1618

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการหา *Staphylococcus aureus* ใน ไอศกรีมกะทิ โดยวิธี Most Probable Number Method (MPN) ด้วย Selective Media และ Non Selective Media

Comparation study on Detection method of *Staphylococcus aureus* in coconut milk ice-cream by MPN Method using Selective Media & Non Selective media

โดย

นาย บัณฑูร พานิชกุล
นาย สมภพ วัฒนมณี

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 31/ส.ค./40 ..... **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

( )

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....
(รศ.ดร. ระเพียร หาเรือนกิจ)
(หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร)
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 30 **เดือน** กันยายน **พ.ศ.** 2540

14922
21 ส.ค. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส.ค. 2541

14922

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการหา *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมกะทิ โดยวิธี Most Probable Number Method (MPN) ด้วย Selective Media และ Non Selective Media

Comparation study on Detection Method of *Staphylococcus aureus* in coconut milk ice-cream by MPN Method using Selective Media & Non Selective Media

บัณฑูร พานิชกุล

สมภพ วัฒนมณี

T096475

ปพ.
ป263ก
2539

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน...96475...
วัน,เดือน,ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมภพ วัฒนมณี และ บัณฑูร พานิชกุล. 2540 : การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการหา *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมกะทิ โดยวิธี Most Probable Number Method (MPN) ด้วย Selective Media และ Non Selective Media

Comparation study on Detection Method of *Staphylococcus aureus* in coconut milk ice-cream by MPN Method using Selective Media & Non Selective Media

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ อดิศร เสวตวิวัฒน์,ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์

บทคัดย่อ

ไอศกรีมกะทิที่จำหน่ายในท้องตลาด ส่วนใหญ่ผลิตจากวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* ในปริมาณสูง และ ภายหลังจากผ่านกระบวนการผลิต มักตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีม เนื่องจาก ในกระบวนการผลิตไอศกรีมจะทำให้ *Staphylococcus aureus* บางส่วนบาดเจ็บ เมื่อนำมาตรวจหาด้วย Selective Media จะทำให้ผลการตรวจหาผิดพลาดได้

ดังนั้น จึงทำการศึกษาตรวจสอบ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมโดยวิธี MPN ด้วย Selective Media คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB +10%NaCl และ Non Selective Media คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

จากการศึกษาพบว่าการตรวจหา *Staphylococcus aureus* ด้วย Selective Media(TSB +10%NaCl) มีประสิทธิภาพดีกว่า Non Selective Media(TSB) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร .....

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเล่มนี้สำเร็จผลได้ด้วยดี ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำ และแก้ไขปัญหาพิเศษ คุณปรีชา จึงสมานกุล และคุณเพ็ญศรี รอดมา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7 และ 8 ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยศเส ผู้ซึ่งให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และแก้ไขปัญหาพิเศษ ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณปุ๊ก, คุณโกโก้, คุณบี, คุณนก, คุณเจี๊ยบ, คุณนุช ข้าราชการและลูกจ้างประจำกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ยศเส ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขอขอบคุณ คุณพรพรหม และ ดช. บุรัสกร วัฒนมณี ที่ให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณ บิดา มารดา เทศา ตะวัน และเสาวนีย์ ที่ให้กำลังใจตลอดเวลา

ขอขอบคุณ คุณจุไรรัตน์ รุ่งโรจนรักษ์ คุณชญานิน สุจิรัตน์ คุณวิรงรอง สุขเสงี่ยม ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง สำหรับความช่วยเหลือและน้ำใจของทุกท่าน รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่รักทุกคนในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

บัณฑูร พานิชกุล

สมภพ วัฒนมณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ค

กิตติกรรมประกาศ.....ง

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญภาพ.....ซ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. วารสารปริทรรศน์.....3

2.1 ไอศกรีม.....3

2.2 ไอศกรีมกะทิ.....4

2.3 หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตไอศกรีม.....5

2.4 *Staphylococcus aureus*.....10

3. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....16

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง.....16

3.2 การเก็บตัวอย่าง.....16

3.3 วิธีการทดลอง.....18

4. สรุปผลการทดลอง.....27

4.1 สรุปผลการทดลอง.....28

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง.....31

เอกสารอ้างอิง.....32

ภาคผนวก.....33

ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....33

ภาคผนวก ข ตารางอ่านค่า MPN.....35

ประวัติผู้เขียน.....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 2.1สมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ที่พบในคนและสัตว์ต่าง ๆ.....11

ตารางที่ 2.2สารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *S. aureus*.....15

ตารางที่ 3.1การคำนวณและรายงานผล Total bacteria count.....24

ตารางที่ 3.2 แผนการดำเนินการทดลอง.....26

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลอง.....27

ตารางที่4.2 แสดงค่า MPN ของ *S. aureus* จากการวิเคราะห์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Non Selective media (TSB) และ Selective Media (TSB + 10% NaCl).....29

ตารางที่4.3 Non Selective Media (TSB) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S. aureus* 30

ตารางที่4.4แสดงผลการทดลองทางสถิติ.....30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่	3.1แสดงแผนภูมิการตรวจวิเคราะห์ MPN *S. aureus*	19
ภาพที่	3.2แสดงแผนภูมิการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณจุลินทรีย์	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่มักพบในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม หรือเกิดการบกพร่องทางสุขลักษณะในการผลิต ซึ่งพระราชบัญญัติอาหาร พศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่33 (พศ.2522) และฉบับที่101 (พศ.2529) ได้กำหนดไอศกรีมเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานและวิธีการผลิต โดยกำหนดไว้ว่าในไอศกรีมทุกชนิดต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในไอศกรีม ในขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป คือ Trypticase Soy Broth (TSB) ซึ่งต้องเติมเกลือให้ครบ 10% ซึ่งจะใช้เป็น(Selective media) เพื่อที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ที่ปนเปื้อนมาในไอศกรีมกะทิ เพราะ *S. aureus* เป็นเชื้อที่ทนเกลือได้สูง แต่ในกระบวนการผลิตไอศกรีมจะทำให้เชื้อ *S. aureus* บางส่วนบาดเจ็บ เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือ 10% เชื้อที่บาดเจ็บอาจจะไม่สามารถเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 10% ซึ่งจะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติมเกลือ 10% และไม่เติมเกลือ

จากผลการศึกษาปัญหาพิเศษปีการศึกษา 2538 เรื่อง การปนเปื้อนของ*Staphylococcus aureus* และการสำรวจสุขลักษณะการผลิตไอศกรีมพื้นบ้านไทยรสกะทิของนางสาว พรวิภา เวฬุกาญจนา และนางสาว มยุรี ดิษย์เมธาโรจน์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งได้ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี MPN ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไอศกรีมกะทิพบว่าวัตถุดิบมีเชื้อ *S. aureus* อยู่ในปริมาณที่สูง แต่เมื่อนำมาผ่านกระบวนการผลิตไอศกรีมพบว่าผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ผลิตได้ตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* ที่เป็นดังนี้อาจเนื่องจาก เชื้อ *S. aureus* ที่บาดเจ็บไม่สามารถทนความเข้มข้นของเกลือ 10%ได้จึงไม่เจริญเติบโตขึ้นใน Selective media (TSB + 10% NaCl) ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา *Staphylococus aureus* ในไอศกรีมกะทิ โดยวิธี MPN ด้วย Selective media คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 10% NaCl และ Non Selective media คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหา *Staphylococus aureus* ใน ไอศกรีมกะทิ โดยวิธี MPN ด้วย Selective Media และ Non Selective Media.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1ไอศกรีม

ไอศกรีม จัดเป็นขนมหวานแช่แข็งชนิดหนึ่ง ที่มีรสชาด และมีหลากหลาย น่ารับประทาน และอุดมด้วยคุณค่าทางอาหาร ซึ่งมีมาตรฐานและคำจำกัดความเฉพาะของแต่ละผลิตภัณฑ์

ชนิดต่าง ๆ ของไอศกรีม มีดังนี้

1. Ice Cream ซึ่งเป็นชนิดที่เราคุ้นกันมากที่สุด หมายถึงอาหารที่ได้จากการปั่น ไอศกรีมเหลว (ice cream mix) ให้แข็ง เพื่อพาสเจอไรส์ไอศกรีมเหลวซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ที่ปลอดภัยและเหมาะสมต่อการนำมาทำไอศกรีม ได้แก่ ของแข็งในนม น้ำตาลทรายหรือสารให้ความหวานอื่น ๆ ที่กฎหมายให้ใช้ได้ และรสกลิ่นต่าง ๆ ที่เติมลงไปเพื่อทำให้เกิดรสชาดที่ต่างกันออกไป ไอศกรีมที่สำเร็จแล้วจะต้องมีไขมันนมไม่น้อยกว่า 8 % และมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 2.2 %

2. French Ice Cream ซึ่งคล้ายไอศกรีมแต่มีไขมันนมและของแข็งมากกว่าไอศกรีม จึงมีสีออกเหลืองกว่าและเติมไข่แดงลงไปในปริมาณน้อยกว่า 1.4 %

3. French Custard Ice Cream คล้ายไอศกรีมฝรั่งเศสแต่มีไข่แดงไม่น้อยกว่า 1.4 % โดยน้ำหนัก สำหรับชนิดธรรมดาและ 1.12 % สำหรับพวกที่เติมกลิ่นรสด้วย

4. Frozen Custard ลักษณะคล้ายไอศกรีมแต่ต้องมีไข่แดงไม่น้อยกว่า 1.4% สำหรับชนิดไม่เติมกลิ่นรสและ 1.2 % สำหรับพวกเติมกลิ่นรส และมักจะขายในรูปที่ยังนิ่มอยู่ แต่บางครั้งก็อาจจะขายในรูปแช่แข็งได้

5. Ice Milk เป็นอาหารที่มีส่วนผสมและวิธีการทำเหมือนไอศกรีมนอกจากว่ามันมีไขมันนม มีมากกว่า 2 % แต่ไม่เกิน 7 % และต้องมีของแข็งไม่น้อยกว่า 1.3 ปอนด์ต่อ 1 แกลลอน

6. Sharbet มีส่วนผสมและการทำเหมือนไอศกรีมแต่ในสัดส่วนของส่วนผสมที่น้อยกว่าและมักจะเติมกลิ่นรสที่เฉพาะลงไป เชอร์เบท 1 แกลลอน ต้องหนักไม่น้อยกว่า 6 ปอนด์ ประกอบด้วยไขมันนมไม่น้อยกว่า 1 % และไม่เกิน 2 % มีของแข็งที่ไม่ใช่มัน (milk solid-not-fat = NSNF) ไม่น้อยกว่า 1 % และของแข็งทั้งหมดต้องไม่น้อยกว่า 2 % แต่ไม่มากกว่า 5 % โดยน้ำหนักของเชอร์เบทที่เสร็จแล้ว กลิ่นรสผลไม้ที่เติมนั้นต้องให้ได้ปริมาณกรดที่ติเตรทได้ในรูปของกรดแลคติดไม่น้อยกว่า 0.35 %

7. Water Ice มีลักษณะคล้ายเชอร์เบท แต่จะไม่มีของแข็งในนม (Milk solid) เลย นอกจากนั้นมาตรฐานจะเหมือนเชอร์เบท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Quiescently Frozen Dairy Confection เป็นผลิตภัณฑ์ที่ออกมาเป็นแท่ง ๆ มันจะถูกทำให้แข็งตัวโดยไม่มีการกวนเลย และต้องมี overrun ไม่เกิน 10 % มีของแข็งในนมไม่น้อยกว่า 13 % และของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่า 33 %

9. Quiescently Frozen confection ลักษณะคล้ายแบบที่ 8 แต่จะมีของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่า 17 % เท่านั้น และอาจจะมีหรือไม่มีของแข็งในนม

10. Dietary Frozen Dessert เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแคลลอรี่ต่ำ และต้องประกอบด้วยไขมันน้อยกว่า 2 % และมีของแข็งในนมทั้งหมดไม่น้อยกว่า 7 % 1 แกลลอน ต้องหนักไม่น้อยกว่า 45 ปอนด์ มีของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่า 1.1 ปอนด์ แต่ไม่เกิน 1.45 ปอนด์ต่อแกลลอน

11. Mellorine เป็นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมในลักษณะคล้ายไอศกรีมแต่ส่วนผสมนั้นเตรียมจากของแข็งที่แปลงจากนมและไขมันอาจจะเป็นไขมันจากสัตว์หรือพืชหรือทั้งสองชนิดผสมกันก็ได้ จะต้องมีของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่า 1.6 ปอนด์ต่อแกลลอนและ 1 แกลลอนหนัก 4.5 ปอนด์ มีไขมันไม่น้อยกว่า 6 % โปรตีนไม่น้อยกว่า 2.7 โดยน้ำหนักของอาหารยกเว้นน้ำหนักของกลิ่นรสที่เติม

12. Nondairy Frozen Dessert ผลิตเหมือนไอศกรีมแต่ส่วนผสมต่าง ๆ จะไม่ใช้ผลิตภัณฑ์นม คือ ใช้พืช ไข่ หรือไม่ใช่จากนม

แม้ว่าไอศกรีมจะเป็นที่นิยมของทั้งเด็กและผู้ใหญ่เนื่องจากรสชาติความเย็นแล้วสิ่งที่จะดึงดูดผู้บริโภคโดยทั่วไป ก็คือวิธีการจัดตกแต่งด้วยไอศกรีม รสต่าง ๆ หน้าไอศกรีมชนิดต่าง ๆ และวิธีการทำให้ไอศกรีมดูน่ารับประทานยิ่งขึ้น เช่นการนำพวกผลไม้ต่าง ๆ มาช่วยประดับให้เป็น ซันเดย์ มิลต์เชค โซดา แบนาน่าสปลิท หรือใส่ในถ้วยไอศกรีมกรอบรูปกรวย (Cone) ซึ่งผู้เขียนได้รวบรวมสูตรและกรรมวิธีการเตรียมมาให้ทราบบางอย่าง รวมทั้งวิธีการตักไอศกรีมเป็นก้อนกลมโดยวิธีที่ถูกต้อง

2.2ไอศกรีมกะทิ เป็นไอศกรีมชนิดหนึ่ง ซึ่งใช้น้ำมันพืช (กะทิ) แทนไขมันเนย (จากสัตว์) และมีส่วนประกอบอื่น ๆ เหมือนไอศกรีมทั่วไป จึงอาจจัดเป็นพวก Mellorine Type Product

ถ้าใช้กะทิล้วน ๆ กับน้ำตาล โดยไม่ใส่สารคงตัว ไอศกรีมที่ได้จะมีลักษณะเนื้อ (Texture) หยาบ ไม่คงรูปอยู่นาน จากการทดลองเติมสารคงตัว (stabilizer) จะช่วยให้ลักษณะเนื้อดีขึ้น ผู้บริโภคส่วนใหญ่ชอบมากขึ้น และมีการเติมนมผงเพื่อช่วยเพิ่มเนื้อและทำให้เพิ่มคุณค่าทางอาหารแก่ไอศกรีมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอศกรีมเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ ตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ฉบับที่ 33 (พ.ศ. 2522) และฉบับที่ 101 (พ.ศ. 2529) กำหนดไว้ดังนี้

1. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในไอศกรีมหนัก 1 กรัม ต้องไม่เกิน 600,000 โคโลนี
2. ตรวจไม่พบบักเตรี ชนิด E. Coli ในไอศกรีมหนัก 0.01 กรัม
3. ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
4. ไม่มีสารเป็นพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

2.3 หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตไอศกรีม

สูตร สำหรับไอศกรีมเหลว 1500 กรัม

1. กะทิ คั้นจากมะพร้าวขูดขาวในอัตราส่วน 1 กก. ต่อน้ำ 800 กรัม จะได้น้ำกะทิ (ซึ่งมีไขมันประมาณ 17 - 19 %) ประมาณ 1050 กรัม
2. น้ำตาลทรายขาว 195 กรัม (ถ้าชอบหวานน้อยลดน้ำตาลลงได้เป็น 150 กรัม ซึ่งเท่ากับ 10 %)
3. เกลือ 1 กรัม เติมเพื่อให้รสชาดดีขึ้น
4. เติมหางนมผง (skimmed milk powder) 100 กรัม
5. สารคงตัว 4 กรัม (อาจเป็น CMC = Carboxy methylcellulose) หรือ แป้งข้าวโพดก็ได้
6. เติมน้ำลงไปจนส่วนผสมทั้งหมดเป็น 1500 กรัม

วิธีทำไอศกรีมกะทิ

1. ผสมส่วนผสมที่เป็นของแห้งเข้าด้วยกัน
2. ใส่น้ำกะทิและน้ำลงในหม้อสเตนเลส
3. โรยส่วนผสมในข้อแรกลงในน้ำกะทิคนให้ทั่ว ๆ ขณะโรย (อาจจะอุ่นเพื่อให้น้ำตาลละลาย)
4. เทส่วนผสมลงในเครื่องปั่นพักหนึ่งเพื่อปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันและช่วยทำให้นมผงหรือแป้งแตกตัวออก ถ้ามันเป็นก้อน
5. เทกลับลงหม้อสแตนเลสแล้วตั้งไฟอุ่นเพื่อพาสเจอไรส์ที่ 70° ซ (ทำให้ไอศกรีมไม่เสียง่าย) ทำให้เย็นทันที
6. ปั่นด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่สุขาภิบาลของโรงงานผลิตไอศกรีมจะดีหรือไม่เพียงใดนั้น นอกจากจะขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการแปรรูป น้ำที่ใช้ในโรงงาน กรรมวิธีที่ใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ เครื่องมือ การกำจัดน้ำเสียและขยะ การป้องกันและกำจัดแมลง การควบคุมสัตว์แทะและสัตว์เลี้ยงแล้ว ยังขึ้นกับสุขวิทยาส่วนบุคคลของบุคลากรที่ทำงานในโรงงานผลิตไอศกรีมนั้น ๆ ด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งสุขวิทยาส่วนบุคคลของพนักงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับแปรรูปไอศกรีมโดยตรง ถ้าหากพนักงานที่มีหน้าที่ในการแปรรูปไอศกรีมมีสุขวิทยาส่วนบุคคลที่ไม่ดีโอกาสที่ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ผลิตได้จะมี คุณภาพไม่ดีหรือไม่ได้มาตรฐานจะมีมากขึ้น เพราะพนักงานที่มีหน้าที่ดังกล่าวจะเป็นผู้แพร่เชื้อได้ดีที่สุด ไม่ว่าจะแพร่ไปยังผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่จะผลิต หรือแพร่ไปยังผู้ร่วมงานก็ตาม ถ้าพนักงานผู้นั้นไม่รักษาความสะอาด เช่น ไม่ล้างมือหลังจากเข้าห้องน้ำ แต่งกายด้วยเสื้อผ้าที่สกปรก เป็นผู้ที่มีนิสัยชอบล้วง แคะ แกะ เกา หรือชอบไอ จามโดยไม่มีการปิดปากและจมูก มีสุขภาพไม่ดีเนื่องจากโรคภัยต่าง ๆ หรือเป็นพาหะของโรคอยู่ เชื้อโรคต่าง ๆ จากร่างกายหรือเสื้อผ้าของพนักงานผู้นี้อาจปนเปื้อนไปสู่ไอศกรีมได้ ซึ่งอาจก่อปัญหาให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคต่อไป เช่น อาจทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร เช่น อหิวาต์ ไทฟอยด์ และบิด เป็นต้น

ปัจจัยที่สำคัญที่จะต้องคำนึงถึงในเรื่องเกี่ยวกับสุขวิทยาส่วนบุคคล ได้แก่

1. ศรีษะและผม
2. ตา
3. หู
4. ปากและฟัน
5. มือและเล็บ
6. เท้า
7. ผิวหนัง
8. ระบบทางเดินหายใจ
9. ระบบทางเดินอาหาร
10. ระบบสืบพันธุ์

ศรีษะและผม

เส้นผมและหนังศรีษะถ้าหากไม่มีการรักษาความสะอาดให้ดี โอกาสที่เชื้อโรคต่าง ๆ จากผมและศรีษะจะปนเปื้อนลงในอาหารจะมีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหากพนักงานผู้นั้นชอบเกาศรีษะ ไม่สวมหมวกหรือผ้าคลุมศรีษะในขณะปฏิบัติงาน เพราะฝุ่นผง รังแค หรือเส้นผม อาจหล่นหรือปนเปื้อนลงในอาหารได้ ฉะนั้นในระหว่างประกอบและแปรรูปไอศกรีมจึงควรให้พนักงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สวมหมวก หรือมีผ้าคลุมเพื่อป้องกัน และควรมีการรักษาความสะอาดของเส้นผมโดยมีการสระผมบ่อย ๆ ถ้าหากหนังศรีษะเป็นโรค ก็ควรรีบทำการรักษาโดยเร็ว

จุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่พบในเส้นผมได้แก่ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli Streptococcus viridan* และพวกแกรมบวกต่าง ๆ ทั้งที่เป็นรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม นอกจากนี้ยังพบว่ามีพวกยีสต์ รา และแอคติโนมัยซีส อีกด้วย ตัวอย่างเช่น *Aspergillus awamori, Aspergillus fumigatus, Pityrosporum ovais, Pityrosporum orbiculare* สำหรับพวก fungi ที่พบ ได้แก่ *Epidermophyton, Microsporum* และ *Truchophyton* เป็นต้น

ตา

พนักงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องการแปรรูปไอศกรีม ควรจะต้องพยายามป้องกันมิให้เป็นโรคเกี่ยวกับตาเพราะจะเกิดการติดต่อได้ง่ายมากในระหว่างพนักงานด้วยกัน ซึ่งการเป็นโรคเกี่ยวกับตาจะไม่มีการติดต่อโดยการปนเปื้อนผ่านไอศกรีม แต่จะติดต่อโดยการสัมผัส พนักงานที่เป็นโรคตาจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลง โรคตาที่พบบ่อยได้แก่ โรคตาแดง โรคเยื่อตาอักเสบ เป็นต้น ผู้ที่เป็นโรคเกี่ยวกับตา ควรหยุดพักรักษาให้หายจึงค่อยกลับมาทำงาน จุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดที่วิเคราะห์พบจากผู้ชอบขยี้ตา คือ *Straphylococcus aureus* ฉะนั้นพนักงานเป็นโรคตาหลังจากขยี้ตาแล้วไม่มีการล้างมือก่อนทำงาน จะเป็นสาเหตุให้เชื้อจุลินทรีย์ที่กล่าวปนเปื้อนลงในไอศกรีมได้

หู

พนักงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปไอศกรีม ควรจะมีการรักษาหูให้ถูกสุขลักษณะอยู่เสมอ อย่าให้หูสกปรก ควรระวังมิให้เป็นไข้หวัด หรือคอเจ็บต่อมทอลซิลอักเสบ เพราะหากปล่อยให้เป็นเรื้อรังจะทำให้เชื้อโรคแพร่กระจายเข้าไปสู่หูส่วนกลางได้ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบและเกิดเป็นโรคหูน้ำหนวกได้ในที่สุด จากการวิเคราะห์จุลินทรีย์จากมือผู้ที่ชอบแคะหูจะพบ *Staphylococcus aureus* มากที่สุด

ปากและฟัน

พนักงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปไอศกรีม ควรจะได้รับการฝึกฝนและอบรมให้ทราบว่า ไม่ควรจะพูดคุยกันในระหว่างปฏิบัติงาน หรือถ้าหากพูดคุยก็ควรกระทำด้วยความระมัดระวัง ไม่บริโภคอาหารหรือเคี้ยวหมากฝรั่งในขณะปฏิบัติงาน ไม่ถ่มน้ำลายในบริเวณโรงงาน และควรจะมีผ้าปิดปากและจมูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานผลิตภัณฑ์อาหารประเภทรับประทานได้ทันที (Ready to eat food) เพราะโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์จากปากจะปนเปื้อนลงในอาหารจะมีการทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตไม่ได้มาตรฐาน นอกจากนี้ควรจะมีการอบรมให้พนักงานรู้จักรักษาฟัน ปาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้สะอาดอยู่เสมอ และควรระมัดระวังมิให้เป็นโรคเกี่ยวกับปากและฟัน เช่น โรคฟันผุ หรือโรคเหงือกอักเสบ เป็นต้น

สำหรับจุลินทรีย์ที่มักพบในปากและฟัน ได้แก่ จุลินทรีย์ในจีนัสต่าง ๆ ต่อไปนี้คือ *Streptococcus, Staphylococcus, Vullonella, Neisseria, Actinomyces, Lactobacillus, Norcardia, Fusobacterium, Bacteroides, Laptitrichia, Candida* และ *Corynebacterium*

มือและเล็บ

มือและเล็บของพนักงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปไอศกรีมเป็นส่วนที่ต้องสัมผัสกับไอศกรีมมากที่สุด ฉะนั้นถ้าหากมือของพนักงานสกปรกอาจเนื่องมาจากการเดินทางมาทำงานด้วยรถเมล์หรือรถรับจ้าง และมิได้ล้างมือก่อนเริ่มลงมือทำงาน หรืออาจจะสกปรกเนื่องจากการทำงานประเภทกวาดพื้น ถูพื้น เก็บขยะ ขุดดิน พรวนดิน และเมื่อเสร็จงานแล้วไม่ได้ทำความสะอาดมือ หรืออาจสกปรกเนื่องจากเข้าห้องน้ำแล้วไม่ได้ล้างมือก่อนทำงาน หรืออาจสกปรกเนื่องจากการมีนิสัยชอบล้วง แคะ แกะ เกา เช่น แกะสิว เกาผื่นคันต่าง ๆ บนร่างกาย ใบหน้า แขน ขา เป็นต้น ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค และทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพไม่ได้มาตรฐาน ฉะนั้นจึงควรมีการอบรมให้พนักงานรู้จักรักษาความสะอาดมือและเล็บ ตัดเล็บให้สั้นอยู่เสมอ ไม่ควรทาเล็บหรือใส่แหวนด้วย ควรจะต้องมีการล้างมือทุกครั้งก่อนจะเริ่มทำงานและถ้าหากมือเป็นโรคต่าง ๆ เช่น หิด หรือราเป็นต้น จะต้องรีบรักษาให้หายโดยเร็ว และอุปนิสัยที่ชอบล้วง แคะ แกะ เกาก็ควรเลิก หรือควรจะล้างมือทุกครั้งหลังจากกระทำอาการต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้การเอามือปิดปากเวลาไอหรือจามก็เช่นกัน ควรจะมีการล้างมือทุกครั้ง

สำหรับจุลินทรีย์ที่พบตามือและเล็บนั้นที่สำคัญ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในจีนัสต่าง ๆ ดังนี้ *Staphylococcus, Streptococcus, Escherichia, Aspergillus, Pityrosporum, Candida, Torulopsis, Epidermophyton, Microsporum* และ *Trichophyton* เป็นต้น

เท้า

เท้าของพนักงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปไอศกรีม จะเป็นอวัยวะอีกส่วนหนึ่งในร่างกายที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการสุขาภิบาลมาก เพราะเท้าของพนักงานบางคนอาจจะต้องยืนอยู่เกือบตลอดเวลา และบางลักษณะงานพนักงานอาจจะย่ำน้ำอยู่เกือบตลอดวัน ฉะนั้นถ้าไม่ใส่รองเท้าหรือใส่รองเท้าชนิดที่ไม่เหมาะสมกับงาน อาจทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นกับเท้าได้ เช่น โรคเท้าเปื่อย เป็นต้น ซึ่งอาจจะเกิดจากเชื้อรา ยีสต์ หรือแบคทีเรีย เมื่อพนักงานผู้นี้เอามือไปสัมผัสเท้า และไม่ได้ล้างมือให้สะอาดดีพอ จะทำให้เกิดการปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเป็นเชื้อ *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ก็จะก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารได้ ถ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พนักงานผู้นั้นไม่ชอบใส่รองเท้าและเผอิญไปเหยียบไข่หรือตัวอ่อนของพยาธิ โอกาสที่พนักงานผู้นี้จะเป็นโรคพยาธิ และแพร่พยาธิไปสู่อาหารจะมีมากขึ้น

ผิวหนัง

เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่พบตามผิวหนังได้แก่ *Staphylococcus aureus, Streptococcus viridans, Escherichia coli, Pityrosporum ovale, Pityrosporum orbiculare, Aspergillus awamori, Aspergillus fumigants, Epidermophyton, Microsporum* และ *Trichophyton* เป็นต้น ถ้าหากพนักงานที่มีหน้าที่เกี่ยวกับงานด้านการแปรรูปไอศกรีม โดยเฉพาะอย่างยิ่งพนักงานที่ทำงานอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูป ซึ่งจะเป็นบริเวณที่มีอากาศค่อนข้างร้อนตลอดเวลา ฉะนั้นพนักงานที่ทำงานในบริเวณนี้จะมีเหงื่อออกเกือบตลอดวัน ถ้าหากพนักงานเหล่านี้ไม่รักษาความสะอาดของร่างกายและเสื้อผ้า จะทำให้เกิดการหมักหมม เป็นสาเหตุให้เกิดโรคผิวหนังต่าง ๆ เช่น กลากเกลื้อน เชื้อราต่าง ๆ เกิดการสะสมของเชื้อโรคต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดปัญหาเกี่ยวพันถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ ฉะนั้นจึงควรมีการอบรมให้พนักงานมีการรักษาความสะอาดร่างกายอย่างสม่ำเสมอ และมีการเปลี่ยนใส่เสื้อผ้าที่สะอาดทุกวัน

ระบบทางเดินหายใจ

วิธีแพร่กระจายเชื้อจุลินทรีย์ที่รวดเร็วและดีที่สุด คือวิธีการแพร่เชื้อด้วยระบบทางเดินหายใจ เพราะเพียงแต่การพูดคุยกันธรรมดา หายใจรดกัน ไอ จามก็สามารถทำให้เกิดโรคติดต่อได้แล้ว ฉะนั้นโอกาสของการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินหายใจลงในอาหารจึงเป็นไปได้มาก ถ้าหากไม่มีการป้องกันที่ดีพอ ให้พนักงานที่เป็นโรคต่าง ๆ เช่น วัณโรค ไข้หวัดใหญ่ ไข้หวัด คอเจ็บ ปอดบวม ไอกรน เข้าทำงานในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหาร เพราะถ้าพนักงานเป็นโรคดังกล่าวจะเป็นผู้แพร่เชื้อได้อย่างดีที่สุด ควรจะให้ผู้ที่ป่วยด้วยโรคดังกล่าวรักษาตัวให้หายเสียก่อนจึงค่อยกลับมาทำงาน และในการทำงานในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารประเภทบริโภคได้ทันที (Ready to eat food) ควรจะให้พนักงานมีผ้าปิดปากจมูกด้วย ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำลายจากการพูดคุย ไอ จาม ถึงจะเป็นการทำงานในส่วนอื่นแต่ถ้าเกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหาร ก็ควรจะมีการอบรมให้พนักงานพูดคุย ไอ จาม ด้วยความระมัดระวัง ทุกครั้งที่มีการไอจามแล้วเอามือไปปิดปากปิดจมูก จะต้องล้างมือก่อนทุกครั้ง ทั้งนี้เพื่อ ป้องกันการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งอาจให้เกิดอันตรายกับผู้บริโภคได้

ระบบทางเดินอาหาร

เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่พบในทางเดินอาหาร ได้แก่ Coagulase positive *Staphylococcus*, Coagulase negative *Staphylococci*, *Micrococci*, *Streptococci*, Non-haemolytic *Streptococci*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enterococci, Lactobacilli, Neisser, Haemophilus, Proteus, Pseudomonas, Klebsiella, Escherichia coli และ *Salmonella* เป็นต้น ซึ่งเชื้อต่าง ๆ ที่พบนี้จะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารต่าง ๆ เช่น ท้องเดิน ท้องร่วง และอาเจียน เป็นต้น ซึ่งถ้าหากพนักงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปไอศกรีมเป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารเหล่านี้ หรือมีเชื้อเหล่านี้อยู่เป็นพาหะ โอกาสที่จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนหรือการแพร่กระจายเชื้อจุลินทรีย์ไปสู่ผู้อื่นย่อมเป็นไปได้มาก นอกจากเชื้อที่กล่าวแล้ว บางครั้งยังพบว่าพนักงานเป็นโรคเกี่ยวกับพยาธิด้วย ซึ่งพยาธิคล้ายคลึงกับเชื้อโรคอื่น ๆ ที่สามารถแพร่กระจายได้ง่ายมาก วิธีป้องกันคือให้ผู้ที่เป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร รักษาตัวให้เรียบร้อยแล้วจึงค่อยกลับมาทำงาน และควรระมัดระวังสุขภาพอย่าให้เป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ห้องน้ำ ห้องส้วมของโรงงานควรจะมีการระมัดระวังอย่าให้แมลงวันหรือสัตว์เลี้ยงเข้าไปเพ่นพ่าน เพราะจะเป็นวิธีการแพร่เชื้อที่ดีวิธีหนึ่ง และหลังจากเข้าห้องน้ำทุกครั้งควรจะล้างมือและเช็ดมือให้สะอาดก่อนเข้าทำงาน

อวัยวะสืบพันธุ์และระบบขับถ่าย

โรคที่เกิดกับระบบสืบพันธุ์และระบบขับถ่ายก็เช่นเดียวกับโรคอื่น ๆ คือสามารถจะแพร่กระจายออกไปโดยตรงจากผู้ป่วยหรือจากการใช้ภาชนะต่าง ๆ เสื้อผ้าร่วมกัน ฉะนั้นถ้าหากพนักงานผู้ใดทราบว่าตนเป็นโรคต่าง ๆ เกี่ยวกับอวัยวะเหล่านี้ ให้รีบปรึกษาแพทย์และทำการรักษาโดยเร็ว นอกจากนี้การรักษาความสะอาด ก็เป็นสิ่งสำคัญในการช่วยสุขวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์และระบบขับถ่าย

2.4 *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 20 ชนิด พบว่าเกี่ยวข้องกับมนุษย์ 12 ชนิด (ดังตาราง ที่ 2.1) แต่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อได้ทั้งหมด ที่เหลืออีก 8 ชนิดพบอยู่ร่วมกับสัตว์และผลผลิตจากสัตว์โดยปกติ *Staphylococci* มักเป็น normal flora อยู่ที่ผิวของสัตว์ทั้งชั้นต่ำ และชั้นสูง แต่จุลินทรีย์เหล่านี้มักฉวยโอกาส ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในสภาวะที่ host อ่อนแอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ที่พบในคนและสัตว์ต่าง ๆ

เชื้อสายที่พบในคนและสัตว์	เชื้อสายที่พบแต่ในสัตว์หรือผลผลิตจากสัตว์
Coagulase-positive	**Coagulase-negative**
S. aureus	*S. intermedius*-cats, dogs, carnivores
Coagulase-negative	*S. intermedius*-cats, dogs, carnivores
S. epidermidis	*S. caprae*-goats (milk)
S. saprophyticus	*S. lentus*-sheep
S. hominis	*S. hyicus*-cattle, pigs
S. haemolyticus	*S. sciuri*-small mammals
S. warneri	*S. gallinarum*-poultry
S. capitis	*S.caseolyticus*-cows, dairy products
S. saccharolyticus	*S. carnosus*-processed meats, beef
S. auricularis	
S. simulans	
S. cohnii	
S. xylosus	

(จาก E.W. Koneman, ***Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology***; 1988 : 313)

รูปร่างและลักษณะทั่วไป

Staphylococcus นี้ รูปร่างกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 - 1.2 ไมโครเมตร แกรมบวก มักเรียงตัวเป็นกลุ่ม ส่วนใหญ่เป็น aerobes หรือ facultative anaerobes ผลิตเอนไซม์ catalase การแบ่งตัวแบ่งได้ทั้งตามยาว และตามขวาง เรียงตัวจับกันเป็นคู่สอง (pairs) หรือเป็นคู่สี่ (tetrad) บางทีก็อยู่เป็นกลุ่ม เรียกว่า Staphyle (ในภาษากรีก แปลว่า พวงองุ่น) ถ้าเพาะเลี้ยงเชื้อนาน ๆ การย้อมสีแกรมอาจเปลี่ยนไป เพราะแบคทีเรียเริ่มขาดคุณสมบัติในการเก็บ crystal violet ไว้ในผนังเซลล์ได้ ดังนั้นจึงควรย้อมสีแกรม ขณะที่เพาะเลี้ยงใหม่ ๆ

สแตฟฟิโลคอคคัส เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาทุกชนิด ที่อุณหภูมิ 37° ซ. pH 4.8 - 7.4 เชื้อสร้างรงควัตถุได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20° ซ. ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ แต่ไม่สร้างรงควัตถุในภาวะที่ไร้ออกซิเจนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หากเจริญบนอาหารวุ้นโคโลนีมีลักษณะกลมนูน เป็นมัน ขนาด 1 - 2 มม. มีสีต่าง ๆ กัน เช่น *S. aureus* มีสีเหลืองทอง *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* มีโคโลนีสีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไป *Staphylococci* ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น สามารถทนทานต่อความร้อนสูงถึง 60° ซ. ได้ เป็นเวลา 30 นาที และมีชีวิตอยู่ในที่เย็น (4° ซ) ได้เป็นเวลานานหลายเดือน นอกจากนี้ยังทนต่อฟีนอล และเมอคูริคคลอไรด์มากกว่าแบคทีเรียอื่น ๆ เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูง 6.5 % ได้ นอกจากนั้นสแตฟฟิโลคอคคัสบางสายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์ penicillinase (beta lactamase) ซึ่งทำให้ดื้อต่อยาเพนิซิลลินได้

สแตฟฟิโลคอคคัส สามารถหมักย่อยน้ำตาลได้หลายชนิดเกิดเป็นกรดแลคติค แต่ไม่เกิดก๊าซ เชื้อที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอล และเกิดกรด ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาล ได้แก่ *S. epidermidis*

สแตฟฟิโลคอคคัส มักพบบริเวณผิวหนังและเยื่อบุเมือก หรือบริเวณลำคอส่วน oropharynx และ nasopharynx เชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ที่พบว่า สามารถก่อโรคในคน ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis* และ *S. saprophyticus*

Staphylococcus aureus

แบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม *Staphylococcus* species ในมนุษย์ก็คือ *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase มีความสำคัญทางการแพทย์มาก สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุก ๆ บริเวณของร่างกาย การติดเชื้อที่ผิวหนังสามารถทำให้ติดเชื้ออย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง รวมทั้งการเกิดหนอง และการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรง เป็นต้น การติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม staphylococci จะเรียกว่า "scalded-skin syndrome" นอกจากนี้ *S. aureus* อาจพบจากการติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ และสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) จาก *S. aureus* มักพบอยู่เสมอ และอาจก่อให้เกิดอาการของโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ และเป็นหนอง เป็นต้น *S. aureus* บางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ซึ่งเป็นผลจากการสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้ นอกจาก *S. aureus* ที่ให้เอนไซม์ coagulase แล้ว ยังมี *S. intermedius* และ *S. hyicus* ที่สร้างเอนไซม์ coagulase ด้วยเหมือนกัน แต่ยังไม่มีรายงานการทำให้เกิดโรคในคน

การทำให้เกิดโรค

สแตฟฟิโลคอคคัส ทำให้เกิดโรคโดยการบุกรุก แพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกาย และมีความสามารถสร้างสารพิษ และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (ตารางที่ 2.2) ได้แก่

1. Hemolysins (Staphylolysins) เป็นสารประกอบที่เชื้อปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alpha hemolysin เป็นโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล 3 x 10^4 มีคุณสมบัติทำลายเม็ดเลือดแดงกระต่าย และทำลายเกล็ดเลือด (platelets) ได้ เมื่อนำไปฉีกเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย ทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงและทำให้เนื้อเยื่อส่วนนั้นเน่าตาย หากฉีดเข้ากระแสเลือดจะทำให้สัตว์ทดลองนั้นตายได้

Beta hemolysin สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแกะ แต่ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงของกระต่าย จะเห็นคุณสมบัตินี้เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบน Blood agar

Delta hemolysin เป็นพวก phospholipase มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาว และต่อเนื้อเยื่ออื่น ๆ หลายชนิด

Gamma hemolysin มีฤทธิ์น้อยกว่าชนิดอื่น ไม่ค่อยมีความสำคัญในการทำให้เกิดโรค Epsilon hemolysin พบใน *S. epidermidis*

2. Leukocidin (Panton-Valentine leukocidin) ออกฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวของสัตว์หลายชนิด ละลายน้ำได้ มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ถูกทำลายด้วยความร้อนง่ายกว่า exotoxin ส่วนบทบาทในการทำให้เกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด

3. Enterotoxins *S. aureus* บางสายพันธุ์ สามารถสร้าง enterotoxin ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ เชื้อสร้างสารดังกล่าวได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ สูงประมาณ 30 % enterotoxin เป็นโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 3.5 x 10^4 กิโลดาลตัน ทนต่อความร้อน 100° ซ. ได้นานประมาณ 30 นาที ทนต่อเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร สารนี้ เป็นสาเหตุของอาการอาหารเป็นพิษในคน

4. Coagulase เชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ที่ทำให้เกิดโรคในคนส่วนมาก สร้างเอนไซม์ coagulase ซึ่งทำให้พลาสมาแข็งตัวได้ มี 2 ชนิด คือ

bound coagulase (clumping factor) เชื่อว่า เป็น receptor ที่จะมีปฏิกิริยากับ fibrinogen ในพลาสมา ทำให้เลือดแข็งตัว

free coagulase เอนไซม์นี้จะทำให้พลาสมาแข็งตัว ทำให้ร่างกายของโฮสต์ไม่สามารถกำจัดโดยเม็ดเลือดขาวได้ โดยที่เอนไซม์จะไปจับกับ coagulase reacting factor (CRF) ในพลาสมา ทำให้ โปรทรอมบิน (prothrombin) เปลี่ยนไปเป็นทรอมบิน (thrombin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) เปลี่ยนไปเป็นไฟบริน (fibrin) ทำให้เลือดแข็งตัว ทำให้เม็ดเลือดขาวไม่สามารถจับทำลายเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการบุกรุกเนื้อเยื่อได้ดี (spreading factor) เนื่องจากเอนไซม์นี้จะไปทำลาย hyaluronic acid ซึ่งเป็นสารเชื่อมเซลล์ให้ติดต่อกันเป็นเนื้อเยื่อ

6. Exfoliatin (Epidermolysin) เป็นสารพิษที่พบมาไม่นานมานี้ ส่วนใหญ่สร้างโดย *S. aureus* phage type 2 สารพิษดังกล่าวทำให้เกิดอาการหลุดลอกของหนังกำพร้าทั่วร่างกาย (scalded skin syndrome) โรคนี้มักพบในเด็ก สำหรับผู้ใหญ่ที่มีภูมิต้านทานต่ำก็เป็นได้เหมือนกัน

7. Penicillinase (Beta-lactamase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อดื้อยากลุ่มเพนนิซิลลิน โดยที่เอนไซม์นี้จะทำลาย beta-lactam ring

นอกจากนี้ สแตฟฟิโลคอคคัส ยังสามารถสร้างเอนไซม์พวก lipase, proteinase และ Dnase ทำให้การแพร่กระจายของโรคมากขึ้นได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *S. aureus*

สารพิษ	ฤทธิ์
Staphylolysins	
Alphatoxin (hemolysin)*	Hemolytic ; increases permeability of Cell membrane ; dermonecrotic in rabbits low activity in humans
Beta hemolysin	More potent than alpha hemolysin, but found primarily in animal strains
Gamma hemolysin*	Hemolytic, leukotoxic
Delta hemolysin	Less dermonecrotic and leukocytic
Epsilon hemolysin	Present in S. epidermidis
Leukocidin	Lyses leukocytes
Enterotoxins	Directly act on intestinal wall, causing severe nausea and vomiting
Exfoliative toxins (exfoliatin)	Disrupts desmosomes that bind cells in the granular layer of epidermis, causes skin peeling
Coagulase	Clots plasma
Hyaluronidase	Depolymerizes ground substance of tissues ("spreading factor")
Staphylokinase	Dissolves fibrin clots
Bacteriocin (staphylococcin)	Inhibits or kills other closely related gram positive cocci

*Greater than 95 percent of *S. aureus* form one of these toxins, 82 percent form both,

(จาก จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, เภสัชจุลวิทยา 2531 : 166)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

1. หลอดทดลอง ขนาด 18 x 150 มิลลิเมตร, 13 x 100 มิลลิเมตร
2. จานเพาะเชื้อ ขนาด 15 x 150 มิลลิเมตร
3. ที่เขี่ยเชื้อ (Loop)
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C
5. ปิเปตขนาด 1 มิลลิเมตร, 5 มิลลิเมตร
6. ถุงสเตอไรส์
7. ช้อนสเตอไรส์
8. เครื่องชั่ง
9. Buffer pH 7.2 ปริมาณขวดละ 225 มิลลิเมตร
10. เครื่องตีบดอาหาร
11. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Agar (MS-EY)
12. อาหารเลี้ยงเชื้อ Total Plate Count Agar (TPC)
13. เกลือ
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB)
15. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth + 10 % NaCl (10%NaCl TSB)
16. Brain Heart Infusion Broth (BHI)
17. Rabbit Plasma
18. Spreader

3.2 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง จากแหล่งผลิตต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดของไอศกรีม	ที่มาของตัวอย่าง
1	รสถั่วดำ	สายฝน
2	รสหวานเย็น	แดรี่เบลล์
3	ดัดแปลงกลิ่นสตรอเบอรี่	ทิพย์รส
4	ดัดแปลงผสมกาแฟ	ทิพย์รส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่	ชนิดของไอศกรีม	ที่มาของตัวอย่าง
5	ดัดแปลงกลิ่นวานิลลา	ทิพย์รส
6	ดัดแปลงผสมผงโกโก้	ทิพย์รส
7	ดัดแปลงเผือก	ทิพย์รส
8	ดัดแปลงผสมกะทิ	ทิพย์รส
9	ดัดแปลงรสทุเรียน	ไพร์มมาร์เก็ตติ้ง
10	ดัดแปลงกลิ่นวานิลลาผสมโคน	สาธารณสุข จ.นครนายก
11	รสถั่วดำ	258 ต.โพสังโฆ ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี
12	กะทิ	23/2 ต.ต้นโพธิ์ อ.เมือง จ.สิงห์บุรี
13	กะทิ	นายวัฒนา ภาคพานิช 3/4 ท่าข้าม
14	กะทิ	ม.4 ท่าข้าม ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี
15	กะทิ	สาธารณสุข จ.นนทบุรี
16	แบบตัก รสรวมมิตร	สาธารณสุข จ.นนทบุรี
17	แบบตัก รสกะทิ	สาธารณสุข จ.นนทบุรี
18	แบบตัก รสกะทิ	เด่นไทย
19	แบบตัก รสกะทิ	ถ้วยโค้ก
20	แบบตัก รสกะทิ	ลอยฟ้า ตามไปดู เด่นจริง
21	กาแฟ แบบแท่ง	สาธารณสุข จ.สิงห์บุรี
22	หวานเย็นรสเผือก	จอมธนา
23	หวานเย็นผสมข้าวโพด	แดรี่เบลล์ จำกัด
24	แบบตัก รสกะทิ	สาธารณสุข จ.สมุทรสงคราม
25	หวานเย็นรสลอดช่อง (Catty)	สาธารณสุข จ.เพชรบุรี
26	หวานเย็นรสถั่วดำ (Catty)	สาธารณสุข จ.เพชรบุรี
27	กระปุก แบบตัก	สาธารณสุข จ.นนทบุรี
28	รสสตรอเบอรรี่	ลูกเสือ
29	รสส้ม	ลูกเสือ
30	รสกะทิ	ลูกเสือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96475

3.3 วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่าง

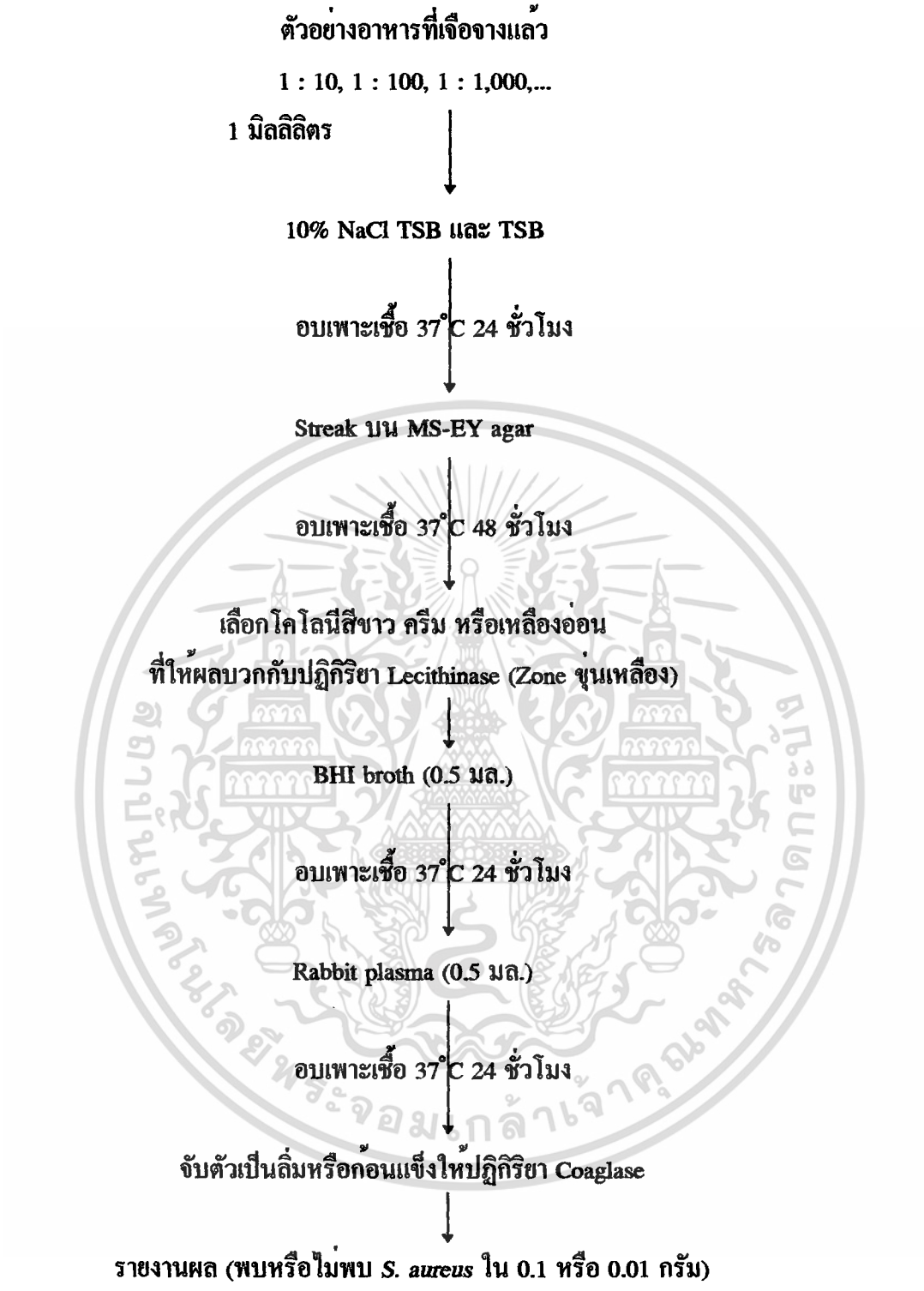
<u>การเตรียมตัวอย่าง</u> ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เติม phosphate buffer pH 7.2 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ food suspension dilution 1 : 10 จากนั้นทำ 10 - fold dilution 1 : 100, 1 : 1000, ... ตามความเหมาะสม

<u>วิธี inoculation</u> ปิเปต food suspension แต่ละ dilution ส่วนละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish, Plate) โดยทำ dilution ละ 2 จาน ในกรณีที่หา Total bacteria count หรือปิเปต food suspension แต่ละ dilution ส่วนละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำ dilution ละ 3 หลอด ในกรณีที่หา MPN ของ *Escherichia coli* หรือ MPN ของ *Staphylococcus aureus*

3.3.1 MPN ของ *Staphylococcus aureus*

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากการเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth(TSB) และ TSB + 10% NaCl โดยใส่ dilution ละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่าง 3 dilution ที่ต่อเนื่องกัน
2. นำหลอด TSB, TSB + 10% NaCl ไปบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35° C, 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหลอด TSB,TSB + 10% NaCl ลงบนผิวหน้าของ Mannitol Salt Agar + 3% Egg Yolk (MS-EY) โดยใช้ loop ขีด (Streak) ในลักษณะที่จะให้โคโลนีแยกจากกันหลังการเพาะเชื้อ นำ plate MS-EY ไปอบที่อุณหภูมิ 35°C 48 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีสีเหลืองขุ่น ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร และอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆโคโลนี มีลักษณะทึบแสงซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *S.aureus*
3. นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะมาทดสอบ coagulase ต่อโดยถ่ายเชื้อที่น่าสงสัยลงในหลอด Brain Heart Infusion (BHI) 0.5 มิลลิลิตร เติม rabbit plasma 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C ตรวจสอบการแข็งตัวของ plasma ภายหลัง 4 - 6 ชั่วโมง ถ้ามีการแข็งตัวของ plasma เกิดขึ้น แสดงว่าเป็น *S. aureus* ดังภาพที่ 3.1
4. เปรียบเทียบกับตาราง MPN นำค่าที่ได้จากการตรวจไปคำนวณเป็น MPN/g ของ *S. aureus* ตามตารางภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แสดงแผนภูมิการตรวจวิเคราะห์ MPN *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>เทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์</u>

วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Streak plate technique นั้นมีข้อควรระวัง คือ

1. ใช้ loop ที่เผาไฟจร้อนแดงแล้วนำมาเขี่ยเชื้อทันทีอาจทำให้เชื้อตายได้
2. ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องไม่เปียก เพราะจะทำให้เชื้อ spread ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ดังนั้นก่อนนำมาใช้ถ้าผิวหน้าอาหารเปียกควรทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ตู้อบเพาะเชื้อ 37 °C ก่อน
3. ในการ streak ต้องระวังไม่ให้ไปชนขอบ plate ซึ่งมีแรงตึงผิวระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อกับ plate อยู่จะทำให้เกิดการ spread ของเชื้อได้

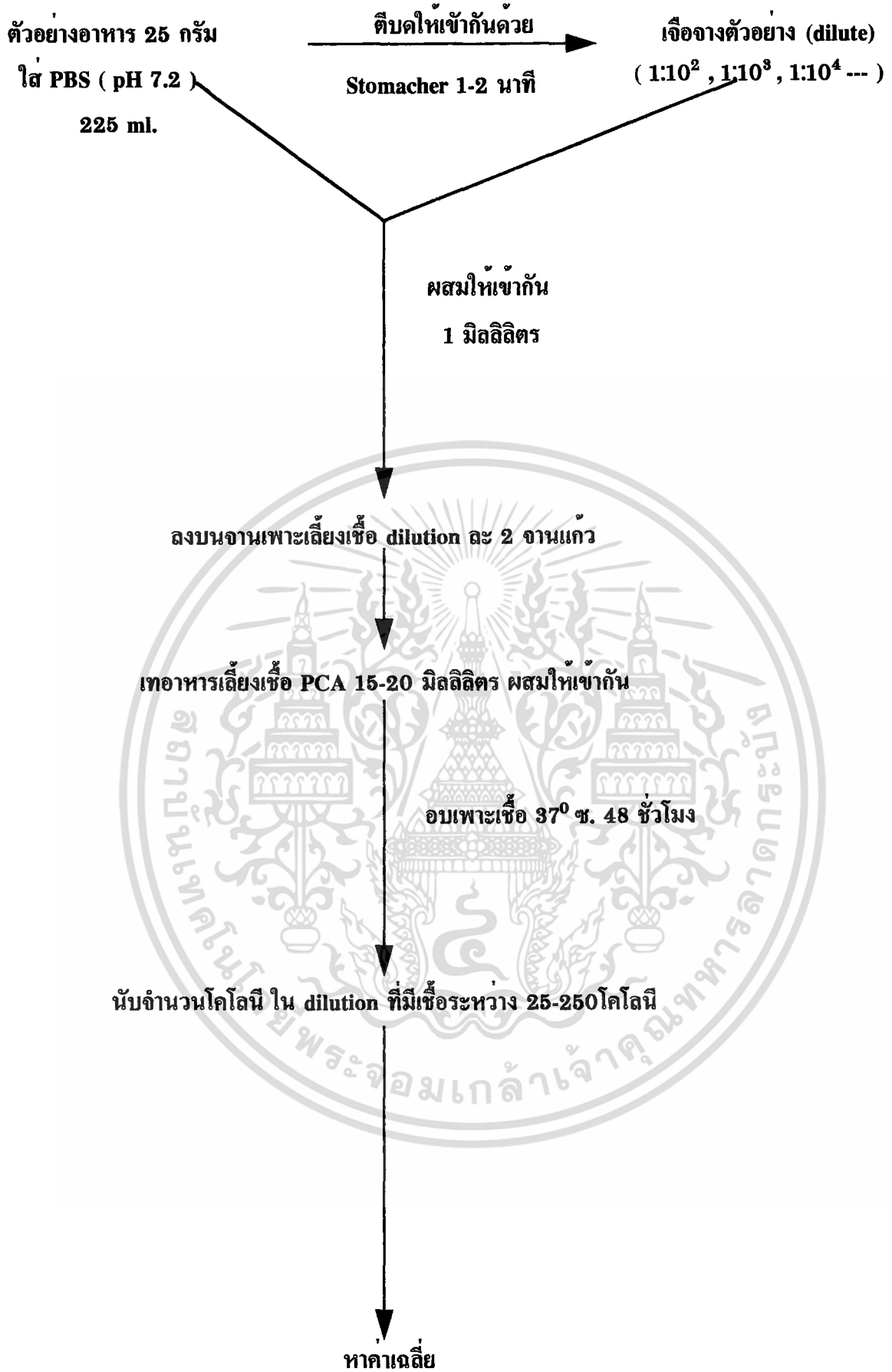
3.3.2 วิธีวิเคราะห์ Total Bacteria Count

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากการเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงไปในจานเพาะเชื้อ โดยทำ dilution ละ 2 จาน
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ TPC ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 45 °C ลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งกลับจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปอบเพาะที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมง
3. นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อซึ่งมีปริมาณ 25 - 250 โคโลนี ด้วยเครื่อง colony counter บันทึกผล
4. หาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วย dilution factor ของจานเพาะเชื้อที่นับจำนวนโคโลนีได้แล้ว คำนวณเป็นโคโลนีต่อกรัม

ดังแสดงในภาพที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14922



ภาพที่3.2 แสดงแผนภูมิการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

น้ำยาสำหรับเจือจางอาหาร (Diluent)

น้ำยาสำหรับเจือจางอาหารที่จะใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและชนิดของจุลินทรีย์ที่จะตรวจวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์อาหารโดยทั่วไปมักจะใช้ phosphate buffer, 0.85% NaCl solution (Normal saline, NSS) หรือ 0.1% peptone water แต่ในอาหารที่มีไขมันสูงอาจใช้ 0.1% peptone water + 0.05% ween 80 หรือ 0.1% peptone water + 0.15% agar เพื่อให้เชื้อหลุดออกจากไขมันและเจริญในอาหารเพาะเชื้อได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ในการตรวจหา osmophile หรือ halophile มักจะมีการเติมน้ำตาลหรือเกลือเพิ่มลงในน้ำยาเจือจาง เช่น osmophile จะใช้น้ำที่มีน้ำตาลซูโครส 10% เป็นน้ำยาเจือจาง และสำหรับการตรวจหา halophile จะใช้น้ำที่มีเกลือ 1 - 5 % เป็นน้ำยาเจือจาง เป็นต้น

ตัวอย่างการนับปริมาณจุลินทรีย์

I. duplicate plate นับโคโลนีในช่วง 25 - 250 โคโลนี

A. duplicate plate ที่มีช่วงที่นับได้ 25 - 250 โคโลนี เพียง dilution เดียว ให้นำมาหาค่าเฉลี่ยคูณด้วย dilution factor ได้เป็นค่า Total bacteria count ต่อกรัม (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 1)

B. duplicate plate ที่มีช่วงที่นับได้ 25 - 250 โคโลนี จาก 2 dilution ให้นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณ (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 2)

II. duplicate plate นับโคโลนีในช่วง 25 - 250 โคโลนี

A. duplicate plate ของ dilution ต่ำสุดนับได้น้อยกว่า 25 โคโลนี ให้หาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณ รายงานเป็นค่าประมาณ ใส่เครื่องหมาย * เพื่อบ่งบอกว่าเป็นค่าที่ได้จากนอกช่วง 25 - 250 โคโลนี (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 3)

B. duplicate plate ของ dilution สูงสุดนับได้มากกว่า 250 โคโลนี ให้เลือกนับบริเวณที่มีการกระจายของโคโลนีดี การนับให้นับในพื้นที่ 1 ตร.ซม. 4 จุด นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วยพื้นที่ทั้งหมด คือ 65 ตร.ซม. นำค่าเฉลี่ยจาก duplicate มาคูณด้วย dilution factor รายงานเป็นค่าประมาณ ใส่เครื่องหมาย * (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 4)

C. Spreader ในกรณีที่ plate มีพื้นที่ที่มี spreader รวมทั้งพื้นที่ที่จุลินทรีย์ถูกระงับการเจริญเนื่องจาก spreader มากกว่า 50% หรือมีพื้นที่มากกว่า 25% บน plate ที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากผลของ spreader ให้รายงานว่า spreader (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) แต่ถ้าจำเป็นต้องนับ ให้นับโคโลนีที่ spreader เป็น 1 โคโลนี และนับโคโลนีปกติไปคำนวณ

D. plate ที่ไม่มีจุลินทรีย์ในทุก di;ution ให้รายงานน้อยกว่า 1 เท่าของ dilution ต่ำสุด เป็นค่าประมาณใส่เครื่องหมาย * (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 6)

E. duplicate plate ซึ่ง plate ที่หนึ่งอยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนีและ plate ที่สองมากกว่า 250 โคโลนี ให้นับทั้งสอง plate แล้วหาค่าเฉลี่ย (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 7)

F. duplicate plate ซึ่ง plate ที่หนึ่งอยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนีและ plate ที่สองมากกว่า 250 โคโลนี หรือน้อยกว่า 25 โคโลนี ให้นับทั้ง 4 plate แล้วหาค่าเฉลี่ย (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 8)

G. duplicate plate ซึ่งทั้งสอง plate ของ dilution แรกอยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนี และอีก dilution ซึ่ง plate ที่หนึ่งอยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนี ส่วน plate ที่สองอยู่นอกช่วง 25 - 250 โคโลนี ให้นับทั้ง 4 plate แล้วหาค่าเฉลี่ย (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่ 9)

H. การรายงานให้รายงานเป็นตัวแรก 2 ตัว จากค่าเฉลี่ย ถ้าเลขลำดับที่สามมากกว่าให้ปัดขึ้น น้อยกว่า 5 ปัดทิ้ง ถ้าเป็นเลข 5 หน้าเลข 5 เป็นเลขคู่ให้ปัดทิ้ง หน้าเลข 5 เป็นเลขคี่ให้ปัดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 การคำนวณและรายงานผล Total bacteria count

ตัวอย่างที่	1 : 100	1 : 1,000	1 : 10,000	Total bacteria count/g
1	TNTC	175	16	190,000
	TNTC	208	17	
2	TNTC	280	34	330,000
	TNTC	296	40	
3	18	2	0	1,600*
	14	0	0	
4	TNTC	TNTC	523	5,100,000*
	TNTC	TNTC	487	
5	TNTC	274	35	300.000
	TNTC	230	Spreader	
6	0	0	0	<100*
	0	0	0	
7	TNTC	322	23	300,000
	TNTC	278	29	
8	TNTC	256	25	300,000
	TNTC	310	40	
9	TNTC	250	28	290,000
	TNTC	280	35	
	TNTC	320	35	340,000
	TNTC	280	40	

เทคนิคการนับจำนวนจุลินทรีย์

การนับจำนวนเซลลแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ Plate count technique จะนับได้ง่าย หรือมีความถูกต้องแค่ไหน ขึ้นอยู่กับเทคนิคพื้นฐานระหว่างการปฏิบัติงาน เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การทำให้เจือจางมีความสำคัญมาก จะต้องควบคุมปริมาตรของสารละลายนั้นให้มีความถูกต้องมากที่สุด โดยระวังในเรื่องการใช้ปิเปต เช่น ไม่ให้มีฟองอากาศขณะดูด การปล่อยสารละลายลงใน plate ควรให้ปลายปิเปตทำมุมกับพื้น 45°

2. อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประมาณ 44 - 46°C

3. ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เทลงใน plate ประมาณ 15 - 20 มิลลิลิตร เพื่อเมื่อ shake plate แล้วอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่หกเปื้อน ซึ่งลดช่วยลดการปนเปื้อนได้

4. ในการ shake plate ควร shake ให้สม่ำเสมอ เพื่อให้เชื้อกระจายตัวและนับได้ง่าย

5. ระยะเวลาในการดูดตัวอย่างจนกระทั่งเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ควรตั้งทิ้งไว้เกิน 20 นาที

6. ควรทำ control สารละลาย buffer อาหารเลี้ยงเชื้อ และบริเวณที่ปฏิบัติงานด้วยทุกครั้ง

<u>เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1. ก่อนการเตรียมต้องอ่านละเอียดและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นให้เข้าใจ

2. การบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรบรรจุมากเกินไปเพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากภายนอกได้ เช่น การทำ slant ควรใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดประมาณ 1/8 ของความสูงและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่จึงจะเอียงหลอด เพื่อเป็นการช่วยลดไอน้ำในหลอดที่จะทำให้หน้า slant เปียก

3. การทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อมีข้อควรระวังเช่น ในการนึ่งฆ่าเชื้อภาชนะที่บรรจุต้องไม่ใหญ่เกินไปและไม่ควรใส่ของแน่นเกิดไปเพราะว่าไอน้ำจะสอดแทรกเข้าไปไม่ทั่วถึง และไม่ปิดภาชนะให้สนิทเกินไปจนไอน้ำผ่านเข้าไม่ได้ หากขวดที่มีฝาจุกหรือเกลียวควรคลายเกลียวก่อน ถ้าต้องอุดจุกด้วยสำลีควรปิกกระดาษทับอีกชั้นเพื่อไม่ให้สำลีเปียกทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย

4. การหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้หลายวิธี เช่นการต้มในน้ำเดือด การใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave) และวิธีที่นิยมกันมากในห้องปฏิบัติการคือ การใช้ตู้อบไมโครเวฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนการดำเนินการทดลอง

ได้ดำเนินการทดลองดังแสดงตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.2 แผนการดำเนินการทดลอง

วันศุกร์	วันจันทร์	วันอังคาร	วันพุธ	วันพฤหัสบดี
เตรียม Media - TSB + 10% เกลือ - TSB - TPC - MS-EY Agar	- เก็บตัวอย่าง - ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง	(ตามผล 24 ชั่วโมง) * TSB + 10% เกลือ plat ลง MS-EY * TSB plat ลงMS-EY	(ตามผล 48 ชั่วโมง) อ่านผล TPC บันทึกผล	ดูผล MS-EY และปฏิบัติตามขั้นตอนและวิธีการ

5. วิเคราะห์ข้อมูล

6. รวบรวมข้อมูล ทำรายงาน และนำเสนอผลงาน

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลอง

จากแผนการดำเนินการทดลอง ได้ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา

1. *Staphylococcus aureus* โดยวิธี MPN ด้วย Selective Media (TSB + 10% NaCl) และ Non Selective Media (TSB)
2. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลอง

ตัวอย่างที่	ค่าMPN ของ *S.aureus* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร		จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) Cfu / g
	Non Selective (TSB)	Selective (TSB + 10% NaCl)	
1	3.6	460	64×10^{5}
2	<3	3.6	16×10^{3}
3	<3	23	16×10^{6}
4	<3	93	16×10^{6}
5	<3	21	26×10^{6}
6	<3	11	19×10^{6}
7	3	9.1	21×10^{6}
8	<3	20	18×10^{6}
9	<3	<3	16×10^{6}
10	<3	<3	20×10^{5}
11	16	19	10×10^{6}
12	<3	<3	54×10^{5}
13	<3	<3	20×10^{4}
14	3.6	36	10×10^{6}
15	<3	<3	12×10^{3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่	ค่าMPN ของ *S.aureus* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร		จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) Cfu / g
	Non Selective (TSB)	Selective (TSB + 10% NaCl)	
16	3	7.3	94×10^{4}
17	<3	<3	35×10^{4}
18	9.1	460	19×10^{5}
19	3	9.1	26×10^{5}
20	7.3	9.1	40×10^{4}
21	<3	<3	17×10^{4}
22	<3	<3	44×10^{3}
23	<3	<3	29×10^{2}
24	<3	<3	58×10^{5}
25	3	23	57×10^{5}
26	210	>1100	68×10^{4}
27	<3	3.6	23×10^{5}
28	<3	<3	12×10^{4}
29	<3	<3	18×10^{4}
30	<3	<3	10×10^{4}

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Selective media (TSB + 10% NaCl) สามารถตรวจพบ ปริมาณ S. aureus ได้สูงกว่า Non Selective media (TSB) ดังตาราง 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า MPN ของ *S. aureus* จากการวิเคราะห์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Non Selective media (TSB) และ Selective Media (TSB + 10% NaCl)

ตัวอย่างที่	ค่าMPN ของ *S.aureus* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร		จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) Cfu / g
	Non Selective (TSB)	Selective (TSB + 10% NaCl)	
1	3.6	460	64×10^{5}
11	16	19	10×10^{6}
14	3.6	36	10×10^{6}
16	3	7.3	94×10^{4}
18	9.1	460	19×10^{5}
19	3	9.1	26×10^{5}
20	7.3	9.1	40×10^{4}
25	3	23	57×10^{5}

2. การอ่าน plate MS-EY ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective Media (TSB + 10% Nacl) สามารถอ่านผลได้ง่ายกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Non Selective Media (TSB) เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* ใน Selective media (TSB + 10% NaCl) สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในไอศกรีม ดังนั้น เวลานำมา plate ลงบน MS-EY จึงทำให้ตรวจพบ *S. aureus* ได้ง่ายและชัดเจน ซึ่งจะตรงกันข้ามกับ Non Selective Media (TSB)

3. จากผลข้อ 2. จึงทำให้ plate MS-EY ของ Selective Media (TSB + 10% NaCl) ง่ายและสะดวกต่อการทำ Coagulase tese เนื่องจาก เชื้อ *S. aureus* ที่ได้บน plate MS-EY จะค่อนข้างบริสุทธิ์ มีเชื้ออื่น ปนเปื้อนน้อยกว่า Non Selective Media (TSB)

4. ในกรณีที่ ตัวอย่างมีเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณสูง การอ่าน plate บน MS-EY ของ Non Selective Media (TSB) จะต้องทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยการ เขี่ย Colony ที่สงสัย ลงบน plate MS-EY อีก 48 ชม. นั้น หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Selective Media (TSB + 10% NaCl) ใช้เวลาน้อยกว่า Non Selective Media (TSB) นอกจากใช้เวลาน้อยกว่าแล้ว ยังประหยัดค่าใช้จ่าย ได้มากว่าอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ *S. aurues* ด้วย Non Selective Media (TSB) พบว่า ในการทดลอง 30 ตัวอย่าง พบว่า 7 ตัวอย่าง ใน Non Selective Media (TSB) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S. aureus* บน plate MS-EY (MPN TSB < 3) แต่ใน Selective Media (TSB + 10% NaCl) ทั้ง 7 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อ *S. aureus* บน plate MS-EY ซึ่งสามารถจะบอกได้ว่าการนำเอา Non Selective Media (TSB) ไปวิเคราะห์ *S. aureus* จะได้ผลการทดลองที่ผิดพลาดได้ ดังแสดงในตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 Non Selective Media (TSB) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S. aureus*

ตัวอย่างที่	ค่าMPN ของ *S.aureus* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร		จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) Cfu / g
	Non Selective (TSB)	Selective (TSB + 10% NaCl)	
2	<3	3.6	16×10^{3}
3	<3	23	16×10^{6}
4	<3	93	16×10^{6}
5	<3	21	26×10^{6}
6	<3	11	19×10^{6}
8	<3	20	18×10^{6}
27	<3	3.6	23×10^{5}

6. จากการทดลองที่ได้นำไปประเมินค่าทางสถิติ พบว่า การตรวจหา *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Seelctive Media (TSB + 10% NaCl) มีประสิทธิภาพดีกว่า Non Selective Media (TSB) โดยมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.4 แสดงผลการทดลองทางสถิติ

ประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า Mean ± SD
	Staphylococus aureus
TSB	$8.72 \pm 38.18_{b}$
10% NaCl TSB	$76.9267 \pm 225.01_{a}$

วิจารณ์ผลการทดลอง

ไอศกรีมที่ผ่านขบวนการผลิต เชื้อ *S. aureus* ที่อาจบาดเจ็บบางส่วน เจริญได้ไม่ดีในการตรวจหาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Non Selective Media (TSB) เนื่องจาก

1. เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นสามารถเจริญเติบโตแข่งกับเชื้อ *S. aureus* ที่บาดเจ็บได้ดีกว่า
2. ไม่มีสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ดังนั้น การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective Media (TSB + 10% NaCl) จึงให้ผลที่ดีกว่า เนื่องจากผลของเกลือที่เติมลงไปสามารถยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

จากแนวคิดที่ว่า ไอศกรีมพื้นบ้าน (ไอศกรีมกะทิ) ซึ่งมีสารอาหารน้อยกว่าไอศกรีมนม *S. aureus* ที่บาดเจ็บในไอศกรีมกะทิ จึงไม่สามารถฟื้นฟูสมรรถนะของตนเองได้ เนื่องจาก

1. สารอาหารที่จะนำไปใช้ในไอศกรีมกะทิมีน้อย
2. เมื่อนำไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective Media (TSB + 10% NaCl) ความเข้มข้นของเกลือ 10 % อาจสูงเกินไปและไม่เหมาะสมกับเชื้อ *S. aureus* ที่บาดเจ็บ

จึงทำให้เกิดการศึกษาปัญหาพิเศษ เรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการหาเชื้อ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิ โดยวิธี MPN ด้วย Selective Media (TSB + 10% NaCl) และ Non Selective Media (TSB) ในไอศกรีมกะทิ ซึ่งก็ยังให้ผลว่า Selective Media (TSB + 10% NaCl) มีประสิทธิภาพดีกว่า Non Selective Media (TSB) ดังนั้น ถ้าต้องการจะทราบว่า TSB + 10% NaCl มีผลต่อเชื้อ *S. aureus* ที่บาดเจ็บหรือไม่ ควรศึกษาต่อ คือการลดระดับความเข้มข้นของเกลือลง และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ Selective Media (TSB + 10% NaCl) ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. R.W. Bennett , G.A. lancette. Staphylococcus aureus. Bacteriological Aualytical Manual 8th Edition. 1995. P. 12.01-12.05.

2. R.W. Bennett . Staphylococcus aureus. Bacteriological Aualytical Manual 6th Edition. 1984. p. 28-32.

3. Staphylococcus aureus. Micro Organisms In Foods 1 ICMSF 2nd Edition. 1978. p. 28-32.

4. จุลชีววิทยาทางการแพทย์ (Medical Microbiology) พ.ศ. 2526 หน้า 64-66.

5. การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาและข้อกำหนดคุณภาพมาตรฐานอาหารแช่แข็งเพื่อการส่งออก : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยศเส, 2535. หน้า 2,4,6,9 .

6. อดิศร เสวตวิวัฒน์. คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา วิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสุขลักษณะการผลิตอาหาร และวิธีการตรวจหาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ: ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, หน้า 6,31.

7. นันทนา อรุณฤกษ์ . การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ , 2537 . หน้า 159 , 163 .

8. ศิริชัย พงษ์วิชัย . การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ :สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2539 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brain Heart Broth (BHI)

Nutrient substrate (extraets of brain and heart and peptones)	27.5 g
D(+)-Glucose	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
di-Sodium hydrogen prosphate	2.5 g

ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121°c)
เวลา 15 นาที

2. Standard Methods Agar

Pancreatic Digest of Casein	5.0 g
Yeast Extract	2.5 g
Dextrose	1.0 g
Agar	15.0 g

ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121°c)
เวลา 15 นาที

3. Trypticase Soy Broth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	17.0 g
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
di-Basic Potassium Phosphate	2.5 g
Glucose	2.5 g

ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121°c)
เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. 10 % Sodium chlorideTrypticase Soy Broth(TSB+ 10% NaCl)

Pancreatic Digest of Casein	17.0 g
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0 g
Sodium chloride	100 g
di-Basic Potassium Phosphate	2.5 g
Glucose	2.5 g

ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121°c) เวลา 15 นาที

5. Mannitol Solt Phenol-red Agar (MS)

Peptones	10.0 g
Meat Extract	1.0 g
Sodium chloride	75.0 g
D(-) Mannitol	10.0 g
Phenol red	0.025g
Agar-agar	12.0 g

ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121°c) เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข แสดงการอ่านค่า Most Probable Number Method (MPN) ของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางของค่า M P N

หลอดที่ให้ผล (POSITVE TUBES)				หลอดที่ให้ผล (POSITVE TUBES)				หลอดที่ให้ผล (POSITVE TUBES)				หลอดที่ให้ผล (POSITVE TUBES)			
0.1	0.01	0.001	M P N	0.1	0.01	0.001	M P N	0.1	0.01	0.001	M P N	0.1	0.01	0.001	M P N
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ประวัติผู้เขียน

บัณฑูร พานิชกุล เกิดเมื่อวันที่ 14 มกราคม 2514 จังหวัดชัยนาท สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท ในปี พ.ศ.2533 และสำเร็จการศึกษาจาก โรงเรียนพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 ปี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี พ.ศ.2535 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปี พ.ศ.2539

สมภพ วัฒนมณี เกิดเมื่อวันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2508 จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนปทุมคงคา จังหวัดกรุงเทพฯ ในปี พ.ศ.2526 และสำเร็จการศึกษาจาก โรงเรียนพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชั้นปี2 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี พ.ศ.2537 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปี พ.ศ.2539

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้