การศึกษาประสิทธิผลของ อี เอ็ม ต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา เอ็นทิไรติดิส

The *In Vitro* Efficacy of Effective Microorganisms (EM) for Inhibition of *Salmonella enteritidis* Gaertner

*นริศร นางาม (Narisorn Na-ngam)[1]**
วสันต์ จันทรสนิท (Wasan Jantarasanit)[2]
พิทักษ์ น้อยเมล์ (Pitak Noimay)[3]

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ประสิทธิภาพ (อี เอ็ม) ได้จัดซื้อจากร้านจำหน่ายในเมืองขอนแก่น 3 ยี่ห้อ ที่จำหน่ายในตลาดอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น และตรวจเช็คปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บน Standard plate agar และคัดเลือก อี เอ็ม ที่เหมาะสมต่อการทดลองมา 1 ยี่ห้อ ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์รวมเท่ากับ 8.2 x 10^3 เซลล์/มล. และ pH 3.49 ประสิทธิภาพของ อี เอ็ม ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella enteritidis* Gaertner ที่ความเข้มข้น 5.0 x 10^8 เซลล์/มล. พบว่า อี เอ็ม ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5% และระยะเวลา 1 ชั่วโมงจึงมีผลทำให้ทำให้เชื้อซัลโมเนลลาในหลอดทดลองตายได้และเมื่อใช้ อี เอ็ม ในอุจจาระไก่ที่ปนเชื้อ *S. enteritidis* พบว่า อี เอ็ม ความเข้มข้น 100% และระยะเวลา 30 นาทีจึงมีผลต่อการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้

Abstract

Three types of EM (effective microorganisms) were purchased from markets in Khon Kaen metropolis, Khon Kaen province. All of them were tested for total microbial count and pH. Only the best type of EM was selected for our research. This EM had total bacteria count and pH of 8.2 x 10^3 cfu/ml and 3.49 respectively. Inhibition effect of EM for *Salmonella enteritidis* Gaertner at 5.0 x 10^8 cfu/ml was 0.5% for 1 hour and 100% for *S. enteritidis* contaminated boiler faeces for 30 minutes.

คำสำคัญ: อี เอ็ม จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ซัลโมเนลลา
Keywords: EM, effective microorganisms, *Salmonella*

[1]*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*นักวิชาการสัตวบาล ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**corresponding author, e-mail: narnan@kku.ac.th*

บทนำ

กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (อี เอ็ม) ประกอบด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน กลุ่มเชื้อราและกลุ่มของยีสต์ รวมกันมากกว่า 80 ชนิด ในปัจจุบัน อี เอ็ม (EM) มีทั้งหมด 5 ชนิด ที่สำคัญได้แก่ อี เอ็ม ชนิดที่มีแบคทีเรียพวก *Lactobacillus casei* Hansen and Lessel และ *Streptococcus lactis* Lister จะผลิตกรดแลคติกช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค และป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ยังเร่งการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและป้องกันการเกิดกลิ่นเหม็น จากรายงานการใช้ อี เอ็ม ในการเลี้ยงสัตว์ มี 2 แบบ คือ แบบที่หนึ่งเป็นชนิดน้ำนำมาขยายโดยใช้ อี เอ็ม 1 ส่วน กากน้ำตาล 1 ส่วน น้ำสะอาด 20 ส่วน แล้วนำไปหมักในภาชนะปิด 7 วัน วิธีการใช้โดย ผสมในน้ำดื่มสำหรับสัตว์ ใช้ อีเอ็มอัตราส่วน 1 ลิตร : น้ำ 1,000 –10,000 ลิตร ให้สัตว์กินทุกวัน จะทำให้สัตว์มีสุขภาพ แข็งแรง ไม่เป็นโรคอุจจาระร่วง และมูลสัตว์ไม่มีกลิ่นเหม็น แบบที่สองเป็นชนิดแห้งจะใช้ขนาด 1 ช้อนโต๊ะ ต่ออาหาร 1 กก. ผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และรักษาเกี่ยวกับโรคทางเดินอาหาร (คลินิกเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครราชสีมา, 2006)

โรคอุจจาระร่วงเป็นโรคติดต่อทางอาหารที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของประเทศไทยโดยเฉพาะจากเชื้อซัลโมเนลลาซึ่งเป็นโรคสัตว์ติดต่อสู่คน โดยเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น สุกร โค และไก่ เป็นต้น เชื้อนี้สามารถแพร่กระจายจากสัตว์ไปยังผู้บริโภคโดยผ่านทางการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลา หรือการปรุงอาหารแบบสุกๆ ดิบๆ ผู้บริโภคที่ได้รับเชื้อนี้เข้าไปมักแสดงอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น อุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และอาจรุนแรงถึงขั้นโลหิตเป็นพิษได้ เป็นต้น ส่วนในบุคคลที่มีสุขภาพแข็งแรงอาจพบเชื้อในร่างกายได้ และสามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังบุคคลอื่น ปัจจุบันโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุจากเชื้อซัลโมเนลลาได้กลับมาระบาดเพิ่มมากขึ้นทำให้ผู้ป่วยต้องเสียเวลา และค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคสูงขึ้นเช่นกัน ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ และสังคมอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ (พรเพ็ญ และคณะ, 2541)

ปัจจุบันผู้บริโภคภายในประเทศได้ให้ความสนใจในสุขภาพมากยิ่งขึ้นโดยเฉพาะเรื่องความปลอดภัยของอาหาร ดังนั้นการนำเอา อี เอ็ม มาประยุกต์ใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยเฉพาะการนำเอา อี เอ็ม ซึ่งผลิตได้เองในท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ และมีคุณค่า เพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ ลดต้นทุนการผลิต และลดปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ซึ่งก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค ถ้าได้ผลดีจะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันเชื้อซัลโมเนลลาที่อาจปนเปื้อนเนื้อสัตว์ติดต่อสู่ผู้บริโภคได้ ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลให้หน่วยงานที่รับผิดชอบสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการควบคุม และป้องกันเชื้อซัลโมเนลลาต่อไป

วิธีการศึกษา

โดยนำ อี เอ็ม (ชนิดน้ำ) 3 ยี่ห้อที่จำหน่ายในท้องตลาดมาศึกษาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Standard plate count และวัด pH แล้วคัดเลือกอี เอ็ม 1 ยี่ห้อที่มีจำนวนจุลินทรีย์ และ pH ที่เหมาะสมมากที่สุด (ตารางที่ 1) แล้วนำมาเตรียมสำหรับการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ใน 0.1% peptone water คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, และ 100.0 ตามลำดับ และเตรียมเชื้อ *S. enteritidis* Gaertner โดยการเพาะเชื้อในอาหารเหลว แล้วทำการนับจำนวนด้วยวิธีการ Standard plate count จากนั้นทำการเจือจางให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 5 x 10^8 เซลล์/มล. (ความเข้มข้นของเชื้อที่ก่อโรคในคนและสัตว์) แล้วทดลองหาระยะเวลาของ อี เอ็ม ต่อการทำลาย เชื้อซัลโมเนลลา ในชั่วโมงที่ 0, 0:30, 1, 3, 6 และ 24 ตามลำดับ

1. วิธีตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง (สุมาลี และคณะ, 2543; อินทิรา และคณะ, 2543)

การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซัลโมเนลลามีขั้นตอนการตรวจดังนี้

1) เมื่อครบเวลาจะเขย่าหลอดตัวอย่างด้วย Vertex Mixer แล้วใช้ไมโครไปเปตดูดตัวอย่างมา 1 มล. ใส่ลงใน 0.1% peptone water ปริมาตร 9 มล. ทำละลายเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2} .... 10^{-5}

2) การตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาใช้เจือจางตัวอย่างที่ 10^{-1}- 10^{-4} โดยใช้ไมโครไปเปตดูดมาหลอดละ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงบน Hektoen Enteric agar แล้วทำ Spread plate ด้วยแท่งแก้ว Spreader ทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชม. แล้วอ่านผลโดยดูลักษณะโคโลนีซึ่งจะมีสีดำ และรอบโคโลนีเป็นสีเขียว (รูปที่ 1. A) แล้วคำนวณจำนวนโคโลนีมีหน่วยเป็น เซลล์/มล. (ใช้ 30-300 โคโลนี)

3) ตรวจยืนยันเชื้อซัลโมเนลลาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV medium), Triple sugar iron (TSI) agar และ Lysine iron agar (LIA) (Hardy diagnostics, Co., LTD.)

2. การวิเคราะห์ข้อมูล

การประเมินผลและวิเคราะห์ข้อมูลจากแบบบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อทางจุลชีววิทยา

3. ขอบเขตของการศึกษา

คัดเลือก อี เอ็ม มาทดลองเพียง 1 ยี่ห้อจาก 3 ยี่ห้อ คือ EM-Q ซึ่งเป็นชนิดน้ำ เนื่องจากมีจำนวนจุลินทรีย์ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทดลองมากที่สุด (ตารางที่ 1) แล้วนำมาเตรียมสำหรับการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ กันใน 0.1% peptone water คือร้อยละ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, และ 100.0 ตามลำดับ และใช้ *S. enteritidis* ขนาด 5 x 10^8 เซลล์/มล. (ซึ่งเป็นขนาดของเชื้อที่ก่อโรค) ทุกตัวอย่างนำไปตรวจแยกหาเชื้อทางจุลชีววิทยา ที่ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การประเมินผลและวิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยแบบบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อทางจุลชีววิทยา

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

อี เอ็มซึ่งได้ทำการตรวจเช็คปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บน Standard plate agar และได้คัดเลือก อี เอ็ม ที่เหมาะสมต่อการทดลองในครั้งนี้คือ EM-Q (ตารางที่ 1) เนื่องจากมีจำนวนจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการทดลองคือ 8.2 x 10^3 เซลล์/มล. ความเป็นกรดด่าง (pH) เฉลี่ย 3.49 (ตารางที่ 2) และประสิทธิภาพของอี เอ็ม ต่อเชื้อ *S. enteritidis* 5.0 x 10^8 เซลล์/มล. พบว่า อี เอ็ม อย่างต่ำ 0.5% และใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงจึงมีผลทำให้ทำให้เชื้อในหลอดทดลองตายได้ (ตารางที่ 3) โดยมีความเป็นกรดเฉลี่ย pH 4.46 เมื่อใช้ อี เอ็มในอุจจาระไก่ทดลองที่ปนเชื้อ *S. enteritidis* 5.0 x 10^8 เซลล์/มล. พบว่าต้องใช้อี เอ็มความเข้มข้น 100% และระยะเวลาอย่างต่ำ 30 นาที จึงมีผลต่อการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้ (ตารางที่ 4) เนื่องจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ อี เอ็ม ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินอาหารยังไม่มีงานวิจัยการตีพิมพ์เผยแพร่มากนัก อย่างไรก็ตามการที่ EM สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *S. enteritidis* ได้ อาจเป็นเพราะ EM มีสภาพเป็นกรด ซึ่งในสภาพกรดนี้สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ (รูปที่ 1)

สรุปผลการศึกษา

อี เอ็ม ที่ใช้ทดลองครั้งนี้มีจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซึ่งมีผลต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ ซึ่งความเข้มข้นของ อี เอ็ม ที่เหมาะสำหรับใช้กับการเลี้ยงสัตว์ที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลาต้องมีความเข้มข้นอย่างต่ำ 0.5% และในบริเวณพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนอุจจาระสัตว์อาจต้องใช้ อี เอ็ม ความเข้มสูงโดยไม่ต้องทำเจือจาง การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ อี เอ็ม ต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา และแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง เช่น ไก่ และสุกรยังไม่มีการตีพิมพ์เผยแพร่มากนัก อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้พอสรุปได้ว่า อี เอ็ม สามารถกำจัดเชื้อ *S. enteritidis* ในหลอดทดลองได้ และในอุจจาระที่ปนเปื้อนเชื้อนี้จะใช้ อี เอ็ม ความเข้มข้น 100% จึงจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อนี้ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผศ. สรรเพชญ อังกิติตระกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *S. enteritidis* เพื่อใช้ในการทดลอง และสุดท้ายขอขอบคุณ รศ. ดร. จริยา ชมวารินทร์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

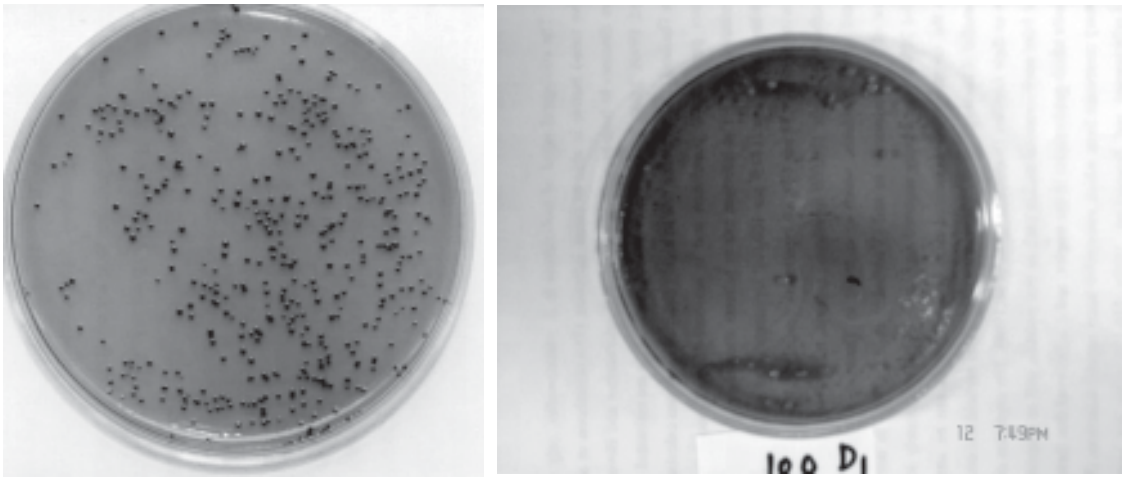
คลินิกเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครราชสีมา. 2006. **การทำปุ๋ยชีวภาพ และการประยุกต์ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ.** (สืบค้นวันที่ 6 มีนาคม 2549) สืบค้นจาก: URL: http://science.rin.ac.th/clinictech/em/em.html

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ ทิพา ตันติเจริญยศ และอิงอร สาธุวงษ์. 2541. การดื้อยาของเชื้อซัลโมเนลลาและอี โคลัยในอาหารสัตว์. **สัตวแพทยสาร** 49(1-3): 11-23.

สุมาลี บุญมา อรุณ บ่างตระกูลนนท์ นพรัตน์ หมานริม มยุรา กุสุมภ์ และอดิศักดิ์ ศักดิ์สิทธิ์วัฒนะ. 2543. การตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อวัวสดโดยวิธี Standard Conventional และ MSRV. ใน: **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 22.** หน้า 218-219. กรุงเทพฯ: สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.

อินทิรา กระหม่อมทอง วารี นิยมธรรม เดชฤทธิ์ นิลอุบล ณุวีร์ ประภัสระกุล และอิงอร สาธุวาษ์. 2543. ซัลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม และเชื้อซัลโมเนลลาอื่น ๆ ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์โดยการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อสองชุด. **วารสารสัตวแพทย์** 10(3): 1-12.

Lin, D. 1998. **Microbiology.** 2ed ed. New York: McGraw-Hill.



A **B**

รูปที่ 1 A โคโลนี สีดำขอบสีเขียวของเชื้อซัลโมเนลลาบน Hektoen Enteric agar และ B ผลการตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างที่ใช้ อี เอ็ม

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ของ อี เอ็ม 3 ยี่ห้อ

อี เอ็ม	จำนวนโคโลนี		
Dilution	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}
1. EM-N	79	< 30	-
2. EM-Q	> 300	> 300	82
3. EX-M	> 300	128	-

ตารางที่ 2 ผลการวัด pH ของ อี เอ็ม ที่คัดเลือกมาศึกษา (EM-Q)

อี เอ็ม (%)	pH				
ชั่วโมงที่	0	1	3	6	24
0	6.49	6.31	6.27	6.60	6.95
0.1	4.96	5.01	5.29	4.94	5.36
0.5	4.44	4.42	4.37	4.31	4.78
1.0	4.12	4.12	4.07	4.06	4.45
5.0	3.69	3.69	3.66	3.68	4.07
10.0	3.63	3.58	3.58	3.59	3.99
20.0	3.53	3.52	3.50	3.54	3.92
50.0	3.45	3.44	3.43	3.44	3.85
100.0	3.42	3.41	3.38	3.42	3.81

pH เฉลี่ยที่ 0.5% = 4.46

ตารางที่ 3 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีเชื้อ *S. enteritidis*

อี เอ็ม (%)	จำนวนโคโลนี				
ชั่วโมงที่	0	1	3	6	24
0	39	13	28	55	49
0.1	55	9	13	37	17
0.5	8	–	–	–	–
1.0	11	–	–	–	–
5.0	5	–	–	–	–
10.0	2	–	–	–	–
20.0	–	–	–	–	–
50.0	–	–	–	–	–
100.0	–	–	–	–	–

– = ตรวจไม่พบโคโลนี

ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาเชื้อ *S. enteritidis* ที่ปนเปื้อนในอุจจาระไก่

อี เอ็ม (%)	ผลการตรวจพบเชื้อ							
ชั่วโมงที่	0	0:30	1	3	6	24	48	72
0	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	–	–	–	–	–	–	–

+ = พบเชื้อ – = ไม่พบเชื้อ