

การปนเปื้อนเชื้อ *Escherichia coli* Miguli และ *Salmonella* spp. ในดิน
และผักที่ปลูกโดยใช้มูลวัวหมักและไม่หมัก

Contamination of *Escherichia coli* Miguli and *Salmonella* spp. in Soils and
Vegetables Planting by Application of Composted and Non-composted Cow Manures

ปิยะมาศ โสมภีร์^{1/2/3/}

อรรวรรณ ฉัตรสิริรุ่ง^{1/2/}

สมพร ชุนท์ลือชานนท์^{1/2/}

Piyamat Somphree^{1/2/3/}

Arawan Shutsrirung^{1/2/}

Somporn Choonluchanon^{1/2/}

ABSTRACT

Mostly, contamination of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., always expose when using non-composted cow manure as organic fertilizer for growing vegetables. However, composting the manure for at least 98 days is enable to either decrease or decontaminate these microbes. This research was aimed to compare the contamination of *E. coli* and *Salmonella* spp. in soil and plants by application of composted and non-composted cow manures. This experiment was designed as a split plot with 3 replications where main plots were kind of vegetables namely asparagus, kale, coriander, stink weed, and peppermint, while the subplots were the kind of fertilizer (composted cow manure, non-composted cow manure and without manure). Research work was carried out at Mae Hai Agricultural Research Station and Training Centre, Chiang Mai University during January-April 2010. Soil from each treatment was periodically sampled at 7, 21, 35 and 49 days after planting, while sampling of vegetables was done once at 49 days for determination of *E. coli* and *Salmonella* spp. Application of composted cow manure did not show any contamination of *E. coli* in either soil or vegetable samples, except that of asparagus growing soil at 49 days. On the other hand, using of non-composted manure

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมืองฯ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Mueang district, Chiang Mai province 50200

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Centre of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

^{3/} สำนักงานวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร อ.สรพยา จ.ชัยนาท 17150

Office of Agricultural Research and Development Region 5, Department of Agriculture, Sapphaya district, Chai Nat province 17150

resulted in contamination of both *E. coli* in all soils (3.29-4.93 log MPN/g) and asparagus, kale, coriander and stink weed at 2.78, 3.11, 4.38 and 2.78 log MPN/g, respectively with the exception of peppermint. Contamination of *Salmonella* spp. in soils of all treatments was fluctuated upon sampling period. However, most of vegetables fertilized by non-composted cow manure were contaminated with *Salmonella*, except peppermint, but the contamination was not found in those using of composted cow manure. This finding ensures that the application of composted cow manure could effectively decrease the possibility of contamination *E. coli* and *Salmonella* spp. in farmed vegetables.

Key words: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., cow manure, vegetables

บทคัดย่อ

การใช้มูลวัวเป็นปุ๋ยอินทรีย์ในการปลูกผัก ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. แต่เมื่อหมักมูลวัวเป็นเวลา 98 วัน ทำให้ไม่พบเชื้อทั้งสองชนิดนี้ไปหรือลดลงได้ จึงทำการเปรียบเทียบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในดินและพืชผักที่มีการใช้มูลวัวหมักและ

ไม่หมัก เพื่อประเมินการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิด โดยทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยสาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหิยะ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน พ.ศ. 2553 โดยวางแผนการทดลองแบบ split plot ซึ่งมีปัจจัยหลักเป็นชนิดของผักคือ หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทย ผักชีฝรั่งและสะระแหน่ ส่วนปัจจัยรองคือ การไม่ใส่มูลวัว (กรรมวิธีควบคุม) การใส่มูลวัวหมักและไม่หมัก การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ และทำสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ระยะ 7 21 35 และ 49 วันหลังปลูก ส่วนตัวอย่างผักเก็บที่ระยะสุดท้ายเพียงครั้งเดียวคือที่ 49 วัน พบว่าการใส่มูลวัวหมักทำให้ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างดินปลูก และตัวอย่างผักทั้ง 5 ชนิดของทุกระยะที่สุ่มตรวจ ยกเว้นที่ 49 วัน ที่พบการปนเปื้อน *E. coli* ในทุกระยะวิธีของดินปลูก หน่อไม้ฝรั่ง แต่การใส่มูลวัวที่ไม่หมักพบว่าการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดในตัวอย่างดินปลูกผักทุกแปลงทดลอง ระหว่าง 3.29-4.93 log MPN/g และพบการปนเปื้อนในตัวอย่างผัก 4 ชนิด คือ หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทยและผักชีฝรั่ง ที่ 2.78 3.11 4.38 และ 2.78 log MPN/g ตามลำดับ ยกเว้นสะระแหน่ สำหรับการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. พบว่าการปนเปื้อนในดินปลูกผักทุกชนิดของทุกระยะวิธีในบางระยะของการเก็บตัวอย่าง แต่ในตัวอย่างผักมีการปนเปื้อนเฉพาะผักในแปลงทดลองที่ใส่มูลวัวไม่หมักเท่านั้น ยกเว้นสะระแหน่ที่ไม่พบการปนเปื้อนในทุกกรรมวิธี ดังนั้นการนำมูลวัวมาหมักก่อนนำมาใช้ในการปลูกผักสามารถช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อ

ก่อโรคทั้งสองชนิดนี้ได้

คำหลัก: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.,
มูลวัวหมัก ผัก

คำนำ

Escherichia coli Miguli และ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียสาเหตุของโรคระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง และวิงเวียนศีรษะ ถ้าเป็นสายพันธุ์รุนแรงอาจทำให้เสียชีวิตได้ (Feng et al., 2002; Walters et al., 2007) โดยทั่วไปพบในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เชื้อทั้งสองชนิดนี้แพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมโดยการปนเปื้อนออกมากับอุจจาระ ซึ่งถ้านำอุจจาระหรือมูลสัตว์ไปใช้เป็นวัสดุปรับปรุงบำรุงดิน อาจทำให้ผลผลิตทางการเกษตรปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้ได้ มูลวัวเป็นวัสดุที่เกษตรกรนิยมใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ เพราะเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาไม่แพง และเหมาะแก่การใช้บำรุงดินในการปลูกพืช โดยเฉพาะการปลูกผัก วิธีใช้มูลวัวของเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ในลักษณะมูลวัวแห้ง จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตมีเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมากน้อยแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสถานที่ปลูกและชนิดของพืช พืชที่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนที่สัมผัสกับดิน เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) ผักชีไทย (*Coriandrum sativa* L.) ผักชีฝรั่ง (*Eryngium foetidum* L.) และ สะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.) เป็นต้น

พืชผักเหล่านี้มีการส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยเฉพาะสหภาพยุโรป ซึ่งหลายครั้งที่ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ในปริมาณที่ไม่สามารถยอมรับได้ ทำให้พืชผักเหล่านั้นต้องถูกทำลาย และสั่งห้ามนำเข้า ส่งผลให้สูญเสียรายได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี กรมการค้าต่างประเทศจึงได้มีประกาศว่า ผักที่จะส่งออกไปยังสหภาพยุโรป ต้องมีหนังสือรับรองการส่งออกจากกรมวิชาการเกษตร โดยผักที่จะส่งออกมี *E. coli* ปนเปื้อนได้น้อยกว่า 100 CFU (cfu/g) และต้องไม่พบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง 25 ก. (นิรนาม. 2550) การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ไม่มีเฉพาะการปลูกพืชในประเทศไทยเท่านั้น ในต่างประเทศก็มีรายงานการพบเชื้อนี้ในผัก และในดินที่ใช้มูลสัตว์เป็นปุ๋ยอินทรีย์ด้วยเช่นกัน (Islam et al., 2004a,b) แต่จากการศึกษาของนักวิจัยหลายคน พบว่าการหมักมูลสัตว์ก่อนนำไปใช้ สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคได้ จากผลของปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น ความร้อน การระเหยของก๊าซแอมโมเนีย การเพิ่มขึ้นของค่าการนำไฟฟ้า เป็นต้น มีผลทำให้เชื้อโรคที่ติดมากับมูลสัตว์ตายได้ (Kudva et al., 1998; Tumer, 2002; You et al., 2006) รวมทั้งจากรายงานของ Johannessen และคณะ (2005) ที่ไม่พบการปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 หลังจากหมักมูลวัวนาน 50 วัน

ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองผลของการใช้มูลวัวที่หมัก จนกระทั่งไม่พบเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. เปรียบเทียบกับการใช้มูลวัว

แห้งที่ไม่มีการหมักในสภาพแปลงทดลอง เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองชนิดทั้งในพืชผัก และดินที่ใช้ปลูกพืช เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการลดการปนเปื้อนของเชือดังกล่าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและผู้บริโภคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ split plot โดยปัจจัยหลัก คือชนิดของผัก ประกอบด้วย หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า (*Brassica alboglabra* Bailey) ผักชีไทย ผักชีฝรั่งและสะระแหน่ ส่วนปัจจัยรอง คือ การใส่มูลวัวหมัก (composted cow manure) การใส่มูลวัวแห้งที่ไม่มีการหมัก (non-composted cow manure) และการไม่ใส่มูลวัว โดยมูลวัวทั้งที่หมักและไม่หมักใส่ในอัตรา 2 กก./ตร.ม. มีการใส่ปุ๋ยเคมีเพิ่มเติมในระยะต่างๆ ของพืชแต่ละชนิดตามสูตรและอัตราที่แนะนำ (ดารารวรรณ, 2552; นิรนาม, 2553) ยกเว้นกรรมวิธีที่ไม่ใส่มูลวัว ดำเนินการทดลอง ณ ศูนย์วิจัยสาริตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม - เมษายน พ.ศ. 2553 โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ระยะ 7 21 35 และ 49 วัน ส่วนตัวอย่างผักสุ่มเก็บที่ระยะสุดท้ายเพียงครั้งเดียวที่ 49 วัน ก่อนการทดลองนำตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำที่ใช้สำหรับรดผักมาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. รวมถึงมูลวัวหมักนาน 140 วัน จากการทดลองของปิยะมาศและคณะ (2554) รวมถึงตัวอย่างมูลวัวที่ไม่หมักด้วย โดยทำ

ตามวิธี BAM (Bacteriological analytical manual online, BAM) (Feng et al., 2002) (ข้อ 3 และ 4) ซึ่งไม่พบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดในมูลวัวหมัก ส่วนมูลวัวที่ไม่หมักมีการปนเปื้อน *Salmonella* spp. และมีการปนเปื้อน *E. coli* ที่ 6.32 log MPN/g

2. การปลูกผัก 5 ชนิด

2.1 หน่อไม้ฝรั่ง ใช้กล้าหน่อไม้ฝรั่งอายุ 5 เดือนปลูกลงบนแปลงปลูกขนาด 0.5x5 ม. ระยะปลูก 0.5x0.5 ม. รักษาความชื้นโดยใช้เปลือกเมล็ดกาแฟคลุมแปลงปลูก เมื่อย้ายปลูกได้ 15 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 21-0-0 ($N-P_2O_5-K_2O$) อัตรา 15 ก./หลุม หลังจากนั้นใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ($N-P_2O_5-K_2O$) อัตรา 15 ก./หลุม (นิรนาม, 2553) ในกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวทั้งที่หมักและไม่หมัก หลังจากลงปลูกได้ 30 วัน

2.2 คะน้า แซ่เมล็ดในน้ำก่อนหนึ่งคืน แล้วจึงนำลงปลูกในแปลงขนาด 1x5 ม. ระยะปลูก 15x15 ซม. โดยหยอดเมล็ดลงในหลุม แล้วกลบด้วยดิน เมื่อคะน้าแตกใบจริงประมาณ 2-3 ใบ ให้ทำการถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น เมื่อผักคะน้ามีอายุ 20 และ 30 วัน ในกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวทั้งที่หมักและไม่หมักใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-8-8 ($N-P_2O_5-K_2O$) อัตรา 100 กก./ไร่ (นิรนาม, 2553)

2.3 ผักชีไทย นำเมล็ดมาทำให้แตกเป็นสองซีก แช่น้ำประมาณ 2-3 ชม. ผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำไปคลุกเคล้ากับทรายหรือดินแห้ง จากนั้นหว่านเมล็ดลงบนแปลงปลูกขนาด 1x5 ม. ให้ทั่ว

แปลง ในกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวหมักและไม่หมัก เมื่อผักชีไทยมีอายุ 20 วัน ทำการใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 21-0-0 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) อัตรา 15 กก./น้ำ 20 ลิตร/ตร.ม. โดยการฉีดพ่น (นิรนาม, 2553)

2.4 ผักชีฝรั่ง นำต้นพันธุ์มาตัดใบยอดออกให้เหลือความยาวประมาณ 10 ซม. จากนั้นนำมาปักชำลงบนแปลงปลูก ขนาด 1x5 ม. ระยะปลูก 12x12 ซม. คลุมฟางข้าวเพื่อรักษาความชื้นและพรางแสงด้วยพลาสติกพรางแสง 80% เมื่อผักชีไทยมีอายุ 15 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 20-20-0 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) ผสมกับสูตร 46-0-0 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) อัตรา 50 กก./ไร่ (ดราวรรณ, 2552) สำหรับกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวทั้งที่หมักและไม่หมัก เมื่อผักอายุ 1 เดือน นำพลาสติกพรางแสงออกเพื่อให้ได้รับแสงเต็มที่

2.5 สะระแหน่ ตัดกิ่งสะระแหน่ให้มีความยาวประมาณ 10 ซม. เด็ดเอาใบและยอดอ่อนออกก่อนชำลงในกระบะเพาะนาน 1 เดือน ย้ายปลูกลงในแปลงขนาด 1x5 ม. ระยะปลูก 10x10 ซม. รักษาความชื้นโดยคลุมแปลงด้วยฟางข้าว และพรางแสงด้วยพลาสติกพรางแสง 80% สำหรับกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวหมักและไม่หมัก ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 21-0-0 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) อัตรา 10 กก./ไร่ เมื่อผักอายุ 20 วัน (นิรนาม, 2553) และเมื่อผักอายุ 1 เดือน นำพลาสติกพรางแสงออกเพื่อให้ได้รับแสงเต็มที่

2.6 การเก็บตัวอย่างดินและผัก

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ระยะหลังปลูก 7 21 35 และ 49 วัน โดยสุ่มเก็บดินบริเวณรอบต้นผัก (1 ต้น เก็บ 2 จุด) รวมกับดิน

ระหว่างต้นให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กก. คลุกเคล้าให้เข้ากัน ส่วนตัวอย่างผักเก็บเกี่ยวเฉพาะระยะสุดท้ายที่ 49 วันเท่านั้น โดยผักแต่ละชนิดเก็บเกี่ยวลักษณะเดียวกับที่ขายในท้องตลาดดังนี้ คือหน่อไม้ฝรั่งเก็บโดยการดึงขึ้นมาทั้งหน่อคะน้า เก็บเฉพาะส่วนเหนือดิน (โดยใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัด) ผักชีไทยและผักชีฝรั่ง ถอนมาทั้งต้นและราก ส่วนสะระแหน่ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดให้มีความยาวจากปลายยอดประมาณ 12 ซม. ตัวอย่างผักที่เก็บมาไม่มีการล้างทำความสะอาดก่อนการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp.

3. การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างดินและผัก

นำตัวอย่างดินและผักที่สุ่มเก็บในแต่ละระยะมาหาปริมาณเชื้อ *E. coli* ตามวิธีของ BAM (Feng et al., 2002) ซึ่งเป็นเทคนิค Most probable number (MPN) โดยตัวอย่างผักตัดด้วยกรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีขนาดเล็กประมาณ 1 ซม. สำหรับตัวอย่างดินนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากันโดยไม่ต้องทำให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำตัวอย่างทั้งสองชนิดมาอย่างละ 50 ก. ใส่ลงใน butterfield's phosphate-buffered (BPB) 450 มล. โดยใส่ลงในถุง stomacher (Bibby Sterilin, Staffs, UK) ขนาด 17.8x30.5 ซม. นำไปเขย่า (ซ้าย-ขวา) ด้วยเครื่องเขย่า (Yumato shakerSA31, Japan) ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการเจือจางสารละลายให้ได้เป็น 10^{-2} และ 10^{-3} แล้วนำแต่ละระดับการ

เจือจาง 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate tryptose broth (LST) (Merck, Darmstadt, Germany) 10 มล. โดยภายในหลอดอาหารมีหลอดดักก๊าซใสอยู่ด้วย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. เป็นเวลา $24-48 \pm 2$ ชม. ตรวจสอบการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ จากนั้นนำสารละลายจากหลอดที่เกิดก๊าซใน LST ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร *E. coli* broth (EC) (Merck, Darmstadt, Germany) 8 มล. ซึ่งมีหลอดดักก๊าซอยู่ภายในเช่นเดียวกัน บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 45.5°C . เป็นเวลา $24-48 \pm 2$ ชม. ตรวจสอบการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ยืนยันผลของเชื้อจากหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้น โดยขีด (streak) บนอาหาร Levine's eosin-methylene blue agar (L-EMB) (Merck, Darmstadt, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C . เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ซึ่งมีสีดำอาจมีหรือไม่มีสีโลหะมันวาว (metallic sheen)

4. การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ตัวอย่างดินและผัก

การตรวจสอบการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ดัดแปลงวิธีของ Andrews และ Hammack (2007) โดยชั่งตัวอย่างดินและผักอย่างละ 25 ก. ใส่ลงใน Trypticasein soy broth (TSB) (Lab-scan, Bangkok, Thailand) ที่มีปริมาตร 225 มล. นำไปเขย่าเช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* นำสารละลายที่ได้ 1 มล. ใส่ใน Tetrathionate broth (TT) (Merck, Darmstadt, Germany) 10 มล. และ

อีก 0.1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport และ Vassiliadis broth (RV) (Merck, Darmstadt, Germany) ที่ 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ $42 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. เมื่อครบกำหนดใช้หลอดเชื้อแต่ละลงในอาหารทั้งสองชนิด ขีดลงบนอาหาร Bismuth sulfite agar (BS) (Lab-scan, Bangkok, Thailand), Hektoe enteric agar (HE) (Lab-scan, Bangkok, Thailand) และ Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (Merck, Darmstadt, Germany) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C . เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหาร BS มีสีน้ำตาลสีเทาหรือสีดำ บางครั้งอาจมีสีโลหะมันวาว ส่วนลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหาร HE มีสีเขียวแกมน้ำเงินหรือน้ำเงิน อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง หรือมีสีดำทั้งโคโลนี และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร XLD มีสีชมพู อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง หรือมีสีดำทั้งโคโลนี

5. การเปรียบเทียบทางสถิติ

นำข้อมูลปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ประมาณการได้จากการประเมินแบบ MPN /g ซึ่งคำนวณให้อยู่ในรูปของ $\log_{10}$ MPN/g จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาประมวลผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม statistix 8.0 (Tallahassee, FL, USA) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้การทดสอบ analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีด้วย Least significant

difference (LSD)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในดินและผัก

ในดินที่ใช้ปลูกผักทั้ง 5 ชนิดคือ หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทย ผักชีฝรั่งและสะระแหน่ ที่ระยะ 7 21 35 และ 49 วัน พบว่าดินที่ใส่มูลวัวที่ไม่หมักมีการปนเปื้อนเชื้อในปริมาณ 3.55–4.46 3.64–4.62 4.06–4.93 และ 3.29–4.69 log MPN/g ตามลำดับ (Tables 1, 2, 3 and 4) แต่ในดินที่ใส่มูลวัวหมัก และดินในแปลงที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยมูลวัว ไม่ปรากฏว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *E.*

Table 1. Quantity (MPN/g) of *E. coli* contaminated in soil incorporated by composted and non-composted cow manures at 7 days after planting.

Kind of vegetable	Application of cow manure			Mean
	Control	CCM	NCCM	
Asparagus	0.00 a	0.00 a	3.55 a	1.18
Kale	0.00 a	0.00 a	3.89 b	1.30
Coriander	0.00 a	0.00 a	3.56 a	1.19
Stink weed	0.00 a	0.00 a	4.46 c	1.49
Peppermint	0.00 a	0.00 a	3.55 a	1.18
Mean	0.00	0.00	3.80	1.27
CV(%)	13.62			

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure

coli ยกเว้นในดินปลูกหน่อไม้ฝรั่งมีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในปริมาณ 3.57 log MPN/g ในกรรมวิธีควบคุม และ 3.14 log MPN/g ในกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวหมักหลังจากปลูกพืชเป็นเวลา 49 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการกระจายของเชื้อจากแปลงข้างเคียงเพราะการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองแบบเปิดซึ่งมีแนวโน้มนที่เชื้อ *E. coli* อาจแพร่ซึมเข้าไปได้ แต่ก็ไม่มีผลต่อการปนเปื้อนในต้นหน่อไม้ฝรั่ง ส่วนดินที่ปลูกผักอีก 4 ชนิดคือ คะน้า ผักชีไทย ผักชีฝรั่งและสะระแหน่ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในระยะนี้ ซึ่งเป็นระยะเก็บเกี่ยว แต่อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างผักใน

Table 2. Quantity (MPN/g) of *E. coli* contaminated in soil which applied by composted and non-composted cow manures at 21 days after planting.

Type of vegetables	Application of cow manure			Mean
	Control	CCM	NCCM	
Asparagus	0.00 a	0.00 a	4.50 c	1.35
Kale	0.00 a	0.00 a	4.30 ab	1.43
Coriander	0.00 a	0.00 a	3.64 a	1.21
Stink weed	0.00 a	0.00 a	3.92 bc	1.31
Peppermint	0.00 a	0.00 a	4.62 c	1.54
Mean	0.00	0.00	4.11	1.37
CV(%)	18.25			

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure

Table 3. Quantity (MPN/g) of *E. coli* contaminated in soil which applied by composted and non-composted cow manures at 35 days after planting.

Kind of vegetable	Application of cow manure			Mean
	Control	CCM	NCCM	
Asparagus	0.00 a	0.00 a	4.55 b	1.18
Kale	0.00 a	0.00 a	4.45 b	1.30
Coriander	0.00 a	0.00 a	4.93 c	1.19
Stink weed	0.00 a	0.00 a	4.44 b	1.49
Peppermint	0.00 a	0.00 a	4.06 a	1.18
Mean	0.00	0.00	4.49	1.27
CV(%)	12.04			

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure

ระยะเก็บเกี่ยวไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในกรรมวิธีที่ใช้มูลวัวหมัก และกรรมวิธีควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหน่อไม้ฝรั่ง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าดินมีการปนเปื้อนหลังจากหน่อไม้ฝรั่งเจริญพันธุ์ดินสูงมากแล้ว ส่วนตัวอย่างผักที่ปลูกในดินที่ใส่มูลวัวที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทยและผักชีฝรั่ง ในปริมาณ 2.78 3.11 4.38 และ 2.79 log MPN/g ตามลำดับ ยกเว้นสระแหม่งที่ไม่พบการปนเปื้อน (Table 5) ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการเก็บเกี่ยว เพราะผักชนิดนี้ต้องเก็บเกี่ยวเฉพาะปลายยอดที่ยาวประมาณ 12 ซม. เท่านั้น หรืออาจเป็นเพราะผักมีสารประกอบ

Table 4. Quantity (MPN/g) of *E. coli* contaminated in soil which applied by composted and non-composted cow manures at 49 days after planting.

Kind of vegetables	Application of cow manure			Mean
	Control	CCM	NCCM	
Asparagus	3.57 c	3.14 d	4.62 c	1.18
Kale	0.00 e	0.00 e	4.25 b	1.30
Coriander	0.00 e	0.00 e	4.45 ab	1.19
Stink weed	0.00 e	0.00 e	4.69 ac	1.49
Peppermint	0.00 e	0.00 e	3.29 a	1.18
Mean	0.71	0.63	4.26	1.27
CV(%)	8.52			

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure

ฟีนอลิก (phenolic compound) สูง ซึ่งสารประกอบชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดได้ (Elnima *et al.*, 1983; Zohri *et al.*, 1995; Sofos *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2005).

2. การปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในดินและผัก

ตัวอย่างดินในแปลงปลูกผักทั้ง 5 ชนิด มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. แปรปรวนในแต่ละระยะของการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อ คือที่ระยะ 7 วัน มีการปนเปื้อนในดินที่ปลูกผักทุกชนิด (Table 6) หลังจากนั้นการปนเปื้อน

ของเชื้อลดน้อยลงโดยไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ในดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและดินที่ใส่มูลวัวหมักแล้วปลูกผักบางชนิด แต่ดินที่ใส่มูลวัวไม่หมัก มีการปนเปื้อนในดินที่ปลูกผักทุกชนิดทั้งในระยะ 21, 35 และ 49 วัน (Tables 7, 8, 9) สาเหตุที่ยังมีการตรวจพบเชื้อในดินในแปลงที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและใส่มูลวัวหมักเป็นบางระยะนั้นอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนมากับน้ำที่ใช้รดผักเป็นแต่มีจำนวนน้อย เมื่อดินแห้งและอุณหภูมิสูงขึ้น เชื้อไม่สามารถทนอยู่ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Zibilske และ Weaver (1978) ที่ว่าเชื้อ *Salmonella* spp. ไม่สามารถทนอยู่ได้ในดินแห้งที่มีอุณหภูมิ 39°C. และรายงานของ Katia และ

Table 5. Quantity (MPN/g) of *E. coli* contaminated in plants which applied by composted and non-composted cow manures.

Kind of vegetable	Application of cow manure			Mean
	Control	CCM	NCCM	
Asparagus	0.00 a	0.00 a	2.78 b	0.93
Kale	0.00 a	0.00 a	3.11 c	1.04
Coriander	0.00 a	0.00 a	4.38 a	1.46
Stink weed	0.00 a	0.00 a	2.78 b	0.93
Peppermint	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00
Mean	0.00	0.00	2.61	0.87
CV(%)	0.59			

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure

Table 6. Detection of *Salmonella* spp. contaminated in soil which applied by composted and non-composted cow manures at 7 days after planting.

Kind of vegetable	Application of cow manure		
	Control	CCM	NCCM
Asparagus	+	+	+
Kale	+	+	+
Coriander	+	+	+
Stink weed	+	+	+
Peppermint	+	+	+

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure.

+ = *Salmonella* spp. was found

- = *Salmonella* spp. was not found

Table 7. Detection of *Salmonella* spp. contaminated in soil which applied by composted cow manure and non-composted cow manure at 21 days after planting.

Kind of vegetable	Application of cow manure		
	Control	CCM	NCCM
Asparagus	+	+	+
Kale	+	+	+
Coriander	+	+	+
Stink weed	-	-	+
Peppermint	-	-	+

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure

+ = *Salmonella* spp. was found

- = *Salmonella* spp. was not found

Table 8. Detection of *Salmonella* spp. contaminated in soil which applied by composted and non-composted cow manures at 35 days after planting.

Kind of vegetable	Application of cow manure		
	Control	CCM	NCCM
Asparagus	-	+	+
Kale	-	+	+
Coriander	-	-	+
Stink weed	-	+	+
Peppermint	-	-	+

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure.

+ = *Salmonella* spp. was found

- = *Salmonella* spp. was not found

Table 9. Detection of *Salmonella* spp. contaminated in soil which applied by composted cow manure and non-composted cow manure at 49 days after planting.

Kind of vegetable	Application of cow manure		
	Control	CCM	NCCM
Asparagus	+	+	+
Kale	+	+	+
Coriander	+	-	+
Stink weed	-	+	+
Peppermint	+	+	+

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure.

+ = *Salmonella* spp. was found

- = *Salmonella* spp. was not found

Table 10. Detection of *Salmonella* spp. contaminated in plant which applied by composted and non-composted cow manures.

Kind of vegetable	Application of cow manure		
	Control	CCM	NCCM
Asparagus	-	-	+
Kale	-	-	+
Coriander	+	-	+
Stink weed	-	-	+
Peppermint	-	-	-

CCM = composted cow manure

NCCM = non-composted cow manure.

+ = *Salmonella* spp. was found

- = *Salmonella* spp. was not found

คณะ (2006) พบว่าเชื้อชนิดนี้ในมูลสุกร ถ้าให้อยู่ในอุณหภูมิ 37°ซ. เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระยะเวลา 0.9 - 1.4 วัน เท่านั้น แต่ในดินที่ใส่มูลวัวไม่หมักยังพบ *Salmonella* spp. ได้ในทุกระยะของการตรวจหาเชื้อ อาจเป็นเพราะมีปริมาณเชื้อมากในระยะเริ่มต้นที่ใส่มูลวัวลงในดินก่อนการปลูกพืช เนื่องจากการแสดงผลของปริมาณเชื้อเป็นการแสดงผลว่าพบหรือไม่พบเชื้อเท่านั้น ไม่ได้ระบุเป็นจำนวนหน่วย จึงสามารถพบเชื้อได้หากในดินมีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมาก

สำหรับผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างผัก พบว่าการใส่มูลวัวไม่หมักทำให้เกิดการปนเปื้อนกับผักทุกชนิด แต่การใส่มูลวัวหมักไม่พบการปนเปื้อนในผักทุกชนิด ส่วนแปลงที่ไม่ใส่มูลวัวยังมีการพบการปนเปื้อนอยู่บ้าง โดยเฉพาะในผักชีไทย

(Table 10) แสดงว่าการหมักมูลวัวก่อนใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์สามารถลดการปนเปื้อนในตัวอย่างดินและทำให้ไม่เกิดการปนเปื้อนในตัวอย่างผักด้วย เนื่องจากกระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมีและกายภาพของมูลวัว จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ ทั้งในกลุ่มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) ที่อุณหภูมิระหว่าง 10 °-45 °ซ. และอีกกลุ่มหนึ่งที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูง (thermophilic) พวกนี้จะเจริญได้ในอุณหภูมิช่วง 45 °-70 °ซ. (ฉัตรชัย, 2553) ทำให้ในระหว่างการหมักมูลวัวมีอุณหภูมิสูง นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบอื่น ได้แก่ การลดลงของค่า pH ในกระบวนการหมัก และการระเหยของแอมโมเนีย ซึ่งเกิดการปลดปล่อย H⁺ จากกิจกรรมของจุลินทรีย์พวกตรึงไนโตรเจน (nitrifying bacteria) ตลอดจนการระเหยของกรดอะซิติก (acetic acid) กรดแลคติก (lactic acid) แอลกอฮอล์ (alcohol) คีโตน (ketone) อัลดีไฮด์ (aldehydes) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีผลโดยตรงต่อการอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนในมูลสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะอุณหภูมิสูง ซึ่งอุณหภูมิที่ *E. coli* สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 6.5 °- 49.4 °ซ. ส่วน *Salmonella* spp. สามารถเจริญได้ที่ 5.2 °- 46.2 °ซ. (Petric and Selimbasic, 2008; Erickson et al., 2009; Wacharasukrwn et al., 2009; Anon, 2010 a, b) ซึ่งจากการทดลองการหมักมูลวัวของปิยะมาศและคณะ (2554) พบว่ามีอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 60.3 °ซ.

แต่อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองชนิดในตัวอย่างผักทั้ง 5 ชนิด พบว่ามีการปนเปื้อนในผักจากกรรมวิธีที่ใส่มูลวัวไม่หมักเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นสาระแนที่ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดในทุกกรรมวิธี เนื่องจากลักษณะการเก็บเกี่ยวที่ต่างจากผักชนิดอื่นๆ โดยการเก็บสาระแนเก็บเฉพาะส่วนของยอดเท่านั้น ทำให้มีการปนเปื้อนน้อยกว่าหรือไม่ปนเปื้อนเลย ซึ่งต่างจากผักชนิดอื่น เช่น ผักชีไทยและผักชีฝรั่ง ที่มีลักษณะการเก็บเกี่ยวโดยถอนทั้งต้นและราก ดังนั้นแสดงว่าลักษณะของการเก็บเกี่ยวของผักแต่ละชนิดที่ต่างกัน ทำให้โอกาสเกิดการปนเปื้อนต่างกันด้วย ตลอดจนชิ้นส่วนของพืชที่นำมารับประทานถ้าเป็นส่วนหัวหรือรากมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อโรคได้มากกว่าผักที่รับประทานส่วนของเมล็ดหรือผัก ที่มีเปลือกห่อหุ้ม (Burnett and Beuchat, 2001) ส่วนการใส่มูลวัวที่ไม่หมักทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในหน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทยและผักชีฝรั่ง ในปริมาณที่เกินมาตรฐานการส่งออกที่กำหนดไว้ว่าตัวอย่างผักสดที่ส่งออกควรพบเชื้อ *E. coli* น้อยกว่า 100 CFU /g หรือ 2 log CFU/g ส่วน *Salmonella* spp. ต้องตรวจไม่พบในตัวอย่าง 25 ก. (นิรนาม, 2550) ถึงแม้จะมีหน่วยที่ไม่ตรงกันระหว่าง MPN/g กับ CFU/g เนื่องจากหน่วย MPN เป็นการหาปริมาณโดยประมาณ จากการคำนวณทางสถิติที่มีค่าอยู่ระหว่างความเป็นไปได้ของค่าสูงสุด (upper limit) และค่าต่ำสุด (lower limit) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Feng et al., 2002)

ขณะที่หน่วย CFU/g เกิดจากการนับปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตที่มีการเจริญรวมกันเป็นกลุ่มที่เรียกว่า โคโลนี (colony) โดยวิธี plate count technique ส่วนใหญ่ค่าที่ได้จากหน่วย MPN/g มากกว่าจากหน่วย CFU/g เนื่องจากการแยกเชื้อโดยวิธีการทำสารละลาย ไม่สามารถทำให้ทุกเซลล์แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวได้ทั้งหมด ดังนั้นบางโคโลนีที่ปรากฏขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงอาจจะเกิดจากเซลล์มากกว่าหนึ่งเซลล์ก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปสามารถนำมาใช้กับการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* ได้เช่นเดียวกัน (Gronewold and Wolpert, 2008; Cho et al., 2010) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Weaver and Frederick, 1972; Hunsinger et al., 2005) ดังนั้นแสดงว่าไม่ว่าจะใช้วิธีการตรวจสอบแบบ MPN หรือการนับโคโลนีจากตัวอย่างของการทดลองนี้ การใช้มูลวัวไม่หมักทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคทั้งสองชนิดในปริมาณที่เกินมาตรฐานการส่งออก

สรุปผลการทดลอง

การใช้มูลวัวที่ผ่านกระบวนการหมักโดยสมบูรณ์แล้วเป็นปุ๋ยอินทรีย์ ในการปลูกหน่อไม้ฝรั่ง คენา ผักชีไทย ผักชีฝรั่งและสะระแหน่ สามารถช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ทั้งในดินปลูกและตัวอย่างผักได้ มากกว่าการใช้มูลวัวที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ดังนั้นการใช้มูลวัวหมักกับการปลูกผักจึงสามารถช่วยให้ได้ผลผลิตที่ปลอดภัยจากการปน

เปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดนี้ และผลจากการทดลองนี้จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่เกษตรกรควรต้องหมักมูลสัตว์ก่อนนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- ฉัตรชัย จันทรเด่นดวง. 2553. *การทำปุ๋ยหมัก*. <http://www.vcharkarn.com.vaaarticle/38803,11/6/2553>.
- ดาราวรรณ ทวีศักดิ์บรรกุล. 2552. *ผักชีฝรั่ง*. <http://www.doae.go.th/library/html/2549/1809/Apiaceae/index.htm,25/12/2552>.
- นิรนาม. 2550. กรมการค้าต่างประเทศ. ประกาศการค้าต่างประเทศ เรื่องกำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ที่ต้องมีหนังสือรับรองในการส่งออก พ.ศ. 2550. *ราชกิจจานุเบกษา* : 124 ตอนพิเศษ (55 ง.) : 22-24.
- นิรนาม. 2553. *การปลูกผัก*. <http://www.Rabankerd.com,19/6/2010>.
- ปิยะมาศ โสมภีร์ อรรวรรณ ฉัตรสิริรุ่ง และสมพร ชุนห์ลือชานนท์. 2554. ผลของการหมักวัสดุรองพื้นคอกไก่และมูลวัวต่อพลวัต

- ของปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* Miguli และ *Salmonella* spp. ว.วิชา การเกษตร 29(1): 34-50.
- Andrews W.H. and T. Hammack. 2007. *Salmonella*. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM_070149#authors, 17/6/2010.
- Anon. 2010 a. *Bacterial Pathogen Growth an Inactivation*. FDA U.S. [http://www.fda.gov/food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation?GuidanceDuc...](http://www.fda.gov/food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDuc...), 11/6/2010.
- Anon. 2010 b. *Environmental Conditions for Pathogenic Bacteria Growth*. Seafood Network Information Centre. <http://seafood.vedavis.edu/pub/pathogen.htm>, 11/6/2010.
- Burnett S.L. and L.R. Beuchat. 2001. Food-borne pathogens human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Indu. Microbiol. Biotechnol.* 27: 104-110.
- Cho K.H., D. Han, Y. Park, S.W. Lee, S.M. Cha, J. Kang and J.H. Kim. 2010. Evaluation of the relationship between two different methods for enumeration fecal indicator bacteria: Colony-forming unit and most probable number. *Environ. Sci.* 22(6): 846-850.
- Elnima E., S.A. Ahmed, A.G. Mekkawi and J.S. Mossa. 1983. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Die Pharmazie* 38: 747-748.
- Erickson M., J. Liao, L. Ma, X. Jiang and M. P. Doyle. 2009. Inactivation of *Salmonella* spp. in cow manure composts formulated to different initial C:N ratios. *Bioresour Technol.* 100: 5898-5903.
- Feng P., S.D. Weagant and M.A. Grant. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam__4.html, 11/6/2007.
- Gronewold A.D. and R.L. Wolpert. 2008. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. *Water Res.* 42: 3327-3334.
- Hunsinger B., B.A. Kamp, C. Kumala and R. Bhm. 2005. Comparison of the spread plate technique and the MPN-technique for the determination of viable colony counts in quantitative suspension tests to evaluate

- bactericidal and fungicidal activity of chemical disinfectants. *Isah - Warsaw, Poland* 2: 221-225.
- Islam M., M.P. Doyle, S.C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2005. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in field treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiol.* 22: 63-70.
- Islam M., J. Morgan, M.P. Doyle and X. Jiang. 2004a. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure compost-amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. *Food Prot.* 67(3): 574-578.
- Islam M., J. Morgan, M.P. Doyle, S.C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004b. Fate of *Salmonella enterica* Serovae, *S. typhimurium* on carrot and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4): 2497-2502.
- Johannessen S.G., G.B. Bengtsson, B.T. Heier, S.B.Y. Wasteson and L.M. Rorvil. 2005. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5): 2221-2225.
- Katia M.A., R.A. Holley, K.H. Ominski, M. Tenuta and G. Blank. 2006. Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livestock Sci.* 102(3): 226-236.
- Kudva I.T., K. Blanch and C.J. Hovde. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3166-3174.
- Petric I. and V. Selimbasic. 2008. Composting of poultry manure and wheat straw in a closed reactor: optimum mixture ration and evolution of parameters. *Biodegradation* 19: 53-63.
- Sofos J.N., L.R. Beuchat, P.M. Davidson and E.A. Johnson. 1998. Naturally Occurring Antimicrobial Agents in Foods. Task Force Rep. No. 132, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, USA. 103 p.
- Turner C. 2002. The thermal inactivation of *Escherichia coli* in straw and pig

- manure. *Bioresource Technol.* 84: 57-61.
- Walters S.P., G.J.P. Victor and F.D. Katharine. 2007. Detection of Bacteroidales fecal indicators and the zoonotic pathogens *E. coli* O157H:7, *Salmonella*, and *Campylobacter* in river water. *Environ. Sci. Technol.* 41: 1856-1862.
- Watcharasukarn M., P. Kaparaju, J.P. Steyer, K.A. Krogfelt and I. Amgelidae. 2009. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as indicator organisms in evaluating pathogen-reducing capacity in biogas plants. *Microbiol. Ecol.* 58:221-230.
- Weaver R.W. and L.R. Frederick. 1972. A new technique for most-probable-number counts of Rhizobia. *Plant and Soil* 36(1-3): 219-222.
- You Y., S.C. Rankin, H.W. Aceto, C. E. Benson, J.D. Toth and Z. Dow. 2006. Survival of *Salmonella enterica* Serovae Newport in manure and manure-amended soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 5777-5783.
- Zibilske L.M. and R.W. Weaver. 1978. Effect of environmental factors on survival of *Salmonella typhimurium* in soil. *J. Environ. Qual.* 7(4): 593-7.
- Zohri, A.N., K. Abdel-Gawad and S. Saber. 1995. Antibacterial, antidermatophytic and antioxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiol. Res.* 150: 167-172.