Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 572-575 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 572-575 (2553)

การปนเปื้อนโดย *Escherichia coli* ในแปลงผลิตที่มีผลต่อคุณภาพของผักกาดหอมหลังการเก็บเกี่ยว

Escherichia coli contamination under field production, a causal to post harvest quality of lettuce

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1] และ ชุตินธร หยุนแดง[1]
Chainarong Rattanakreetakul[1] and Chotinthorn Yuendaeng[1]

Abstract

Microbial contamination on vegetable produce can be caused by poor management during the production. In this study, the possibility of *Escherichia coli* contamination on lettuce seedling was performed. Eosin methylene blue (EMB) agar was used to isolate *E. coli* from pre-cooked food from fresh market and enriched in Nutrient Broth with shaking for 36 hours. Various bacterial inoculation methods including soil draining, leaf spraying, plant wound and soil base inoculation were tested on lettuce seedling. An infested lettuce seedling contamination by dilution plate method with EMB agar at 3, 7 and 14 day was determined the bacteria. A possibility of *E. coli* contamination was highly found on wound inoculated of the non-transplant seedling and soil base inoculums before transplant of seedling. The limitation of bacterial contamination to lettuce seedling was found from the inoculation methods of leaf spraying and soil draining to the non-transplant seedling after 7 to 14 day of inoculation. The result reveals that an injury of lettuce during the production wax prone to contaminate with *E. coli* while the contamination of *E. coli* to healthy or non injured lettuce is rare.

Key word: *Escherichia coli*, contamination, lettuce

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ติดไปกับผักสดสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องการไม่มีระบบจัดการที่ดีในแปลงผลิต สภาพจำลองของการปนเปื้อนจึงได้ทดสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และผักกาดหอม โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue (EMB) จากตัวอย่างอาหารปรุงสำเร็จในตลาดสด และนำไปเพิ่มปริมาณด้วยอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 36 ชั่วโมงก่อนนำไปปลูกเชื้อลงในพืชด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การราดเชื้อลงดิน การฉีดพ่นเชื้อที่ใบ การสร้างบาดแผลที่ลำต้น และการผสมเชื้อลงดินก่อนการย้ายปลูกต้นกล้า ซึ่งจะบ่งบอกถึงโอกาสการปนเปื้อนไปสู่ผักกาดหอม ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในผักกาดหอมภายหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ด้วยวิธี dilution plate count ด้วย อาหาร EMB agar พบว่าผักกาดหอมมีโอกาสปนเปื้อนได้สูงในตัวอย่างที่ได้รับเชื้อทางบาดแผลบริเวณลำต้นของผักกาดหอมที่ไม่มีการย้ายปลูก และในต้นกล้าผักกาดหอมที่ย้ายลงปลูกในดินที่มีเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับการฉีดพ่นเชื้อหรือการรับเชื้อผ่านการชะล้างสู่ผักกาดหอมที่ไม่มีการย้ายปลูกจะพบอย่างจำกัดในตัวอย่างภายหลังการปลูกเชื้อ 7 ถึง 14 วัน ดังนั้นเชื้อ *E. coli* มีโอกาสปนเปื้อนในผักกาดหอมที่มีบาดแผลได้มากกว่าในผักกาดหอมที่สมบูรณ์หรือผักกาดหอมที่ไม่มีบาดแผล

คำสำคัญ เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, การปนเปื้อน, ผักกาดหอม

คำนำ

ความต้องการของผู้บริโภคในการบริโภคผักสดและผลไม้มีเพิ่มสูงขึ้น ในบางครั้งผักสดและผลไม้ก็เป็นอันตรายได้หากมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่เป็นอันตรายซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ในผักสดที่ส่งออกจากประเทศไทยได้มีรายงานการตรวจพบ *E. coli* หรือ Salmonella และแจ้งผ่านระบบเตือนภัยของสหภาพยุโรป (Rapid Alert System for Food and Feed) ซึ่งนำความเสื่อมเสียชื่อเสียงให้กับประเทศไทย การปนเปื้อนของเชื้อโรคในผักสดสามารถเกิดได้ในแปลงเพาะปลูก ระหว่างการเก็บเกี่ยว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว กระบวนการขนส่ง การจัดเก็บในตลาด รวมไปถึงการเตรียมอาหารภายในครัวเรือน (วชิราภรณ์, 2545) ในภาคการผลิตการปนเปื้อนจุลินทรีย์เกิดขึ้นจาก ดินที่ปนเปื้อนมูลสัตว์ น้ำชลประทานที่ไม่ได้รับการบำบัด

[1] คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Faculty of Agriculture, Kasetsart Univesity, Nakhon Pathom 73140

ปุ๋ยคอกที่มีเชื้อโรคปะปน การวิจัยครั้งนี้ได้จำลองจุดเสี่ยงของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในระหว่างการเพาะปลูกผักกาดหอม เพื่อนำผลการศึกษาไปใช้เป็นแนวทางในการลดการปนเปื้อนในระหว่างการจัดการแปลงผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* จากอาหารในธรรมชาติ

เชื้อ *E. coli* ที่แยกจากส่วนของน้ำปรุงรสในอาหารปรุงสุกจากตลาดสด โดยเลือกโคโลนีเชื้อเดี่ยวๆบนอาหาร EMB (Eosin methylene blue) agar ที่มีลักษณะโคโลนีสีม่วงน้ำเงิน ผิวโคโลนีเหลือบสี และเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหาร NB (Nutrient broth) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยการเจือจางที่ระดับ 1:10,1:100, 1:1000 และ 1:10000 (โดยปริมาตร) ด้วยสารละลาย 0.1 M NaCl ใช้สารละลายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร EMB ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนีต่อจาน บันทึกค่าระดับการเจือจาง และนำมาสรุปผลการตรวจเชื้อเป็น colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลตร

2. การตรวจสอบสาเหตุการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในผักกาดหอม

ปลูกเมล็ดผักกาดหอม 15-20 เมล็ด ในถ้วยที่มีขนาดปากถ้วย 7 เซนติเมตร มีความจุ 150 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องเจาะก้นถ้วย ภายในบรรจุพีทมอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และใช้น้ำที่สะอาดรดพอเปียก เมื่อผักกาดหอมอายุ 30 วัน ให้ถอนแยกแต่ละถ้วยให้เหลือ 9 ต้น แบ่งผักกาดหอมเป็น 5 กลุ่มเพื่อทดสอบการปลูกเชื้อแบบต่างๆ โดยใช้เชื้อ *E. coli* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.55 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร เพื่อการปลูกเชื้อในผักกาดหอมแต่ละถ้วย (ภาพที่ 1) โดยมีวิธีการปลูกเชื้อดังนี้

กลุ่มที่ 1 จะเป็นวิธีการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ *E. coli* (ชุดควบคุม)
กลุ่มที่ 2 เป็นวิธีการทดลองราดเชื้อลงดิน
กลุ่มที่ 3 วิธีการทดลองฉีดพ่นเชื้อทางใบ
กลุ่มที่ 4 วิธีการทดลองที่สร้างบาดแผลทางใบและลำต้น
กลุ่มที่ 5 วิธีการทดลองที่ผสมเชื้อลงดินก่อนย้ายปลูก

ทำการเก็บตัวอย่างผักกาดหอมมาตรวจหาปริมาณ *E. coli* ภายหลังจากปลูกเชื้อไป 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน โดยจะตัดตัวอย่างผักกาดหอมในส่วนที่ไม่สัมผัสดิน ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และผสมกันให้ทั่วในถุงพลาสติก จากนั้นสุ่มตัวอย่างผักกาดหอมการทดลองละ 1 กรัม นำมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด และทำการเจือจางน้ำผัก (เช่นเดียวกับข้อ 1) เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อบนอาหาร EMB ภายหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 36 - 48 ชั่วโมง คำนวณหาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดและเชื้อ *E. coli* ที่พบ และรายงานผลการตรวจเชื้อเป็น colony forming unit (CFU) ต่อกรัม

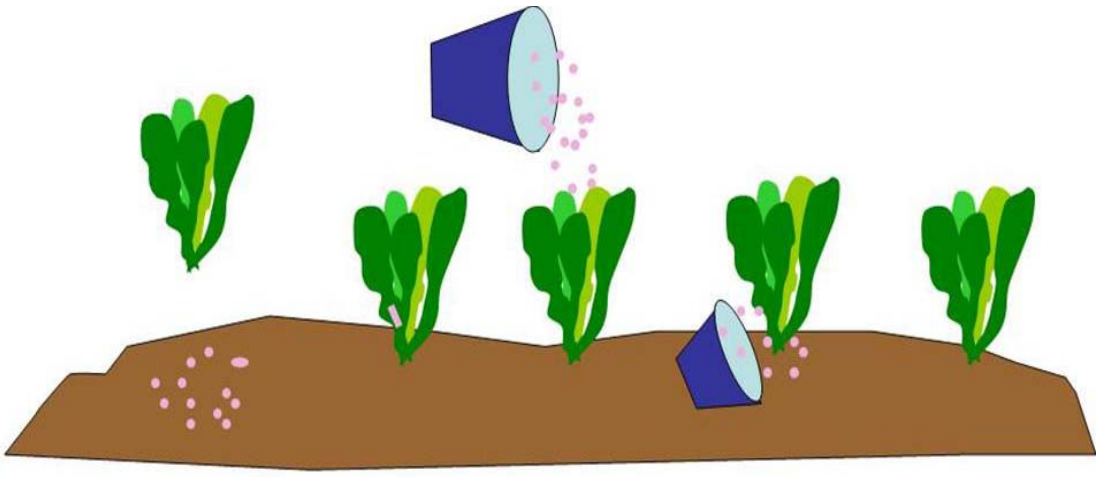

Figure 1 Diagram of *E. coli* inoculations to lettuce seedlings by various means of infectious port as A) non-inoculation, B) soil draining, C) Leaf spraying, D) plant wound and E) soil base inoculation

ผล

การตรวจสอบวิธีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในผักกาดหอมในแปลงผลิต โดยการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธีต่างๆได้แก่ การราดลงดิน การฉีดพ่นทางใบ การทำบาดแผลแล้วปลูกเชื้อ การผสมเชื้อลงดินปลูก และการไม่ปลูกเชื้อเพื่อเป็นชุดควบคุม ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ปนเปื้อนภายหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Number of microorganisms founded (log_{10} CFU/gram) after 3, 7 and 14 day of various inoculation process on lettuce seedling.

Day after inoculation	Inoculation methods				
	Non inoculation	Soil draining	Leaf spraying	Plant wound	Soil base inoculums
Number of *Escherichia coli*					
3	0^{c}	3.265^{ab}	2.875^{b}	4.925^{a}	3.595^{ab}
7	0^{b}	0^{b}	2.785^{a}	4.480^{a}	2.990^{a}
14	0^{b}	0^{b}	0^{b}	4.295^{a}	3.815^{a}
Total Plate Count					
3	6.060^{a}	3.490^{b}	3.515^{b}	5.695^{a}	3.880^{b}
7	2.285^{ns}	2.085^{ns}	2.810^{ns}	3.980^{ns}	3.170^{ns}
14	2.955^{ns}	3.325^{ns}	2.53^{ns}	4.460^{ns}	3.905^{ns}

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี lsd ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการปลูกเชื้อ 14 วันในตัวอย่างผักกาดหอมพบว่า วิธีการสร้างบาดแผลที่ใบและลำต้นก่อนการป้ายเชื้อจะพบปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ปนเปื้อนในผักกาดหอมมากที่สุด รองลงมาเป็นวิธีการผสมเชื้อลงดินก่อนย้ายปลูก ในขณะที่วิธีการราดเชื้อ *E. coli* ลงดิน และการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ใบจะสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ในระยะแรก และปริมาณเชื้อ *E. coli* จะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 7 และ 14 วัน

วิจารณ์

จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Listeria sp*., *E. coli* เป็นต้น ผักสดสามารถปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้เมื่อสัมผัสกับอุจจาระ สิ่งปฏิกูล และน้ำผิวดินที่ไม่ได้บำบัด และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สามารถเกิดได้ในขณะที่ผักกำลังเจริญเติบโต (Tauxe, 1997; Beuchatt, 1997) จากสภาพการผลิตทางการเกษตร การปนเปื้อนของจุลินทรีย์จะมาจากดินที่มีการปนเปื้อนของมูลสัตว์ แหล่งน้ำที่สกปรก หรือปุ๋ยคอกที่ไม่ได้ผ่านการหมัก (วชิราภรณ์, 2545) จากการจำลองแบบการปนเปื้อนในระบบการผลิต (ภาพที่ 1) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เริ่มต้นที่ระดับ 8.55 log_{10}CFU/มิลลิลิตร ทำการปลูกเชื้อลงในผักกาดหอมโดยการราดเชื้อให้ลงดิน (ภาพที่ 1-B) การฉีดพ่นเชื้อให้ทั่วบริเวณใบ (ภาพที่ 1-C) การทำแผลและใส่เชื้อไปที่กิ่งหรือใบของผักกาดหอม (ภาพที่ 1-D) และวิธีการคลุกเชื้อกับดินก่อนการย้ายกล้าปลูก (ภาพที่ 1-E) จะมีความสัมพันธ์กับการปฏิบัติของเกษตรกรในแปลงผลิตดังนี้

การทดลองที่	การจำลองการปลูกเชื้อ	เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในแปลงผลิต
1	ชุดควบคุมในผักที่ไม่มีการย้ายปลูกและไม่ปลูกเชื้อ	การย้ายปลูกในดินที่สะอาด หรือการไม่ย้ายปลูกในดินที่สะอาด
2	การผสมเชื้อลงในดินปลูก ก่อนการย้ายปลูก	การปนเปื้อนของเชื้อจากปุ๋ยคอกที่ไม่สะอาด
3	การปลูกเชื้อผ่านทางแผลที่ต้นหรือใบ	การปลูกพืชหนาแน่น ทำให้เกิดบาดแผลในระหว่างการจัดการ
4	การรดใบพืชด้วยน้ำที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย	การใช้น้ำจากแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์
5	การรดโคนต้นด้วยน้ำที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย	การชะล้างของจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีการปนเปื้อน

จากการศึกษาสาเหตุการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย E. *coli* ในผักกาดหอมทั้ง 5 วิธีการทดลอง คือ วิธีการราดเชื้อลงดินแทนสาเหตุการปนเปื้อนจากการใช้ปุ๋ยคอกบำรุงพืช วิธีการฉีดพ่นเชื้อทางใบแทนสาเหตุการปนเปื้อนจากน้ำใช้ทางการเกษตร วิธีการสร้างบาดแผลที่ใบและลำต้นก่อนปลูกเชื้อแทนการปนเปื้อนของเชื้อโดยตรง วิธีการผสมเชื้อลงดินก่อนย้ายปลูกแทนสาเหตุการปนเปื้อนจากพื้นที่ดิน และวิธีที่ไม่ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แทนชุดควบคุม พบว่า การสร้างบาดแผลที่ใบและลำต้นก่อนปลูกเชื้อจะเป็นสาเหตุที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในผักสดมากที่สุด รองลงมาเป็นวิธีการผสมเชื้อลงดินก่อนย้ายปลูก ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ตลอดการทดลอง สำหรับวิธีการอื่นๆจะตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในระยะแรกๆของการตรวจสอบเท่านั้น ยิ่งระยะเวลานานขึ้นการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จะลดลงจนตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออีก แสดงว่าการสร้างบาดแผลจะเป็นการส่งเสริมทำให้เชื้อ *E. coli* สามารถเข้าไปเจริญเติบโตในพืชได้มากขึ้น ส่วนการผสมเชื้อ *E. coli* ลงดินก่อนย้ายปลูกทำให้รากเกิดบาดแผลซึ่งเป็นเหตุให้เชื้อ E. *coli* เข้าไปเจริญภายในพืชได้ การเคลื่อนที่ของเชื้อ *E. coli* ในพืชนั้นมีความเป็นไปได้สูง ดังเช่นการทดลองของ Cooley et al. (2003) และ Cooley et al. (2006) ที่ได้ปลูกเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่รากของพืชตระกูลกะหล่ำประเภท *Arabidopsis thaliana* และพบว่าเชื้อสามารถกระจายไปได้ทั่วทั้งต้น อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติจะพบว่ามีเชื้อ *Enterobacter asburiae* ซึ่งเจริญอยู่ผิวใบของพืชจะสามารถควบคุมประชากรของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ แต่ถ้าเชื้อเจริญเข้าไปในต้นพืชแล้วการควบคุมก็จะเป็นไปได้ยากขึ้น

สรุป

ในผักปกติที่ไม่มีบาดแผลเกิดขึ้นในระหว่างการเพาะปลูก การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จะเป็นไปได้ยาก แต่เมื่อเกิดบาดแผลที่ใบ ลำต้น หรือรากก็จะทำให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถแทรกเข้าทางบาดแผลได้ ซึ่งจะเป็นผลให้มีการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในตัวอย่างผักสด และเมื่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเข้าไปอาศัยในผักแล้วก็จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ภายในผักได้

เอกสารอ้างอิง

วชิราภรณ์ เทียมพันธุ์. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อเพื่อลดจำนวน *Escherichia coil* และ *Salmonella Typhimurium* ปนเปื้อนบนผักกาดหอม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Beuchat, L.R. and J. Ryu. 1997. Produce handling and processing practices. Emerging Infectious Diseases 3(4):459-465.

Cooley, M.B., D. Chao and R.E. Mandrell. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. J Food Prot. 69(10):2329-2335.

Cooley, M.B., W.G. Miller and R.E. Mandrell. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by Enterobacter asburiae. Appl Environ Microbiol. 69(8):4915-4926.

Tauxe, R.V. 1997. Emerging food borne diseases: an evolving public health challenge. Emerging Infectious Diseases 3 (4):425-434.