E. coli* and *C. perfringens*, respectively. Neither the first nor the second evaluation was demonstrated the contamination of Salmonellae.

Key words : sugar syrup packed in cartoon-shaped plastic container, microbiological qualities

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบันมีการแข่งขันผลิตเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ อย่างแพร่หลายเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคให้ได้มากที่สุด เครื่องดื่มมีความสำคัญเช่นเดียวกับอาหาร เพราะนอกจากให้พลังงานและดับกระหายคลายความร้อนแล้ว เครื่องดื่มบางชนิดยังอุดมด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าต่อร่างกายไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลซึ่งให้พลังงานแก่ร่างกายและทำให้รู้สึกสดชื่น อีกทั้งในน้ำผลไม้ยังมีวิตามินและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อร่างกาย ปกติน้ำตาลในเครื่องดื่มมักมีความเข้มข้นสูงซึ่งนอกจากจะเป็นตัวให้ความหวานแล้วยังทำหน้าที่ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ด้วย ดังนั้นหากมีการควบคุมการผลิตที่ดีจะสามารถยืดอายุการเก็บของเครื่องดื่มโดยไม่ต้องพึ่งวัตถุกันเสีย แต่เครื่องดื่มโดยเฉพาะน้ำผลไม้หรือน้ำหวานมีสารอาหารบางชนิดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ถ้าเครื่องดื่มมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเครื่องดื่มจะสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสามารถก่อโรคแก่ผู้บริโภคก่อนที่จะมีการเน่าเสียของเครื่องดื่มนั้นเสียอีก (ธาริยา, 2540)

น้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนจัดเป็นเครื่องดื่มที่บรรจุในภาชนะปิดสนิท ซึ่งมีมาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 62 (พ.ศ.2524) เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ น้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนเป็นเครื่องดื่มที่มุ่งขายให้แก่เด็ก เนื่องจากเด็กจะชอบความแปลกของรูปร่างภาชนะที่บรรจุและสีสันที่สะดุดตา แต่ปัญหาที่พบคือในการผลิตเครื่องดื่มประเภทนี้มักไม่มีการขออนุญาตจากเจ้าหน้าที่ของรัฐ การผลิตจะทำเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่พิเศษทันสมัย สถานที่ผลิตยังไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตจึงมีความเสี่ยงสูง (ยุพา และคณะ, 2538) จุลินทรีย์ที่บ่งชี้ถึงสุขลักษณะได้แก่ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย *Escherichia coli* ยีสต์หรือรา และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Staphylococcus aureus* *Clostridium perfringens* และ Salmonellae ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง ชีพจรอ่อนและอาจมีไข้หรือปวดศีรษะร่วมด้วยแล้วแต่ชนิดของเชื้อ (ลดาพรรณ และคณะ, 2533)

การดูแลความสะอาดของกระบวนการผลิตเป็นสิ่งที่ผู้ผลิตต้องให้ความใส่ใจระมัดระวังนับตั้งแต่วัตถุดิบ อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ภาชนะบรรจุน้ำหวานและขบวนการบรรจุน้ำหวานลงในภาชนะ รวมทั้งสุขอนามัยของผู้ผลิตด้วย การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษสามารถทำให้ผู้บริโภคน้ำหวานที่มีการปนเปื้อนเกิดอาการของโรคได้ โดยเฉพาะเด็กที่มีภูมิต้านทานต่อโรคต่ำกว่าผู้ใหญ่และเป็นกลุ่มผู้บริโภคที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เป็นเป้าหมายหลักของการผลิตเครื่องดื่มประเภทนี้ เด็กจะเกิดอาการของโรคง่ายกว่าผู้ใหญ่ เนื่องจากปริมาณของเชื้อที่จะทำให้เกิดอาการของโรคในเด็กน้อยกว่าผู้ใหญ่ การบริโภคเครื่องดื่มที่ยังมีการผลิตไม่ถูกต้องตามสุขลักษณะที่ดีอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคโดยเฉพาะเด็กที่มีภูมิต้านทานต่อโรคต่ำ ดังนั้นเพื่อเป็นการเฝ้าระวังและคุ้มครองผู้บริโภค จึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการสำรวจคุณภาพของเครื่องดื่มประเภทนี้ที่จำหน่ายในบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้แก่หน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบในการควบคุมคุณภาพอันได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสามารถสะท้อนปัญหาที่พบเพื่อให้มีการปรับปรุงการผลิตเครื่องดื่มประเภทนี้ให้ดีขึ้นและถูกต้องตามกฎหมายต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความมุ่งหมายของการศึกษา

เพื่อศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนที่จำหน่ายในร้านขายของชำและตลาดนัดในบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี

ความสำคัญของการศึกษา

1. เพื่อทราบคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนที่วางจำหน่ายในบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี
2. เพื่อนำข้อมูลไปใช้เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากเครื่องดื่มประเภทนี้

สมมติฐานของการศึกษา

น้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนที่มาจากแหล่งผลิตต่างกัน มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระดับต่างกัน โดยน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนที่มีการผลิตแบบอุตสาหกรรมครัวเรือนไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม น่าจะพบการปนเปื้อนมากกว่าที่มีการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มที่แน่นอน

ขอบเขตของการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และราทั้งหมด โคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* *C. perfringens* และ *Salmonella* spp. ที่อาจมีการปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ ประเภทที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มและประภทที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม ดำเนินการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ในเดือนตุลาคม และครั้งที่ 2 ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2544 โดยสุ่มจากร้านขายของชำและตลาดนัดในบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี โดยให้เกณฑ์ในการตัดสินที่กำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ.2524)

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. **รายละเอียดและวิธีการผลิตน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน**
2. **รายละเอียดและวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม** *Escherichia coli Clostridium perfringens Staphylococcus aureus* **และ** *Salmonalla*
3. **รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา**

ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. รายละเอียดและวิธีการผลิตน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน

ในการผลิตน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนส่วนมากเป็นการผลิตแบบอุตสาหกรรมในครัวเรือนซึ่งจะมีขั้นตอนการผลิตดังนี้ (นงคราญ และคณะ, 2540)

1. นำน้ำหวานที่มีความเข้มข้นสูง ๆ มาทำการเจือจางให้ได้ปริมาณที่มาก ๆ
2. เมื่อได้ความหวานที่ต้องการแล้วอาจมีการเติมสีแต่งกลิ่นหรือวัตถุกันเสีย เพื่อให้มีสีสันที่สะดุดตาและยืดอายุการเก็บให้ยาวนานขึ้น
3. นำมาบรรจุในหลอดพลาสติกที่มีรูปร่างต่าง ๆ
4. นำมาผนึกปากหลอดให้สนิท

2. รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Escherichia coli Clostridium perfringens Staphylococcus aureus* และ *Salmonalla*

2.1 แบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *E. coli*

โคลิฟอร์ม (Coliforms)

โคลิฟอร์ม (Coliforms) หมายถึง กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์เป็นพวกแอโรปส์หรือแฟคัลเททีฟ หมักน้ำตาลแล็กโทสได้ผลผลิตเป็นกรดและก๊าซภายในเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญนำมาแยกจากแบคทีเรียวงศ์อื่นคือ สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และสามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ (นันทนา, 2537) โคลิฟอร์มที่สำคัญได้แก่ *E. coli* และ *Enterbacter aerogenes* โดยทั่วไปพบโคลิฟอร์มได้ในแหล่งธรรมชาติ เช่น พืชผัก น้ำ ขยะ อาหารดิบ เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบโคลิฟอร์มบางชนิดได้ในทางเดินอาหารและลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น โดยสามารถแบ่งโคลิฟอร์มตามแหล่งกำเนิดได้ 2 กลุ่มคือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ก. ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) หมายถึง โคลิฟอร์มที่มีแหล่งกำเนิดจากระบบทางเดินอาหาร ลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น โคลิฟอร์มกลุ่มนี้จึงเป็นดัชนีของการปนเปื้อนจากอุจจาระและโอกาสการพบแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ เช่น *Salmonalla* และ *Shigella* ได้ ฟีคัลโคลิฟอร์มที่สำคัญได้แก่ *E. coli* สมบัติสำคัญที่ใช้ในการแยกโคลิฟอร์มกลุ่มนี้ออกจากโคลิฟอร์มกลุ่มอื่นได้แก่ การเจริญที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส ซึ่งโคลิฟอร์มทั่วไปไม่สามารถเจริญได้

ข. นอนฟีคัลโคลิฟอร์ม (non-fecal coliforms) หมายถึง โคลิฟอร์มที่ไม่ได้มีแหล่งกำเนิดมาจากระบบทางเดินอาหารและลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น แต่พบได้ในแหล่งธรรมชาติ นอนฟีคัล-โคลิฟอร์มที่พบมากได้แก่ *Enterbacter aerogenes* *Klebsiella spp.* และ *Citrobacter spp.* เป็นต้น

E. coli

E. coli เป็นเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูลบาง ๆ ห่อหุ้ม ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่มีรอบตัว เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นพวกแฟคัลเททีฟ มักพบในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์

E. coli สามารถก่อให้เกิดโรคได้ เช่น โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ทำให้เกิดโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ เป็นต้น และบางสายพันธุ์จะสร้าง enterotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค traveler's diarrhea ซึ่งมักพบในนักท่องเที่ยว อีกทั้งยังทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในคนและสัตว์ด้วย

วิธีตรวจสอบโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในเครื่องดื่ม

การตรวจโคลิฟอร์มในอาหารทำได้หลายวิธี โดยอาจหาในเชิงคุณภาพ (มีหรือไม่มี) หรือเชิงปริมาณ (จำนวน) ก็ได้ แต่วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันอาศัยหลักการตรวจสอบสมบัติสำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ซึ่งได้แก่ การเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน หมักน้ำตาลแล็กโทสได้กรดและก๊าซภายใน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบว่า โคลิฟอร์มที่พบเป็น *E. coli* หรือไม่ต้องทำการตรวจสอบทางชีวเคมีที่จำเพาะต่อไปอีก

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN methods) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาปริมาณโคลิฟอร์มและ *E. coli* วิธีนี้อาจเรียกว่าวิธี multiple tube fermentation เนื่องจากมีขั้นตอน คือ เพาะเลี้ยงตัวอย่างความเจือจางหลาย ๆ ระดับติดต่อกันด้วยชุดอาหารเหลวที่เหมาะสม โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงตัวอย่างความเจือจาง 3 ระดับติดต่อกันใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาหารเลี้ยงเชื้อความเจือจางละ 3, 5 หรือ 10 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลอดที่มีการเจริญของโคลิฟอร์มซึ่งสังเกตได้จากความขุ่นและฟองอากาศของอาหารเลี้ยงเชื้อ อ่านผลเป็นหลอดผลบวก (+) ส่วนหลอดที่ไม่ให้ผลการทดสอบดังกล่าวอ่านผลเป็นหลอดผลลบ (-) ค่าจำนวนหลอดผลบวกจากทุกระดับความเจือจางนำไปอ่านค่าจากตารางมาตรฐานที่เรียกว่า ตารางเอ็มพีเอ็น (MPN table) ซึ่งเป็นค่าปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่าง หน่วยเป็น เอ็มพีเอ็นต่อ 100 มิลลิลิตรของเครื่องดื่ม

สำหรับการหาปริมาณ *E. coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็นมีวิธีการเช่นเดียวกับการหาปริมาณโคลิฟอร์มแต่ต้องใช้การทดสอบเพิ่มเติม โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 ขั้นดังนี้

1. การทดสอบขั้นต้น (presumptive test) เป็นการตรวจสอบสมบัติในการหมักแล็กโทสได้กรดและก๊าซของโคลิฟอร์ม โดยเพาะเลี้ยงตัวอย่างในอาหารเหลวที่มีแล็กโทสเป็นส่วนประกอบ เช่น lauryl sulphate tryptose broth หรือ lactose broth ที่มีหลอดดักก๊าซ (Durham tube) ซึ่งเป็นหลอดแก้วขนาดเล็กวางคว่ำอยู่ด้วย หลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซขึ้นในเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลเป็นหลอดผลบวก อย่างไรก็ตามขั้นตอนนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า จุลินทรีย์ที่พบเป็นโคลิฟอร์ม ทั้งนี้เนื่องจากอาจมีจุลินทรีย์อื่นที่ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบขั้นยืนยันต่อไป

2. การทดสอบขั้นยืนยัน (confirmed test) ขั้นนี้เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันผลของโคลิฟอร์ม โดยถ่ายตัวอย่างที่ให้ผลบวกในขั้นต้นลงในอาหารเหลว brilliant green lactose bile broth ซึ่งมีแล็กโทสเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งมี brilliant green และ bile ที่ช่วยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับโคลิฟอร์มที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบนั้น จะเจริญได้และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเกิดฟองก๊าซภายในระยะเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งอ่านผลเป็นหลอดผลบวก สำหรับหลอดที่ไม่ให้ผลการทดสอบดังกล่าวให้ถือเป็นหลอดผลลบ ผลของจำนวนหลอดผลบวกที่พบจากทุกความเจือจางในขั้นยืนยันนำไปอ่านค่าปริมาณโคลิฟอร์มได้จากตารางเอ็มพีเอ็น

3. การทดสอบขั้นสมบูรณ์ (completed test) ขั้นนี้เป็นการตรวจสอบว่าโคลิฟอร์มที่พบในขั้นยืนยันเป็น *E. coli* หรือไม่ โดยนำหลอดผลบวก BGLB broth ที่ให้ผลบวกมาขีดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง eosin methylene blue (EMB) agar บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าพบโคโลนีที่มีลักษณะ แบน ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ผิวไม่เยิ้มมีจุดสีเข้ม ผิวโคโลนีมีสีเหลือบแสง ซึ่งเรียกลักษณะการเหลือบแสงนี้ว่า เงาโลหะ (metalic sheen) ซึ่งเป็นโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ให้นำมาทำการทดสอบต่อ ดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(1) ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของ *E. coli* ด้วยชุดการทดสอบที่เรียกว่า IMViC ซึ่งเป็นคำย่อที่ได้จากอักษรตัวแรกของชื่อการทดสอบ 4 การทดสอบย่อย ดังนี้

- I มาจาก Indole test หรือการทดสอบอินโดล
- M มาจาก Methyl red test หรือการทดสอบเอ็มอาร์
- V มาจาก Voges-Proskauer test หรือการทดสอบวีพี
- C มาจาก Citrate utilization test หรือการทดสอบการใช้ซิเทรต

โดย *E. coli* และ *Enterbacter aerogenes* ให้ผลการทดสอบ IMViC ดังตารางที่ 1

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของ *E. coli*

แบคทีเรีย	I	M	V	C
E. coli type I *	+	+	-	-
E. coli type II	-	+	-	-
Enterbacter aerogenes	-	-	+	+

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลบวกกับการทดสอบ

- หมายถึง ให้ผลลบกับการทดสอบ

* หมายถึง *E. coli* สายพันธุ์ที่พบมาก

(2) เพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง nutrient agar เมื่อเจริญแล้วนำมาย้อมแกรมเพื่อตรวจดูว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนหรือไม่ พร้อมทั้งเพาะเชื้อลงอาหารเหลว lauryl sulphate tryptose broth ซ้ำอีกครั้งหนึ่งเพื่อยืนยันการผลิตก๊าซจากแล็กโทส

2.2 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนขนาดใหญ่ปลายตัด (blunt ends) ไม่เคลื่อนที่ สร้างสปอร์ได้โดยสปอร์จะเป็นรูปไข่อยู่กลางเซลล์ มักไม่สร้างสปอร์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปแต่สร้างได้ดีเมื่ออยู่ในลำไส้ ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 43-47 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0 หรือมากกว่า 9.0 ไม่เจริญเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 5% และสมบัติอื่น ๆ ของเชื้อนี้คือ รีดิวซ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไนเตรท และผลิตเลซิทิเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไข่แดง สปอร์ของแต่ละสายพันธุ์ทนความร้อนได้แตกต่างกัน บางสายพันธุ์สปอร์อาจทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นานหลายชั่วโมง เชื้อชนิดนี้พบได้ในดิน ขยะ น้ำเสีย ผักสดและอาหารดิบ และพบในลำไส้คนและสัตว์ อาหารที่มีการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ได้แก่ เนื้อสัตว์ ไก่ ปลาและผักที่ปรุงสุกแต่ปล่อยให้เย็นลงนานเกินไปจนสปอร์ที่เหลืออยู่งอก และเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนขึ้นได้

C. perfringens เป็นสาเหตุในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne disease) มักเกิดจากสายพันธุ์ที่สามารถสร้างท็อกซิน type A อาการของโรคเกิดขึ้นได้โดยรับประทานอาหารที่มีเชื้อเข้าไปประมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัมของอาหาร โดยเซลล์จะสร้าง enterotoxin ทำให้มีอาการปวดท้องรุนแรงและท้องร่วง โดยอาการปรากฏอย่างฉับพลันภายใน 8-12 ชั่วโมง (Tortora, 1995) แต่มักไม่มีอาการอาเจียนหรือไข้ และอาการจะหายเองภายใน 1-2 วัน (นันทนา, 2538)

วิธีตรวจหา *Clostridium perfringens* ในเครื่องดื่ม

การตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* ในอาหารอาจตรวจสอบเชิงคุณภาพเพื่อสำรวจว่ามีแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างหรือไม่ หรือตรวจสอบในเชิงปริมาณโดยการนับจำนวนเชื้อก็ได้ ในการศึกษานี้จะใช้การตรวจสอบเชิงคุณภาพ ซึ่งการตรวจแบบนี้มักใช้ในกรณีที่คาดว่าตัวอย่างมีเชื้อนี้อยู่ในปริมาณน้อยหรืออยู่ในลักษณะอ่อนแอ โดยมีขั้นตอนสำคัญคือ การเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว (enrichment broth) การเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือก (selective plating) และการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) เพื่อจำแนกเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวน *C. perfringens* ได้แก่ cook meat medium และ trypticase peptone glucose yeast extract broth โดยบ่มเชื้อโดยสภาวะไร้ออกซิเจน สำหรับอาหารแข็งชนิดคัดเลือกมักผสมยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น cycloserine ที่ยับยั้งการเจริญของแอนแอโรปส์และแฟคัลเททีฟชนิดอื่นที่ปนอยู่ในตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีเหล็กและซัลไฟด์เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ *C. perfringens* รีดิวซ์ซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ได้ ซึ่งซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นจะรวมกับเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เหล็กซัลไฟด์ (FeS) ทำให้โคโลนีของเชื้อมีสีดำและต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากนั้นอาจผสมไข่แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการผลิตเลซิทิเนส หรือทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดด้วยก็ได้ ตัวอย่างของอาหารแข็งชนิดคัดเลือกและแสดงสมบัติของ *C. perfringens* ดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อพบโคโลนีลักษณะจำเพาะดังกล่าวแล้ว ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมในตารางที่ 3 เพื่อจำแนกว่าเป็น *C. perfringens* แน่นอนหรือไม่ด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดคัดเลือกและลักษณะโคโลนีของ *C. perfringens*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Tryptose sulphite egg-yolk cycloserine agar	สีเทาดำ (เนื่องจากเกิดตะกอนเหล็กซัลไฟด์) มีวงขุ่น (เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์เลซิทิเนส)
Tryptose sulphite cycloserine agar	สีเทาดำ (เนื่องจากเกิดตะกอนเหล็กซัลไฟด์)
D-cycloserine blood agar	สีขาวขุ่น มีวงใส (เนื่องจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง)
Trypticase soy sheep blood agar	สีขาวขุ่น มีวงใส (เนื่องจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง)

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนก *C. perfringens*

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
การเคลื่อนที่	-
การหมักแล็กโทส	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	+
การย่อยเจลาติน	+
การผลิตกรดจากซาลิซิน	-
การผลิตกรดจากแรฟฟิโนส	+

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เซลล์เกาะกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น หรืออาจอยู่เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ เป็นพวกแฟคัลเททีฟ เมื่อเจริญบนอาหารแข็งธรรมดามักให้โคโลนีสีเหลือง แต่บางสายพันธุ์โคโลนีอาจไม่มีสี ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (coagulase) และเทอร์โมนิวคลีเอสชนิดทนความร้อน (thermonuclease) ได้ มีชีวิตอยู่ได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาลสูง ๆ ช่วงอุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญคือ 35 –40 องศาเซลเซียส ทนการแช่เยือกแข็งได้ดี แหล่งที่มาของ *S. aureus* ได้แก่ มนุษย์และสัตว์ ที่พบมากคือ บริเวณช่องจมูกและผิวหนัง แผลติดเชื้อ และมักพบการปนเปื้อนในอาหารดิบ เช่น เนื้อสัตว์ และนมดิบ

S. aureus สายพันธุ์ก่อโรคผลิตสารพิษชนิดทนความร้อนได้เมื่อเจริญในอาหาร ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า staphylococcal food poisoning สารพิษที่เชื้อผลิตขึ้นมี 7 ชนิด ได้แก่ A, B, C_1, C_2, C_3, D และ E ผลิตภัณฑ์อาหารที่มักเป็นสาเหตุในการระบาดได้แก่ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น แฮม ไส้กรอก นอกจากนั้นยังพบเชื้อในน้ำสลัด ผลิตภัณฑ์ขนมอบไส้ครีม และผลิตภัณฑ์นมเป็นต้น โดยจะสร้างสารพิษที่เรียกว่า enterotoxin ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง ปวดท้อง หลังรับประทานอาหารที่มีสารพิษนาน 4 ชั่วโมง (บัญญัติ, 2521)

วิธีตรวจหา *S. aureus* ในเครื่องดื่ม

โดยศึกษาการตรวจหา *S. aureus* ในเชิงคุณภาพ คือตรวจสอบว่ามี *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่หรือไม่ มักกระทำในกรณีอาหารผ่านการแปรรูปมาแล้ว ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนที่ทำให้เซลล์ที่อ่อนแอและมีจำนวนน้อยฟื้นตัวในอาหารชนิดไม่คัดเลือก (non-selective enrichment broth) เช่น trypticase soy broth ก่อน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือกต่อไป ถ้าตัวอย่างยังไม่ผ่านการแปรรูปและคาดว่ามี *S. aureus* ปริมาณน้อยแต่มีเชื้ออื่นอยู่ด้วยปริมาณมาก ควรเพิ่มจำนวน *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก (selective enrichment broth) เช่น trypticase soy broth ที่มี NaCl เข้มข้น 7.5-10% ก่อน จากนั้นจึงเพาะแยกเชื้อลงบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือก เช่น Baird-Parker egg-yolk tellurite agar ที่ผสมไข่แดง เพื่อตรวจสอบการผลิตเลซิทิเนสและความทนต่อ potassium tellurite (K_2TeO_3) ของ *S. aureus* นอกจากนั้นยังเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็ง manitol salt egg-yolk agar ที่มีแมนนิทอลเป็นส่วนผสมซึ่ง *S. aureus* หมักได้ และมีไข่แดงสำหรับตรวจสอบเลซิทิเนส ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้แสดงในตารางที่ 4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>ตารางที่ 4</u> ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Baird-Parker egg-yolk tellurite agar	ขนาด 1.5 มิลลิเมตรหรือใหญ่กว่า ผิวเรียบ นูน ขอบเรียบ สีดำหรือ สีเทาเข้ม (เนื่องจาก tellurite ถูกรีดิวซ์เป็น tellurium) มีวงขุ่นรอบโคโลนี (เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์เลซิทิเนส) และ/หรือมีวงใสใต้วงขุ่น (เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส)
manitol salt egg-yolk agar	ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ผิวเรียบ นูน รอบโคโลนีมีวงสีเหลือง (เนื่องจากแมนนิทอลถูกหมักได้กรด) มีวงขุ่น (เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เลซิทิเนส) และ/หรือมีวงใสใต้วงขุ่น (เนื่องจากกิจกรรมของโปรติเอส)

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

เมื่อพบลักษณะเฉพาะดังกล่าวควรนำไปทดสอบเพิ่มเติมเพื่อแยก *S. aureus* จาก staphylococci ชนิดอื่น ๆ โดยการทดสอบการผลิตโคแอกูเลสอิสระ (free coagulase) และชนิดเกาะติด (bound coagulase หรือ clumping factor) และนิวคลีเอสชนิดทนความร้อน ซึ่ง *S. aureus* ส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับการทดสอบนี้

2.4 *Salmonalla*

Salmonalla เป็นสกุลหนึ่งของแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นพวกแกรมลบรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญแบบแฟคัลเททีฟ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ ยกเว้น *S. pullorum* และ *S. gallinarum* สมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonalla* ที่สำคัญและช่วยในการจำแนกเชื้อได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ซึ่ง *Salmonalla* ส่วนใหญ่ผลิตได้ การมีเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซีเลส (lysine decarboxylase) อาร์จินีนดีคาร์บอกซีเลส (arginine decarboxylase) และออร์นิทีนดีคาร์บอกซีเลส (crnithine decarboxylase) แต่ไม่ผลิตยูรีเอส (urease) การหมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดและอาจได้ก๊าซ แต่ไม่หมักแล็กโตสและซูโครส ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวได้ เป็นต้น *Salmonalla* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือตั้งแต่อุณหภูมิตู้เย็น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(2-4 องศาเซลเซียส) จนถึง 54 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.5-7.5 แต่เจริญได้ที่ช่วงพีเอช 4.5-9.5 *Salmonalla* มีแหล่งกำเนิดในลำไส้ของคนและสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ปีก และพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน แมลง มูลสัตว์ พื้นโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น อาหารที่มักพบการปนเปื้อนของ *Salmonalla* ได้แก่ สัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ เช่น ไข่ นอกจากนั้นยังพบในสัตว์อื่น ๆ เช่น หมู วัว แกะ รวมทั้งนมและผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น

Salmonalla เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยเชื้อจะสร้าง endotoxin ทำลายเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหาร อาการจะเกิดขึ้นภายใน 7-12 ชั่วโมงหลังกรับประทานอาหารที่มีเชื้อเข้าไป และกลุ่มอาการที่เรียกว่า ซัลโมเนลโลซีส (salmonellosis) ซึ่งมีความรุนแรงแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์เชื้อที่เป็นสาเหตุ โดยมีอาการปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีไข้และท้องเดินอยู่ได้หลายวัน นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากอาหารที่เรียกว่า ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) อีกด้วย

วิธีตรวรหา *Salmonalla* ในเครื่องดื่ม

การตรวจเชิงคุณภาพเพื่อหาว่ามี *Salmonalla* ปนเปื้อนอยู่หรือไม่ประกอบด้วยขั้นตอนโดยทั่วไปเช่นเดียวกับการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิดอื่นที่ได้กล่าวมาแล้วคือ

ก. <u>การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือก</u>

ขั้นตอนนี้มีความจำเป็นสำหรับตัวอย่างอาหารแห้งหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธีแปรรูป เช่น ไข่ผงเนยแข็ง ผักและผลไม้เยือกแข็ง อาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือกที่นิยมในการฟื้นเซลล์ *Salmonalla* ได้แก่ lactose broth, trypticase soy broth และ buffered peptone water เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่มีส่วนผสมที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ แต่ช่วยทำให้เซลล์ *Salmonalla* ที่อ่อนแอหรือบาดเจ็บฟื้นตัวขึ้น

ข. <u>การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชนิดคัดเลือก</u>

ขั้นนี้เป็นการถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือก หรือเพาะโดยตรงจากตัวอย่างที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของ *Salmonalla* สูง เช่น เนื้อดิบหรือขยะ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีส่วนประกอบที่ช่วยเสริมการเจริญของ *Salmonalla* และมีส่วนประกอบที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก *Salmonalla* ได้แก่ selenite cystine broth และ tetrathionate broth เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ห้องสมุด
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

02397

ค. <u>การเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือก</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะแยก *Salmonalla* มักมีส่วนประกอบของสี (dyes) เกลือน้ำดี (bile salt) และสารประกอบบางชนิดที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น และมีส่วนประกอบที่ใช้แสดงสมบัติสำคัญของ *Salmonalla* เช่น การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ การใช้น้ำตาลต่าง ๆ เป็นต้น ตัวอย่างของอาหารแข็งเหล่านี้ ได้แก่ MacConKey agar, brilliant green agar, bismuth sulfite agar, *Salmonalla-Shigella* agar, desoxycolate citrate agar และ xylose lysine desoxycolate agar เป็นต้น เมื่อ *Salmonalla* เจริญบนอาหารแข็งดังกล่าวแล้วจะให้โคโลนีลักษณะเฉพาะ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้มีระดับความแรงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่เท่ากัน ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงเลือกใช้อาหารแข็งนี้อย่างน้อย 2 ชนิดที่มีระดับการยับยั้งต่างกันเพื่อทำให้โอกาสในการแยกเชื้อ *Salmonalla* สูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 5

<u>ตารางที่ 5</u> แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดคัดเลือกและลักษณะโคโลนีของ *Salmonalla*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	**ระดับการยับยั้ง**	**ลักษณะโคโลนี**
MacConkey agar	ต่ำ	ไม่มีสี ทึบแสงเล็กน้อย
Brilliant green agar	สูง	สีแดงหรือชมพู โปร่งแสงหรือทึบแสง มีวงสีแดงล้อมรอบ
Desoxycholate citrate agar	ปานกลาง	ไม่มีสี ทึบแสงเล็กน้อย นูน มีจุดสีดำหรือไม่มี
Xylose lysine desoxycholate agar	ค่อนข้างต่ำ	สีแดง มีจุดสีดำหรือไม่มี
Bismuth sulphite agar	สูง	สีน้ำตาล ดำ หรือเขียว มีเงาโลหะหรือไม่มี รอบโคโลนีมีสีดำ
Salmonalla-Shigella agar	สูง	ไม่มีสี หรือสีชมพูจาง มีจุดสีดำหรือไม่มี

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ง. <u>การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical tests)</u>

ขั้นนี้เป็นการตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีที่สำคัญของโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *Salmonalla* ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือกเพื่อจำแนกเชื้อเบื้องต้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบในขั้นนี้ได้แก่

- triple sugar iron agar สำหรับทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และ แล็กโทส และการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์
- lysine iron agar สำหรับทดสอบการผลิตไลซีนดีคาร์บอกซีเลส และไฮโดรเจนซัลไฟด์
- urea agar สำหรับทดสอบการผลิตยูริเอส

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 6

<u>ตารางที่ 6</u> การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจำแนก *Salmonalla*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเจริญของ *Salmonalla*	การอ่านผล	การบันทึก
triple sugar iron agar	• ส่วนเอียงมีสีแดง • ส่วนก้นมีสีเหลือง • วุ้นมีรอยแตก • มีสีดำ	• ไม่หมักแล็กโทสและซูโครส • หมักกลูโคส • ผลิตก๊าซ •ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	Alkaline (K) slant Acid (A) butt Gas + H_2S +
lysine iron agar	• เปลี่ยนเป็นสีม่วง • มีสีดำ	• ผลิตไลซีนดีคาร์บอกซีเลส • ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	LDC + H_2S +
urea agar	ไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง	ไม่ผลิตยูริเอส	-

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในกรณีที่การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นดังกล่าวแสดงผลของ *Salmonalla* ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันโดยเลือกจากตารางที่ 7 นอกจากนั้นยังควรทดสอบทางเซอโรโลยีเพื่อดูการเกาะกลุ่ม (agglutination) กับแอนติซีรัม (antiserum) จำเพาะต่อ *Salmonalla* อีกด้วย

ตารางที่ 7 การทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมสำหรับจำแนก *Salmonalla*

การทดสอบ	ผลการทดสอบของ *Salmonalla* [a]
การเจริญใน KCN broth	+
อินโดล (indole)	-
เอ็มอาร์ (MR test)	+
วีพี (VP test)	-
การใช้น้ำตาลแล็กโทส	- [b]
การใช้น้ำตาลซูโครส	-

(ที่มา: ศิริโฉม, 2543)

หมายเหตุ

[a] + ร้อยละ 90 หรือมากกว่าให้ผลบวกภายในเวลา 1-2 วัน ; - ร้อยละ 90 หรือมากกว่าให้ผลลบภายในเวลา 1-2 วัน

[b] บางสายพันธุ์ให้ผลบวก

3. **งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา**

ลดาพรรณ และคณะ (2533) รายงานถึง การสำรวจคุณภาพน้ำหวานหาบเร่ประเภทน้ำผลไม้และน้ำหวานผสมสีในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 360 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนธันวาคม 2530 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2531 ได้ผลวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาที่น่าสนใจคือตรวจพบ Coliforms, *E. coli*, ยีสต์และราในตัวอย่างร้อยละ 76.3, 43.3, 92.5 และ 67.2 ตามลำดับ และมีตัวอย่างที่พบเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* ร้อยละ 23.6 *C. perfringens* ร้อยละ 64.8 และ Salmonellae ร้อยละ 0.8 การทดสอบทางสถิติพบว่าการปนเปื้อนของ Coliforms ในน้ำหวาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หาบเร่มีความสัมพันธ์กับ *S. aureus* แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับ *C. perfringens* ผลวิเคราะห์ทางเคมีตรวจพบซัคคารินและกรดเบนโซอิคในตัวอย่างร้อยละ 20.3 และ 10.6 ของตัวอย่างทั้งหมด ตามลำดับ ร้อยละ 55.3 ของตัวอย่างที่ตรวจพบกรดเบนโซอิคมีปริมาณกรดเบนโซอิคเกินมาตรฐาน และไม่พบกรดซาลิซิลิคในทุกตัวอย่างร้อยละ 1.9 ของตัวอย่างน้ำผลไม้ และร้อยละ 6.2 ของน้ำหวานผสมสีมีปริมาณสีเกินมาตรฐาน น้ำหวานซึ่งห้ามผสมสีประเภทโอเลี้ยงหรือกาแฟและประเภทที่ได้ตรวจพบสีร้อยละ 14.7 และ 90 ของจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ ตามลำดับ

สุวรรณี และใจภักดิ์ (2537) รายงานถึง ในการผลิตน้ำหวานเข้มข้นผู้ผลิตนิยมใช้วัตถุเจือปน ได้แก่ วัตถุกันเสีย และสี จึงได้ทำการวิเคราะห์วัตถุกันเสียชนิดกรดเบนโซอิค กรดซอร์บิค และกรดซาลิซิลิค ชนิดและปริมาณสีสังเคราะห์ รวมทั้งซัคคารินในน้ำหวานเข้มข้นซึ่งบรรจุภาชนะปิดสนิท ที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดต่าง ๆ 23 จังหวัด ระหว่างปี 2533 ถึง 2535 จำนวน 239 ตัวอย่าง โดยได้รับตัวอย่างจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและเอกชน พบว่าน้ำหวานเข้มข้นยังมีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 62 (พ.ศ.2524) คิดเป็นร้อยละ 16.7 และ 12.5 นอกจากนั้นยังตรวจพบกรดซาลิซิลิค และซัคคารินซึ่งเป็นสารที่ห้ามใช้ในเครื่องดื่ม คิดเป็นร้อยละ 2.3 และ 8.8 ตามลำดับ

ยุพา และคณะ (2538) รายงานถึง การสำรวจคุณภาพน้ำหวานผสมสีที่บรรจุในภาชนะพลาสติกรูปตุ๊กตาแบบต่าง ๆ ซึ่งเด็กนิยมบริโภค จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยเก็บจากร้านค้าและตลาดในเขตกรุงเทพมหานครเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมีและทางจุลชีววิทยา จากผลวิเคราะห์ พบว่า น้ำหวานผสมสีประเภทนี้มีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานถึงร้อยละ 97 โดยไม่เข้ามาตรฐานทางเคมี 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 69.7 มีการเติมซัคคารินซึ่งไม่อนุญาตให้ใช้ในเครื่องดื่มร้อยละ 36.4 พบวัตถุกันเสียในปริมาณที่เกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนดร้อยละ 30.3 และพบสีสังเคราะห์เกือบทุกตัวอย่าง ส่วนด้านจุลชีววิทยาไม่เข้ามาตรฐาน 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 87.9 เนื่องจากพบยีสต์, รา, Coliform bacteria, และ *E. coli* เกินมาตรฐานในตัวอย่างร้อยละ 84.8, 54.5, 69.7 และ 9.1 ตามลำดับ พบเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิด *C. perfringens* ร้อยละ 9.1 แต่ไม่พบ *S. aureus* และ Salmonellae ดังนั้นการที่เด็กซึ่งมีภูมิต้านทานต่ำบริโภคน้ำหวานที่ไม่ได้มาตรฐาน อาจก่อให้เกิดอันตรายได้จากวัตถุกันเสียที่ห้ามใช้หรือใช้มากเกินไป และจากเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ

นงคราญ และคณะ (2540) รายงานถึง การศึกษาคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในจังหวัดเชียงใหม่ระหว่างเดือนตุลาคม 2538 ถึงกุมภาพันธ์ 2539 จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่ามีคุณภาพไม่เข้ามาตรฐานจำนวน 52 ตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คิดเป็นร้อยละ 96.3 โดยพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อรา-ยีสต์ โคลิฟอร์ม และ *C. perfringens* ในตัวอย่างร้อยละ 81.5, 24.1 และ 18.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดเบนโซอิกและสีสังเคราะห์เกินมาตรฐาน ร้อยละ 29.6 และ 1.9 ตามลำดับ

ธาริยา (2540) รายงานถึง ฝ่ายวิเคราะห์อาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา ร่วมกับศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 12 สงขลา จัดทำโครงการปรับปรุงคุณภาพทางจุลชีววิทยาในเครื่องดื่มจากสถานศึกษาในจังหวัดสงขลา โดยทำการสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาในเครื่องดื่มจากสถานศึกษาของรัฐบาล 7 แห่ง เอกชน 3 แห่ง รวม 10 แห่ง ๆ ละ 2 ครั้ง ครั้งที่หนึ่งทำ Pre-test ในเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2538 ก่อนให้การอบรมทางด้านสุขลักษณะการผลิตและสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อมแก่ผู้ประกอบการผลิตเครื่องดื่ม โดยจัดอบรมในเดือน มิถุนายน 2538 ครั้งที่สองทำ Post-test ในเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน 2538 ภายหลังการอบรมแล้ว พบว่า เครื่องดื่มที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งสองครั้งมีคุณภาพไม่ตรงตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) คิดเป็นร้อยละ 83.8 (101/117 ตัวอย่าง) และ 82.5 (90/109 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบในภาพรวมของสถานศึกษา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($p>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. โถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน (anaerobic jar)
2. ปิเปตปลอดเชื้อ
3. ตู้บ่มอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส
4. ห่วงเขี่ยเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

1. Potato dextose agar (PDA) หลอมเหลว pH 3.5
2. Plate count agar (PCA)
3. Lauryl sulphate tryptose (LST) broth ความเข้มข้น 2 เท่าและความเข้มข้น 1 เท่า หลอดละ 10 มิลลิลิตร ภายในมีหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
4. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth หลอดละ 10 มิลลิลิตร ภายในมีหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
5. สารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ขวดละ 225 มิลลิลิตร และหลอดละ 9 มิลลิลิตร
6. Cook meat medium บรรจุหลอดฝาปิดชนิดเกลียว หลอดละ 10 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันทีหรือต้มเดือดไล่อากาศ)
7. Trypticase soy broth ที่มี NaCl เข้มข้น 10% ขวดละ 225 มิลลิลิตร
8. Selenite cystine broth (SCB) ขวดละ 225 มิลลิลิตร
9. Eosin methylene blue (EMB) agar
10. Baird-Parker egg-yolk tellurite agar
11. MacConKey agar (MAC)
12. *Salmonella-Shigella* agar
13. Xylose lysine desoxycolate (XLD) agar
14. Tryptose sulfite egg-yolk cycloserine (TSEC) agar
15. Triple sugar iron (TSI) agar
16. Lysine iron (TSI) agar

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

17. Urea agar
18. Simmon 's citrate agar
19. Nutrient agar (NA)
20. MR-VR broth
21. Motility nitrate medium
22. Lactose gelatin medium
23. 1% salicin fermentation broth
24. 1% raffinose fermentation broth

สีย้อมและสารเคมี (ภาคผนวก ข)

1. สารละลายโคแวคส์ (Kovac 's reagent)
2. สารละลายเมทิลเรด
3. โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40% (40% KOH)
4. สารละลายแอลฟาแนฟทอล (∝- napthol solution)
5. พลาสมา
6. สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10%
7. ชุดทดสอบการย้อมสีแกรม

แบคทีเรียอ้างอิง

แบคทีเรียอ้างอิง ได้แก่ *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp.

ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ชนิดที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม 10 ตัวอย่างและชนิดที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 15 ตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่าง

1. ร้านขายของชำบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี
2. ตลาดนัดบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

1. การตรวจสอบคุณภาพต้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างเครื่องดื่ม

ก. การนับจำนวนเชื้อราและยีสต์โดยใช้ pour plate technique

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสารละลายเปปโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}
2. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองบรรจุสารละลายเปปโตนปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2}
3. เจือจางตัวอย่างโดยวิธีเดียวกับข้อ 2.2 จนได้ความเจือจางที่ต้องการ 3 ความเจือจาง
4. ถ่ายตัวอย่างจากแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร
5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextose agar (PDA) pH 3.5 หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร เอียงจานไปมาให้อาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างเข้ากันดีเป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยให้อาหารแข็ง
6. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 วัน (ไม่ต้องคว่ำจาน)
7. นับจำนวนโคโลนีของราและยีสต์ที่เกิดขึ้น และคำนวณเป็นค่า CFU/ml ของตัวอย่าง

ข. ตรวจหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *Escherichia coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

1. การทดสอบขั้นต้น

1.1 ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายตัวอย่างใส่หลอดทดลองบรรจุ lauryl sulphate tryptose broth ความเข้มข้น 2 เท่าปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ โดยถ่ายตัวอย่างลงหลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด

1.2 ถ่ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองบรรจุ lauryl sulphate tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่าปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ โดยถ่ายตัวอย่างลงหลอดละ 1 มิลลิลิตรจำนวน 5 หลอด

1.3 ถ่ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองบรรจุ lauryl sulphate tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่าปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ โดยถ่ายตัวอย่างลงหลอดละ 0.1 มิลลิลิตรจำนวน 5 หลอด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 บ่มหลอด lauryl sulphate tryptose broth ที่มีตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลครั้งแรกหลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสังเกตการขุ่นของอาหารและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

<u>หมายเหตุ</u> หลอดที่ถือว่าให้ผลบวก ต้องเกิดที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1/10 ของปริมาตรหลอดดักก๊าซ

1.5 บ่มหลอดที่ไม่ให้ผลบวกต่ออีก 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกัน

2. การทดสอบขั้นยืนยัน

2.1 ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดผลบวกขั้นต้น ลงในหลอดอาหาร brilliant green lactose bile (BGLB) broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีหลอดดักก๊าซทำเช่นเดียวกับหลอดผลบวกทุกหลอด

2.2 บ่มหลอด brilliant green lactose bile (BGLB) broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยหลอดที่ให้ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลอมเหลือง และเกิดที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1/10 ของปริมาตรหลอดเช่นเดียวกัน

2.3 นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกภายใน 48 ชั่วโมงไปอ่านค่า MPN/100 มิลลิลิตรของตัวอย่างจากตารางซึ่งเป็นค่าของ confirmed coliform

3. การทดสอบขั้นสมบูรณ์

3.1 ถ่ายเชื้อจากหลอดผลบวก brilliant green lactose bile (BGLB) broth ลงบนอาหารแข็ง eosin methylene blue (EMB) agar โดยการขีดแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* นำไปทดสอบ IMViC การติดสีแกรม และการหมักย่อยแล็กโตส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงอาหารเหลว lauryl sulphate tryptose broth ซ้ำอีกครั้ง

3.3 อ่านค่า MPN/100 มิลลิลิตรของตัวอย่างจากตาราง MPN ซึ่งเป็นค่าของ *E. coli*

ค. การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดย pour plate technique

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสารละลายเปปโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายตัวอย่างจากข้อ 4.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองบรรจุสารละลายเปปโตนปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2}
3. เจือจางตัวอย่างโดยวิธีเดียวกับข้อ 4.2 จนได้ความเจือจางที่ต้องการ 3 ความเจือจาง
4. ถ่ายตัวอย่างจากแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร
5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร เอียงจานไปมาให้อาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างเข้ากันดีเป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยให้อาหารแข็ง
6. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เกิดขึ้น และคำนวณเป็นค่า CFU/ml ของตัวอย่าง

ง. การตรวจหา *Staphylococcus aureus*

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 25 มิลลิลิตรลงในขวดบรรจุอาหาร trypticase soy broth ที่มี NaCl เข้มข้น 10% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ขีดแยกเชื้อบนจานอาหาร Baird-Parker egg-yolk tellurite agar 3 จาน และขีดเชื้อ *S. aureus* อ้างอิงอีก 1 จาน บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ตรวจหาโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* จากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีอ้างอิง
5. เลือกโคโลนีจากตัวอย่าง 2-3 โคโลนี และโคโลนีอ้างอิงมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์โคแอกูเลส

จ. การตรวจหา *Clostridium perfringens*

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองบรรจุอาหาร cook meat medium ที่ปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ขีดแยกเชื้อบนจานอาหารแข็ง Tryptose sulphite egg-yolk cycloserine (TSEC) agar 3 จาน และขีดแยกเชื้อ *C. perfringens* อ้างอิงอีก 1 จาน บ่มในโถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ตรวจหาโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *C. perfringens* จากตัวอย่า โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีอ้างอิง
5. เลือกลักษณะโคโลนีเฉพาะจากตัวอย่าง 2-3 โคโลนี และโคโลนีอ้างอิงมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยเพาะเชื้อลงในอาหารต่อไปนี้ motility nitrate medium, lactose gelatin medium, 1% salicin fermentation broth และ 1% raffinose fermentation broth

ฉ. การตรวจหา *Salmonella*

1. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 25 มิลลิลิตรลงในขวดบรรจุอาหาร selenite cystine broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
2. บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ขีดแยกเชื้อบนจานอาหารแข็ง 3 ชนิด คือ MacConkey (MAC) agar, Xylose lysine desoxycolate (XLD) agar และ *Salmonella-Shigella* (SS) agar ชนิดละ 3 จาน และขีดแยกเชื้อ *Salmonella* อ้างอิงอีก 1 จาน บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ตรวจหาโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* จากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีอ้างอิง
5. เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะจากตัวอย่าง 2-3 โคโลนี และโคโลนีอ้างอิงมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยเพาะเชื้อลงในอาหาร Triple sugar iron (TSI) agar, Lysine iron (LI) agar และ Urea agar

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การตัดสินคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน

โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนทั้ง 2 ประเภท โดยเทียบกับมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ.2524) กำหนดไว้ดังนี้ (ภาคผนวก ง)

ยีสต์รา	ไม่พบ
โคลิฟอร์ม	น้อยกว่า 2.2 MPN/100 มิลลิลิตร
E. coli	ไม่พบ
แบคทีเรียก่อโรค	
S. aureus	ไม่พบ
C. perfringens	ไม่พบ
Salmonella spp.	ไม่พบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การตรวจคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน

จากการเก็บตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน 2 ประเภท คือ ประเภทที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม และประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มจำนวน 15 ตัวอย่าง จากร้านขายของชำและตลาดนัดในบริเวณตลาดหนองมนและตลาดชลบุรี นำมาตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยา ได้แก่ การหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา โคลิฟอร์มและ *E. coli* รวมทั้งการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *S. aureus* *C. perfringens* และ *Salmonella* spp. จากผลการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544 พบว่าตัวอย่างประเภทที่มีการแสดงฉลาก 10 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 5 ถึง 405 CFU/ml พบการปนเปื้อนของยีสต์ จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณ 55 และ 953 CFU/ml พบการปนเปื้อนของรา จำนวน 2 ตัวอย่าง มีปริมาณ 5 และ 20 CFU/ml และตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษในตัวอย่างประเภทนี้ทุกตัวอย่าง ส่วนในตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลาก 5 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 20 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml พบการปนเปื้อนของยีสต์ จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 520 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml ไม่พบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างประเภทนี้ทุกตัวอย่าง ส่วนโคลิฟอร์มพบการปนเปื้อน จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณมากกว่า 1600 MPN/100 ml และพบการปนเปื้อนของ *E. coli* 2 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณ 2 และ 6 MPN/100 ml นอกจากนี้ยังตรวจพบ *S. aureus* และ *C. perfringens* ในตัวอย่างประเภทนี้อย่างละ 1 ตัวอย่าง แสดงไว้ดังตารางที่ 8

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 เป็นการตรวจซ้ำจากแหล่งเดียวกันในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2544 พบว่า ตัวอย่างประเภทที่มีการแสดงฉลากตรวจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 10 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml พบการปนเปื้อนของยีสต์ จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 10 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml แต่ไม่พบการปนเปื้อนของราของตัวอย่างประเภทนี้ทุกตัวอย่าง สำหรับโคลิฟอร์มพบการปนเปื้อน 2 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณ 2 และ 17 MPN/100 ml ส่วน *E. coli* และแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษตรวจไม่พบในตัวอย่างประเภทนี้ สำหรับตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 500 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml พบการปนเปื้อนของยีสต์ จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณระหว่าง 20 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml พบการปนเปื้อนของรา 1 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณ 5 CFU/ml และพบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์ม จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณ 50 และมากกว่า 1600 MPN/100 ml สำหรับ *E. coli* พบเพียง 1 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณ 4 MPN/100 ml และตรวจพบ *C. perfringens* 1 ตัวอย่างของตัวอย่างประเภทนี้ แสดงได้ดังตารางที่ 9

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ตารางที่ 8 การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรีครั้งที่ 1 ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544

ชนิดของตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์ (CFU/ml)	รา (CFU/ml)	โคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	*E. coli* (MPN/100 ml)	แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ		
						S. aureus	*C. perfringens*	*Salmonella* spp.
ก. ตัวอย่างที่มีการแสดงฉลาก								
1. เยลลี่ชาฟารี	20	0	0	0	0	-	-	-
2. เยลลี่บิ๊กบิ๊ก	40	55	20	0	0	-	-	-
3. โกลเดนแพนไอซ์	0	0	0	0	0	-	-	-
4. แอโร	10	0	0	0	0	-	-	-
5. พริสกี้	110	0	0	0	0	-	-	-
6. ยูไนเต็ด โพล่า	20	0	5	0	0	-	-	-
7. มินิเจอร์	0	0	0	0	0	-	-	-
8. ยูไนเต็ด เยลลี่	5	0	0	0	0	-	-	-
9. แฟนซี เยลลี่	0	0	0	0	0	-	-	-
10. ม็อดต้า เยลลี่	405	953	0	0	0	-	-	-

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์ (CFU/ml)	รา (CFU/ml)	โคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	*E. coli* (MPN/100 ml)	แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ		
						S. aureus	*C. perfringens*	*Salmonella* spp.
ข. ตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลาก								
11. ตลาดนัดหนองมน	40	520	0	0	0	-	-	-
12. ตลาดนัดเคียงมอ	160000	220000	0	≥1600	6	-	+	-
13. ตลาดนัดสดใส	125000	16133	0	≥1600	2	+	-	-
14. ตลาดนัดวังมุก	20	0	0	0	0	-	-	-
15. ตลาดนัดชลบุรี	987	0	0	0	0	-	-	-

หมายเหตุ

+ หมายถึง พบ

- หมายถึง ไม่พบ

0 หมายถึง ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>ตารางที่ 9</u> การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในตลาดหนองมนและตลาดชลบุรีครั้งที่ 2 ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2544

ชนิดของตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์ (CFU/ml)	รา (CFU/ml)	โคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	*E. coli* (MPN/100 ml)	แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ		
						S. aureus	*C. perfringens*	*Salmonella* spp.
ก. ตัวอย่างที่มีการแสดงฉลาก								
1. เยลลี่ซาฟารี	10	0	0	0	0	-	-	-
2. เยลลี่บิ๊กบิ๊ก	670	34000	0	0	0	-	-	-
3. โกลเดนแพนไอซ์	50	10	0	17	0	-	-	-
4. แอโร	76300	114000	0	0	0	-	-	-
5. ฟริสกี้	230	94000	0	0	0	-	-	-
6. ยูไนเต็ด โพล่า	550	49000	0	2	0	-	-	-
7. มินิเจอร์	0	0	0	0	0	-	-	-
8. ยูไนเต็ด เยลลี่	10	0	0	0	0	-	-	-
9. แฟนซี เยลลี่	0	0	0	0	0	-	-	-
10. ม็อดด้า เยลลี่	620	0	0	0	0	-	-	-

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์ (CFU/ml)	รา (CFU/ml)	โคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	*E. coli* (MPN/100 ml)	แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ		
						S. aureus	*C. perfringens*	*Salmonella* spp.
ข. ตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลาก								
11. ตลาดนัดหนองมน	5050	20	5	50	0	-	-	-
12. ตลาดนัดเคียงมอ	15400000	10700000	0	≥1600	0	-	+	-
13. ตลาดนัดสดใส	>30000000	2900000	0	≥1600	4	-	-	-
14. ตลาดนัดวังมุก	0	0	0	0	0	-	-	-
15. ตลาดนัดชลบุรี	540	0	0	0	0	-	-	-

หมายเหตุ

+ หมายถึง พบ

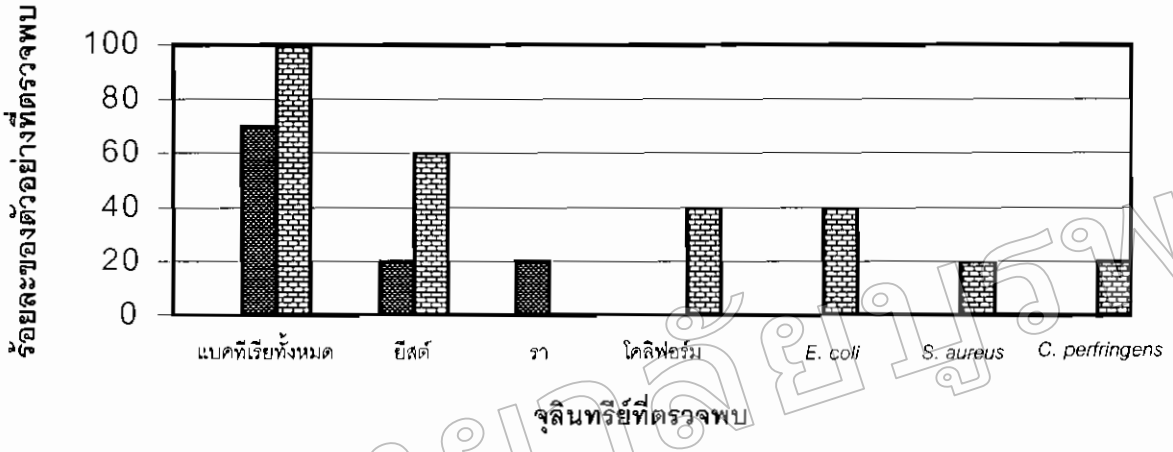
- หมายถึง ไม่พบ

0 หมายถึง ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

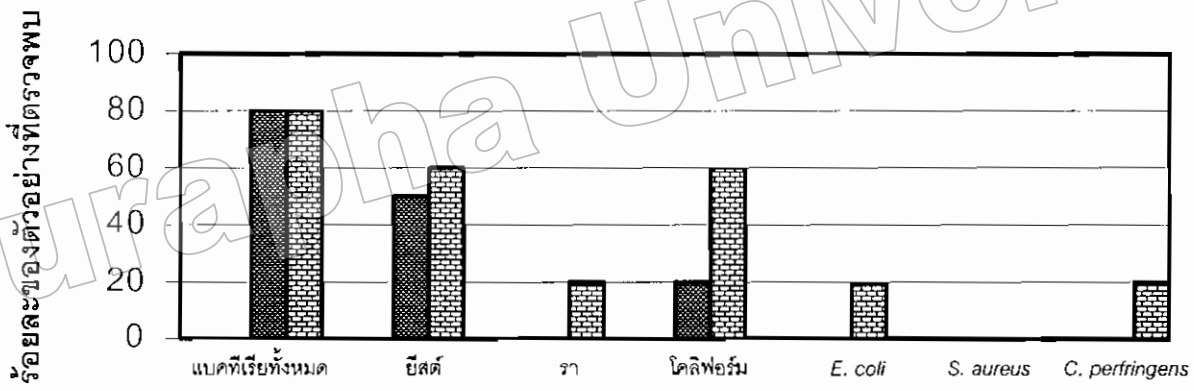
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากข้อมูลในตารางที่ 8 และ 9 นำมาคำนวณร้อยละการตรวจพบจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนแต่ละประเภท ได้ผลแสดงดังภาพที่ 1 พบว่า ร้อยละขการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ของตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มสูงกว่าประเภทที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น ตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษคือ *S. aureus* และ *C. perfringens* ในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มแต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียเหล่านี้ในตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University



(ก)



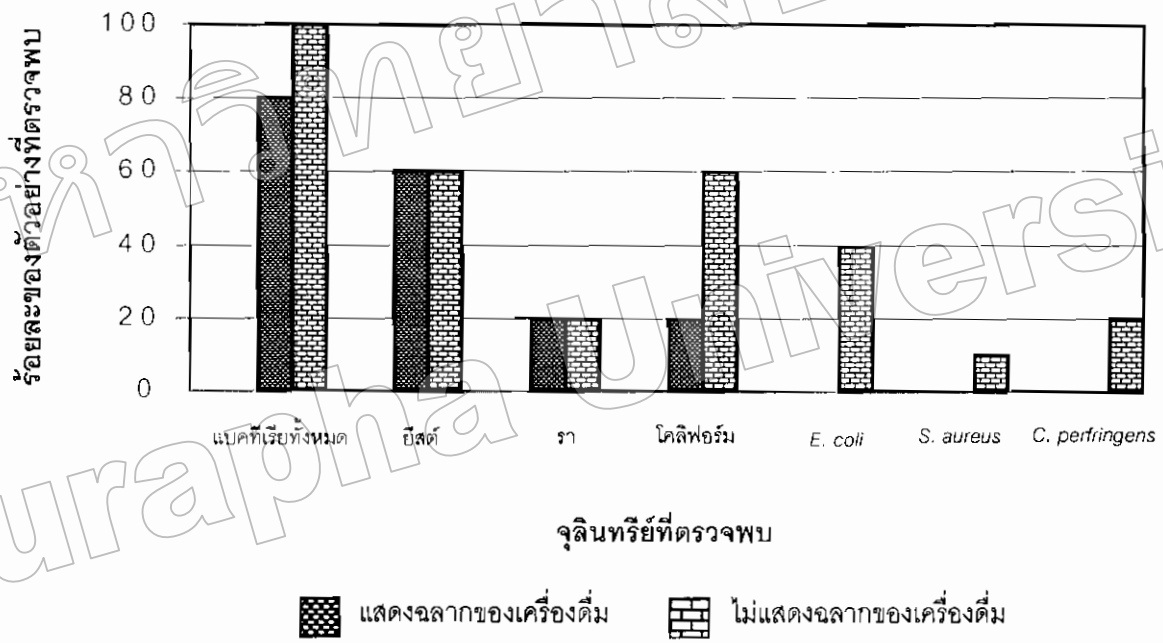
(ข)

แสดงฉลากของเครื่องดื่ม ไม่แสดงฉลากของเครื่องดื่ม

<u>ภาพที่ 1</u> การเปรียบเทียบร้อยละการตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* และ *C. perfringens* ในตัวอย่างทั้งสองประเภท (ก) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และ (ข) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 เพื่อหาค่าเฉลี่ยของร้อยละการตรวจพบจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนแต่ละประเภท แสดงได้ดังภาพที่ 2 พบว่า ตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากตรวจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา และโคลิฟอร์ม แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทุกชนิด ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา โคลิฟอร์ม และ *E. coli* นอกจากนี้ยังตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด *S. aureus* และ *C. perfringens* ด้วย



<u>ภาพที่ 2</u> การเปรียบเทียบร้อยละการตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ รา แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* และ *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำหวานที่แสดงและไม่แสดงฉลากของเครื่องดื่มของการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากข้อมูลในตารางที่ 8 และ 9 พบการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างทั้งสองประเภทนี้พบว่า ตัวอย่างประเภทที่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระดับต่ำถึงสูงคือ มีค่าระหว่าง 5 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนในระดับต่ำถึงสูงเช่นเดียวกันคือ มีค่าระหว่าง 20 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml โดยส่วนใหญ่มีปริมาณมากกว่า 1000 CFU/ml และพบว่าการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างทั้งสองประเภทในการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีค่าใกล้เคียงกันคิดเป็นร้อยละ 80 และ 73.33 ตามลำดับ

สำหรับการตรวจพบการปนเปื้อนของยีสต์ในตัวอย่างทั้งสองประเภท พบว่าตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนในระดับต่ำถึงสูงคือ มีค่าระหว่าง 10 ถึงมากกว่า 1000 CFU/ml ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากส่วนใหญ่พบการปนเปื้อนในระดับสูงคือ มากกว่า 1000 CFU/ml และพบว่าในการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 พบการปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 53.33 ซึ่งมากกว่าครั้งที่ 1 ที่มีการปนเปื้อนร้อยละ 33.33 ของตัวอย่างทั้งสองประเภท ส่วนการตรวจหาการปนเปื้อนของราพบว่า มีการปนเปื้อนในระดับต่ำคือ มีค่าระหว่าง 5 ถึง 20 CFU/ml ของตัวอย่างทั้งสองประเภท โดยการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 พบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างที่แสดงฉลากคิดเป็นร้อยละ 20 มีค่าระหว่าง 5 ถึง 20 CFU/ml และไม่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างที่ไม่แสดงฉลากทุกตัวอย่าง ส่วนการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ไม่พบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากทุกตัวอย่าง แต่ในตัวอย่างที่ไม่แสดงฉลากพบ 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 20 และมีค่า 5 CFU/ml

สำหรับการตรวจพบโคลิฟอร์ม การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 ของตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากพบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มในทุกตัวอย่างประเภทนี้ สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 40 โดยมีปริมาณมากกว่า 1600 MPN/100 ml ของทั้งสองตัวอย่าง ส่วนในการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 พบการปนเปื้อนของตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากคิดเป็นร้อยละ 20 มีปริมาณ 2 และ 17 MPN/100 ml สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 60 มีปริมาณ 50 และมากกว่า 1600 MPN/100 ml ของทั้งสองตัวอย่าง ส่วนการตรวจหาการปนเปื้อนของ *E. coli* พบว่าในตัวอย่างประเภทที่มีการแสดงฉลากของไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* ของตัวอย่างประเภทนี้ทุกตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อน 2 ใน 5 ตัวอย่างในระดับต่ำคือ 2 ถึง 6 MPN/100 ml ของการวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และพบการปนเปื้อน 1 ใน 5 ตัวอย่างของการวิเคราะห์ครั้งที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

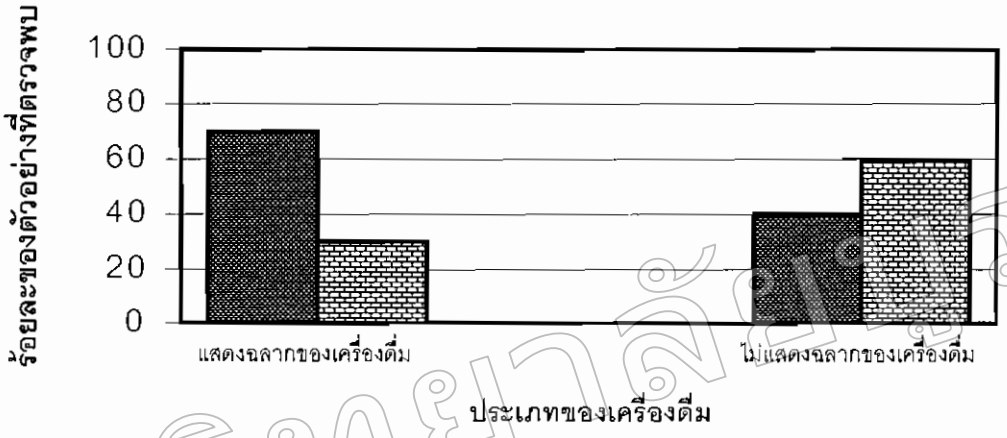
2. การตัดสินคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูน

เมื่อนำผลการตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนทั้ง 2 ประเภท โดยเทียบกับมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ.2524) กำหนดไว้ดังนี้

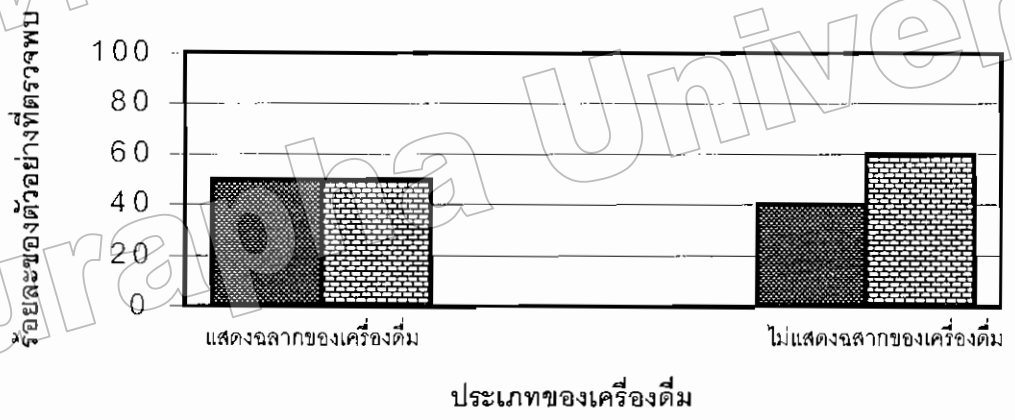
ยีสต์และรา	ไม่พบ
โคลิฟอร์ม	น้อยกว่า 2.2 MPN/100 ml
E. coli	ไม่พบ
แบคทีเรียก่อโรค	
S. aureus	ไม่พบ
C. perfringens	ไม่พบ
Salmonella spp.	ไม่พบ

จากการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 พบว่าน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนประเภทที่มีการแสดงฉลากของมีตัวอย่างที่เข้ามาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 70 และไม่เข้ามาตรฐานร้อยละ 30 ของตัวอย่างประเภทนี้ ส่วนตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากมีตัวอย่างเข้ามาตรฐานร้อยละ 40 และไม่ได้มาตรฐานร้อยละ 60 ของตัวอย่างประเภทนี้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 พบว่าตัวอย่างประเภทที่แสดงฉลากเข้ามาตรฐานลดลงคิดเป็นร้อยละ 50 และไม่เข้ามาตรฐานสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 50 ส่วนตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากมีตัวอย่างเข้ามาตรฐานร้อยละ 40 และไม่ได้มาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 60 ของตัวอย่างประเภทนี้ แสดงได้ดังภาพที่ 3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



(ก)



(ข)

เข้ามาตรฐาน ไม่เข้ามาตรฐาน

<u>ภาพที่ 3</u> จำนวนร้อยละของตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนของตัวอย่างที่แสดงและไม่แสดงฉลากของเครื่องดื่มที่เข้าและไม่เข้ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) (ก) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 และ (ข) การตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนทั้ง 2 ประเภทคือ ประเภทที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม และประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่ม เพื่อวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลชีววิทยาเทียบกับมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) พบว่า ในการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 ตัวอย่างประเภทที่มีการแสดงฉลากมีคุณภาพไม่เข้ามาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 30 โดยตรวจพบเฉพาะการปนเปื้อนของยีสต์และราในอัตราเท่ากันคิดเป็นร้อยละ 20 ของตัวอย่างประเภทนี้ ส่วนในตัวอย่างประเภทที่ไม่มีการแสดงฉลากมีคุณภาพไม่เข้ามาตรฐานสูงกว่าประเภทที่มีการแสดงฉลากคิดเป็นร้อยละ 60 โดยตรวจพบการปนเปื้อนของยีสต์คิดเป็นร้อยละ 60 ส่วนโคลิฟอร์มและ *E. coli* พบการปนเปื้อนในอัตราเท่ากันคือร้อยละ 40 ของตัวอย่างประเภทนี้ และตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด *S. aureus* และ *C. perfringens* เท่ากันโดยพบ 1 ใน 5 ตัวอย่างของตัวอย่างประเภทนี้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ในตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มมีคุณภาพไม่เข้ามาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 50 ซึ่งมีค่าสูงกว่าครั้งแรก โดยพบการปนเปื้อนของยีสต์ และโคลิฟอร์มร้อยละ 50 และ 20 ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากมีคุณภาพไม่เข้ามาตรฐานร้อยละ 60 โดยพบการปนเปื้อนของยีสต์ รา โคลิฟอร์ม และ *E. coli* ร้อยละ 60 20 60 และ 20 ตามลำดับ และยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคอีกหนึ่งชนิดคือ *C. perfringens* โดยพบ 1 ใน 5 ตัวอย่างของตัวอย่างประเภทนี้ ส่วนการหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับมาตรฐานของตัวอย่างเพราะยังไม่มีการออกกฎหมายในประกาศกระทรวงสาธารณสุข จึงเป็นเพียงการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อแสดงให้เห็นถึงโอกาสที่จะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

อภิปรายผลการทดลอง

จุลินทรีย์ที่พบการปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่สำรวจได้แก่ ยีสต์ รา โคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* และ *C. perfringens* ในการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 ตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนของยีสต์ร้อยละ 20 ส่วนในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มพบว่ามีการปนเปื้อนของยีสต์ในอัตราที่สูงกว่าคือร้อยละ 60 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ในตัวอย่างที่มีการแสดงพบการปนเปื้อนของยีสต์สูงกว่าในครั้งแรกคิดเป็นร้อยละ 50 ส่วนในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ว่ามีการปนเปื้อนของยีสต์เท่ากับครั้งแรกคิดเป็นร้อยละ 60 ของตัวอย่างประเภทนี้ ปริมาณยีสต์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างทั้งสองประเภทพบว่ามีปริมาณระหว่าง 10 ถึงมากกว่า 1,000 CFU/ml สำหรับการตรวจพบการปนเปื้อนของราพบว่า ในการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 1 พบการปนเปื้อนเฉพาะในตัวอย่างที่แสดงฉลาก คิดเป็นร้อยละ 20 ของตัวอย่างประเภทนี้ และไม่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างที่ไม่แสดงฉลากทุกตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ในตัวอย่างที่แสดงฉลากไม่พบการปนเปื้อนทุกตัวอย่าง แต่ตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่แสดงฉลาก 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20 โดยปริมาณราที่ปนเปื้อนในตัวอย่างทั้งสองประเภท มีปริมาณระหว่าง 5 ถึง 20 CFU/ml

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของยุพา และคณะ (ยุพา และคณะ, 2538) ซึ่งศึกษาคุณภาพน้ำหวานผสมสีในภาชนะพลาสติกรูปตุ๊กตา พบว่ามีการปนเปื้อนของยีสต์และราในตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 84.8 และ 54.5 ตามลำดับ โดยมีจำนวนระหว่าง 1 ถึงมากกว่า 100,000 CFU/ml และงานวิจัยของนงคราญ และคณะ (นงคราญ และคณะ, 2540) ศึกษาคุณภาพน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในจังหวัดเชียงใหม่ พบการปนเปื้อนของยีสต์หรือราในตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 81.5

จากการศึกษาเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าปริมาณยีสต์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณสูง นั่นคือ มีจำนวนมากกว่า 100,000 CFU/ml ส่วนการปนเปื้อนของราโดยส่วนใหญ่มีปริมาณระหว่าง 1 ถึง 100 CFU/ml ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของยีสต์และราเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ตัวอย่างไม่ได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) กล่าวไว้ว่า ต้องตรวจไม่พบยีสต์และรา ดังนั้นแม้จะพบการปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยก็ถือว่าไม่เข้ามาตรฐาน สาเหตุที่พบการปนเปื้อนของยีสต์และราได้สูงนั่นมาจากผู้ประกอบการขาดความระมัดระวังในเรื่องความสะอาดในการผลิต ถ้าเกิดมีการปนเปื้อน น้ำตาลในน้ำหวานจะเอื้ออำนวยต่อการเจริญของยีสต์ และถ้ามียีสต์ในปริมาณสูง ก็อาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะของการบูดเสียเกิดขึ้น กลิ่นและรสจะเปลี่ยนแปลงไป (ยุพา และคณะ, 2538)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่มีและไม่มีการแสดงฉลากของเครื่องดื่มพบว่า ตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากมีโอกาสพบการปนเปื้อนของยีสต์ได้สูงกว่าตัวอย่างที่มีการแสดงฉลาก ซึ่งตรงกับสมมติฐานที่คาดว่าจะพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากมากกว่าตัวอย่างที่มีการแสดงฉลาก ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากจะมีการผลิตเป็นแบบอุตสาหกรรมในครัวเรือน ดังนั้นในระหว่างขั้นตอนการผลิต ผู้ผลิตจะขาดความระมัดระวังในเรื่องความสะอาด โดยอาจมีการปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบ อุปกรณ์เครื่องใช้ที่ใช้ในการผลิต โดยทั่วไปมักพบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ยีสต์และรามักอยู่ตามผิวของผักหรือผลไม้ และน้ำตาล ซึ่งในน้ำหวานมีองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาล จะทำให้พบการปนเปื้อนได้สูงถ้าไม่มีการควบคุมการผลิตและการฆ่าเชื้อที่ดี แต่เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ในตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากกลับพบการปนเปื้อนของยีสต์สูงกว่าครั้งแรกในตัวอย่างทั้งสองประเภท ทั้งที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งผลิตเดียวกัน ผู้ผลิตเดียวกัน และมีการเว้นระยะเวลานาน 1 เดือน เมื่อทำการตรวจวันหมดอายุที่แสดงไว้ก็พบว่ายังไม่หมดอายุ แต่กลับพบการปนเปื้อนของยีสต์ในระดับสูง และบางตัวอย่างมีกลิ่นบูดเสียด้วย แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากแม้มีอุปกรณ์เครื่องมือและขั้นตอนการผลิตที่มีประสิทธิภาพดีกว่าที่ทำในครัวเรือน โดยพบว่าการให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5-10 นาที สามารถทำลายเซลล์ปกติและสปอร์ของยีสต์และราได้ (Frazier และ Westhoff, 1998) ก็ยังมีข้อบกพร่องของขั้นตอนการผลิตและการฆ่าเชื้อที่ยังไม่ได้มาตรฐาน ทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีโอกาสเจริญขึ้นมาได้อีก

นอกจากพบการปนเปื้อนของยีสต์แล้ว ยังพบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* ด้วย โดยในการตรวจวิเคราะห์ครั้งแรกไม่พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในทุกตัวอย่างของประเภทที่มีการแสดงฉลาก ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลาก โดยพบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในอัตราเท่ากันคือ ร้อยละ 40 โดยมีการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มที่มีค่ามากกว่า 1600 MPN/100 ml ส่วน *E. coli* พบการปนเปื้อนมีค่า 2 ถึง 6 MPN/100 ml เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ในตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนเฉพาะโคลิฟอร์มร้อยละ 20 มีค่า 2 ถึง 17 MPN/100 ml และไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* คิดเป็นร้อยละ 60 และ 20 ตามลำดับ พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มมีค่า 50 และมากกว่า 1600 MPN/100 ml ส่วน *E. coli* มีค่า 4 MPN/100 ml เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยของยุพา และคณะ (ยุพา และคณะ, 2538) พบว่ามีการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 69.7 และ 9.1 ตามลำดับ โดยมีค่าส่วนใหญ่มากกว่า 240 MPN/100 ml คิดเป็นร้อยละ 60.6 ของตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจพบ และงานวิจัยของนงคราญ และคณะ (นงคราญ และคณะ, 2540) พบการปนเปื้อนของเฉพาะโคลิฟอร์มคิดเป็นร้อยละ 24.1 และตรวจไม่พบ *E. coli* ในทุกตัวอย่าง การปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ตัวอย่างไม่เข้ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) กำหนดไว้ว่า ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มน้อยกว่า 2.2 ในเครื่องดื่ม 100 มิลลิลิตรโดยวิธีเอ็มพีเอ็น และตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *E. coli*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโคลิฟอร์มและ *E. coli* ที่พบในตัวอย่างที่ศึกษาทั้งสองประเภท พบว่าตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากพบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและ *E. coli* สูงกว่าตัวอย่างที่มีฉลาก (ดังแสดงในภาพที่ 1) ทั้งนี้ก็เนื่องจากตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากยังไม่มีการควบคุมการผลิตที่ดีจึงอาจมีการปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบ อุปกรณ์ที่ใช้ ภาชนะบรรจุ น้ำที่นำมาใช้ผลิตหรือการสัมผัสของผู้ประกอบการที่ใช้มือในบางขั้นตอนของการผลิต รวมทั้งการบรรจุน้ำหวานลงในภาชนะ โดยการตรวจพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ รวมถึงการให้ความร้อนไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อด้วย นอกจากนี้การพบ *E. coli* จะบ่งชี้ถึงความสกปรกของน้ำที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำนั้นและอาจแสดงถึงความเป็นไปได้ว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษอื่น ๆ ได้ (ธาริยา, 2540) ดังนั้นถ้าพบการปนเปื้อนที่สูงก็แสดงว่า กรรมวิธีการผลิตยังขาดระบบสุขาภิบาลที่ดี (good manufacturing practice) คือผู้ประกอบการขาดความระมัดระวังเรื่องความสะอาดในการผลิตนั่นเอง

นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด *S. aureus* และ *C. perfringens* เฉพาะในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลาก โดยตรวจพบ *S. aureus* เฉพาะการตรวจวิเคราะห์ครั้งแรกโดยพบ 1 ใน 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในการวิเคราะห์ครั้งที่ 2 ส่วน *C. perfringens* พบในการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองครั้งเท่า ๆ กันคือ พบ 1 ใน 5 ตัวอย่างของแต่ละครั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของยุพา และคณะ (ยุพา และคณะ, 2538) พบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษเฉพาะ *C. perfringens* คิดเป็นร้อยละ 9.1 และตรวจไม่พบ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. และงานวิจัยของนงคราญ และคณะ (นงคราญ และคณะ, 2540) พบการปนเปื้อนของเฉพาะ *C. perfringens* คิดเป็นร้อยละ 18.5 ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) กำหนดไว้ว่า ต้องตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรคทุกชนิด

การตรวจพบ *S. aureus* เฉพาะในตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลากเป็นเครื่องแสดงให้เห็นว่า ในขั้นตอนการผลิตอาจจะมีการสัมผัสระหว่างผู้ประกอบการกับน้ำหวาน เพราะ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่พบตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย บริเวณจมูก มือ แผล สิว และแพร่กระจายในฝุ่นละอองได้ดี การปนเปื้อนของ *S. aureus* จึงมักพบในอาหารที่มีการสัมผัสก่อนนำมาบริโภค เพราะฉะนั้นการที่ตรวจพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* จะแสดงให้เห็นว่ามีการปฏิบัติไม่ถูกสุขลักษณะคือ มีการสัมผัสระหว่างผู้ประกอบการและน้ำหวาน ซึ่งจะแสดงถึงสุขวิทยาส่วนบุคคลที่ไม่ดีพอ ส่วนการปนเปื้อน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

C. perfringens ซึ่งเป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญได้ดี โดยสปอร์นี้สามารถแพร่กระจายในอากาศ ดิน และน้ำได้ ถ้าสถานที่ผลิตไม่มีการดูแลรักษาความสะอาดและควบคุมการผลิตให้ดี ก็จะทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้สูง จะสังเกตุได้ว่าไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษในตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากในทุกตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการผลิตเป็นแบบระบบอุตสาหกรรมที่มีการใช้เครื่องมือที่ทันสมัยกว่าแบบอุตสาหกรรมครัวเรือนจึงใช้เครื่องจักรมากกว่าการใช้แรงงานคน การทำเช่นนี้สามารถหลีกเลี่ยงการสัมผัสระหว่างผู้ประกอบการกับผลิตภัณฑ์ได้มากกว่า ประกอบกับลักษณะของสถานที่ผลิต ถ้ามีการดูแลรักษาความสะอาด มีการสุขาภิบาลที่ดี ก็จะสามารถป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคต่าง ๆ ได้

เมื่อพิจารณาน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนที่เข้ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) ตัวอย่างที่มีการแสดงฉลากส่วนใหญ่จะมีการแสดงวันผลิต วันหมดอายุ ส่วนประกอบของเครื่องดื่ม สถานที่ผลิต ฯลฯ ที่แน่นอนซึ่งพบว่า เข้ามาตรฐาน 4 ตัวอย่าง คือ ตราเยลลี่ชาพ่าริ (ตัวอย่างที่ 1) มินิเจอร์ (ตัวอย่างที่ 7) ยูไนเต็ดเยลลี่ (ตัวอย่างที่ 9) และแพนซีเยลลี่ (ตัวอย่างที่ 9) โดยสามตัวอย่างหลังคือ ตัวอย่างที่ 7, 8 และ 9 มีสถานที่ผลิตมาจากแหล่งเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า มีขั้นตอนการผลิตและการฆ่าเชื้อที่ดี และยังพบตัวอย่างที่ไม่เข้ามาตรฐานของเครื่องดื่มประเภทนี้ด้วย แม้ว่าจะตรวจดูแล้วว่ายังไม่ถึงวันหมดอายุ แต่มีบางตัวอย่างเช่น ตราโกลเด้นแพนไอซ์ (ตัวอย่างที่ 3)และแอโร (ตัวอย่างที่ 4) ที่มีลักษณะการปิดผนึกไม่ดี จึงมีการไหลของน้ำหวานออกปนเปื้อนกับจุลินทรีย์ภายนอกทำให้เกิดกลิ่นบูด ส่วนใหญ่จะตรวจพบการปนเปื้อนของยีสต์และรา โดยมีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่ปนเปื้อนของโคลิฟอร์มเกินมาตรฐานได้แก่ โกลเด้นแพนไอซ์ (ตัวอย่างที่ 3) แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการผลิตและการฆ่าเชื้อยังไม่ได้มาตรฐาน โดยเฉพาะตราโกลเด้นแพนไอซ์ซึ่งพบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์ม นั่นน่าจะมีสาเหตุมาจากมีการปนเปื้อนภายหลัง เพราะโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อนมากนัก แต่สามารถพบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อม โดยเมื่อมีการปิดภาชนะไม่สนิทดี จึงอาจมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ประเภทนี้ในภายหลังระหว่างการเก็บได้ และยังพบว่าตราแอโร ที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของยีสต์ แม้ว่าจะมีการแสดงฉลาก วันเดือนปีที่ผลิต วันหมดอายุแน่นอน และมีการปิดผนึกที่ดีไม่มีร่องรอยการฉีกขาดของภาชนะบรรจุแสดงให้เห็นว่า อาจจะมีขั้นตอนการผลิตและฆ่าเชื้อยังไม่ได้มาตรฐาน เมื่อนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก็เป็นการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงฉลาก มักวางขายในถาดอะลูมิเนียมที่มีการแช่น้ำแข็งในตลาดนัดพบว่า มีน้ำหวานลักษณะหนึ่งคือ มีลักษณะเหมือนนมเย็นที่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูงมาก โดยจะนำน้ำหวานมาผสมกับน้ำและนมข้นหวาน นำไปต้มแล้วปิดผนึกด้วยยางรัดของ ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีโอกาสในการปนเปื้อนจุลินทรีย์สูงมาก ลักษณะน้ำหวานเช่นนี้พบตัวอย่างที่ไม่เข้ามาตรฐานทั้งหมด คือ ตัวอย่างที่ 12 และ 13 และพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ สูง ทั้งนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากขั้นตอนในการผลิตและการฆ่าเชื้อยังไม่ได้มาตรฐาน โดยเห็นได้จากขั้นตอนการผลิตที่มีโอกาสการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ตลอดเวลา ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการให้ความร้อนในการผสมน้ำหวานที่อาจให้ความร้อนไม่มากพอที่จะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ และขั้นตอนในการบรรจุและปิดผนึกด้วยยางรัดของ โดยเฉพาะการบรรจุที่ต้องกรอกน้ำหวานใส่ภาชนะพลาสติกปากแคบอาจมีการสัมผัสระหว่างผู้ประกอบการกับน้ำหวานได้ จึงเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค ส่วนการปิดปากภาชนะด้วยยางรัดของซึ่งไม่สนิทพอที่จะกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ เพราะน้ำหวานประเภทนี้มักขายตามบริเวณตลาดนัดที่มีสุขลักษณะที่ไม่ดี จึงเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มาก น้ำหวานประเภทนี้จึงไม่สมควรอย่างยิ่งที่จะนำมารับประทานเพราะมีโอกาสปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่าน้ำหวานประเภทอื่น

จากผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนทั้งประเภทที่มีการแสดงฉลากและที่ไม่มีการแสดงฉลาก ส่วนใหญ่ยังไม่เหมาะสมต่อการบริโภคเนื่องจากมีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) แสดงให้เห็นว่า น้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนยังไม่เหมาะสมในการนำมาบริโภคเพราะคุณภาพไม่สม่ำเสมอ ทั้งยังเป็นเครื่องดื่มที่ให้คุณค่าทางโภชนาการต่ำคือมีเพียงแต่น้ำตาล ดังนั้นในการเลือกซื้อบริโภคต้องพิจารณาให้รอบคอบ เพราะหากบริโภคในสภาวะที่ร่างกายมีภูมิต้านทานต่ำ อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและยีสต์หรือราควรเพิ่มระดับความเจือจางให้มากขึ้น เพราะมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เหล่านี้ค่อนข้างสูงคือมากกว่า 3,000,000 CFU/ml เพื่อเป็นการนับปริมาณให้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น
2. ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ในแต่ละประเภทควรมีการเก็บตัวอย่างให้มากกว่านี้และควรทำซ้ำมากกว่า 2 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องในการประเมินคุณภาพ
3. ควรมีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของตัวอย่างประกอบด้วย เพื่อยืนยันว่าการวิเคราะห์นี้ได้มาตรฐานทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและทางเคมี ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอกสารอ้างอิง

ธาริยา เสาวรัญ. 2540. การปรับปรุงคุณภาพทางจุลชีววิทยาในเครื่องดื่มจากสถานศึกษาบางแห่งในจังหวัดสงขลา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 39(4) : 243-251.

นงคราญ เรืองประพันธ์ และคณะ. 2540. คุณภาพน้ำหวานในภาชนะพลาสติกรูปการ์ตูนในจังหวัดเชียงใหม่. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 39(3) : 191-194.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2538. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์.

ยุพา ฉันทปัญญารัตน์. 2538. คุณภาพน้ำหวานผสมสีในภาชนะพลาสติกรูปตุ๊กตา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 37(2) : 127-135.

ลดาพรรณ แสงคล้าย และคณะ. 2533. คุณภาพน้ำหวานหาบเร่จากแหล่งชุมชนในเขตกรุงเทพมหานคร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 32(3) : 121 -132.

วีรชัย โชควิญญู. 2530. เทคนิคการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำด้านแบคทีเรีย. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า. 2543. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุวรรณี ธีรภาพธรรมกุล และใจภักดิ์ พราหมณ์พันธุ์. 2537. วัตถุเจือปนในน้ำหวานเข้มข้นที่บรรจุในภาชนะปิดสนิท. อาหาร : 95-104.

APHA. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washichton, DC : American Public Health Association.

Frazier, W. C. and Westhoff, D.C. 1978. Food microbiology. New Delhi : Mcgrar Hill.

Tortoa, G. J., Funck , B.R. and Casl, Microbbiology. 19 92 .Microbiology and Introduction. Redwood City : The Benjamin/Cumming.

Volk, W. A. and Wheeler, M.F. 1980. Basic Microbiology. Philadelphia : J. B. Lippincott.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Baird-Parker egg yolk tellurite agar

1.1 ส่วนผสมพื้นฐาน

Tryptone	10.0	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Lithium chloride, hydrated	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Sodium sulphadimidine(0.2%)	25.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

<u>หมายเหตุ</u>

เตรียมสารละลาย Sodium sulphadimidine เข้มข้น 0.2% โดยละลาย sulphadimidine (sulphamezathine) ใน 0.1 sodium hydroxide 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 ส่วนผสมเพิ่มเติม

ก. Glycine 20 %

<u>วิธีเตรียม</u>

ชั่ง glycine 20.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง ขนาดช่อง 0.45 ไมครอน

ข. Potassium tellurite 1%

<u>วิธีเตรียม</u>

ชั่ง potassium tellurite 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง ขนาดช่อง 0.45 ไมครอน

ค. Egg-yolk emulsioนี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>วิธีเตรียม</u>

แช่ไข่ไก่ในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 1 ชั่วโมง แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ส่วนลงในไข่แดง 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน (เก็บไว้ในตู้เย็น)

<u>วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อครบสูตร</u>

เติมส่วนผสม ก 6.5 มิลลิลิตร ส่วนผสม ข 1.1 มิลลิลิตร และส่วนผสม ค 5.4 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมพื้นฐาน (อุณหภูมิไม่เกิน 50 °ซ) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ

2. Brilliant green lactose bile broth

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Oxgall	20.2	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16×150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตรและใส่หลอด Durham 1 หลอด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

3. Cook meat medium

Beef heart	454.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Glucose	2.0	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ชั่งส่วนผสม 1.25 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ฝาเกลียว เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. Eosin methylene blue agar

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sucrose	5.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เขย่าให้เข้ากันก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ

5. Lactose gelatin medium

Tryptose	15.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม
Phenol red	0.05	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น gelatin และ phenol red ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ต้ม gelatin กับน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50° -60°ซ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิจนละลาย นำมาผสมกันปรับพีเอชเป็น 7.5 เติม phenol red บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. Lauryl sulphate tryptose broth

Tryptose	20.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.75	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sodium lauryl sulphate	0.1	กรัม

PH 6.8 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 6.8 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16×150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอด Durham 1 หลอด (คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

7. Lysine iron agar

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucrose	1.0	กรัม
L-lysine hydrochloride	10.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Sodium thiosulphate	0.04	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 6.7 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 6.7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที นำมาวางในลักษณะเอียง (slant)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

8. MacConkey 's agar

Peptone	20.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salts	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม

pH 7.1 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.1 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

9. Motility nitrate medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potassium nitrate	1.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Galactose	5.0	กรัม
Glycerol	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

10. MR-VP broth

Peptone	5.0	กรัม
Glucrose	5.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0	กรัม

pH 6.9 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

11. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.4 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

12. Peptone (0.1%)

ละลาย peptone 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.1 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

13. Plate count agar (standard method agar)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
D-glucrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

14. Potato dextrose agar (pH 3.5)

Potato infusion form	200.0	กรัม
Glucrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 3.5 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 50 °ซ ปรับพีเอชเป็น 3.5 ด้วยสารละลายกรด tataric acid เข้มข้น 10% (ฆ่าเชื้อแล้ว) เทใส่จานเพาะเชื้อ

15. 1% Raffinose fermentation broth

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red	0.018	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เติมสารละลาย raffinose (0.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ปลอดเชื้อ 0.3 มิลลิลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากัน

16. 1% Salicin fermentation broth

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red	0.018	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เติมสารละลาย salicin (0.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ปลอดเชื้อ 0.3 มิลลิลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากัน

17. *Salmonella-Shigella* agar

Beef extract	5.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salts	8.5	กรัม
Sodium citrate	10.0	กรัม
Sodium thiosulphate	8.5	กรัม
Ferric citrate	10.0	กรัม
Brilliant green	0.33	มิลลิกรัม
Neutral red	0.025	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือดนานประมาณ 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

18. Selenite cystine broth

Tryptone	4.0	กรัม
Lactose	4.0	กรัม
Sodium hydrogen selenite	4.0	กรัม
Disodium hydrogen phosphate	5.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	5.0	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

L-Cystine	0.01	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือดนานประมาณ 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

19. Simmon 's citrate agar

Sodium chloride	5.0	กรัม
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
Sodium citrate	5.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 6.8 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที วางในลักษณะอาหารเอียง

20. Triple sugar iron agar

Peptone	20.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Ferrous sulphate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodiumthiosulphate pentahydrate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	15.0	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

pH 7.4 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที วางในลักษณะอาหารเอียง

21. Trypticase soy broth, 10% NaCl

Tryptone หรือ Trypticase	17.0	กรัม
Soya peptone หรือ phytone	3.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
D-glucose	2.5	กรัม

pH 7.2 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.2 เติม Sodium chloride เพิ่มอีก 75.0 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

22. Tryptose sulphite egg-yolk cycloserine agar

22.1 **ส่วนผสมพื้นฐาน**

Tryptose	15.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	1.0	กรัม
Sodium metabisulphite	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.6 ± 0.2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

22.2 ส่วนผสมเพิ่มเติม

ก. Egg-yolk agar

<u>วิธีเตรียม</u>

แช่ไข่ไก่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% นานประมาณ 1 ชั่วโมง แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ผสมไข่แดง 1 ส่วนกับน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% 1 ส่วน ทำให้เข้ากัน

ข. Cycloserine 0.5%

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลาย D- Cycloserine 0.5 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 ไมครอน

<u>วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อครบสูตร</u>

เติม egg-yolk emulsion (ก) 10 มิลลิลิตร และสารละลาย ข 8 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมพื้นฐาน 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อ

23. Urea agar

Peptone	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	1.2	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.8	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Urea	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น agar ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 ไมครอน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ละลาย agar ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 50 °ซ ผสมส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกัน บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที วางในลักษณะอาหารเอียง

24. Xylose lysine desoxycholate agar

Yeast extract	3.0	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
L-lysine monochloride	5.0	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium desoxychloate	2.5	กรัม
Sodium thiosulphate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.4 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือดนานประมาณ 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข
น้ำยาทดสอบและสีย้อม

1. Crytral violet solution

<u>สารละลาย ก</u>

ละลาย crytral violet 2.0 กรัม ใน ethanal (95%) 20 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง

<u>สารละลาย ข</u>

ละลาย ammonium oxalate monohydrate 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

<u>วิธีผสม</u>

ผสมสารละลาย ก และสารละลาย ข อย่างละเท่า ๆ กัน

2. Gram's iodine solution

ละลาย iodine cystral 1.0 กรัม และ potassium iodide 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

3. Kovac's reagent

p-Dimethyiaminobenzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl alcohol	75.0	กรัม
Hydrocholric acid (conc.)	25.0	กรัม

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลาย *p*-Dimethyiaminobenzaldehyde ใน amyl alcohol ค่อย ๆ เติม hydrocholric acid ลงไป เก็บในขวดสีน้ำตาล

4. Methyl red reagent

Methyl red	0.1	กรัม
Ethanol, 95%	300.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลาย methyl red ใน ethanol เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. Nitrate reduction reagent

<u>สารละลาย ก</u>

ละลาย sulfanilic acid 0.5 กรัม และ glacial acetic acid 30.0 กรัมในน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร

<u>สารละลาย ข</u>

ละลาย N(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0.2 กรัม และ glacial acetic acid 30.0 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร

6. Safanin O solution

ละลาย safanin O 2.5 กรัม ใน ethanol (95%) 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายนี้ 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7. Voges-Proskauer reagent

<u>สารละลาย ก</u>

ละลาย ∝-napthol 5.0 กรัม ใน ethanol (absolute) 100 มิลลิลิตร

<u>สารละลาย ข</u>

ละลาย potassium hydroxide 40.0 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค
ตารางเอ็มพีเอ็น (MPN Table)

จำนวนหลอดผลบวกใน 5 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ			เอ็มพีเอ็น/ 100 มิลลิลิตร
10 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร	
0	0	0	<2
0	0	1	2
0	1	0	2
0	2	0	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	6
1	2	0	6
2	0	0	4
2	0	1	7
2	1	0	7
2	1	1	9
2	2	0	9
2	3	0	12
3	0	0	8
3	0	1	11
3	1	0	11
3	1	1	14
3	2	0	14
3	2	1	17
4	0	0	13
4	0	1	17
4	1	0	17
4	1	1	21
4	1	2	26
4	2	0	22

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จำนวนหลอดผลบวกใน 5 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ			เอ็มพีเอ็น/ 100 มิลลิลิตร
10 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร	
4	2	1	26
4	3	0	27
4	3	1	33
4	4	0	34
5	0	0	23
5	0	1	30
5	0	2	40
5	1	0	30
5	1	1	50
5	1	2	60
5	2	0	50
5	2	1	70
5	2	2	90
5	3	0	80
5	3	1	110
5	3	2	140
5	3	3	170
5	4	0	130
5	4	1	170
5	4	2	220
5	4	3	280
5	4	4	350
5	5	0	240
5	5	1	300
5	5	2	500
5	5	3	900
5	5	4	
5	5	5	≥1600

(ที่มา : วีรชัย, 2530)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บางครั้งผลที่ได้ไม่สามารถเทียบหาค่าจากตารางเอ็มพีเอ็นได้ ต้องทำการคำนวนใช้สูตรของโธมัส (Thomas' simple formula)

$$= \frac{\text{จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก} \times 100}{\sqrt{\left(\begin{array}{c}\text{ปริมาณน้ำตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร}\\ \text{ในหลอดที่ให้ผลลบ}\end{array}\right) \times \left(\begin{array}{c}\text{ปริมาณน้ำตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร}\\ \text{ในหลอดที่ให้ผลลบ}\end{array}\right)}}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ง
เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 62 (พ.ศ. 2524) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังนี้

ข้อ 1. ให้เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทดังต่อไปนี้เป็นอาหารควบคุม

(1) น้ำที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือออกซิเจนผสมอยู่

(2) เครื่องดื่มที่มีหรือทำจากน้ำผลไม้ พืชหรือผัก ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือออกซิเจนผสมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ตาม

(3) เครื่องดื่มที่มีหรือทำจากส่วนผสมที่ไม่ใช่ผลไม้ พืชหรือผัก ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือออกซิเจนผสมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ตาม

(4) เครื่องดื่มตาม (2) หรือ (3) ชนิดเข้มข้นซึ่งต้องเจือจางก่อนบริโภค

(5) เครื่องดื่มตาม (2) หรือ (3) ชนิดแห้ง

ข้อ 2. เครื่องดื่มตาม (1) ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังต่อไปนี้

(1) มีกลิ่นและรสตามลักษณะเฉพาะของเครื่องดื่มนั้น

(2) ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันมีตามธรรมชาติของส่วนประกอบ

(3) น้ำที่ใช้ผลิตต้องเป็นน้ำที่มีคุณภาพหรือมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท

(4) ตรวจพบบัคเตรีชนิดโคลิฟอร์ม น้อยกว่า 2.2 ต่อเครื่องดื่ม 100 มิลลิลิตร โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number)

(5) ตรวจไม่พบบัคเตรีชนิด อี. โคไล (*Escherichia coli*)

(6) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

(7) ไม่มีสารเป็นพิษจากจุลินทรีย์หรือสารเป็นพิษอื่นในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

(8) ไม่มียีสต์และเชื้อรา

(9) ไม่มีสารปนเปื้อน เว้นแต่ดังต่อไปนี้

(ก) สารหนู ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

(ข) ตะกั่ว ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

(ค) ทองแดง ไม่เกิน 5 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ง) สังกะสี ไม่เกิน 5 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

(จ) เหล็ก ไม่เกิน 15 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

(ฉ) ดีบุก ไม่เกิน 250 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

(ช) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

(10) ไม่มีวัตถุที่ให้ความหวานชนิดอื่นนอกจากน้ำตาล แต่ถ้าเป็นเครื่องดื่มที่มีจุดประสงค์จะใช้เฉพาะผู้ป่วยที่ต้องการจำกัดการบริโภคน้ำตาล อาจใช้วัตถุที่ให้ความหวานชนิดอื่นได้ ตามชนิดและปริมาณที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาและจะต้องแสดงจุดประสงค์ดังกล่าวไว้ในฉลากด้วย

(11) มีแอลกอฮอล์อันเกิดขึ้นจากธรรมชาติเป็นส่วนประกอบ และแอลกอฮอล์ที่ใช้ในกรรมวิธีผลิต รวมกันได้ไม่เกินร้อยละ 0.5 ของน้ำหนัก ถ้าจำเป็นต้องมีแอลกอฮอล์ในปริมาณที่สูงกว่าที่กำหนดไว้ ต้องได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

แอลกอฮอล์ที่ใช้ในกรรมวิธีการผลิตต้องไม่ใช้เมทิลแอลกอฮอล์

เครื่องดื่มชนิดเข้มข้นที่ต้องเจือจาง หรือเครื่องดื่มชนิดแป้งที่ต้องละลายก่อนบริโภคตามที่กำหนดไว้ในฉลากเมื่อเจือจางหรือละลายแล้ว ตรวจพบบัคเตรีชนิดโคลิฟอร์มได้ตาม (4) และมีสารปนเปื้อนได้ตามที่กำหนดไว้ใน (9)

ข้อ 3. เครื่องดื่มตามข้อ 1 นอกจากต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 2 แล้ว ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานเฉพาะดังต่อไปนี้ด้วย

(1) เครื่องดื่มตามข้อ 1(2) ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามประเภทหรือชนิดของผลไม้ พืชหรือผักชนิดนั้น ๆ ที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

(2) เครื่องดื่มตามข้อ 1(2) ชนิดเข้มข้นหรือชนิดแห้ง เมื่อเจือจางหรือละลายแล้วต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามประเภทหรือชนิดของผลไม้ พืชหรือผักนั้น ๆ ที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

(3) เครื่องดื่มชนิดแห้งมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 6 ของน้ำหนัก ถ้าเป็นเครื่องดื่มชนิดแห้งที่ผลิตจากพืชหรือผักให้มีความชื้นได้ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

(4) เครื่องดื่มตามข้อ 1(2) หรือ 1(3) มีวัตถุกันเสียได้ ดังต่อไปนี้

(ก) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่เกิน 70 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ข) กรดเบนโซอิค หรือกรดซอร์บิค หรือเกลือของกรดทั้งสองนี้ตัวกรดได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัม ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม

เครื่องดื่มตามข้อ 1(2) หรือ 1(3) ชนิดเข้มข้นเมื่อเจือจางแล้วมีวัตถุกันเสียได้ไม่เกินที่กำหนดไว้ใน (4)

การใช้วัตถุกันเสียให้ใช้ได้เพียงชนิดหนึ่งชนิดใดตามที่กำหนดใน (4) (ก) หรือ (ข) ถ้าใช้เกินหนึ่งชนิดต้องมีปริมาณของชนิดที่ใช้รวมกันไม่เกินปริมาณของวัตถุกันเสียชนิดที่กำหนดให้ใช้น้อยที่สุด

เมื่อจำเป็นต้องใช้วัตถุกันเสียแตกต่างไปจากที่กำหนดไว้ดังกล่าวขั้นต้นต้องได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 4. ภาชนะบรรจุที่ใช้บรรจุเครื่องดื่ม ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วย เรื่องภาชนะบรรจุ

ข้อ 5. การแสดงฉลากของเครื่องดื่ม ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องฉลากเว้นแต่การใช้ชื่อเครื่องดื่มตามข้อ 1(2) ที่มีหรือทำจากน้ำผลไม้ ทั้งชนิดเหลวหรือชนิดแห้งและเครื่องดื่มตามข้อ 1(3) ซึ่งมีกลิ่นหรือรสผลไม้ที่ได้จากการสังเคราะห์ ทั้งชนิดเหลวและชนิดแห้ง ให้ปฏิบัติดังต่อไปนี้

(1) เครื่องดื่มตามข้อ 1(2) ให้ใช้ชื่อดังนี้

(ก) "น้ำ...100%" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชื่อผลไม้) สำหรับเครื่องดื่ที่มีหรือทำจากผลไม้ล้วน

(ข) "น้ำ...100% จากน้ำ...เข้มข้น" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชื่อผลไม้) สำหรับเครื่องดื่มที่ทำจากการนำน้ำผลไม้ชนิดเข้มข้นมาเจือจางด้วยน้ำ เพื่อให้มีคุณภาพหรือมาตรฐานเหมือนกับเครื่องดื่ม (ก)

(ค) "น้ำ...%" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชื่อและปริมาณเป็นร้อยละของผลไม้) สำหรับเครื่องดื่มที่มีหรือทำจากผลไม้ตั้งแต่ร้อยละ 20 ของน้ำหนักขึ้นไป แต่ไม่ใช่ตามเครื่องดื่ม (ก)

(ง) "น้ำรส...%" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชื่อและปริมาณเป็นร้อยละของผลไม้) สำหรับเครื่องดื่มที่มีหรือทำจากผลไม้ ไม่เกินร้อยละ 20 ของน้ำหนัก

(2) เครื่องดื่มตามข้อ 1(3) ซึ่งมีกลิ่นหรือรสของผลไม้ที่ได้จากการสังเคราะห์เป็นส่วนผสมให้ใช้ชื่อดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ห้องสมุด
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
02397

"น้ำหวานกลิ่น..." (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชื่อกลิ่นของผลไม้ที่ได้จากการสังเคราะห์)

(3) เครื่องดื่มตามข้อ 1(4) นอกจากจะต้องใช้ชื่อเครื่องดื่มตาม (1) หรือ (2) โดยไม่ต้องแสดงปริมาณของผลไม้แล้ว จะต้องมีข้อความ "เข้มข้น" ต่อท้ายชื่อดังกล่าว และให้แสดง ข้อความ "เมื่อเจือจางแล้ว มีน้ำ...%" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชนิดและปริมาณของผลไม้) ไว้ใต้ชื่อเครื่องดื่มด้วย

(4) เครื่องดื่มตามข้อ 1(5) นอกจากจะต้องใช้ชื่อเครื่องดื่มตาม (1) หรือ (2) โดยไม่ต้องแสดงปริมาณของผลไม้แล้ว จะต้องแสดงข้อความ "เมื่อละลายน้ำแล้วมีน้ำ...%" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุชนิดและปริมาณของผลไม้) ไว้ใต้เครื่องดื่มด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University