รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ผลของโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง

(Effect of Probiotics on The Growth of Pathogens in Fermented Crab)

โดย

ผศ.วันชัย สุทธินุ่น

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจากรายได้คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2546

RCH
QR
121
ว44ว5ช

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....58923
วัน,เดือน,ปี.....17 ก.พ. 2549

b.1144 2462
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโปรไบโอติคต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำเกลือและน้ำปลา จากการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของปูดองจากตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกโดยรวมของปูดองทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง 10^5 - 10^8 และ 10^3 - 10^7 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ พบจุลินทรีย์ก่อโรคดังนี้ *Bacillus cereus* 52.5 เปอร์เซ็นต์ (10^3 - 10^4 โคโลนีต่อกรัม) *Escherichia coli* 37.5 เปอร์เซ็นต์ (10^2-10^3 โคโลนีต่อกรัม) *Staphylococcus aureus* 20 เปอร์เซ็นต์ (10^2 โคโลนีต่อกรัม) *Clostridium perfringens* และ *Salmonella typhimurium* 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดสอบการเจริญเติบโตของโปรไบโอติค 4 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Pediococcus* sp. และ *Enterococcus faecium* ในน้ำสกัดปูดอง ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ในน้ำสกัดปูดองทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ โปรไบโอติคสามารถเจริญได้ดีที่สุด นอกจากนี้ ยังพบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หลังจากนั้นได้นำโปรไบโอติค *L. plantarum* และ *L. acidophilus* มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 5 ชนิด คือ *B. cereus* , *Cl. perfringens* , *E. coli* , *S. aureus* และ *S. typhimurium* ในอาหารเหลว MRS เปรียบเทียบกับในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ และน้ำสกัดปูดองน้ำปลา ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติคสามารถยับยั้งจุลิทรีย์ก่อโรคได้ดี โดยที่ *L. plantarum* ชนิดเดียว สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

ในขั้นตอนสุดท้ายได้ศึกษาผลของ *L. plantarum* ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมักปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *L. plantarum* สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวปูและในน้ำเกลือหรือน้ำปลาที่ใช้ในการหมักปูได้ไม่มากนัก (ไม่เกิน 1-2 ลอการิทึม) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเกลือแกง ที่ใช้ในการหมักปูมีปริมาณสูง ไม่เหมาะสมต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติค ดังนั้น จึงน่าจะทำการศึกษาปริมาณเกลือแกงที่เหมาะสมหรือลดปริมาณลงร่วมกับการใช้โปรไบโอติคในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

The objective of this research was to study the effects of probiotics on growth inhibition of pathogens in brine and fish sauce fermented crabs. The examination of microbiological quality of 40 fermented crab samples obtained from fresh markets in Bangkok metropolitan area found that the samples contained total microbial counts of $10^5 - 10^8$ cfu / g , total lactic acid bacteria of $10^3 - 10^7$ cfu / g and *Bacillus cereus* was found in 52.5 % (10^3 - 10^4 cfu / g), *Escherichia coli* in 37.5 % (10^2 - 10^3 cfu / g), *Staphylococcus aureus* in 20 % (10^2 cfu / g), *Clostridium perfringens* and *Salmonella typhimurium* in 25 and 12.5 % respectively.

A study on growth of four species of which were *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Pediococcus* sp. and *Enterococcus faecium* in fermented crab extracts during fermentation at room temperature for 24 hours found that, all 2 kinds of extracts, at 25% concentration the growth of *L. plantarum* and *L. acidophilus* were significantly greater than those the other two probiotics ($P \leq 0.05$). These probiotics were then used in a test to inhibit the growth of five pathogens which were *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium* in MRS medium, original brine and fish sauce fermented crab extracts, at room temperature for 48 hours. This study found that *L. plantarum* exhibited the best inhibitory effect on pathogen growth in all extracts and medium.

In the final step, effects of inhibitory study of *L. plantarum* on pathogens during fermentation of crabs in brine and fish sauce at room temperature for 48 hours revealed that *L. plantarum* showed a little effects on inhibition of pathogens (<1 - 2 log) when compared with control samples, because of the concentration of salt in fermented medium was higher than the suitable amount for probiotics growth and producing anti-microbial substances. So, the evaluation of the appropriated salt concentration in fermented crab medium or the reduction of the salt should be further studies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
สารบัญ.....III
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ..... VII
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 โปรไบโอติค.....4
2.2 แบคทีเรียแลกติก.....4
2.3 ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก.....9
2.4 ปูดอง.....10
2.4.1 ความสำคัญ และการบริโภค..... ..10
2.4.2 ชนิดของปูดองที่นิยมใช้ในการหมัก.....11
2.4.3 การผลิตปูดอง..... 11
2.5 จุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารหมักดองเป็นสื่อ.....13
2.5.1 *Bacillius cereus*..... 14
2.5.2 *Clostridium perfringens* 15
2.5.3 *Escherichia coli*..... 16
2.5.4. Salmonellae.....17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.5 *Staphylococcus aureus*.....18
2.5.6 *Vibrio cholerae*.....19
2.5.7 *Vibrio paraheamolyticus* 20
2.6 งานวิจัยการใช้โปรไบโอติคในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค.....20

บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย.....24
3.1 จุลินทรีย์.....24
3.2 วัตถุดิบ..... 24
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 25
3.4 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ.....25
3.5 อาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์..... 26
3.6 ขั้นตอน และวิธีการดำเนินงานวิจัย..... 27
3.6.1 ศึกษาจุลินทรีย์ ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวม และจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง..... 27
3.6.2 ศึกษาการเจริญของโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดอง.....27
3.6.3 ศึกษาการยับยั้งของโปรไบโอติคแบคทีเรียต่อจุลินทรีย์ ก่อโรคในฟลาสก์..... 28
3.6.4 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติค แบคทีเรียในกระบวนการผลิตปูดอง.....29

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 31
4.1 ผลการศึกษาจุลินทรีย์ ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ ก่อโรคในปูดอง.....31
4.2 ผลการศึกษาการเจริญของโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดอง.....32
4.3 ผลการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคแบคทีเรียในฟลาสก์.....35
4.4 ผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติค แบคทีเรียในกระบวนการผลิตปูดอง.....39.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....47

บทที่ 6 ข้อเสนอแนะ.....48

เอกสารอ้างอิง..... 49

ภาคผนวก ก.....54

ภาคผนวก ข..... 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรียแลกติก.....7
2.2 แหล่งที่มาของปูดองที่บริโภคในประเทศไทย.....11
2.3 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารหมักจากสัตว์ ตามประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.....12
2.4 จำนวนผู้ป่วยและตายจากโรคท้องร่วงในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2539 - พ.ศ. 2543 14
4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของปูดองน้ำปลาและปูดองน้ำเกลือที่จำหน่ายในตลาดสด บริเวณกรุงเทพมหานคร.....31
4.2 ปริมาณโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดองความเข้มข้นต่าง ๆ 34
4.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคในอาหารเหลว MRS 36
4.4 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ 38
4.5 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคในน้ำสกัดปูดองน้ำปลา.....40
4.6 ค่าพีเอช ในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลา.....41
4.7 กรดแลกติกในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลา.....41
4.8 จุลินทรีย์ในปูดองน้ำเกลือ 43
4.9 จุลินทรีย์ในปูดองน้ำปลา 45
6.1 ปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ใน TSI Agar และ MIL.....60
7.1 จุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวม และจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำเกลือ ที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร.....64
7.2 จุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวม และจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำปลา ที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร.....66
7.3 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและ น้ำสกัดปูดองน้ำปลา.....67
7.4 ค่าพีเอชและปริมาณกรดในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา.....67
7.5 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา.....67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ขั้นตอนการผลิตปูดอง.....13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อาหารหมักดองพื้นบ้านของประเทศไทยมีหลายชนิด เช่น ข้าวหมาก ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง สะตอดอง แหนม ไส้กรอกอีสาน ปลาร้าและปูดอง เป็นต้น อาหารหมักดองเหล่านี้ส่วนใหญ่อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น รา ยีสต์และแบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบที่ต้องการผลิต อุปกรณ์ที่ใช้และบรรยากาศรอบ ๆ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญเติบโต เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบตามต้องการ หากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ เจริญขึ้นมาแทนที่เนื่องจากการควบคุมกระบวนการผลิตที่ไม่ดีพอ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพต่ำ ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค เช่น ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน บางครั้งอาจถึงกับเสียชีวิตด้วย นอกจากนี้แล้ว การปฏิบัติกับอาหารหมักดองภายหลังการหมักก็เป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อความปลอดภัยของอาหารด้วย

นักวิจัยหลายท่านได้ศึกษา ค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับการนำโปรไบโอติค ชนิดแบคทีเรียแลกติกหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ มากมาย รวมไปถึงการใช้เป็นกล้าเชื้อในการพัฒนาการหมักดองอาหารพื้นบ้านหลายชนิด ทั้งนี้ เนื่องมาจากจุลินทรีย์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ กล่าวคือ สามารถหมักน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดแลกติกซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้อาหารมีพีเอชต่ำลง เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ ยังมีสารต่าง ๆ อีกหลายชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักและมีส่วนช่วยในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล คาร์บอนไดออกไซด์และแบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ส่วนเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่ยังมีชีวิตอยู่ ช่วยย่อยอาหารในลำไส้ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ทำให้สุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงดีขึ้น

ปูดอง เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่เกิดจากภูมิปัญญาชาวบ้าน โดยการนำปูนาหรือปูแสมมาดองด้วยน้ำเกลือหรือน้ำปลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 - 2 วัน ก็สามารถนำมาบริโภคได้ ส่วนมากนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของส้มตำ เรียกว่า ส้มตำปู ซึ่งปัจจุบันเป็นอาหารที่ชาวไทยและชาวต่างประเทศนิยมบริโภคกันมาก แต่การบริโภคปูดองหรืออาหารที่มีปูดองเป็นส่วนประกอบก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษบ่อยครั้ง ทั้งนี้ เนื่องจากวัตถุดิบ กรรมวิธีการผลิต และการจัดจำหน่ายที่ไม่มีการควบคุมอย่างเหมาะสมและถูกสุขลักษณะ ทำให้เกิดการปนเปื้อนหรือเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดการสูญเสียสุขอนามัยที่ดีของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตาม ปูดองและส้มตำปูก็ยังเป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันอย่างสม่ำเสมอ เพราะมีรสชาติอร่อย หารับประทานได้ง่ายและราคาไม่แพง

หากได้มีการศึกษาถึงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในปูดอง และหาวิธีการลดปริมาณให้เหลือน้อยลงจนถึงระดับที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือกำจัดจุลินทรีย์ดังกล่าวให้หมดสิ้นไปโดยไม่สูญเสียรสชาติดั้งเดิม ก็จะทำให้การบริโภคปูดองมีความปลอดภัยจากโรคระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้มีการยอมรับและบริโภคแพร่หลายมากขึ้น นอกจากนี้อาจเป็นลู่ทางในการพัฒนาสู่การจัดจำหน่ายต่างประเทศได้ในอนาคต ดังนั้น การใช้โปรไบโอติคชนิดแบคทีเรียแลกติกบางชนิดเป็นกล้าเชื้อหรือการใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวร่วมกับจุลินทรีย์จากธรรมชาติในการผลิตปูดอง อาจเป็นหนทางหนึ่งในการบรรลุถึงจุดประสงค์ดังกล่าวได้

1.2 วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง

2) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกบางชนิดในน้ำสกัดปูดอง

3) เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลกติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำสกัดปูดอง

4) เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียแลกติก ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในการผลิตปูดอง

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1) ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *B.cereus* , *E. coli* ,*Cl. perfringens* , *Salmonella* sp., *S. aureus* , *V. cholerae* และ *V. paraheamolyticus* ในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา

2) นำโปรไบโอติคที่เป็นแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Pediococcus* sp., *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* และ *Enterococcus faecium* ชนิดเดียวและสองชนิดร่วมกัน มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลา

3) นำแบคทีเรียแลกติกที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด ใส่ลงในกระบวนการผลิตปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา เปรียบเทียบผลการทดลองกับตัวอย่างควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ใช้เป็นแนวทางในการลดปริมาณหรือกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง

2) เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคปูดองมากยิ่งขึ้น

3) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจนำมาประยุกต์ใช้ปรับปรุงมาตรฐานความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ในอาหารหมักดองพื้นบ้านชนิดอื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรไบโอติค

Lilly และ Stillwell ได้นำคำว่า โปรไบโอติค (Probiotics) มาใช้ครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ในปี ค.ศ. 1935 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งบทบาทตรงกันข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มุ่งทำลายจุลินทรีย์ ในปี ค.ศ. 1926 Parker ได้ให้คำนิยามของโปรไบโอติค ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ล่าสุด Fuller ได้ให้ความหมายของคำว่า โปรไบโอติค คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวซึ่งจัดเป็นโปรไบโอติค ประกอบด้วย รา ได้แก่ *Aspergillus niger* , *A. oryzae* , *Neocallimasttix* sp. ยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* , *Candida milleri* และแบคทีเรีย ได้แก่ *Lactobacillus delbrukii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. cillobiosus*, *L. lactis*, *L. reuteri* , *Lactococcus* subsp. *lactis*, *Lc.* subsp. *cremoris*, *Lc.* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophillus*, *S. anginosus*, *Pediococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis* , *B. bifidum* , *B. infantis* , *B. longum* , *Enterococcus faecium* M74 และ SF 68 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกเป็นส่วนใหญ่ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541)

2.2 แบคทีเรียแลกติก (Lactic Acid Bacteria ; LAB)

ในอดีต แบคทีเรียแลกติก หมายถึง แบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวเนื่องจากการผลิตกรดแลกติกรวมถึงแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย (Stiles and Holzapfel. 1997) ปัจจุบัน ถึงแม้ว่าไม่มีคำนิยามของแบคทีเรียแลกติกที่ชัดเจน แต่นิยมใช้ลักษณะพื้นฐานทั่วไปเป็นตัวบ่งบอก คือ เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ยกเว้น *Sporolactobacillus* เซลล์มีรูปร่างทรงกลม ท่อน หรือกึ่งท่อนกึ่งทรงกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ทนต่อสภาวะที่มีอากาศ ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตสูง หมักน้ำตาลให้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Axelsson. 1998) แบ่งแบคทีเรียแลกติกตามลักษณะการหมักน้ำตาล ได้ 2 กลุ่ม คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) Homofermentative สามารถหมักน้ำตาลให้กรดแลกติกมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณเล็กน้อย ด้วยวิถี Emden - Meyerhof Panas (EMP) ซึ่งสรุปปฏิกิริยาทั้งหมด ได้ดังนี้

กลูโคส + 2Pi + 2ADP ⟶ กรดแลกติก + 2ATP

2) Heterofermentative สามารถหมักน้ำตาลให้กรดแลกติกและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ด้วย เช่น กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลในปริมาณที่มากกว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักโดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม homofermentive ด้วยวิถี phosphogluconate ซึ่งสรุปปฏิกิริยาทั้งหมด ได้ดังนี้

กลูโคส + Pi + ADP ⟶ กรดแลกติก + กรดอะซิติก + เอทานอล + CO_2 + ATP

แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ สามารถพบได้ในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักดองจากพืชและสัตว์ เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง หญ้าหมัก แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534) นอกจากนี้ ยังพบในอาหารที่เน่าเสีย อวัยวะสืบพันธุ์ ลำไส้เล็กและทางเดินหายใจของมนุษย์และสัตว์ (Wood and Holzapfel. 1995)

แบคทีเรียแลกติกจำแนกเป็น 12 สกุล ลักษณะสำคัญในแต่ละสกุลมีดังนี้

1) *Streptococcus* เซลล์รูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ ขนาด 0.8 - 1.2 ไมโครเมตร เรียงกันเป็นสายโซ่หรือต่อกันเป็นคู่ จัดเป็นพวก homofermentative ผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส คือ กรดแลกติกชนิด L(+) ต้องการสารอาหารในการเจริญสูง สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20 - 41 องศาเซลเซียส บางชนิดทำให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ (Hardie and Whiley.1995)

2) *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียแลกติกซึ่งเคลื่อนที่ได้บางชนิดเท่านั้น สกุลนี้พบเพียง 2 ชนิดคือ *Vagococcus flauvialis* ซึ่งเดิมจัดอยู่ใน streptococci กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอลที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel. 1997)

3) *Lactococcus* เซลล์รูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ ขนาด 0.5 - 1 ไมโครเมตร อยู่เดี่ยว ๆ ต่อกันเป็นคู่หรือเรียงกันเป็นสายโซ่สั้น ๆ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) มักใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิต ผลิตภัณฑ์นมหมัก สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 - 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่าง ๆ เช่นผักกาดถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ (Teuber. 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) *Enterococcus* เซลล์เป็นรูปไข่ อยู่เดี่ยว ๆ หรือเรียงกันเป็นสายโซ่สั้น ๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 - 45 องศาเซลเซียส ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) จัดเป็น facultative anaerobe ต้องการสารอาหารในการเจริญสูง บางชนิดทำให้เกิดโรค (Deveriese and Pot. 1995)

5) *Pediococcus* เซลล์รูปร่างทรงกลม ขนาด 0.34 – 1.43 ไมโครเมตร การเรียงตัวมีลักษณะเฉพาะ โดยเรียง 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส หมักกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้กรดแลกติกชนิด DL และ L(+) บางชนิดทำให้เบียร์และไวน์เสีย (Simpson and Taguchi. 1995)

6) *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือชนิด *P. halophilus* และได้จัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซนต์ และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Simpson and Taguchi. 1995)

7) *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* มี 2 ชนิดคือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* โดย *A. viridans* ทำให้กุ้งลอปเตอร์ (lobster) เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในคน (Stiles and Holzapfel. 1997)

8) *Lactobacillus* เซลล์รูปร่างเป็นท่อน อาจเรียงกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ จัดเป็น facultative anaerobe ต้องการสารอาหารในการเจริญสูง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทฟ์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีระ (Axelsson. 1998)

9) *Leuconostoc* รูปร่างของเซลล์ขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น ในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกเป็นท่อนคล้ายกับเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกสกุล *Lactobacilllus* ในน้ำนม เซลล์มีรูปร่างทรงกลมอยู่เดี่ยว ๆ ต่อกันเป็นคู่หรือเรียงกันเป็นสายโซ่สั้น ๆ จัดเป็นพวก heterofermentative เนื่องจากหมักกลูโคสได้กรดแลกติกและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหย แบคทีเรียแลกติกสกุลนี้จึงมีบทบาทช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง ต้องการสารอาหารในการเจริญสูง (Teuber. 1995)

10)*Oenococcus* มีชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ และลำดับเบสบน 16s rRNA ต่างจากชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio *et.al.* 1995)

11) *Weissella* รูปร่างเซลล์เป็นท่อนและทรงกลม คล้าย *Leuconostoc* เดิมจัดอยู่ในสกุล *Leconostoc* และ *Lactobacillus* มี 7 ชนิด คือ *Weissella paramesenteroides*, *W. confuses* ,*W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. veridescens* (Stiles and Holzapfel. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12)*Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) มี 6 ชนิด คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funfitum* และ *C. alterfunditum* (Schillinger and Holzapfel. 1995)

Axelsson (1998) ได้แบ่งแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 12 สกุล ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* (แยกมาจาก *Leuconostoc*), *Pediococcus*, *Tetragenococcus* (แยกมาจาก *Pediococcus*), *Sterptococcus*, *Vagococcus* (แยกมาจาก *Steptococcus*) และ *Weissella* แต่ละสกุลมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรียแลกติก

คุณสมบัติ	เซลล์รูปท่อน		เซลล์รูปทรงกลม								
	Carnobacterium	*Lactobacillus*	*Weissella*[a]	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Lactococcus*	*Vagococcus*	*Leuconostoc*	*Oenococcus*[b]	*Pediococcus*	*Streptococcus*	*Tetragenocicccus*
เรียงตัวสี่เซลล์ติดกัน	-	-	-	+	-	-		-	+	-	+
หมักกลูโคสให้ CO_2	-	+/-	+	-	-	-		+	-	-	-
เจริญที่อุณหภูมิ 10 °c	+	+/-	+	+	+	+		+	+/-	-	+
เจริญที่อุณหภูมิ 45 °c	-	+/-	-	-	+	-		-	+/-	+/-	-
เจริญในเกลือ 6.5 %	ND	+/-	+/-	+	+	-		-	+/-	-	+
เจริญในเกลือ 18 %	+	-	-	-	-	-		-	-	-	+
เจริญที่พีเอช 4.4	ND	+/-	+/-	-	+	+/-		+/-	+	-	-
เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	-	+	+	-		-	-	-	+
ไอโซเมอร์ของกรดแลกติก	L	DL[b]	D,DL[b]	L	L	L		D	D	L	L

+ = ผลบวก , - = ผลลบ, +/- = แตกต่างกันระหว่างชนิด, ND = ไม่มีข้อมูล

[a] = บางชนิดรูปร่างเป็นท่อน , [b] = ไอโซเมอร์แตกต่างกันตามชนิด

(**ที่มา** : Axelsson. 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแลกติก นอกจากมีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารหมักดองแล้วยังมีบทบาทสำคัญอื่น ๆ อีก เช่น สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น *Bacillus subtilis*, *Micrococcus pyogenes*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Gilliland and Speck. 1977; Inoue *et. al.*1980) เนื่องจากกรดแลกติก อะซิติก ที่สร้างขึ้น ทำให้พีเอชลดต่ำลง จนไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้ ในกระบวนการหมักยังเกิดสารอื่น ๆ ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย เช่น

1) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้จำนวนมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส (Price and Lee. 1970; Gilliland and Spech. 1975; Gilliland and Speck. 1977; Haryoro *et. al.* 1981; Abdel Bar and Harris. 1984)

2) ไดอะเซทิล (Diacetyl) มีสูตรเป็น $C_4H_6O_2$ ไดอะเซทิลชนิด 2,3 - butanedione เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะตัว ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก สารไดอะเซทิลได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS มีความปลอดภัย สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหารได้ หากใส่ในปริมาณมาก อาจทำให้อาหารมีกลิ่นรุนแรง ดังนั้น แทนที่จะใส่ลงไปในอาหารโดยตรง อาจใช้ไดอะเซทิลกับภาชนะ เครื่องมือหรือเครื่องใช้ที่สัมผัสอาหาร เนื่องจากเป็นสารที่ระเหยง่าย จึงไม่เหลือตกค้างในอาหาร (Jay.1982)

3) แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้รวดเร็ว ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* , *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกัน มีคุณสมบัติทางเคมีและความสามารถในการยับยั้งที่ต่างกัน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *S. aureus* ,*Listeria monocytogenes* เป็นต้น ไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่ง ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* หรือ Streptococci กลุ่ม N สามารถป้องกันการงอกของสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ซึ่งทนความร้อนสูงในอาหารกระป๋องได้ แต่ไม่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา (อรวินท์ เลาหรัชตนันท์. 2532)

4) รูทีรีน (Reuterin) เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่พีเอช เป็นกลาง รูทีรีนที่ผลิตจาก *L. reuteri* สามารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น Salmonellae, Shigellae, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* และ*Trypanosoma* เป็นต้น (Jay.1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ เมื่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ได้รับแบคทีเรียแลกติกกลุ่มที่เป็นโปรไบโอติคเข้าไปในระบบทางเดินอาหาร เซลล์ของจุลินทรีย์จะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสารพิษหรือสารก่อมะเร็งโดยการลดกิจกรรมของเอนไซม์อะโซรีดัคเทส (azoreductase) เบตา - กลูคูโรนิเดส (β - glucuronidase) เบตา - กลูโคซิเดส (β - glucosidase) และ ไนโตรรีดัคเทส (nitroreductas) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยน้ำตาลแลกโทส ทำให้ไม่เกิดอาการแพ้ ช่วยสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อร่างกายให้เพียงพอกับความต้องการ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สร้างสารอาหารที่เรียกว่า gut nutrients เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโนบางชนิด ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ลดคอเลสเทอรอลในเลือด และลดการติดเชื้อในช่องคลอด เป็นต้น (Hilton *et. al.*1992)

2.3 ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก

ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก เป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางในประเทศแถบตะวันออกมากว่าประเทศในแถบตะวันตก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม กัมพูชา ลาวและไทย บางชนิดใช้เป็นเครื่องปรุงหรือส่วนประกอบของอาหารที่ขาดไม่ได้ในชีวิตประจำวันเป็นเวลานานมาแล้ว ในกระบวนการหมักส่วนใหญ่อาศัยปฏิกิริยาจากจุลินทรีย์ที่ติดมาและที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำรวมไปถึงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และมีการเติมเกลือลงไปด้วย เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ต้องการให้สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภาษาของแต่ละประเทศหรือแต่ละท้องถิ่น ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่เกิดจากกระบวนการหมัก แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ (มัทนา แสงจินดาวงษ์ 2545)

1) ผลิตภัณฑ์พื้นเมือง กระบวนการหมักส่วนใหญ่อาศัยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ของสัตว์น้ำโดยมีการใส่เกลือในปริมาณสูง เพื่อป้องกันการเสียจากแบคทีเรีย เช่น ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักของประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ กะปิ น้ำปลาและบูดู

2) ผลิตภัณฑ์พื้นเมืองที่มีกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก เกิดการหมักโดยอาศัยเอนไซม์จากสัตว์น้ำ ขั้นตอนที่ 2 เกิดจากการเติมจุลินทรีย์หรือคาร์โบไฮเดรตลงไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ก่อให้เกิดกลิ่นรสที่ดี ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ่าและผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน เช่น mam - chao ในประเทศกัมพูชา makassar fish ในประเทศอินโดนีเซีย และ funa sushi ในประเทศญี่ปุ่น เป็นต้น

3) ผลิตภัณฑ์ที่อาศัยกรดเป็นตัวช่วยย่อยสลาย เพื่อเร่งปฏิกิริยา ไม่จัดเป็นผลิตภัณฑ์พื้นเมือง เช่น น้ำปลาที่ผลิตในระยะเวลาสั้น ซึ่งใช้ระยะเวลาหมักไม่เกิน 1 เดือน น้ำปลาที่ได้มีกลิ่นและรสชาติแตกต่างจากน้ำปลาพื้นเมือง นอกจากนี้ยังมี fish silage และ fish soluble เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังแบ่งผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักตามลักษณะทางกายภาพภายหลังการหมักเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ (ศิวาพร ศิวเวชช. 2543)

1) ประเภทซอส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสัตว์น้ำกับเกลือ หลังจากบ่มไว้ในสภาพไม่มีอากาศประมาณ 3 - 6 เดือน นำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวมาปรุงแต่งรสชาติ และฆ่าเชื้อ เก็บไว้บริโภค ได้แก่ น้ำปลา น้ำบูดู เป็นต้น

2) ประเภทกะปิ เป็นผลิตภัณฑ์จาก ปลา กุ้ง หอย หรือปลาหมึก หมักกับเกลือ บ่มในสภาพไม่มีอากาศระยะหนึ่ง นำมาบดให้ละเอียดและตากแดด ได้ผลิตภัณฑ์ประเภทกะปิ ซึ่งนอกจากในไทยแล้วประเทศในแถบเอเชียหลายประเทศมีการผลิตและบริโภคผลิตภัณฑ์นี้เช่นกัน เช่น ในมาเลเซียและเวียดนามมีกะปิกุ้ง ในญี่ปุ่นมีกะปิปลา เป็นต้น

3) ประเภทเป็นตัวหรือเป็นชิ้น ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ อาจเกิดจากการหมักกับเกลือเพียงอย่างเดียว หรืออาจมีการใส่ข้าวสุก ข้าวคั่ว ข้าวหมาก หรือรำข้าวลงไปด้วย ซึ่งจะทำให้ได้อาหารหมักที่มีกลิ่นรสแตกต่างออกไป นอกจากนี้ ในบางแห่ง เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีการใส่สับปะรดลงไปด้วย ตัวอย่างอาหารหมักที่อยู่ในประเภทนี้ ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาส้ม ส้มฟัก กุ้งจ่อม เค็มบักนัด เป็นต้น

2.4 ปูดอง

2.4.1 ความสำคัญและการบริโภค

ปูดองหรือปูเค็ม เป็นอาหารหมักซึ่งเกิดจากภูมิปัญญาของชาวบ้าน เกลือหรือน้ำปลาที่ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการหมัก นอกจากทำหน้าที่ในการให้รสชาติกับปูดองแล้ว ยังเป็นตัวช่วยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของปูดองอีกด้วย ปูดองนอกจากนิยมนำมาเป็นส่วนประกอบของส้มตำ ที่เรียกว่าส้มตำปู ซึ่งเป็นที่นิยมรับประทานกันของประชาชนทุกภาคในประเทศไทยและชาวต่างประเทศบางกลุ่ม เนื่องจากมีรสชาติอร่อย หารับประทานได้ง่ายและราคาไม่แพง แล้ว ปูดอง ยังสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายอย่าง เช่น ยำ หรือรับประทานโดยตรงโดยการนำมาคลุกกับข้าวสวยร้อน ๆ เป็นต้น ปัจจุบัน พบว่า ปูแสม ซึ่งจับได้จากบริเวณป่าชายเลนของประเทศไทยมีน้อยลง เนื่องจากมีการทำลายและปรับปรุงบริเวณดังกล่าวเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบางชนิด ปริมาณปูที่จับได้จึงไม่พอเพียงต่อการบริโภคภายในประเทศ และมีต้นทุนการผลิตสูง ทำให้ต้องนำเข้าปูแสมดองจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า เวียดนามและกัมพูชา เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2 แล้วนำไปจำหน่ายในตลาดสดในจังหวัดใหญ่ ๆ เช่น กรุงเทพมหานคร และหลาย ๆ จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แหล่งที่มาของปูดองที่บริโภคในประเทศไทย

อันดับ	แหล่งผลิต	ปริมาณ(%)	หมายเหตุ
1	พม่า	70	
2	เวียดนาม และ กัมพูชา	20	
3	ไทย	10	ส่วนใหญ่มาจากภาคใต้
รวม		100	

(**ที่มา** : ทรงกรด ชื่นชูผล. 2547)

2.4.2 **ชนิดของปูที่นิยมใช้ในการหมัก**

ปูที่นิยมนำมาใช้ในการหมักเป็นปูดองเพื่อการบริโภคมี 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือปูนา และปูแสม ซึ่งปูทั้งสองชนิดนี้ จัดเป็นสัตว์คืบคลานที่มีขา 10 ขา ส่วนท้องลดรูปงอพับไปอยู่ใต้ส่วนทรวงอก มีสองเพศ โดยในเพศเมียจับปิ้งจะมีลักษณะกว้างปลายมนกลมกว่าเพศผู้ ซึ่งมีรูปเรียวและแคบ ผสมพันธุ์ภายใน ออกลูกเป็นไข่ เจริญเติบโตโดยการลอกคราบเป็นระยะ ๆ

1) ปูนา (*Somanniathelpusa dugasti*) พบอยู่ทั่ว ๆ ไปบริเวณท้องนา ตามลำธารที่น้ำไหลหนองบึง ลักษณะกระดองโค้งนูน ผิวเรียบเป็นมัน ก้ามหนีบมีผิวเรียบ ขาเดินเรียวยาว ส่วนใหญ่มีสีม่วงดำ สีเหลือง สีเทา ซึ่งลักษณะสีจะปรากฏตามสีของดินที่ปูอาศัยอยู่ (นิภาศักดิ์ คงงามและคณะ. 2544) ประชาชนบางกลุ่มนิยมนำมาต้มหรือนึ่งให้สุกหรือนำมาเคี่ยวเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปรุงกับเครื่องปรุงรสรับประทานกับข้าวสวย ประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนิยมนำมาหมักเป็นปูดองเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของส้มตำ ซึ่งเป็นอาหารประจำวันที่ขาดไม่ได้ แต่เนื่องจากปูนาเป็นพาหะของพยาธิใบไม้ในปอด ความนิยมในการนำมาผลิตปูดองจึงน้อยกว่าปูแสม และการนำไปผ่านความร้อนเพื่อทำให้ปูดองสุกก่อนนำมาบริโภค ทำให้ปูดองเสียรสชาติ ไม่น่ารับประทาน

2) ปูแสม (*Sesarma mediri*) พบอยู่ทั่ว ๆ ไปบริเวณป่าชายเลน โคนไม้ และรากต้นแสมโกงกาง หรือริมฝั่งทะเล ลักษณะกระดองเป็นรูปสี่เหลี่ยมหรือโค้งกลม ส่วนหน้าของกระดองระหว่างเบ้าตามีขนาดกว้างมาก ตามีก้านสั้นพับอยู่ในเบ้าตา ก้ามหนีบสองข้างขนาดใกล้เคียงกันหรือต่างกันเล็กน้อย ขาเดินเรียวยาวแข็งแรงและมักมีขนปกคลุมกระจัดกระจายทั่วไป ในอ่าวไทยมีอยู่ราว 38 สายพันธุ์ (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2540) นิยมนำมาดองเพื่อการบริโภคของประชาชนทุกภาคในประเทศไทย

2.4.3 **การผลิตปูดอง**

การผลิตปูดองเพื่อการบริโภคในครัวเรือน ในประเทศไทย เริ่มจากชาวบ้านจับปูแสมจากพื้นที่ป่าชายเลนใกล้เคียงที่พักอาศัยหรือปูนาเป็น ๆ จากท้องนา มาล้างน้ำให้สะอาด บรรจุใส่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาชนะสำหรับดอง ใส่น้ำเกลือจนท่วมตัวปูและปิดภาชนะ ปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน (Phithakpol *et. al.* 1995) ส่วนการผลิตปูดองในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า และเวียดนามนั้น มักทำคราวละมาก ๆ เพื่อการจำหน่ายโดยกลุ่มชาวประมงไปจับปูแสมบริเวณพื้นที่ป่าชายเลนและเกาะต่าง ๆ ใส่ลงในภาชนะสำหรับจับปู เมื่อได้ในปริมาณที่ต้องการแล้ว ใส่น้ำทะเลที่สะอาดให้ท่วมตัวปู เพื่อให้ปูสลบ นำไปจำหน่ายที่แพปู คนงานที่แพทำการคัดเลือกปูแสมตามขนาด แบ่งออกเป็น 2 ขนาดคือ ขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ล้างน้ำสะอาด ชั่งน้ำหนัก บรรจุในปี๊บ ซึ่งมีถุงพลาสติกรองไว้ ใส่น้ำเกลือเข้มข้นและปิดทับด้วยเกลือ รวบรวมเพื่อให้ได้จำนวนที่ต้องการ จัดส่งมาทางเรือให้กับตัวแทนจำหน่ายตามตลาดสดในประเทศไทย ส่วนการผลิตปูดองน้ำปลา การผลิตเช่นเดียวกันกับการผลิตปูดองน้ำเกลือเพียงแต่ใส่น้ำปลาแท้หรือน้ำปลาผสมลงไปแทนน้ำเกลือ ขั้นตอนการผลิตแสดงในภาพที่ 2.1 และเนื่องจาก ยังไม่มีหน่วยงานใดกำหนดมาตรฐานของปูดองออกมาโดยเฉพาะ ดังนั้น การผลิตปูดองเพื่อจำหน่าย ควรมีคุณภาพทางจุลินทรีย์เช่นเดียวกับอาหารหมักจากสัตว์ ตามประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปี 2525 ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารหมักจากสัตว์ตามประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

จุลินทรีย์	ค่ากำหนด
ยีสต์	$< 1 \times 10^4$ cfu / g
รา	< 500 cfu / g
E. coli	< 100 MPN / g
Staphylococcus aureus	< 10 cfu / g
Bacillus cereus	< 100 cfu / g
Clostridium perfringens	ไม่พบ
Salmonellae	ไม่พบ

(**ที่มา** : จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2538)

จากการวิเคราะห์คุณภาพของปูดองโดยทั่วไป พบว่า มีความชื้น โปรตีนและไขมันอยู่ระหว่าง 31.2 - 70.5, 2.5 - 13.3 และ 0 - 1.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารเยื่อใย เถ้า โซเดียมคลอไรด์ และกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 0 - 7.9, 15.7 - 26.2, 7.8 - 17.3 และ 0 - 1.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.2 - 7.8 และค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ ประมาณ 0.76 (Phithakpol *et. al.* 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตปูดอง (ก)ปูดองน้ำเกลือเพื่อการบริโภคในครัวเรือนในประเทศไทย (ข)ปูดองน้ำเกลือเพื่อการจัดจำหน่ายของประเทศเพื่อนบ้าน (ค)ปูดองน้ำปลา

2.5 จุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารหมักดองเป็นสื่อ

ประชาชนส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารหมักดองพื้นบ้านกันสด ๆ ไม่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อเพื่อประกันความปลอดภัยต่อการบริโภค ดังนั้น การระบาดของโรคที่มีอาหารหมักดองเป็นสื่อจึงเกิดขึ้นอยู่เนือง ๆ ส่วนใหญ่มักมีอาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ปวดท้อง อุจจาระร่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลื่นไส้และอาเจียน ระยะเวลาตั้งแต่บริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคหรือสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจนเกิดอาการและระยะเวลาในการเกิดโรคขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ภูมิต้านทาน สุขภาพและวัยของผู้บริโภค เป็นต้น ตารางที่ 2.4 แสดงจำนวนผู้ป่วยและตายจากโรคท้องร่วงในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2538 - พ.ศ. 2542 จากตารางดังกล่าวแม้ไม่ได้ระบุถึงสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วง แต่คาดว่าน่าจะมีสาเหตุจากการบริโภคอาหารหมักดองที่ผ่านกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะรวมอยู่ด้วย การปนเปื้อนของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่วัตถุดิบที่ใช้ การเตรียมการ การหมักและการจัดจำหน่าย จุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารหมักดองเป็นสื่อ โดยทั่วไปมักเป็นแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.4 จำนวนผู้ป่วยและตายจากโรคท้องร่วงในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2539 - พ.ศ. 2543 (หน่วย : คน)

พ.ศ. 2539		พ.ศ. 2540		พ.ศ. 2541		พ.ศ. 2542		พ.ศ. 2543	
ป่วย	ตาย	ป่วย	ตาย	ป่วย	ตาย	ป่วย	ตาย	ป่วย	ตาย
981072	397	1054904	352	1157629	323	963246	215	954019	196

(**ที่มา** : กองระบาดวิทยา. 2544)

2.5.1 *Bacillus cereus*

B. cereus เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์รูปร่างเป็นท่อนยาว ขนาด 1 × 3.5 ไมโครเมตร สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน สามารถทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 30 นาที เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) เจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 10 - 48 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงที่เหมาะสม คือ 35 - 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค สร้างสารพิษ 2 ชนิดคือ สารพิษชนิดที่ไม่ทนความร้อน สร้างและปล่อยออกนอกเซลล์ขณะเจริญเติบโตอยู่ในระยะ logarithmic สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสารพิษชนิดที่ทนความร้อน ซึ่งสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 126 เซลเซียส ได้นานถึง 90 นาที ผู้บริโภคต้องได้รับในปริมาณมากประมาณ 10^5 - 10^8 โคโลนีต่อกรัมของอาหารจึงจะแสดงอาการของโรค *B. cereus* ทำให้เกิดโรคได้ 2 ลักษณะ คือ (Becker. 1988)

1) อุจจาระร่วง (diarrhea) เกิดจากสารพิษชนิดที่ไม่ทนความร้อน อาการของโรคเกิดขึ้นภายหลังการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน 8 -16 ชั่วโมง อาการของโรคจะหายไปภายใน 24 ชั่วโมง

2) อาเจียน (vomitting) เกิดจากสารพิษชนิดที่ทนความร้อน เกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียนภายหลังการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน 1 - 5 ชั่วโมง ปกติการป่วยจะมีระยะเวลานาน 6 - 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของโรค ได้แก่ เนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ เครื่องเทศ ข้าวสุกที่ทิ้งไว้นานก่อนบริโภค ข้าวผัดและน้ำนมพาสเจอไรซ์ ความร้อนที่ใช้ในการประกอบอาหารดังกล่าวไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* มีรายงานการระบาดของโรคระบบทางเดินอาหารเนื่องจาก *B. cereus* ในหลาย ๆ ประเทศในทวีปยุโรป อเมริกาและแคนาดา เช่น ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้เกิดการระบาดของโรคดังกล่าวบ่อยมาก อาหารที่เกี่ยวข้องมักเป็นเนื้อสัตว์ที่ปรุงรสด้วยเครื่องเทศชนิดต่าง ๆ เนื่องจากเครื่องเทศมักมีแบคทีเรีย ที่มีเซลล์รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้ รวมทั้ง *B. cereus* ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง ความร้อนที่ใช้ในการเตรียมอาหารประเภทนี้ไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ แต่กลับเป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ ทำให้ *B. cereus* เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนอย่างมากถึง 10^5-10^6 โคโลนีต่อกรัมของอาหารภายหลังการเตรียม (Beckers.1988) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการระบาดของโรคเนื่องจาก *B. cereus* ที่เกิดจากการบริโภคข้าวผัดที่ผลิตจากร้านอาหารจีนหรือร้านอาหารที่จำหน่ายอาหารสำหรับซื้อไปรับประทานภายนอกร้าน (take away shop) ช่วงที่มีการงอกของสปอร์และการเจริญของเซลล์นั้นเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมข้าวสุกและภายหลังการผัดที่ผ่านความร้อนช่วงสั้น รวมทั้งช่วงรอการบริโภค อาการของผู้ป่วยที่บริโภคอาหารที่มี *B. cereus* ปนเปื้อน คือ คลื่นไส้ อาเจียน และแน่นหน้าอก ภายหลังการบริโภคเป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง จากการตรวจหา *B. cereus* จากข้าวผัดที่เหลือ พบ *B. cereus* 10^7 โคโลนีต่อกรัมของอาหาร ในประเทศไทยจากรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษของกองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2528 - พ.ศ. 2538 พบว่า โรคส่วนใหญ่เกิดจาก *B. cereus* ร่วมกับ *S. aureus* (จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2538)

2.5.2 *Clostridium perfringens*

Cl. perfringens หรือ *Cl. welchii* เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก เป็นปรสิต (obligate parasite) ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนขนาด 0.6 - 2.4 × 1.3 - 19.0 ไมโครเมตร มักพบเซลล์อยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ ไม่เคลื่อนที่ สร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 37 - 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในที่อุณหภูมิต่ำถึง 15 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญของ *Cl. perfringens* ที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 และที่พีเอชสูงกว่า 8.5 สามารถสร้างสารพิษ 5 ชนิด คือ ชนิด A, B, C, D และ E สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารจะสร้างสารพิษชนิด A และ C สปอร์ของสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษชนิด A ทนความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดนานถึง 1 - 5 ชั่วโมง เมื่อมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วย *Cl. perfringens* ปริมาณมากเข้าไป *Cl. perfringens* จะเจริญและสร้างสปอร์ในลำไส้เล็กแล้วปล่อยสารพิษออกมาทำให้เกิดอุจจาระร่วงอย่างแรง เป็นตะคริวที่ท้อง แต่ไม่มีอาการอาเจียนหรือมีไข้ อาการของโรคเกิดขึ้นภายหลังการบริโภคอาหารที่มี *Cl. perfringens* ปนเปื้อน 6 - 22 ชั่วโมง (Hayes. 1992) มีรายงานการระบาดของโรคระบบทางเดินอาหาร เนื่องจาก *Cl. perfringens* ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศสหรัฐอเมริกาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1945 จากนั้นมา จนถึงปี ค.ศ. 1982 พบว่า มีผู้ป่วยเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากการบริโภคเนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ (Frazier and Westhoff. 1988) มีรายงานการระบาดครั้งใหญ่ในประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1986 อาหารที่เป็นสาเหตุ คือ ปลาแซลมอลต้ม (boiled salmon) ที่ทางโรงแรมแห่งหนึ่งในกรุงลอนดอนได้ซื้อและแช่แข็งไว้เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาเตรียมเป็นอาหาร โดยการหั่นเป็นชิ้นขนาด 1.25 เซนติเมตร ใส่ในน้ำซุปที่เย็น จากนั้นนำไปต้มนาน 15 - 30 นาที และทิ้งให้เย็นเป็นเวลา 1 คืน วันต่อมาก็จัดแบ่งใส่จาน และแช่เย็นต่ออีก 1 คืน จึงนำมาให้ผู้เข้าพักบริโภค ปรากฏว่าประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของผู้เข้าพักทั้งสิ้นจำนวน 1100 คนป่วยเป็นโรคอาหารเป็นพิษ ภายหลังการบริโภคอาหารเป็นเวลา 6 - 30 ชั่วโมงผู้ป่วยฟื้นจากการป่วยในเวลา 3 วัน (Hayes. 1992)

2.5.3 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ จัดอยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เซลล์รูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาด 1.1 - 1.5 × 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร เซลล์มักอยู่เดียว ๆ และอาจพบอยู่เป็นคู่ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ยื่นออกมารอบเซลล์ พบ *E. coli* ได้ทั่วไปในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นและในธรรมชาติโดยเฉพาะในดินและน้ำ จึงใช้เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ (indicator microorganism) ด้านสุขลักษณะของน้ำและอาหาร

E. coli มีทั้งสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในคนและสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารนั้น แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มแตกต่างกันที่ความรุนแรงและอาการของโรค การแพร่ระบาด ความแตกต่างของ somatic (O) และ flagella (H) antigens *E. coli* แต่ละกลุ่มยังจัดจำแนกออกเป็น สายพันธุ์ ต่าง ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของ O และ H antigens *E. coli* กลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรค (Hitchins *et.al.* 1992) ได้แก่

1) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วง (Watery diarrhea) ในเด็กแรกเกิด กลไกในการทำให้เกิดโรคยังไม่แน่ชัดว่าเกิดจากสารพิษหรือความสามารถในการบุกรุกเข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ แต่มีรายงานการตรวจพบเซลล์เกาะติดกับเซลล์ของลำไส้เล็ก EPEC มีพลาสมิดขนาด 60 เมกะดอลตัน บางสายพันธุ์สร้างสารพิษคล้ายสารพิษที่สร้างโดยแบคทีเรียในสกุล Shigellae

2) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า traveller's diarrhea เนื่องจากมักเกิดกับนักท่องเที่ยว แต่ไม่เกิดกับคนในท้องถิ่นเนื่องจากการมีภูมิต้านทาน ETEC สร้างสารพิษ 2 ชนิด คือ สารพิษชนิดที่ไม่ทนความร้อน (heat - labile toxin [LT]) สามารถทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 นาที และสารพิษชนิดที่ทนความร้อน (heat - stable toxin [ST]) ซึ่งทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ETEC บางสายพันธุ์สร้างสารพิษชนิดใดชนิดหนึ่ง บางสายพันธุ์สร้างสารพิษทั้งสองชนิด

3) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นกลุ่มที่สามารถบุกรุกและเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้และเซลล์ใกล้เคียง ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณนั้นตาย เช่นเดียวกับการเกิดโรคของ Shigellae ความสามารถในการบุกรุกเซลล์เกิดจากยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนอยู่บนพลาสมิดขนาด 140 เมกะดอลตัน นอกจากนี้ EIEC ยังมี somatic (O) antigen คล้าย Shigellae อีกด้วย การบริโภค EIEC ที่ปนเปื้อนในอาหารทำให้เกิดอาการของโรคระบบทางเดินอาหารและถ่ายอุจจาระมีมูกเลือดปน อาหารที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรค คือ เนยแข็ง น้ำ นม และเนื้อสัตว์ โรคอุจจาระร่วงที่เกิดจาก EIEC มักเกิดกับนักท่องเที่ยวที่เคยอาศัยในสถานที่ที่มีมาตรฐานทางสุขอนามัยสูงเดินทางไปและบริโภคอาหารในสถานที่ที่มีสุขอนามัยต่ำ

4) Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็นกลุ่มที่สร้างสารพิษที่มีผลต่อเซลล์ของมนุษย์และสัตว์ คุณสมบัติคล้ายสารพิษที่สร้างโดย *Shigella dysenteriae* เรียกสารพิษที่สร้างโดย EHEC นี้ว่า verotoxin สารพิษนี้ทำให้ลำไส้ใหญ่อักเสบและมีเลือดออก อุจจาระร่วง และมีผลต่อการทำงานของไต ทำให้ไตวายได้ พบทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ EHEC สายพันธุ์ที่แพร่ระบาดมาก คือ 0157:H7 สายพันธุ์นี้สร้าง verotoxin จากยีนของ bacteriophage ที่อยู่บนโครโมโซม นอกจากนี้ยังมีพลาสมิดชนิด 60 เมกะดอลตัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง fimbrial protein โดยความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับความสามารถของ EHEC ในการเกาะบนเซลล์ของลำไส้ รายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก EHEC มีบ้างในทวีปอเมริกา ยุโรป และเอเชีย ในสหรัฐอเมริกาพบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 จากนั้นมีรายงานการระบาดในแคนาดาและญี่ปุ่น สายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคคือ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 และในปัจจุบันพบ สายพันธุ์ อื่น ๆ ด้วย ได้แก่สายพันธุ์ O26, O111, O113 และ O145 แต่มีความรุนแรงน้อยกว่าสายพันธุ์ O157:H7 (Eley. 1992)

2:5.4 **Salmonellae**

Salmonellae เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับลำไส้ (enteric bacteria) จัดอยู่ในสกุล *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาด 0.7 - 1.5 × 2.0 - 5.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่าที่ยื่นออกมารอบเซลล์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดและก๊าซ ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโทสและซูโครสได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 38 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำถึง 7 - 8 องศาเซลเซียส สามารถทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 - 20 นาที

Salmonellae สร้างสารพิษที่เป็น lipopolysaccharide ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า salmonellosis ซึ่งปกติจะมีอาการหลังบริโภค

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

58923

อาหารที่มีการปนเปื้อนในปริมาณที่มากพอ (มากกว่า 10^5 เซลล์) ประมาณ 12 - 36 ชั่วโมง อาการจะปรากฏอยู่นานตั้งแต่ 1 - 5 วัน อาการของโรคที่พบ ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง ปวดท้อง มีไข้และอ่อนเพลีย โรคอุจจาระร่วงที่มีอาการรุนแรงกว่า salmonellosis ปกติเกิดจาก *S. typhimurium* มีชื่อเฉพาะว่าโรคไทฟอยด์ (typhoid fever หรือ enteric fever) และที่เกิดจาก *S. paratyphi* เรียกว่า โรคพาราไทฟอยด์ ซึ่งมีอาการไม่รุนแรงเท่าโรคไทฟอยด์ ผู้ป่วยที่เป็นโรคไทฟอยด์จะมีไข้สูงในระยะแรก และพบจุลินทรีย์ก่อโรคในเลือดและปัสสาวะในระยะต่อมา ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับความต้านทานของผู้บริโภค ปริมาณและสายพันธุ์ โดยสามารถแพร่กระจายได้ในดิน แหล่งน้ำ น้ำดื่ม และน้ำใช้ ซึ่งอาจทำให้กุ้ง หอย ปู และปลาที่จับจากแหล่งน้ำนั้นมีการปนเปื้อน *S. typhimurium* ด้วย (Hobbs and Roberts. 1993) ตัวอย่างการระบาดครั้งใหญ่ ได้แก่ การระบาดของโรคไทฟอยด์ในสหราชอาณาจักร ในปี ค.ศ. 1937 มีผู้ป่วยถึง 700 คน เสียชีวิต 70 คน และในปีเดียวกัน พบการระบาดอีกครั้งโดยมีไอศครีมเป็นสาเหตุมีผู้ป่วย 210 คน ต่อมา ในปี ค.ศ. 1964 เกิดการระบาดของโรคอีกครั้ง มีผู้ป่วย 515 คน สาเหตุจากเนื้อกระป๋องที่ส่งมาจากอเมริกาใต้ เนื่องจากน้ำที่ใช้ในการทำให้อาหารกระป๋องเย็นภายหลังกระบวนการผลิตโดยใช้ความร้อนมีการปนเปื้อนด้วย *S. typhimurium* (Hayes. 1992)

2.5.5 *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.5 - 1 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ในสภาพที่เจริญจะพบเซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงผลองุ่น เจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 8 องศาเซลเซียส ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 0.86 เจริญได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เลือดหรือพลาสมาจับตัวเป็นก้อน และสามารถสร้างสารพิษและปล่อยออกมานอกเซลล์ปนเปื้อนในอาหาร สารพิษที่สร้างขึ้นมี 6 ชนิด คือ A, B, C_1 ,C_2 , D และ E สารพิษชนิด A และ D เกี่ยวข้องกับอาการเป็นพิษเนื่องจากอาหาร *S. aureus* ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ทั้งหมดสามารถสร้างสารพิษ และประมาณ 2 ใน 3 ของสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษสามารถสร้างสารพิษชนิดเดียว ซึ่งมักเป็นสารพิษชนิด A สายพันธุ์ที่เหลือมักสร้างสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิด สารพิษเหล่านี้ทนความร้อน ส่วนใหญ่ทนความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดนาน 30 นาที ดังนั้น ถ้าใช้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ คือ 62.8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถทำลาย *S. aureus* แต่ไม่สามารถทำลายสารพิษได้ ผู้ที่บริโภคอาหารที่มีสารพิษของ *S. aureus* เข้าไปจะเกิดอาการผิดปกติขึ้นกับระบบทางเดินอาหารอย่างเฉียบพลัน อาการจะเกิดภายหลังได้รับสารพิษในช่วง 1 - 4 ชั่วโมง ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับภูมิต้านทานของผู้บริโภค และปริมาณสารพิษที่บริโภคเข้าไป ระดับของสารพิษที่ทำให้เกิดโรคประมาณ 1 ไมโครกรัม แต่ถ้าเป็นเด็ก ได้รับสารพิษประมาณ 0.2 ไมโครกรัมก็เกิดอาการได้ อาการ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เกิดขึ้น คือ มึนงง คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง เป็นตะคริวที่ท้อง และจะหายไปเองภายในเวลา 24 - 27 ชั่วโมง เมื่อขับถ่ายอุจาระที่มีสารพิษออกหมดแล้ว ไม่ค่อยพบการตาย การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *S. aureus* ได้แก่ ในยุโรปพบการระบาดของโรค 9 ครั้งในปี ค.ศ. 1984 มีผู้ป่วยรวม 47 คน เกิดจากการบริโภค Italian egg lasagne ซึ่งจากการตรวจสอบอาหารดังกล่าวจำนวน 50 กล่อง ที่ยังไม่ปิดผนึก พบว่า อาหารจำนวน 41 กล่องมีการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในปริมาณ 10^4 - 10^8 โคโลนีต่อกรัมของอาหาร และยังตรวจพบสารพิษชนิด A จากการสืบสวน พบว่า *S. aureus* ปนเปื้อนในไข่ ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหารและได้เพิ่มจำนวนระหว่างเตรียมอาหาร (Hayes.1992) ในประเทศไทย จากรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษของกองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2528 - 2538 พบว่า มีจำนวน 17 ครั้ง ส่วนใหญ่เกิดเนื่องจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ หรือเนื่องจาก *S. aureus* ร่วมกับ *B. cereus* ปริมาณที่ตรวจพบมีมากกว่า 1×10^6 โคโลนีต่อกรัมของอาหาร และอาหารที่พบว่าเป็นสาเหตุ คือ อาหารที่มีการหยิบจับด้วยมือ ได้แก่ ขนมจีน ข้าวเหนียวมะม่วง แหนม ขนมแอแคร์ เป็นต้น จะเห็นได้ว่าสาเหตุการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารส่วนใหญ่ เกิดเนื่องจากสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี ผู้ประกอบการหรือบริกรอาหาร ขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการสุขาภิบาลอาหาร (จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2538)

2.5.6 *Vibrio cholerae*

V. cholerae เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการโซเดียมอิออนในการเจริญต่ำมาก ซึ่งแตกต่างจาก Vibrio ชนิดอื่นที่ชอบความเค็ม *V. cholerae* สายพันธุ์ต่าง ๆ จำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่ม O1 และกลุ่ม non – O1 ตามคุณสมบัติทางซีรัมวิทยา โดยใช้ somatic (O) antigen เป็นตัวทดสอบ กลุ่ม non - O1 มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มเมื่อรวมกับ antisera ของ O1 ส่วนกลุ่ม O1 ไม่มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มเมื่อรวมกับ antisera ของ O1 antiserum *V. cholerae* O1 ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่าอหิวาตกโรคในคน *V. cholerae* non - O1 อาจเกี่ยวข้องกับโรคอุจจาระร่วงที่คล้ายอหิวาตกโรค โดยเชื้อสามารถเกาะกับผนังลำไส้เล็กและเพิ่มจำนวน แต่ไม่บุกรุกผ่านผนังลำไส้หรือบุกรุกไปยังอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคสามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า cholera toxin (CT) CT เป็นสารพิษที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย ซึ่งเป็น polypeptides ที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในเยื่อบุลำไส้ ทำให้มีการผลิต cyclic adenosine monophosphate (cAMP) เพิ่มมากขึ้น มีผลให้เกิดการหลั่งน้ำ และเกลือแร่เข้าสู่ลำไส้เล็ก ทำให้มีอาการอุจจาระร่วงรุนแรงลักษณะเหมือนน้ำซาวข้าว อาการของโรคจะปรากฏภายหลังการได้รับการ จุลินทรีย์ก่อโรค 1 - 4 วัน ผู้ป่วยมักมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และมีอาการอุจจาระร่วง ร่างกายสูญเสียน้ำมากอาจถึง 10 - 15 ลิตรต่อวัน ถ้ารักษาไม่ทันอาจตายได้ (Holt *et. al.* 1994) การระบาดของโรคเกิดจาก *V. cholerae* ปนเปื้อนอยู่ในน้ำและอาหารหลายชนิด พบทั้ง *V. cholerae* กลุ่ม O1 และ non

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

O1 แต่พบการระบาดของกลุ่ม non - O1 ได้บ่อยกว่ากลุ่ม O1 สำหรับอหิวาตกโรคที่เกิดเนื่องจาก *V. cholerae* กลุ่ม O1 เป็นโรคติดต่อที่มีการระบาดอย่างรวดเร็วมาก อาหารที่เป็นสาเหตุมักมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง *V. cholerae* กลุ่ม O1 สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็น ตู้แช่แข็ง อาหารที่เป็นสาเหตุของการระบาดของอหิวาตกโรคในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ.1984 ,1986 ,1988 และ 1991 คือ เนื้อปู นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์น้ำกะทิที่ส่งจากประเทศไทยเป็นสาเหตุของการระบาดของอหิวาตกโรคที่รัฐแมรีแลนด์ ในปี ค.ศ. 1991 (อรสา สุตเธียรกุล. 2538)

2.5.7 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ (halophilic bacteria) 3 - 8 เปอร์เซ็นต์ ไม่เจริญในอาหารที่ไม่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ ซึ่งแตกต่างจาก *V. cholerae* จึงพบ *V. parahaemolyticus* ได้ในน้ำทะเลและปนเปื้อนในอาหารทะเลประเภทปลา กุ้ง หอย ปู ที่ปรุงสุก ๆ ดิบ ๆ สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 9 - 10 องศาเซลเซียส และพีเอช 5 - 11 *V. parahaemolyticus* มีคุณสมบัติทางชีวเคมีส่วนใหญ่คล้ายคลึงกับ *V. vulnificus* มาก แต่สามารถบอกความแตกต่างได้จากการทดสอบกิจกรรมของ β - galactosidase (ONPG test) และการสร้างกรดจากเซลโลไบโอสและน้ำตาลแลคโตส อาการของโรคอาจเกิดภายหลังได้รับการ จุลินทรีย์ก่อโรค 2 - 3 วัน ผู้ป่วยมักมีอาการ ปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ มีไข้เล็กน้อย หนาวสั่น พบการระบาดของโรคระบบทางเดินอาหาร ที่เกิดเนื่องจาก*V. parahaemolyticus* ได้ทั่วไป (Kaysner *et. al.* 1992) ในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยจาก *V. parahaemolyticus* ตลอดปี อาหารที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรค ได้แก่ ปลา ปู และหอยแมลงภู่ (อรสา สุตเธียรกุล. 2538) ในประเทศญี่ปุ่น ส่วนใหญ่พบ *V. parahaemolyticus* ระบาดมากในฤดูร้อน และมักปนเปื้อนมากับอาหารทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาดิบ ส่วนใน สหราชอาณาจักร และสหรัฐอเมริกา พบการระบาดของโรคเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* โดยมี ปู และกุ้ง ซึ่งนำเข้าจากประเทศแถบตะวันออกไกลเป็นสาเหตุ มีรายงานการป่วยประมาณ 100 คนต่อปีในสหราชอาณาจักรในปี ค.ศ. 1980 และลดจำนวนลงจนเหลือน้อยมาก ภายหลังปี ค.ศ. 1980 (Hayes.1992)

2.6 งานวิจัยการใช้โปรไบโอติคยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

อรนุช อุตรภิชาติ (2530) ได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากแหนมจำนวนทั้งสิ้น 112 ไอโซเลท ได้แก่ *Pediococcus* spp. 78 ไอโซเลท *Lactobacillus* spp. 34 ไอโซเลท พบว่าแต่ละไอโซเลทให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ Salmonellae ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ *S. anatum* , *S. bovimorbificans* , *S. derby* ,*S. krefeld* , *S. lexington* , *S. london* , *S. weltevreden* และ *S.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

newport ได้แตกต่างกัน โดยที่แบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้ง *S. anatum* ได้น้อยที่สุด และได้คัดเลือก *Pediococcus* spp. P_{42} และ *Lactobacillus* spp. L_{23} มาผลิตเป็นกล้าเชื้อผง

วิลาวัณย์ เจริญจิระสกุลและคณะ (2539) ได้ศึกษาผลของ *Lactobacillus* 5 ชนิด จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* , *S. typhimurium* และ *E. coli* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันโดย *Lactobacillus* แต่ละชนิดมีปริมาณเริ่มต้นชนิดละ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร *S. aureus*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ปริมาณเริ่มต้นชนิดละ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร มาผสมกันในอัตราส่วนโดยปริมาณ 1 : 1 ในหลอดทดลอง บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า *Lactobacillus* ทั้ง 5 ชนิด สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ 61.1 - 75.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *S. typhimurium* และ *E. coli* ถูกยับยั้งระหว่าง 40.5 - 62.1 และ 47.9 - 53.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วิลาวัณย์ เจริญจิระสกุล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) ได้ศึกษาการแยกเชื้อ คัดเชื้อและเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว บูดู ปลาร้า ปลาส้ม ปลาแป้งแดง แหนมปลา กุ้งส้ม ข้าวหมาก และผักดองชนิดต่าง ๆ สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 80 ชนิด หลังจากนั้นได้นำแบคทีเรียดังกล่าวทั้งหมดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium* , *B. cereus* และ *S. aureus* โดยวิธีหยดบนอาหารแข็ง สามารถคัดแบคทีเรียแลกติกที่มีบริเวณการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร ต่อแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 3 ชนิด ได้ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำไปเทียบเคียงชนิด พบว่าเป็น *L. plantarum* 16 สายพันธุ์ *L. bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์

วิลาวัณย์ เจริญจิระสกุล (2543) แยกแบคทีเรียแลกติกได้ 212 สายพันธุ์จากอาหารหมักพื้นบ้าน 329 ตัวอย่าง จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* 198 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 14 สายพันธุ์ และนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *B. cereus* ATCC 1178 , *S. aureus* ATCC 25923 , *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* ATCC 3230 โดยวิธีหยดบนอาหารแข็ง พบว่า แบคทีเรียแลกติก 193 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้

Smith, *et. al.* (1975) ใช้ *Pediococcus cerevisiae* ผสมกับ *L. plantarum* หมักไส้กรอก bologna พบว่า สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ที่มีปริมาณเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์ประมาณ 10^4 โคโลนีต่อกรัม ได้หมดหลังการหมักผ่านไป 4 วัน

Gilliland and Speck (1977) พบว่า *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Cl. perfringens* โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *Cl.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

perfringens ได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* และพบว่าการยับยั้งมีผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ *L. acidophilus* สร้างขึ้น

Fravier, *et. al.* (1980) ใช้ Micrococci และ Lactobacilli หมัก French dried sausages พบว่า ผลิตภัณฑ์ มีสีและกลิ่นที่ดี ลดระยะเวลาในการหมักและพีเอช ได้เร็วขึ้น รวมทั้งยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการในระหว่างการหมัก

Metaxopoulos, *et. al.* (1981) ได้ศึกษาการหมักไส้กรอกซาลามี (salami) โดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp. เพื่อลดปริมาณ *S. aureus* พบว่า ปัจจัยต่าง ๆ คือ ปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อน ปริมาณของ *Lactobacillus* sp. เริ่มต้นในไส้กรอก พีเอช เริ่มต้นของการหมัก อัตราการเกิดกรดในไส้กรอก และระยะเวลาในการหมักมีผลต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ขณะหมักพบ *S. aureus* ส่วนหนึ่งบาดเจ็บจากกรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

Mitic, *et. al.* (1982) ได้ทดสอบความสามารถของ *Lactobacillus bulgaricus* ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Shigella sonnei*, *Proteus* , Salmonellae , *Klebsiella* , *Pseudomones* spp. และ *E. coli* พบว่า *L. bulgaricus* สายพันธุ์ C ซึ่งแยกได้จากนมเปรี้ยวในยูโกสลาเวียให้ผลการยับยั้งดีที่สุด

Vignolo, *et.al.* (1989) ใช้ *L. plantarum* และ *Micrococcus varians* ในการผลิตไส้กรอกหมัก พบว่าไส้กรอกที่ได้มีเนื้อสัมผัสแน่น สีและกลิ่นเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค กรดที่เกิดขึ้นทำให้พีเอชของไส้กรอกอยู่ในช่วง 4.4 - 4.5 ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ มีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอก และช่วยป้องกันการเจริญของ *Cl. botulinum* นอกจากนี้ยังลดเวลาการหมักเหลือ 7 วันแทนที่จะเป็น 14 วัน

Aryanta, *et. al.* (1991) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกปลา โดยใช้ *Pediococcus acidilactici* เป็นกล้าเชื้อ พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่เกิดตามธรรมชาติ เช่น *Pediococcus plantarum* , *L. plantarum* เจริญอย่างเด่นชัด และพบจุลินทรีย์ก่อโรคและไม่ก่อโรคอื่น ๆ อีก เช่น *Staphylococcus warneri*, *S. aureus*, *S. epidermidis* , *Micrococcus luteus* ส่วน *Bacillus megaterium*, *S. typhimurium*, *S. sofia*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *Cl. perfringens* และยีสต์มีปริมาณน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่กล้าเชื้อ

Elaine *et. al.* (1991) ได้ศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *P. acidilactici* JD1-23 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในไส้กรอกเยอรมัน (Frankfurters) ที่อุณหภูมิ 4 และ15 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน พบว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีออกซิเจน Pediococci สามารถลดการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไม่สามารถลดการเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoover (1992) ได้ทดสอบความสามารถของ *L. acidophilus* จำนวน 13 สายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis*, *Salmonella* spp. *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis*, *Salmonella* spp. *S. aureus* และ *E. coli* ได้ และเมื่อทำการสกัดและวิเคราะห์สารดังกล่าวจากน้ำหมักจาก *L. acicophilus* AR1 ที่ผ่านการแยกเซลล์ออก พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ โปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 5200 ดอลตัน และทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 สัปดาห์

Fernandez (1994) ได้ทดลองแยก *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp. จากเนยแข็งและนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. โดยใช้แบคทีเรียแลกติกปริมาณ 30 เท่าของจุลินทรีย์ดังกล่าว พบว่า *Streptococcus* spp. สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ได้สมบูรณ์ ในขณะที่ *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp. สามารถยับยั้งได้บ้าง แต่เมื่อใช้แบคทีเรียแลกติกปริมาณน้อยกว่าจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้งประมาณ 3 - 4 เท่า พบว่า *Streptococcus* spp. ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shigella* spp. และ *Streptococcus* spp. เกือบทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Salmonella* spp.ได้ ในขณะที่ *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp. สามารถยับยั้งได้น้อยกว่า

Olasupo, *et. al.* (1994) ได้ศึกษาการหมักหางนมด้วย *E. faecium* พบว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Listeria* ได้แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารนี้จะหมดไปเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 2.0 - 3.0 มีเอนไซม์โปรตีเอส และสาร ethidium bromide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 *Bacillus cereus* DMSC 5040 ATCC 11778 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.2 *Clostridium perfringens* DMSC 10442 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.3 *Escherichia coli* DMSC 4242 ATCC 25922 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.4 *Salmonella typhimurium* DMSC 0562 ATCC 13311
จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.5 *Staphylococcus aureus* DMSC 3697 ATCC 25923
จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.6 *Vibrio cholerae* DMSC 2873 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.7 *Vibrio parahaemolyticus* DMSC 5665 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.8 *Pediococcus* sp. TISTR 129 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

3.1.9 *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450
จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

3.1.10 *Lactobacillus plantarum* TISTR 854
จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

3.1.11 *Enterococcus faecium* TISTR 1283
จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

3.2 วัตถุดิบ

3.2.1 ปูแสม จากตลาดสดหัวตะเข้และสมุทรปราการ

3.2.2 เกลือแกง จากตลาดสดหัวตะเข้

3.2.3 น้ำปลาผสมตราเด็กอ้วน จากตลาดสดหัวตะเข้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 ตู้อบลมร้อน	รุ่น FD 58	ของ	Binder
3.3.2 ตู้เขี่ยเชื้อ	รุ่น Bio 48	ของ	Faster
3.3.3 เครื่องวัดพีเอช	รุ่น SA 520	ของ	Orion
3.3.4 เครื่องเขย่าหลอดผสมสาร	รุ่น G-560E	ของ	Scientific industries. Inc.
3.3.5 หม้อนึ่งความดัน	รุ่น HA-3D	ของ	Scientific industries. Inc.
3.3.6 ตู้บ่มเชื้อ	รุ่น B 60	ของ	Memmert

3.3.7 Hot plate

3.3.8 เครื่องปั่นอาหาร

3.3.9 เทอร์โมมิเตอร์

3.3.10 ขวดพลาสติกขนาด 3 ลิตร

3.3.11 เครื่อง stomacher

3.3.12 ถุง stomacher

3.3.13 anaerobic jar

3.3.14 เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

3.4 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

3.4.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.4.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์

3.4.3 กรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล

3.4.4 ชุดย้อมสีแบบแกรม

3.4.5 คริสตอลไวโอเลต

3.4.6 ไอโอดีน

3.4.7 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

3.4.8 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์

3.4.9 ฟีนอล เรด

3.5.10 Rabbit plasma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.11 เงินไนเตรท

3.5.12 กรดไนตริก

3.5.13 แอมโมเนียมเฟอริกซัลเฟต

3.5.14 แอมโมเนียมไธโอไซยาเนต

3.5.15 ฟีนอล์ฟทาลีน

3.5.16 แอซิดโพแทสเซียมพาธาเลท

3.5 อาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์

3.5.1 Brain Heart Infusion, BHI	Difco Co.,Ltd.
3.5.2 Cook Meat Medium, CM	Difco Co.,Ltd.
3.5.3 Mannitol Yolks Polymycin, MYP	Merck Co.,Ltd.
3.5.4 Eosin Methylene Blue Agar, EMB	Difco Co.,Ltd.
3.5.5 Hektogen Enteric Agar, HE	Merck Co.,Ltd.
3.5.6 Plate Count Agar, PCA	Merck Co.,Ltd.
3.5.7 Lactobacillus Broth หรือ Man Rogosa Sharpe, MRS	Merck Co.,Ltd.
3.5.8 Mannitol Salt Agar, MSA	Merck Co.,Ltd.
3.5.9 Motility Indole Lysine, MIL	Merck Co.,Ltd.
3.5.10 Selenite Cystine Broth	Difco Co.,Ltd.
3.5.11 Triple Sugar Iron Agar,TSI	Difco Co.,Ltd.
3.5.12 Trypticase Soy Broth,TSB	Merck Co.,Ltd.
3.5.13 Thiosulfate – Citrate - Bile Salts – Sucrose,TCBS	EIKEN Chemical Co.,Ltd.
3.5.14 Violet Red Bile Agar, VRBA	Difco Co.,Ltd.
3.5.15 Salmol - Shigella Agar, SSA	Difco Co.,Ltd.
3.5.16 Xylose Lysine Deosexycholate Agar, XLD	Difco Co.,Ltd.
3.5.17 ยาปฏิชีวนะ Kanamycin	Thai meiji Co.,Ltd.
3.5.18 ยาปฏิชีวนะ Neomycin	Sigma
3.5.19 ไข่ไก่ (ไข่แดง)	C.P. Co., Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.6.1 ศึกษาจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง

3.6.1.1 การเก็บตัวอย่าง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลาที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นปูดองน้ำเกลือ 30 ตัวอย่าง และปูดองน้ำปลา 10 ตัวอย่าง โดยให้ผู้ขายเก็บตัวอย่างปูดองใส่ในถุงพลาสติก ใส่ในกระติกที่มีน้ำแข็งระหว่างรอการวิเคราะห์

3.6.1.2 การตรวจวิเคราะห์ นำตัวอย่างปูดองจากข้อ 3.6.1.1 มาตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวม และจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *B. cereus*, *Cl. perfringens* , *E. coli* , *S. aureus* , *Salmonella* sp. , *V. cholerae* , *V. parahaemolyticus* ตามวิธีการในภาคผนวก ก

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มาแสดงผลในรูปของช่วงข้อมูลต่ำสุดถึงสูงสุดและแสดงการพบและไม่พบจุลินทรีย์

3.6.2 ศึกษาการเจริญของโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดอง

3.6.2.1 เตรียมน้ำสกัดปูดอง โดยการนำตัวอย่างปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา มาตัดด้วยกรรไกรให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แบ่งปูดองที่ตัดเป็นชิ้นแล้วชนิดละ 3 ตัวอย่าง เจือจางด้วยน้ำ 75 50 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปั่นจนละเอียด กรองด้วยผ้าขาวบางเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวตัวอย่างละ 600 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร นำไปต้มให้โปรตีนตกตะกอนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเอาของเหลวปริมาตร 99 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนตัวอย่างละ 4 ฟลาสก์ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.6.2.2 เตรียมจุลินทรีย์โปรไบโอติค โดยการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติค 4 ชนิด ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. plantaram*, *Pediococcus* sp. และ *Enterococus faecium* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใสทิ้ง ใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากัน ทำเช่นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง นำส่วนที่เป็นตะกอนมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard No. 5 (ภาคผนวก ก) เจือจางจุลินทรีย์โปรไบโอติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้ง 4 ชนิด ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ชนิดละประมาณ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.6.2.3 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติคในน้ำสกัดปูดอง โดยการปิเปตสารละลายจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2.2 มาชนิดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำสกัดปูดองที่เตรียมไว้จากข้อ 3.6.2.1 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจหาปริมาณโปรไบโอติคในรูปของแบคทีเรียแลกติก เมื่อเวลาผ่านไป 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตามวิธีการในภาคผนวก ก

ทำการศึกษาแบบเดียวกันจำนวน 3 ซ้ำ ในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อหาความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ทำได้โดยการแปลงปริมาณจุลินทรีย์เป็นค่าลอการิทึมของจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ โดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan' New Multiple Range) เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติคที่เจริญได้ดีที่สุดในน้ำสกัดปูดอง จำนวน 2 ชนิด

3.6.3 ศึกษาการยับยั้งของโปรไบโอติคแบคทีเรียต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในฟลาสก์

3.6.3.1 เตรียมจุลินทรีย์โปรไบโอติค โดยนำจุลินทรีย์โปรไบโอติคที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าสามารถเจริญเติบโตดีที่สุดในน้ำสกัดปูดอง จากข้อ 3.6.2 จำนวน 2 ชนิด มาเตรียมตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.2 และทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นชนิดละ 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.6.3.2 เตรียมจุลินทรีย์ก่อโรค โดยนำจุลินทรีย์ก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* , *Cl. perfringens* , *E. coli* , *S. aureus* และ *S. typhimurium* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมจุลินทรีย์โปรไบโอติคตามวิธีการในข้อ 3.6.2.2 และเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นชนิดละ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.6.3.3 ศึกษาการยับยั้งของจุลินทรีย์โปรไบโอติคต่อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยการนำอาหารเหลว MRS (การเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลาจากข้อ 3.6.2.1 ปริมาณอย่างละ 94 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ใส่จุลินทรีย์โปรไบโอติค จากข้อ 3.6.3.1 แยกกันลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตรและจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิดจากข้อ 3.6.3.2 ลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยกันชนิดละ 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ และน้ำสกัดปูดองน้ำปลา เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคเริ่มต้นชนิดละ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เขย่าให้จุลินทรีย์กระจายตัว ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติคในรูปของแบคทีเรียแลกติกโดยรวม ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค กรดแลกติก และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อเวลาผ่านไป 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามวิธีการในภาคผนวก ก

ในกรณีที่ศึกษาการยับยั้งของจุลินทรีย์โปรไบโอติกสองชนิดรวมกันต่อจุลินทรีย์ก่อโรค ทำได้โดยการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้งสองชนิดผสมกันในอัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ก่อน แล้วปิเปตมา 1 มิลลิลิตรเพื่อทำการศึกษาพร้อม ๆ กันกับกรณีของจุลินทรีย์โปรไบโอติกชนิดเดียว เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ได้ผสมจุลินทรีย์โปรไบโอติคลงไป

ทำการศึกษาแบบเดียวกันจำนวน 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของปัจจัยที่ทำการศึกษา แปลงปริมาณจุลินทรีย์เป็นค่าลอการิทึมของจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างและคำนวณการยับยั้งจากสูตรของ Gilliland and Speck. (1977) ข้างล่างนี้ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่างควบคุม เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติคที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดเพียงชนิดเดียวมาใช้ในการศึกษาในข้อต่อไป

$$\% \text{ inhibit} = \frac{(\text{cfu / ml in control}) - (\text{cfu / ml in associative cultures}) \times 100}{(\text{cfu / ml in control})}$$

3.6.4 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปูดอง

3.6.4.1 เตรียมน้ำเกลือเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยการนำเกลือแกง 200 กรัม ผสมกับน้ำสะอาด 800 มิลลิลิตร ต้มให้เกลือละลาย ตั้งทิ้งให้เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง

3.6.4.2 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยจุลินทรีย์โปรไบโอติค โดยนำปูแสมสดมาล้างน้ำให้สะอาด ใส่ลงในขวดพลาสติก ใบแรกใส่จุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมจุลินทรีย์โปรไบโอติคตามวิธีการในข้อ 3.6.2.2 แล้วเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นชนิดละ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงไปด้วยกัน ชนิดละ 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำเกลือจนได้ปริมาตรครบ 3 ลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคเริ่มต้นชนิดละ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม ส่วนขวดพลาสติกใบที่สอง ใส่จุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิดเช่นเดียวกับในตัวอย่างควบคุม และจุลินทรีย์โปรไบโอติคที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด จากการศึกษาในข้อ 3.6.3 และได้ปรับความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตรมาเรียบร้อยแล้ว ลงไป 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำเกลือจนได้ปริมาตรครบ 3 ลิตร เพื่อได้ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียแลกติก จุลินทรีย์ *B. Cereus, S. aureus* และ *E. coli* ทั้งในส่วนที่เป็นน้ำเกลือหรือน้ำปลาและในตัวปู ส่วนจุลินทรีย์ก่อโรคที่เหลือ 2 ชนิด คือ *S. typhimurium* และ *Cl. perfringens* ทำการตรวจวิเคราะห์แบบพบหรือไม่พบ ตามวิธีการในภาคผนวก ก ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารที่มีเกลือประกอบอยู่ด้วยในปริมาณสูง เช่น ในอาหารหมักดองประเภทต่าง ๆ จะทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารแข็งที่ใช้ตรวจนับได้ ทำให้ผลการทดลองที่ได้เกิดการผิดพลาด (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2525) และทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก โซเดียมคลอไรด์ และพีเอช ในส่วนที่เป็นของเหลว เมื่อเวลาผ่านไป 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามวิธีในภาคผนวก ก

ส่วนการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยจุลินทรีย์โปรไบโอติคในกระบวนการผลิตปูดองน้ำปลา ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับวิธีการข้างต้นเพียงแต่ใส่น้ำปลาผสมแทนน้ำเกลือเท่านั้น

ทำการศึกษาแบบเดียวกันจำนวน 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของปัจจัยที่ทำการศึกษาและเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง

ผลการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร 2 ชนิด คือปูดองน้ำเกลือ 30 ตัวอย่างและปูดองน้ำปลา 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 7.1 และ 7.2 ในภาคผนวก ค ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของปูดองน้ำปลาและปูดองน้ำเกลือที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร

ชนิดจุลินทรีย์	ปูดองน้ำเกลือ[a]			ปูดองน้ำปลา[b]		
	ปริมาณที่พบ (ตัวอย่าง)	(%)	ช่วงปริมาณ (cfu / g)	ปริมาณที่พบ (ตัวอย่าง)	(%)	ช่วงปริมาณ (cfu / g)
จุลินทรีย์ทั้งหมด	30	100	10^5 - 10^6	10	100	10^5 - 10^8
แบคทีเรียแลกติกโดยรวม	30	100	10^5 - 10^6	10	100	10^5 -10^7
B. cereus	14	46.6	10^2 - 10^4	7	70	10^2 - 10^3
E. coli	10	33.3	10^2	5	50	10^2 - 10^3
S. aureus	5	16.6	10^2	3	30	10^2 - 10^3
Cl. perfringens	3	9	+[c]	2	20	+[c]
Salmonella sp.	8	26	+[c]	2	20	+[c]
V. cholerae	0	0	-	0	0	-
V. parahaemolyticus	0	0	-	0	0	-

[a] = ปริมาณตัวอย่างทั้งหมดที่สุ่มมาวิเคราะห์ 30 ตัวอย่าง

[b] = ปริมาณตัวอย่างทั้งหมดที่สุ่มมาวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง

+[c] = พบจุลินทรีย์แต่ไม่ต้องนับปริมาณ

\- = ไม่พบจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พยายามสุ่มเลือกตัวอย่างปูดองที่มีคุณภาพต่ำที่สุด เพราะคาดหวังให้มีโอกาสพบปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากที่สุด จากตารางดังกล่าวจะเห็นได้ว่าปริมาณจุลิทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวมและจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลามีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อนำปริมาณการพบที่เป็นเปอร์เซ็นต์มาเปรียบเทียบแล้วพบว่า *B. cereus*, *E. coli* , *S. aureus* และ *Cl. perfringens* ในปูดองน้ำปลาสามารถตรวจพบได้มากกว่าในปูดองน้ำเกลือ

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของศรีเมือง มาลีหวลและคณะ (2539) เรื่องการสำรวจจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง โดยการเก็บตัวอย่างปูดองจากทุก ๆ ภาคของประเทศยกเว้นภาคใต้ จำนวนทั้งสิ้น 92 ตัวอย่าง ตรวจพบ *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* และ *Cl. perfringens* แต่ตรวจไม่พบ *V. cholerae* ,*V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* sp. อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ (2546) ได้สำรวจปูดองจำนวน 100 ตัวอย่าง จากตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร ตรวจพบ *Salmonella* sp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* 4 , 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บัญญัติ สุขศรีงาม (2529) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* สามารถปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของแพลงตอนทำให้แพร่กระจายอยู่ในน้ำทะเล Boy and Hoerl (1991) รายงานว่า ในช่วงฤดูหนาว *V. parahaemolyticus* จะอยู่ในตะกอน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในฤดูร้อนจะแบ่งตัวแล้วแพร่กระจายสู่แพลงตอนและสัตว์น้ำ โดยพบ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเลพวก หอย ปู กุ้งและปลา ตามปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเลทั่วโลก และ Molittoris *et.al.* (1985) รายงานว่า การแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล ในช่วงฤดูร้อนจะพบเป็นปริมาณมากส่วนในช่วงฤดูหนาวจะพบน้อยลง ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูหนาว และปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาอาจไม่มากพอ ทำให้สำรวจไม่พบ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้ Pelezar *et. al.* (1993) รายงานว่า *Salmonellae* sp. สามารถปนเปื้อนในอาหาร น้ำดื่มและน้ำใช้ การตรวจพบ *Salmonella* sp. ในปูดองครั้งนี้ จึงอาจเกิดจากการปนเปื้อนของ *Salmonella* sp. จากภาชนะ เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต ขนส่ง และสุขลักษณะ ของการจัดจำหน่ายปูดองในตลาดสดไม่ดีพอ

4.2 ผลการศึกษาการเจริญของโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดอง

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* , *L. acidophilus* , *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* ในน้ำสกัดปูดองทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรไบโอติคแบคทีเรียทุกชนิด สามารถเจริญได้ทั้งในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำข้อมูลของปริมาณจุลินทรีย์ดังกล่าวในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu / ml) มาคำนวณเป็นค่าลอการิทึมของโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log cfu / ml) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

จากตารางที่ 4.2 พบว่า ในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* ส่วนในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *L. plantarum* เจริญเติบโตได้ดีกว่าจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดที่เหลือ ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง *L. plantarum* , *L. acidophilus* และ *Pediococcus* sp. เจริญเติบโตได้ดีกว่า *E. faecium* ส่วนที่ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium*

ส่วนในน้ำสกัดปูดองน้ำปลาความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมงจุลินทรีย์ทั้งหมดเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเวลา 48 ชั่วโมง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* ส่วนที่ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จุลินทรีย์ทั้งหมด เจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากข้อมูลดังกล่าว พอสรุปได้ว่า โปรไบโอติคแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตในน้ำสกัดปูดองน้ำปลาทุกความเข้มข้นในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงได้ดีกว่าในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ 1 – 2 ลอการิทึม อาจเป็นเพราะในน้ำปลาผสมที่นำมาดองปูแสมมีน้ำตาลและองค์ประกอบต่าง ๆ ซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารที่เหมาะสม ทำให้โปรไบโอติคแบคทีเรีย สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าในน้ำเกลือ

นอกจากนี้ ยังพบอีกว่า โปรไบโอติคแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดสามารถเจริญในน้ำสกัดปูดองทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ไม่ว่าในเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมงได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ที่เหลือ และไม่ว่าในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือหรือน้ำสกัดปูดองน้ำปลา ไม่ว่าในเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมงส่วนใหญ่แล้ว พบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้น จากผลการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการคัดเลือกโปรไบโอติคแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่เจริญได้ดีที่สุด คือ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* จากจำนวนโปรไบโอติคทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา และได้คัดเลือกเอาน้ำสกัดปูดองความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ มาทำศึกษาการยับยั้ง *B. cereus* , *E. coli* , *Cl. perfringens* , *S. aureus* และ *S. typhimurium* ในหัวข้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดองความเข้มข้นต่าง ๆ (หน่วย : log cfu / ml)

ชนิดจุลินทรีย์	ปูดองน้ำเกลือ									ปูดองน้ำปลา								
	ความเข้มข้น 25 %			ความเข้มข้น 50 %			ความเข้มข้น 75 %			ความเข้มข้น 25 %			ความเข้มข้น 50 %			ความเข้มข้น 75 %		
	0 ชม	24 ชม	48 ชม	0 ชม	24 ชม	48 ชม	0 ชม	24 ชม	48 ชม	0 ชม	24 ชม	48 ชม	0 ชม	24 ชม	48 ชม	0 ชม	24 ชม	48 ชม
L. acidophilus	3.37^{ก}	6.88^{ก}	8.31^{ก}	3.43^{ก}	6.60^{ก}	7.60^{ก}	3.55^{ก}	6.31^{ก}	7.45^{ก}	3.29^{ก}	7.43^{ก}	9.18^{ก}	3.39^{ก}	6.54^{ก}	9.07^{ก}	3.50^{ก}	6.80^{ก}	8.64^{ก}
L. plantarum	3.31^{ก}	6.90^{ก}	7.76^{ข}	3.47^{ก}	6.51^{ก}	7.39^{ก}	3.50^{ก}	6.57^{ก}	7.57^{ก}	3.37^{ก}	7.54^{ก}	9.31^{ก}	3.33^{ก}	6.77^{ก}	9.28^{ก}	3.48^{ก}	7.00^{ก}	8.51^{ก}
Pediococcus sp.	3.43^{ก}	6.06^{ข}	7.64^{ข}	3.37^{ก}	6.39^{ก}	7.47^{ก}	3.40^{ก}	5.80^{ข}	6.96^{ข}	3.38^{ก}	6.73^{ข}	8.68^{ข}	3.55^{ก}	6.84^{ก}	8.66^{ข}	3.32^{ก}	6.77^{ก}	8.63^{ก}
E. faecium	3.38^{ก}	5.88^{ข}	7.46^{ข}	3.57^{ก}	6.07^{ข}	6.87^{ข}	3.27^{ก}	5.93^{ข}	6.92^{ข}	3.40^{ก}	6.47^{ข}	8.31^{ข}	3.24^{ก}	6.39^{ก}	8.19^{ข}	3.26^{ก}	6.62^{ก}	8.48^{ก}

หมายเหตุ ตัวอักษร (ก และ ข) ที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

4.3 ผลการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคแบคทีเรียในฟลาสก์

จากผลการคัดเลือกโปรไบโอติคแบคทีเรียที่สามารถเจริญในน้ำสกัดปูดองได้ดีที่สุด ในข้อ 4.2 คือ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* จึงได้นำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ และน้ำสกัดปูดองน้ำปลา เมื่อเวลาผ่านไป 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7.3 - 7.6 ในภาคผนวก ค และตารางที่ 4.3 - 4.5

ตารางที่ 4.3 เป็นผลการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS พบว่า *L. plantarum* , *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถยับยั้ง *S. aureus* , *Cl. perfringens* และ *S. typhimurium* ได้ทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง *L. plantarum* และ จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *L. acidophilus* ชนิดเดียว สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้เพียง 65.20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่โปรไบโอติคแต่ละชนิดและโปรไบโอติคทั้งสองชนิดผสมกันไม่สามารถยับยั้ง *B. cereus* จนหมดสิ้นได้ในเวลาดังกล่าว ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของ *B. cereus* ที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถสร้างสปอร์ได้ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ (2546) ได้สำรวจจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งจ่อมและปลาร้าซึ่งเป็นอาหารหมักมีพีเอชค่อนข้างต่ำ มีค่าพีเอช ระหว่าง 3.79 - 4.86 แต่ก็ยังสำรวจพบ *B. cereus* เช่นกัน การที่ *L. plantarum* , *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้นั้น ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะกรดที่โปรไบโอติคแบคทีเรียผลิตขึ้น ทำให้อาหารมีพีเอชต่ำลง เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. (2539) ได้ศึกษาผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมระหว่าง *L. plantarum* , *P. cerevesiae* และ *M. varians* ต่อการยับยั้ง *S. typhimurium* และ *S. anatum* ในอาหารเหลว MRS พบว่า สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้หมดไปในชั่วโมงที่ 28 และ 32 ตามลำดับ โดยในเวลาดังกล่าว พีเอชของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีค่า 4.18 และ 4.10 ตามลำดับ ปริมาณกรดแลกติก 1.58 และ 1.78 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Raccach and Baker. (1979) ได้ใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp. ในการหมักผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ พบว่า สามารถลด *S. aureus* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 โคโลนีต่อกรัม เหลือปริมาณ 10^2 โคโลนีต่อกรัมในระยะเวลา 9 วัน โดยที่ *Lactobacillus* sp. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณ 1.6 เปอร์เซ็นต์ และ พีเอชมีค่าลดลงจาก 6.8 เป็น 4.70 เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 60 ชั่วโมง Vignolo, *et. al.* (1989) ได้ใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์เริ่มต้นผสมระหว่าง *L.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

plantarum และ *M. varians* ในการหมักไส้กรอกซาลามี ทำให้พีเอชของไส้กรอกหมักมีค่าลดลงเหลือประมาณ 4.40 – 4.50 และได้รายงานว่า พีเอช เป็นปัจจัยหนึ่งในการช่วยป้องกันการเจริญของ *Cl. botulinum* ได้

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคในอาหารเหลว MRS

เวลา (ชม)	ชนิดโปรไบโอติค	ปริมาณการยับยั้ง (%)				
		E. coli	*B. cereus*	*S. aureus*	*Cl. perfringens*	*S. typhimurium*
0	*L. plantarum*	0	0	0	0	0
	L. acidophilus	0	0	0	0	0
	L. pla + L. aci	0	0	0	0	0
12	*L. plantarum*	3.37	4.66	6.68	6.68	2.76
	L. acidophilus	4.40	4.43	3.78	17.10	1.18
	L. pla + L. aci	4.15	4.43	1.77	2.57	1.84
18	*L. plantarum*	21.90	26.40	44.10	47.20	41.50
	L. acidophilus	20.80	24.20	42.20	53.56	45.40
	L. pla + L. aci	20.80	18.20	42.40	53.94	44.50
24	*L. plantarum*	32.10	37.30	100	100	100
	L. acidophilus	29.70	38.20	100	100	100
	L. pla + L. aci	29.10	36.70	100	100	100
36	*L. plantarum*	65.63	39.55	100	100	100
	L. acidophilus	62.57	40.17	100	100	100
	L. pla + L. aci	64.09	38.37	100	100	100
48	*L. plantarum*	100	57.35	100	100	100
	L. acidophilus	65.20	38.43	100	100	100
	L. pla + L. aci	100	50.84	100	100	100

หมายเหตุ *L. pla + L. aci* = จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรไบโอติคแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในเวลาต่าง ๆ พบว่า *L. plantarum* มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ได้มากกว่า *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ในขณะที่ *L. acidophilus* มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของ *Cl. perfringens* ได้มากกว่า *L. plantarum* , และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เป็นการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โปรไบโอติคแต่ละชนิดและโปรไบโอติคทั้งสองชนิดผสมกันสามารถยับยั้ง *E. coli* , *B. cereus* และ *Cl. perfringens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้ทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 30 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ การที่โปรไบโอติคแบคทีเรียสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้ทั้งหมดในเวลาที่นานกว่าจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ ที่เหลือ น่าจะมีสาเหตุมาจาก *S. aureus* และ *S. typhimurium* สามารถเจริญในอาหารที่มีสภาพความเค็ม(ตารางที่ 7.3 ในภาคผนวก ค)ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น ๆ ที่เหลือ ทำให้มีความทนทานต่อการยับยั้งได้ดีกว่า หรือน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือมีสภาพความเค็มที่ทำให้โปรไบโอติกแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา สามารถสร้างสารหรือสภาวะที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรด 2 ชนิดดังกล่าวได้ต่ำกว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรไบโอติคแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในเวลาต่าง ๆ พบว่า *L. plantarum* มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus*, *Cl. perfringens* และ *S. typhimurium* ได้มากกว่า *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ส่วน *L. acidophilus* นั้นไม่สามารถเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบติคแบคทีเรียระหว่างในอาหารเหลว MRS และน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ ในกรณีของการศึกษาในอาหารเหลว MRS พบว่า การยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *B. cereus* โดยโปรไบโอติคแบคทีเรียต้องใช้เวลานานกว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น ๆ ที่เหลือ ส่วนการศึกษาในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือกลับพบว่า การยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *S. typhimurium* ต้องใช้เวลานานกว่า ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะองค์ประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณของเกลือแกง ในสภาพของอาหารที่มีเกลือแกงอยู่ด้วยนั้นจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่มีเกลือแกงได้ดีกว่าย่อมมีความทนทานต่อการยับยั้งได้ดีกว่า ทำให้ผลการทดลองที่ได้ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด การมีเกลือแกงอยู่ในปริมาณ 1.05 เปอร์เซ็นในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลืออาจทำให้ *S. aureus* และ *S. typhimurium* เจริญเติบโตได้ดี จึงมีความทนทานต่อการยับยั้งจากโปรไบโอติกแบคทีเรียได้ดีกว่าจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น ๆ

ตารางที่ 4.5 เป็นผลการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำสกัดปูดองน้ำปลา เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติคแบคทีเรียแต่ละชนิดและโปรไบโอติคทั้งสองชนิดผสมกันสามารถยับยั้ง *E. coli* , *B. cereus* และ *Cl. perfringens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าว *L. plantarum* สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ

เวลา (ชม)	ชนิดโปรไบโอติค	ปริมาณการยับยั้ง (%)				
		E. coli	*B. cereus*	*S. aureus*	*Cl. perfringes*	*S. typhimurium*
0	*L. plantarum*	0	0	0	0	0
	L. acidophilus	0	0	0	0	0
	L. pla + L. aci	0	0	0	0	0
12	*L. plantarum*	19.67	6.60	9.96	5.90	7.76
	L. acidophilus	8.52	10.15	9.22	3.98	7.70
	L. pla + L. aci	7.41	7.61	3.66	5.46	5.19
18	*L. plantarum*	70.68	53.18	37.76	48.90	9.99
	L. acidophilus	59.56	54.89	34.04	36.16	8.02
	L. pla + L. aci	68.04	54.52	10.77	41.64	6.05
24	*L. plantarum*	100	100	55.92	100	26.97
	L. acidophilus	100	100	46.56	100	25.31
	L. pla + L. aci	100	100	53.17	100	19.36
30	*L. plantarum*	100	100	100	100	54.64
	L. acidophilus	100	100	100	100	54.51
	L. pla + L. aci	100	100	100	100	50.00
36	*L. plantarum*	100	100	100	100	100
	L. acidophilus	100	100	100	100	100
	L. pla + L. aci	100	100	100	100	100
48	*L. plantarum*	100	100	100	100	100
	L. acidophilus	100	100	100	100	100
	L. pla + L. aci	100	100	100	100	100

หมายเหตุ *L. pla + L. aci* = จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

ระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งได้เพียง 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเท่านั้น และในขณะเดียวกันก็พบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้งต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ดีว่า *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ส่วน *L. acidophilus* นั้นไม่สามารถเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดได้ เช่นเดียวกับการทดลองในอาหารเหลว MRS และในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคแบคทีเรียในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลา พบว่า ผลการยับยั้งเป็นไปในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ โปรไบโอติคแบคทีเรียสามารถยังยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคส่วนใหญ่ให้หมดไปในเวลา 24 ชั่งโมงเช่นเดียวกัน ยกเว้น *S. aureus* และ *S typhimurium* ซึ่งทนทานต่อการยับยั้งได้ดีกว่าจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น ๆ ที่เหลือ แต่เวลาที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวให้หมดไปต่างกัน คือ ในน้ำสกัดปูดองน้ำปลาต้องใช้ระยะเวลายับยั้งนานกว่าในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำสกัดปูดองน้ำปลามีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือสภาวะทางกายภาพ เช่น แรงดันออสโมติกที่เหมาะสมกว่าในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ จึงทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคสองชนิดดังกล่าวมีความทนทานต่อการยับยั้งโดยโปรไบโอติกแบคทีเรียมากกว่า

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นพอสรุปได้ว่า *L. plantarum* ชนิดเดียวให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคส่วนใหญ่ได้ดีกว่า *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L.acidophilus* ซึ่งอาจเป็นเพราะ *L. plantarum* สามารถผลิตกรดชนิดต่าง ๆ ทำให้พีเอชมีค่าต่ำลงดังตารางที่ 4.6 และตารางที่ 4.7 พร้อม ๆ กับการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ดีกว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียที่เหลือ สอดคล้องกับรายงานของ สุวิมล มานะจิต (2541) พบว่า *L. plantarum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *P. cerevesiae* และจุลินทรีย์บริสุทธิ์เริ่มต้นผสมซึ่งประกอบด้วย *L. plantarum* , *P. cervesiae* และ *M. varians* โดย *L. planta rum* จะใช้ระยะเวลา 32 และ 36 ชั่วโมงในการยับยั้ง *S. aureus* ที่ปริมาณ 10^2 และ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ *P. cerevesiae* จะใช้ระยะเวลา 40 และ 44 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เริ่มต้นผสม *L. plantarum* , *P. cervesiae* และ *M. varians* จะใช้ระยะเวลา 36 และ 40 ชั่วโมงในการยับยั้ง *S. aureus* ที่ปริมาณ 10^2 และ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ซึ่งระยะเวลา ในการยับยั้ง *S. aureus* นานกว่าการใช้ *L. plantarum* อยู่ 4 - 8 ชั่วโมง ผลการศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือก *L. plantarum* เพียงชนิดเดียว มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในการผลิตปูดองน้ำเกลือ และปูดองน้ำปลา ในข้อต่อไป

4.4 ผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปูดอง

เมื่อใส่โปรไบโอติคแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคส่วนใหญ่ได้ดีที่สุด คือ *L. plantarum* จากการศึกษาในข้อ 4.3 และจุลินทรีย์ก่อโรคลงไปในน้ำเกลือและน้ำปลาที่ใช้ในการหมักปูเพื่อให้ได้ปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตรและจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดละประมาณ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาการยับยั้งเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่แบคทีเรียก่อโรคลงไปในน้ำเกลือและน้ำปลาที่ใช้ในการหมัก แต่ไม่ได้ใส่โปรไบโอติคแบคทีเรียลงไปด้วย ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.8 - 4.9

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำเกลือเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่า ในน้ำเกลือมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวมลดลงจากประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเริ่มคงที่ที่ประมาณ10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 – 48 ชั่วโมง ส่วน

ตารางที่ 4.5 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยโปรไบโอติคในน้ำสกัดปูดองน้ำปลา

เวลา (ชม)	ชนิดโปรไบโอติค	ปริมาณการยับยั้ง (%)				
		E. coli	*B. cereus*	*S. aureus*	*Cl. perfringens*	*S. typhimurium*
0	*L. plantarum*	0	0	0	0	0
	L. acidophilus	0	0	0	0	0
	L. pla + L. aci	0	0	0	0	0
12	*L. plantarum*	3.83	18.12	6.28	0	7.32
	L. acidophilus	1.87	16.86	4.69	26.80	3.14
	L. pla + L. aci	1.22	17.20	16.49	26.00	2.39
18	*L. plantarum*	52.21	60.97	19.44	56.49	10.34
	L. acidophilus	54.35	64.32	4.92	56.49	10.74
	L. pla + L. aci	55.11	63.17	18.81	56.28	10.47
24	*L. plantarum*	100	100	30.6	100	12.87
	L. acidophilus	100	100	13.57	100	16.25
	L. pla + L. aci	100	100	26.79	100	16.93
30	*L. plantarum*	100	100	42.13	100	27.53
	L. acidophilus	100	100	16.95	100	20.93
	L. pla + L. aci	100	100	28.69	100	19.82
36	*L. plantarum*	100	100	47.05	100	37.99
	L. acidophilus	100	100	24.39	100	34.92
	L. pla + L. aci	100	100	38.05	100	36.51
48	*L. plantarum*	100	100	100	100	100
	L. acidophilus	100	100	39.92	100	100
	L. pla + L. aci	100	100	61.24	100	100

หมายเหตุ *L. pla + L. aci* = จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่าพีเอช ในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลา

ชนิดโปรไบโอติค	อาหารเหลว MRS						น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ							น้ำสกัดปูดองน้ำปลา						
	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	30 ชม	36 ชม	48ชม	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	36 ชม	40 ชม	48 ชม
Control	6.25	6.08	6.02	5.89	5.59	5.57	7.62	7.61	7.60	7.60	7.60	7.60	7.60	8.26	8.24	8.25	8.25	8.25	8.25	8.26
L. plantarum	6.25	4.63	4.07	3.82	3.74	3.72	7.62	7.62	7.62	7.60	7.60	7.60	7.60	8.26	7.74	7.70	7.64	7.25	7.25	7.25
L. acidophilus	6.25	4.96	4.45	4.20	3.94	3.80	7.62	7.62	7.62	7.60	7.60	7.60	7.60	8.26	7.68	7.65	7.60	7.47	7.35	7.02
L. pla + L. acid	6.25	4.89	4.26	3.91	3.79	3.75	7.62	7.57	7.51	7.51	7.51	7.50	7.50	8.26	7.91	7.90	7.87	7.48	7.45	7.42

หมายเหตุ *L. pla + L. acid* = จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

ตารางที่ 4.7 กรดแลกติกในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือและน้ำสกัดปูดองน้ำปลา(หน่วย : เปอร์เซ็นต์)

ชนิดโปรไบโอติค	อาหารเหลว MRS						น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ							น้ำสกัดปูดองน้ำปลา						
	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	30 ชม	36 ชม	48ชม	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	36 ชม	40 ชม	48 ชม
Control	0.09	0.13	0.13	0.17	0.17	0.21	0.09	0.09	0.09	0.09	0.12	0.17	0.17	0.09	0.09	0.09	0.09	0.12	0.12	0.14
L. plantarum	0.09	1.46	1.63	1.72	1.84	1.89	0.09	0.09	0.09	0.09	0.16	0.17	0.17	0.09	0.09	0.09	0.09	0.14	0.17	0.17
L. acidophilus	0.09	1.20	1.37	1.59	1.80	1.84	0.09	0.09	0.09	0.09	0.16	0.17	0.17	0.09	0.09	0.12	0.13	0.17	0.17	0.26
L. pla + L. acid	0.09	1.29	1.50	1.63	1.80	1.89	0.09	0.09	0.09	0.09	0.16	0.17	0.17	0.09	0.09	0.09	0.09	0.16	0.16	0.24

หมายเหตุ *L. pla + L. acid* = จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

ในตัวปู ปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวมได้เพิ่มขึ้นจากประมาณ 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงเป็นประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ในปูดองน้ำเกลือที่เป็นตัวอย่างควบคุม ในส่วนที่เป็นน้ำเกลือ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวมมีประมาณ 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง และได้เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ในตัวปู พบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลคติกโดยรวมมีประมาณ 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงและได้เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาถึงจุลินทรีย์ก่อโรค ในส่วนที่เป็นน้ำเกลือ พบว่า *E coli* มีประมาณ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากเวลาเริ่มต้น แล้วค่อย ๆ ลดลง เป็น 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับในน้ำเกลือจากตัวอย่างควบคุม ในกรณีนี้อาจสรุปได้ว่า การเติม *L. plantarum* ลงไปในน้ำเกลือที่ใช้หมักปู ไม่มีส่วนช่วยให้ *E coli* ลดลงได้เร็วขึ้น ส่วนในตัวปู พบว่า ในเวลา 12 ชั่วโมง มี *E coli* อยู่ประมาณ10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เป็น 10^3 และ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ36 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นได้ลดปริมาณลงเล็กน้อยเหลือประมาณ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวปูจากตัวอย่างควบคุม พบว่า ในเวลา 12 ชั่วโมง มี *E coli* อยู่ประมาณ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เป็น 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ค่อย ๆ ลดลง เหลือประมาณ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าในปูดองที่มีการเติมโปรไบโอติคแบคทีเรียลงไป ทำให้ *E coli* ในตัวปูลดลงได้มากกว่าในตัวอย่างควบคุมประมาณ 1 ลอการิทึม ส่วน *B. cereus* และ *S. aureus* ในน้ำเกลือ เวลาเริ่มต้นมีอยู่ประมาณ10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ ลดลงเหลือประมาณ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับในน้ำเกลือจากตัวอย่างควบคุม ในกรณีนี้ แสดงว่า การเติม *L. plantarum* ลงไปในน้ำเกลือที่ใช้หมักปู ไม่มีส่วนช่วยให้ *B. cereus* และ *S. aureus* ลดลงได้เร็ว ส่วน *B. cereus* ในตัวปู พบว่า เพิ่มขึ้นจาก 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเพิ่มเป็น 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวอย่างควบคุม พบว่า มีปริมาณมากขึ้นจาก10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงเป็น10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วน *S .aureus* พบว่า เพิ่มขึ้นจาก10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงเป็น10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวอย่างควบคุม พบว่าค่อย ๆ เพิ่มจาก10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงเป็น10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วน *S. typhimurium* และ *Cl. Perfringens* ในน้ำเกลือนั้น ตรวจไม่พบตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป เช่นเดียวกับ *S. typhimurium* ในตัวปู ส่วน *Cl. perfringens* ยังมีการตรวจพบถึงแม้ว่าเวลาผ่านไปแล้ว 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 จุลินทรีย์ในปูดองน้ำเกลือ (หน่วย : โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ โคโลนีต่อกรัม)

ชนิดจุลินทรีย์	Cntr	*L. pla*	cntr	*L. pla*	Cntr	*L. pla*	cntr	*L. pla*	cntr	*L. pla*
	0 ชม		12 ชม		24 ชม		36 ชม		48 ชม	
ในน้ำเกลือ										
แบคทีเรียแลกติกโดยรวม	ND	4.9×10^{7}	3.2×10^{2}	2.6×10^{5}	3.0×10^{2}	5.4×10^{5}	3.2×10^{2}	4.2×10^{5}	1.2×10^{3}	3.0×10^{5}
E. coli	4.6×10^{5}	4.6×10^{5}	4.2×10^{4}	5.3×10^{4}	2.2×10^{4}	3.2×10^{4}	2.6×10^{3}	3.0×10^{3}	2.6×10^{3}	2.9×10^{3}
B. cereus	2.3×10^{5}	2.3×10^{5}	4.2×10^{4}	6.2×10^{4}	2.0×10^{4}	5.3×10^{4}	6.0×10^{4}	3.0×10^{4}	6.2×10^{4}	4.0×10^{4}
S. aureus	2.6×10^{5}	2.6×10^{5}	5.1×10^{4}	4.5×10^{4}	4.8×10^{8}	3.2×10^{4}	2.5×10^{4}	2.0×10^{4}	3.5×10^{4}	4.2×10^{4}
S. typhimurium	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	-	$+^{b}$	-	-	-
Cl. perfringens	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	-	-	$-^{c}$	-	-	-
ในตัวปู										
แบคทีเรียแลกติกโดยรวม	ND	ND	2.5×10^{2}	2.9×10^{2}	4.2×10^{2}	4.2×10^{3}	3.2×10^{3}	5.8×10^{5}	1.2×10^{4}	2.1×10^{7}
E. coli	ND	ND	2.9×10^{3}	4.2×10^{2}	5.3×10^{5}	2.6×10^{3}	4.8×10^{4}	2.3×10^{4}	2.7×10^{4}	4.0×10^{3}
B. cereus	ND	ND	2.6×10^{3}	2.6×10^{2}	5.2×10^{4}	2.6×10^{4}	4.2×10^{4}	3.6×10^{4}	4.9×10^{5}	2.3×10^{4}
S. aureus	ND	ND	2.4×10^{4}	4.3×10^{3}	1.5×10^{5}	1.8×10^{3}	6.5×10^{5}	7.0×10^{4}	4.5×10^{4}	1.2×10^{5}
S. typhimurium	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	-	-	-	-
Cl. perfringens	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$

หมายเหตุ cntr = control, *L. pla* = *L. plantarum*, ND = ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์, $+^{c}$ = พบจุลินทรีย์แต่ไม่ต้องนับจำนวน, - = ไม่พบจุลินทรีย์

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำปลาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่าในน้ำปลามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวมค่อย ๆ ลดลงจากประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวปู ปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวมได้เพิ่มขึ้นจากประมาณ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงเป็นประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ในปูดองน้ำปลาที่เป็นตัวอย่างควบคุม ในส่วนที่เป็นน้ำปลา พบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวมประมาณ 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงและได้เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ในตัวปู พบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลคติกโดยรวมประมาณ 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมงและได้เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาถึงจุลินทรีย์ก่อโรค ในส่วนที่เป็นน้ำปลา พบว่า *E coli* ประมาณ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากเวลาเริ่มต้น แล้วค่อย ๆ ลดลง เป็น 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับในน้ำปลาจากตัวอย่างควบคุม ซึ่งอาจสรุปในกรณีนี้ได้ว่า การเติม *L. plantarum* ลงไปในน้ำปลาที่ใช้หมักปูไม่มีส่วนช่วยให้ *E coli* ลดลงได้เร็วขึ้น ส่วนในตัวปู พบว่า ในเวลา 12 ชั่วโมง มี *E coli* อยู่ประมาณ10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร คงที่อยู่เช่นนี้จนถึงเวลา 36 ชั่วโมงแล้วเพิ่มขึ้น 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวปูจากตัวอย่างควบคุม พบว่า ในเวลา 12 ชั่วโมง มี มี *E. coli* อยู่ประมาณ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เป็น 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าในปูดองน้ำปลาที่มีการเติมโปรไบโอติคแบคทีเรียลงไปไม่ทำให้ *E. coli* ในตัวปูลดลงได้มากกว่าในตัวอย่างควบคุม ส่วน *B. cereus* ในน้ำปลา จากเวลาเริ่มต้น มีอยู่ประมาณ10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วค่อย ๆลดลงจนเหลือประมาณน้อยกว่า 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวอย่างควบคุมลดลงเหลือ 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในกรณีนี้ สามารถสรุปได้ว่า การเติม *L. plantarum* ลงไปในน้ำปลาที่ใช้หมักปูมีส่วนช่วยให้ *B. cereus* ลดลงได้เร็วกว่าในน้ำปลา จากตัวอย่างควบคุม อย่างน้อย 1 ลอการิทึม ส่วน *B. cereus* ในตัวปู พบว่า มีปริมาณน้อยกว่า 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ภายหลังเวลาผ่านไป 12 - 48 ชั่วโมง ส่วนในตัวอย่างควบคุม พบว่า ในเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบในปริมาณที่ต่ำกว่า 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น10^3 และ10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 36 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ดังนั้น ในกรณีนี้ สามารถสรุปได้ว่า การเติม *L. plantarum* ลงไปในน้ำปลาที่ใช้หมักปู มีส่วนช่วยให้ *B. cereus* ในตัวปูลดลงได้เร็วกว่าในตัวปูจากตัวอย่างควบคุม อย่างน้อย 2 ลอการิทึม ส่วน *S. aureus* ในน้ำปลา พบว่า ลดลงจาก10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ค่อยๆ ลดลงเหลือ10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในตัวอย่างควบคุม ส่วน *S*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 จุลินทรีย์ในปูดองน้ำปลา (หน่วย : โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ โคโลนีต่อกรัม)

ชนิดจุลินทรีย์	Cntr	*L. pla*	cntr	*L. pla*	Cntr	*L. pla*	cntr	*L. pla*	cntr	*L. pla*
	0 ชม		12 ชม		24 ชม		36 ชม		48 ชม	
ในน้ำเกลือ										
แบคทีเรียแลกติกโดยรวม	ND	1.2×10^{7}	4.2×10^{2}	5.2×10^{6}	3.5×10^{2}	1.4×10^{6}	6.4×10^{3}	5.3×10^{6}	1.0×10^{3}	9.8×10^{5}
E. coli	1.4×10^{5}	1.4×10^{5}	1.2×10^{5}	1.5×10^{5}	2.0×10^{4}	2.9×10^{4}	8.9×10^{3}	1.2×10^{4}	1.5×10^{3}	5.8×10^{3}
B. cereus	1.5×10^{5}	1.5×10^{5}	1.0×10^{4}	2.1×10^{4}	1.0×10^{3}	2.2×10^{3}	2.6×10^{3}	$<10^{2}$	2.5×10^{3}	$<10^{2}$
S. aureus	1.9×10^{5}	1.9×10^{5}	6.7×10^{4}	1.2×10^{4}	5.2×10^{4}	1.4×10^{4}	7.5×10^{4}	3.6×10^{4}	5.1×10^{4}	2.8×10^{4}
S. typhimurium	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	-	$+^{b}$	-	-	-
Cl. perfringens	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	-	-	-	-	-	-
ในตัวปู										
แบคทีเรียแลกติกโดยรวม	ND	ND	5.8×10^{2}	4.6×10^{3}	5.4×10^{3}	5.8×10^{4}	2.0×10^{4}	3.2×10^{5}	4.5×10^{4}	4.2×10^{6}
E. coli	ND	ND	4.2×10^{3}	5.2×10^{3}	1.5×10^{4}	5.9×10^{3}	2.5×10^{4}	2.5×10^{3}	1.8×10^{4}	2.2×10^{4}
B. cereus	ND	ND	$<10^{2}$	$<10^{2}$	$<10^{2}$	$<10^{2}$	3.6×10^{3}	$<10^{2}$	6.7×10^{4}	$<10^{2}$
S. aureus	ND	ND	$<10^{2}$	$<10^{2}$	1.5×10^{4}	6.2×10^{2}	2.7×10^{4}	5.4×10^{3}	8.9×10^{5}	2.0×10^{4}
S. typhimurium	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	-	-	-	-
Cl. perfringens	ND	ND	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$	$+^{b}$

หมายเหตุ cntr = control, *L. pla* = *L. plantarum*, ND = ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์, $+^{c}$ = พบจุลินทรีย์แต่ไม่ต้องนับจำนวน, - = ไม่พบจุลินทรีย์

.aureus ในตัวปูที่หมักด้วยน้ำปลา พบว่าปริมาณค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จากต่ำกว่า10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลา 12 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นเป็น10^3 และ10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 36 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ในตัวปูจากตัวอย่างควบคุม เวลา 12 พบน้อยกว่า 10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และค่อยเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เป็น 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้น การเติม *L. plantarum* ลงไปในน้ำปลาที่ใช้หมักปู มีส่วนช่วยให้ *S .aureus* ในตัวปูลดลงได้เร็วกว่าในตัวปูจากตัวอย่างควบคุม อย่างน้อย 1 ลอการิทึม และตรวจพบ *S. typhimurium* ทั้งในน้ำปลาที่มีการเติม *L. plantarum* และในตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมโปรไบโอติคในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วน *Cl. Perfringens* ในน้ำปลานั้น ตรวจไม่พบตั้งแต่เวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป เช่นเดียวกับในตัวอย่างควบคุม และตรวจไม่พบ *S. typhimurium* ในตัวปู ตั้งแต่เวลา 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่พบในตัวอย่างควบคุม จนถึงเวลา 48 ชั่วโมง ส่วน *Cl. Perfringens* ในตัวปูที่เป็นตัวอย่างควบคุมเริ่มตรวจไม่พบ ในเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่ในน้ำปลาที่เติมโปรไบโอติคแบคทีเรีย เริ่มตรวจไม่พบตั้งแต่เวลา 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป

จะเห็นได้ว่าในกระบวนการผลิตปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลาที่ใส่โปรไบโอติคแบคทีเรียลงไป พบว่า การลดลงของจุลินทรีย์ก่อโรคในส่วนที่เป็นน้ำเกลือและน้ำปลาไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม แต่สามารถลด *E. coli* , *B. cereus* และ *S.aureus* ในตัวปูลงประมาณ 1 – 2 ลอการิทึม ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติคแบคทีเรีย ส่วน *S. typhimurium* และ *Cl. perfringens* ในตัวปูที่ดองน้ำเกลือ พบว่า ไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม แต่ในตัวปูที่ดองน้ำปลา ตรวจไม่พบเร็วกว่าในตัวอย่างควบคุมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง การที่ผลการทดลองในข้อนี้ โปรไบโอติคแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้น้อยกว่าและแตกต่างไปจากการทดลองในข้อ 4.3 อาจเนื่องมาจากความเค็มหรือปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในกระบวนการหมักปูดองเป็นสาเหตุหลัก มีผลทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อื่น ๆ ของโปรไบโอติคแบคทีเรียได้ ส่วนการศึกษาในฟลาสก์นั้นใช้น้ำสกัดปูดองที่เจือจางด้วยน้ำ จึงทำให้มีความเค็มไม่มากเท่ากับการทดลองในข้อนี้ (ตารางที่ 7.4 ภาค ผนวก ค) แต่ในกระบวนการผลิตปูดองจริง ๆ นั้น จุลินทรีย์ก่อโรคไม่ได้มีปริมาณสูงเท่ากับการทดลองในครั้งนี้ การใช้โปรไบโอติคแบคทีเรีย จึงน่าจะสามารถช่วยลดปริมาณของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ในระดับหนึ่ง และอาจให้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่งขึ้น หากลดปริมาณเกลือแกงในกระบวนการหมักลงโดยที่ปูดองยังคงมีคุณสมบัติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของโปรไบโอติคต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง พอสรุปผลได้ดังนี้

1. การตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของปูดองน้ำเกลือ 30 ตัวอย่าง และปูดองน้ำปลา 10 ตัวอย่าง ที่สุ่มจากตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่า ปูดองทั้งสองชนิดมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^5-10^8 โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียแลกติกโดยรวมอยู่ในช่วง 10^3-10^7 โคโลนีต่อกรัม *B. cereus, E.coli* และ *S.aureus* อยู่ในช่วง 10^2 - 10^4 , 10^2 - 10^3 และ 10^2 - 10^3 โคโลนีต่อกรัมตามลำดับ ตรวจพบ *Salmonella* sp. และ *Cl. perfringens* 5 และ10 ตัวอย่างตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

2. การทดลองนำโปรไบโอติค 4 ชนิด คือ *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* มาเลี้ยงในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ และน้ำสกัดปูดองน้ำปลา พบว่า โปรไบโอติคสามารถเจริญในน้ำสกัดปูดองทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ได้ดีที่สุด ส่วนใหญ่แล้ว พบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เจริญเติบโตได้ดีกว่า *Pediococcus* sp. และ *E. faecium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และโปรไบโอติคแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตในน้ำสกัดปูดองน้ำปลาทุกความเข้มข้นได้ดีกว่าในน้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ 1 – 2 ลอการิทึม

3. การทดลองนำโปรไบโอติคแบคทีเรียที่คัดเลือกมายับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ และน้ำสกัดปูดองน้ำปลา พบว่า โปรไบโอติคแบคทีเรียสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี และ *L. plantarum* ชนิดเดียว สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีกว่า *L. acidophilus* และจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

4. ในกระบวนการผลิตปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา พบว่า *L. plantarum* มีส่วนช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งในตัวปูและน้ำเกลือหรือน้ำปลาที่ใช้ในการหมักลงได้บ้าง แต่ไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และไม่สามารถลดจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำเกลือหรือน้ำปลาที่ใช้ในการหมักปริมาณเริ่มต้นชนิดละ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตรและในตัวปูได้ทั้งหมด ในเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของโปรไบโอติคแบคทีเรียต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา มีข้อเสนอแนะเพื่อประกอบการพิจารณาในการศึกษาต่อไป ดังนี้

1. ควรศึกษาโปรไบโอติคชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดอง เพื่อหาชนิดและสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด มาใช้เป็นแนวทางในการผลิตปูดองที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคต่อไป

2. ควรศึกษาปริมาณเกลือแกงที่เหมาะสมหรือลดปริมาณเกลือแกงจากการหมักปูโดยปกติร่วมกับการใช้โปรไบโอติคเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยการพิจารณาการยอมรับของผู้บริโภคร่วมด้วย

4. เมื่อทราบชนิดหรือสายพันธุ์ของโปรไบโอติคแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดแล้ว ควรศึกษาถึงการผลิตโปรไบโอติคดังกล่าวเพื่อให้ได้รูปแบบที่สะดวกต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2538. "ปรากฏการณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร." หน้า3 - 2. **เอกสารประกอบการบรรยายในการประชุมเชิงปฏิบัติการ**. กรุงเทพฯ. มหาลัยมหิดล.

ทรงกรด ชื่นชูผล. 2547. **ปูเค็ม**. [online] Available : http://www.pookem.com

นิภาศักดิ์ คงงาม และคณะ. 2544. "ความสามารถในการติดต่อของตัวอ่อนพยาธิใบไม้จากปูนา Rice -field Crab ต่อ Definitive host ในท้องถิ่น." [online] Available : http://15101.htm

บัญญัติ สุขศรีงาม. "นิเวศวิทยา *Vibrio parahaemolyticus*." **วารสารวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี**. 1(1) : 55 - 60

มัทนา แสงจินดาวงษ์ 2545. **ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. "ผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณเชื้อ*Salmonella typhimurium* และ *Salmonella anatum*." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. "อาหารจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย." แลกติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารของไทย:คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. "โปรไบโอติค." **จาร์พา**. 41 : 50 - 53

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ. 2539. " ผลการยับยั้งของ *Lactobacillus* จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อ *Staphylococcus aureus*, *Salmolnella typhimurium* และ *Escherichia coli* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน." Songklanakarin J. Sci. Technol. 18 (3) : 301 - 305.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบล รอดประดิษฐ์. 2540. "การแยกเชื้อ คัดเชื้อและเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย." Songklanakarin J. Sci. Technol. 19 (2) :181 - 188.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย." Songklanakarin J. Sci. Technol. 22 (2) : 177 - 189.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2540. **ปูน้ำเค็มของไทย**. กรุงเทพฯ : บริษัทรุ่งศิลป์การพิมพ์(1977) จำกัด.

สุวิมล มานะจิตร. 2541. "ผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการหมักแหนม *Lactobacillus plantarum* ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus cervesiae และ *Micrococcus varians* ต่อการลดลงของ *S. aureus*." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีเมือง มาลีหวล และคณะ. 2539. "การศึกษาความปลอดภัยของอาหารหมักพื้นบ้านชนิดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนการบริโภค." สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2543. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร**. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ. 2546. "แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษจากอาหารหมักพื้นบ้านที่ไม่ผ่านความร้อน." สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

อดิสร เสวตวิวัฒน์. 2538. "อาหารแช่แข็งพร้อมบริโภคกับความปลอดภัยในด้านจุลชีววิทยา." **เกษตรพระจอมเกล้า**. 13 (2) : 29 - 38.

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. "การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรสา สุตเธียรกุล. 2538. "การตรวจเชื้อ Vibrio จากอาหารทะเล." หน้า 6-1 - 6-9. **เอกสารประกอบการบรรยายในการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการตรวจสอบจุลินทรีย์และสารปนเปื้อนในอาหาร**. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อรวินท์ เลาหรัชตนันท์. 2532. "สารกันเสียในอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลกติก." **วารสารอาหาร**. 19 (3) : 7 - 9.

Association of Official Analytical Chmists. 1995. **Official Method of Analysis**. 13th ed. Association of Official Analytical manual : Washington

Axelsson. 1998. "Lactic Acid Bacteria : classification and physiolophy." *In* Lalminen and Wright (eds.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Function Aspects.** New York : Marcel Dekker.

Becker B. A. 1988. "Incidence of foodborne diseases in the Netherlands : annual summary 1982 and overview from 1979 to 1982." **J. Food Prot.** 51 : 327 - 334.

Boy and Bryan G Hoerl. 1991. **Basic Medical Microbiology**. Boston. Little : Brown and company.

Food and Drug Administration. 1995. **Bacteriological Analytical Manual**. 8th ed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dellaglio,F. *et. al.* 1995. The genus *Oenococcus In* Wood B.J.B. and Holzapfel W. H. (eds). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall. 235 - 269

Deveriese, L. A. and Pot, B. 1995. The genus *Enterococcus. In* Wood B.J.B. and Holzapfel W. H. (eds). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall. 327 - 367

Elaine, *et. al.* 1991. "The Use of Bacteriocin Producing *Pediococcus acidilactici* to Control Postprocessing *Listeria monocytogenes* Contamination of Frankfurters." **J. Food Prot.** 54 (9) : 681 - 686.

Eley, A. R. 1992. **Microbial Food Poisoning.** London : Chapman & Hall. 15 - 36.

Fernandez K. 1994. "Mode of Action of a Bacteriocin (J46) Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis* J46." **J. Food Prot.** 59 (9) : 955 - 962.

Frazier, W. C. and Westhoff, D. C. 1988. **Food Microbiology.** 4th ed. New York : McGraw - Hill.

Gilliland, S.E. and Spech,M.L. 1975. "Inhibition of Psychrotrophic bacteria by Lactobacilli and Pediococci in non - fermented Foods." **J. Food Sci.** 40 : 903 - 905

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1977. " Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in addociative cultures." **J. Food Prot.** 40 : 820 - 823.

Hardie, J.M.and Whiley, R.A. 1995. The genus of *Streptococcus In* : Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds.). **The genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall. 54 - 124.

Haryono, *et. al.* 1981. "Hyerogen Perocide Fermation. " by *Lactobacillus* sp. **Annu. Rep. ICMS.** 4 : 231 - 243.

Hamms, W.P. *et. al.* 1992. " The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium.*" **In The Prokaryotes.** 2nd ed. New York : Springer-Verlag.

Hayes, P. R. 1992. **Food Microbiology and Hygiene.** 2nd ed. London : Elsevier Applied Science.

Hitchins. A.D. *et. al.* 1992. "Coliforms - *Escherichia coli* and its toxins." *In* Vanderzant C. and Splittstoessor D.F. (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Examination of Foods. 3rd ed. Washington DC : American Public Health Association. 325 - 370

Hilton, E. *et.al.* 1992. "Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* prophylaxis for candidal vaginitis." **Ann Intern Med.** 116 : 353 - 357

Hobbs, B.C. and Roberts, D. 1993. **Food Poisoning and Food Hygiene.** 6th ed. London : Edward Amold.

Hoower, D.G. 1992. "Improvement of Detection and Production of Propionicin PLG - 1. A Bacteriocin Produced by *Propionibacterium thoenii.*" **J. Food Prot.** 59 (7) : 734 – 738.

Inoue, *et, al.* 1980. "Antagonistic action of Lactic Acid Bacteria from Nham toward food-deteriorating bacteria. "**Microbial Utilization of Renewable Resources.** 1 : 108 - 115.

Jay, J. M. 1982. "Antimicrobial Propeties of Diacetyl." **Appl. Environ. Microbiol.** 44 : 525

Jimenez-Diaz *et. al.* 1993. "Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO010 isolated from agreen olive fermentation." **Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1416 - 1424.**

Kaysner, C.A. et. al. 1992. Vibrio. *In* Vanderzant C. and Splittstoessor D.F. (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3rd ed. Washington DC : American Public Health Association. 451 - 474

Metaxopoulos, *et. al.* 1981. "Production of Italian dry salami : Effect of starter culture and chemical acidulation on *Staphylococcus* growth In salami under commercial manufacturing conditions." **Appl. Env. Microbiol.** 42 (5) : 863 - 871.

Mitic, *et. al.* 1982. "Selection of Cultures with Antimicrobial Properties for Production of Fermented Beverages." **Dairy Sci. Abstr.** 44 (8) : 619.

Molittoris, *et. al.* 1985. "Characterization and Distributiom of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* : Isolation in Indonesia." **Appl. Env. Microbiol.** 50(6) : 1388 - 1394.

Aryanta, *et. al.* 1991. "The occurance and growth of microorganisms during the fermentation of fish sausage." **International Journal of Food Microbiology.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. 143 - 156.

Olasupo, *et. al.* 1994. "Bacteriocin Production of *Enterococcus faecium* NAO1 from "wara". Fermented Skimmed Cow Milk Product from West Africa Letters in App." **Microbiol. Abstr.** 19 (6) : 438 - 441.

Phithakpol, . *et. al.* 1995. **The Traditional Fermented Foods of Thailand.** Kuala Lumur : SP - Muda.

Price, R.T. and Lee, .J.S. 1970. "Inhibition of *Pseudomonas* species by Hydrogen Peroxide Producing - Lactobacilli." **J. Milk Food Technol.** 33 : 13 - 18.

Schilinger, U.and Holzapfel, W.H. 1995. The genus *Carnobacterium In* : Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds.). **The genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall.

Schmidt, *et. al.*1981. "Functionnality of a protein matric in comminuted meat Products". **Food Technol.** 35 (5) : 235 - 237.

Shah, *et. al.* 1989. "Toxicity studies on six plants used in the traditional Arab system of medicine."**Phytotherapy Res.** 3 (1) : 25 - 29.

Simson, W.J. and Taguchi, H. 1995. The genus *Pediococcus In* : Wood, B.J.B. and Holzapfel ,W.H.(eds.). **The genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall. 173 - 174

Smith, *et.al.* 1975. "Survival of Salmonellae during Pepperoni manufacture." **Appl. Microbiol.** 30 (5) : 759 - 763.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. "Lactic Acid Bacteria of foods and their current Taxonomy." **Food Microbiol.** 36 : 1 - 29.

Teuber M. 1995. The genus *Lactococcus In* : Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds.) **The genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall. 173 - 174

Weast, R.C. and Astle M.J. 1980. **CRC handbook of chemistry and physics.** 60th ed

Wood B.J.B. and Holzapfel W. H. 1995. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London : Chapman and Hall.

Vignolo *et.al.* 1989. "Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages." **J. Food Prot.** 52 (1) : 787 - 791

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการตรวจสอบทางจุลินทรีย์ (BAM, 1995)

1. การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

1.1.1 ตัดตัวอย่างปูดอง ด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ

1.1.2 นำปูดองที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วหนัก 25 กรัม ใส่ลงในถุง stomacher เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาณ 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตีผสมในเครื่อง stomacher โดยใช้ความเร็วปานกลาง นาน 1 นาที

1.1.3 ปิเปตส่วนที่เป็นของเหลวมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1 : 100 จากนั้นทำเช่นเดียวกันจนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม เพื่อใช้ทดลองในข้อต่อไป

กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวให้ปฏิบัติตามข้อ 1.1.3 โดยในการเจือจางครั้งแรกจะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1 : 10

1.2 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

1.2.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

1.2.2 เทอาหาร PCA ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 - 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ

1.2.3 หมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายตัวรวมกับจุลินทรีย์ โดยหมุนวนไปมาลักษณะคล้ายเลข 8 ประมาณ 6 รอบ ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.4 คัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณจุลินทรีย์ ประมาณ 25 - 250 โคโลนี มาทำการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วยของโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง จากสูตรของ Maturin and Peeler(1998) ข้างล่างนี้ (กรณี นำตัวอย่างมา spread plates ให้คูณปริมาณจุลินทรีย์ที่คำนวณได้ด้วย 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu / g หรือ cfu / ml)} = \frac{\sum c}{\{(1 \times n1) + (0.1 \times n2)\} \times (d)}$$

เมื่อ $\sum c$ = ปริมาณโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดทุกจานเพาะเชื้อรวมกัน

n1 = จำนวนจานเพาะเชื้อของตัวอย่างที่ระดับความเจือจางแรกที่ตรวจนับ

n2 = จำนวนจานเพาะเชื้อของตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่สองที่ตรวจนับ

d = ระดับความเจือจางแรกที่นับ

1.3 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยรวม

1.3.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

1.3.2 เทอาหารแข็ง MRS ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 - 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ

1.3.3 หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้อาหารกระจายตัวผสมกับจุลินทรีย์ โดยหมุนวนไปมาลักษณะคล้ายเลข 8 ประมาณ 6 รอบ ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนอาหารแข็งตัว จากนั้นเทอาหาร MRS ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 - 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อเดิมอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง

1.3.4 หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงไปบริเวณโคโลนีของจุลินทรีย์ 2 - 3 หยด สังเกตผลของปฏิกิริยาคะตะเลสซึ่งจะเกิดฟองก๊าซขึ้น นับปริมาณโคโลนีที่ไม่เกิดปฏิกิริยาคะตะเลสจากจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 25 - 250 โคโลนี นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วยของโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง จากสูตรในข้อ 1.2.4

1.4 การตรวจนับปริมาณ *E. coli*

1.4.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 เทอาหาร VRBA ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 - 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ

1.4.3 หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้อาหารกระจายตัวผสมกับจุลินทรีย์ โดยหมุนวนไปมาลักษณะคล้ายเลข 8 ประมาณ 6 รอบ ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.4.4 นับปริมาณโคโลนีสีชมพู แดง และแดงดำที่เกิดขึ้นจากจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณจุลินทรีย์ ประมาณ 25 - 250 โคโลนี และเขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีใส่ลงในหลอดอาหารแข็ง TSI โดยการแทงลงในแนวตรงและลากบนพื้นผิว (stab and surface streak) พร้อมกับเขี่ยลงในหลอดอาหารแข็ง MIL โดยการแทงลงในแนวตรง (stab) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลดังตารางที่ 6.1 นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง จากสูตรในข้อ 1.2.4

1.5 **การตรวจนับปริมาณ *S. aureus***

1.5.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง MSA ระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

1.5.2 ใช้แท่งแก้วรูปตัว แอล (L) จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ และปล่อยให้เปลวไฟที่แท่งแก้วดับ ทิ้งไว้จนแท่งแก้วมีอุณหภูมิลดลง เกลี่ยหยดสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง (spread plates technique) คว่ำจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.5.3 นับปริมาณโคโลนีสีเหลืองที่ล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นขาวทึบแสง (opaque zone) จากจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณจุลินทรีย์ ประมาณ 25 - 250 โคโลนี และเขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมาเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว TSB เป็นเวลา18 ชั่วโมง

1.5.4 ทดสอบการแข็งตัวของพลาสมา (coagulase test) โดยนำอาหาร TSB จากข้อ 1.5.3 และพลาสมา (Rabbit Plasma) อย่างละ 0.5 มิลลิลิตรผสมกันในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ้าหากเป็น *S. aureus* พลาสมาจะแข็งตัวภายใน 3 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง จากสูตรในข้อ 1.2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 การตรวจนับปริมาณ *B. cereus*

1.6.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง MYP ระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

1.6.2 ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ และปล่อยให้เปลวไฟที่แท่งแก้วดับ ทิ้งไว้จนแท่งแก้วมีอุณหภูมิลดลง เกลี่ยหยดสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.6.3 นับปริมาณโคโลนีสีชมพูที่ล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นขาวที่เกิดขึ้นจากจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 25 - 250 โคโลนี และเขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมาย้อมสีแบบแกรม ถ้าหากเป็น *B. cereus* เซลล์จะมีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีม่วง(แกรมบวก)และสร้างเอนโดสปอร์ นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง จากสูตรในข้อ 1.2.4

1.7 การตรวจ *Salmonella* spp.

1.7.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง XLD ระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

1.7.2 ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ และปล่อยให้เปลวไฟที่แท่งแก้วดับ ทิ้งไว้จนแท่งแก้วมีอุณหภูมิลดลง เกลี่ยหยดสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7.4 สังเกตโคโลนีสีชมพู ซึ่งอาจมีจุดดำอยู่ภายในหรือไม่ก็ได้ในอาหารแข็ง XLD และโคโลนีสีเขียวออกน้ำเงินมีจุดดำอยู่ภายในหรือไม่ก็ได้ในอาหารแข็ง HE เขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวจากอาหารแข็งทั้งสองชนิด ชนิดละ 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมาใส่ในหลอดอาหารแข็ง TSI โดยการแทงลงในแนวตรงและลากบนพื้นผิว พร้อมกับเขี่ยจุลินทรีย์ลงในหลอดอาหาร MIL โดยแทงลงในแนวตรง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สังเกตผลดังตารางที่ 6.1 นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.8 การตรวจ *Salmonella* spp. (ตรวจแบบไม่นับจำนวนจุลินทรีย์)

1.8.1 นำชิ้นปูดองจากข้อ 1.1.1 มา 25 กรัม (กรณีตัวอย่างเป็นของเหลวให้ปิเปตมา 25 มิลลิลิตร) ใส่ลงในขวด Duran ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่อาหารเหลว TSB ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.8.2 ปิเปตตัวอย่างจากขวด Duran มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเหลว Selenite Cystine Broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.8.3 เขี่ยจุลินทรีย์จากหลอดอาหารมาลากในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง XLD และอาหารแข็ง HE แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.8.4 สังเกตโคโลนีสีชมพู ซึ่งอาจมีจุดดำอยู่ภายในหรือไม่ก็ได้ในอาหารแข็ง XLD และโคโลนีสีเขียวออกน้ำเงินมีจุดดำอยู่ภายในหรือไม่ก็ได้ในอาหารแข็ง HE เขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวจากอาหารแข็งทั้งสองชนิด ชนิดละ 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมาใส่ในหลอดอาหารแข็ง TSI โดยการแทงลงในแนวตรงและลากบนพื้นผิว พร้อมกับเขี่ยจุลินทรีย์ลงในหลอดอาหาร MIL โดยแทงลงในแนวตรง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สังเกตผลดังตารางที่ 6.1 นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง

1.9 การตรวจ *Cl. perfringens*

1.9.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม จากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจางต่างกัน 3 ระดับต่อเนื่องกัน ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Modified BHI ระดับความเจือจางละ 2 จาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

1.9.2 ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ และปล่อยให้เปลวไฟที่แท่งแก้วดับ ทิ้งไว้จนแท่งแก้วมีอุณหภูมิลดลง เกลี่ยหยดสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.9.3 สังเกตโคโลนีสีเหลืองล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นขาว และเขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมามาย้อมสีแบบแกรม ถ้าหากเป็น *Cl. perfringens* เซลล์จะมีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.10 **การตรวจ** *Cl. perfringens* (ตรวจแบบไม่นับจำนวนจุลินทรีย์)

1.10.1 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 1.1 ที่ระดับความเจือจาง 1 : 10 ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว Cook Meat จำนวน 2 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.10.2 เขี่ยจุลินทรีย์จากหลอดอาหาร Cook Meat นำมาลากในจานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารแข็ง Modified BHI แล้วนำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.10.3 สังเกตโคโลนีสีเหลืองล้อมรอบด้วยบริเวณขุ่นขาว และเขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมามาย้อมสีแบบแกรม ถ้าหากเป็น *Cl. perfringens* เซลล์จะมีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีม่วง

1.11 **การตรวจ** *V. cholerae* (ตรวจแบบไม่นับจำนวนจุลินทรีย์)

1.11.1 นำชิ้นปูดองจากข้อ 1.1.1 มา 25 กรัม ใส่ในขวด Duran ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่อาหาร Alkaline Peptone Water ปริมาณ 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.11.2 เขี่ยจุลินทรีย์จากบริเวณผิวหน้าอาหาร มาลากในจานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารแข็ง TCBS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.11.3 สังเกตโคโลนีที่มีขนาดใหญ่สีเหลืองค่อนข้างแบน เขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมาใส่ในหลอดอาหารแข็ง TSI โดยแทงลงในแนวตรงและลากบนพื้นผิว พร้อมกับเขี่ยจุลินทรีย์ลงในหลอดอาหารแข็ง MIL โดยแทงลงในแนวตรง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลดังตารางที่ 6.~~1~~

1.12 **การตรวจ** *V. parahaemolyticus* (ตรวจแบบไม่นับจำนวนจุลินทรีย์)

1.12.1 ทำตามวิธีการในข้อ 1.10

1.12.2 เขี่ยจุลินทรีย์จากขวดอาหาร Alkaline Peptone Water มาลากในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง TCBS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

1.12.3 สังเกตโคโลนีที่มีสีเขียวออกน้ำเงิน เมื่อใช้เข็มเขี่ยเชื้อสัมผัสมีลักษณะหนืด ๆ เขี่ยจุลินทรีย์จากโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา 3 - 5 โคโลนี แต่ละโคโลนีนำมาใส่ลงในหลอดอาหารแข็ง TSI โดยแทงลงในแนวตรงและลากบนพื้นผิวพร้อมกับเขี่ยจุลินทรีย์ลงในหลอดอาหารแข็ง MIL โดยแทงลงในแนวตรง และเขี่ยจุลินทรีย์ใส่ในหลอดอาหาร Alkaline Peptone Water ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลดังตารางที่ 6.1 และในหลอดอาหาร Alkaline Peptone Water ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 และ 8 เปอร์เซ็นต์ โดย *V. parahaemolyticus* จะสามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้หลอดอาหารขุ่น

ตารางที่ 6.1 ปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ใน TSI Agar และ MIL

จุลินทรีย์	TSI Agar				MIL		
	Slant	Butt	Gas	H_2S	Lysine	Indole	Motility
E. coli	A(K)	A	+(-)	-	+(-)	+	+(-)
Salmonella sp.	K	A	+	+(-)	+(-)	-	+(-)
V. cholerae	A	A	-	-	+	+	+
V. parahaemolyticus	K	A	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : ใน TSI Agar K = แดง A = เหลือง + = เกิดก๊าซ - = ไม่เกิดก๊าซ

ใน MIL Lysine + = สีม่วง - =สีเหลือง

Indole + = สีแดง - = ไม่เกิดปฏิกิริยา

Motility + = จุลินทรีย์เจริญนอกบริเวณstab - = จุลินทรีย์เจริญบริเวณ stab

(**ที่มา** : ดัดแปลงจาก Ohashi, *et. al.* 1978)

2. วิธีทำ standard McFarland No. 5

2.1 เขี่ยจุลินทรีย์ตัวอย่างมา 1 ลูป ใส่ลงในหลอดอาหาร BHI ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที รินส่วนใสทิ้ง ใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน รินส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง

2.3 นำส่วนที่เป็นตะกอนมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland Standard No. 5 เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ใส่บนอาหารแข็ง BHI หรือ PCA เกลี่ยหยดสารละลายให้กระจายทั่วผิวหน้า หรืออาจใช้วิธี pour plate technique ก็ได้ คว่ำจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม

2.4 นับโคโลนีที่เกิดขึ้น นำมาคำนวณหาปริมาณ โดยใช้สูตร ในข้อ 1.4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการตรวจสอบทางเคมี (AOAC,1995)

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

1.1 การเตรียมสารเคมี

1.1.1 น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มให้เดือดนาน 20 นาที ปล่อยให้เย็น

1.1.2 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน เตรียมโดย ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล เตรียมโดย ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติกหรือขวดแก้วที่มีฝาพลาสติก ก่อนใช้ให้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อนทุกครั้ง

1.2 การหาความเข้มข้นมาตรฐานของโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.2.1 อบ แอซิดโพแทสเซียมพาธาเลท ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งอย่างละเอียด 0.3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 50 มิลลิลิตร เมื่อแอซิดโพแทสเซียมพาธาเลทละลายหมดแล้ว เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากข้อ 1.1.3 จนถึงจุดยุติ คำนวณหาความเข้มข้นมาตรฐานของโซเดียมไฮดรอกไซด์จากสูตร

1.3 การคำนวณ

ความเข้มข้นมาตรฐาน (นอร์มัล)

$$= \frac{N \times 1{,}000}{V \times 204.229}$$

เมื่อ N = แอซิดโพแทสเซียมพาธาเลท (กรัม)

V = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

204.229 = น้ำหนักโมเลกุลของแอซิดโพแทสเซียมพาธาเลท

1.3 การวิเคราะห์

1.3.1 นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งตัวอย่างเกิดสีชมพูและไม่จางหายไปในเวลา 15 วินาที

1.4 การคำนวณ

ปริมาณกรดแลกติก (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1000 \times 1}$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (นอร์มัล)

V = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร)

90.01 = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลกติก

2. การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (AOAC,1995)

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลาย เงินไนเตรท 0.1 นอร์มัล เตรียมโดย ชั่งเงินไนเตรต 1.6987 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลาย แอมโมเนียมไซยาเนต 0.1 นอร์มัล เตรียมโดย ชั่งแอมโมเนียมไธโอไซยาเนต 0.7612 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2.1.3 สารละลายแอมโมเนียมเฟอริกซัลเฟตอิ่มตัว เตรียมโดย ละลายแอมโมเนียมเฟอริกซัลเฟตในน้ำกลั่นจนอิ่มตัว นำส่วนที่เป็นของเหลวไปใช้

2.2 การวิเคราะห์

2.2.1 ชั่งตัวอย่าง 2 - 3 กรัม (ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว ปิเปตตัวอย่างมา 2 - 3 มิลลิลิตร) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย เงินไนเตรท 0.1 นอร์มัล ลงไป 25 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ใส่กรดไนตริกลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate จนเดือด ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วใส่น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

2.2.3 ใส่สารละลายแอมโมเนียมเฟอริกซัลเฟตอิ่มตัวลงไป 5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน นำไปไทเทรตด้วยสารละลาย แอมโมเนียมไธโอไซยาเนต0.1 นอร์มัล จนกระทั่งได้สีแดงที่คงตัวเป็นเวลานานกว่า 15 วินาที เพื่อหาปริมาณของเงินไนเตรตที่มากเกินพอ

2.3 การคำนวณ

ความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{(N_1V_1 - N_2V_2) \times 58.5}{Ws}$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของเงินไนเตรท (นอร์มัล)

V_1 = ปริมาตรของเงินไนเตรต (มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไธโอไซยาเนตที่ใช้ไทเทรต (นอร์มัล)

V_2 = ปริมาตรของแอมโมเนียมไธโอไซยาเนตที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

58.5 = น้ำหนักโมเลกุลของโซเดียมคลอไรด์

Ws = ปริมาณตัวอย่าง (กรัมหรือมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 7.1 จุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวม และจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำเกลือที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร

ลำดับ	ตลาดสด	TPC (cfu / g)	Lactics (cfu / g)	*E. coli* (cfu / g)	*B. cereus* (cfu / g)	*S. aureus* (cfu / g)	*Salmonella* sp.	*Cl. perfringens*	*V. cholerae*	*V. parahaemolyticus*
1	กล้วยน้ำไท	1.9×10^5	1.7×10^3	3.0×10^2	-	4.0×10^2	-	-	-	-
2	อัมรินทร์	1.2×10^5	3.0×10^3	-	-	-	-	-	-	-
3	บางกะปิ 1	1.0×10^5	5.7×10^4	1.6×10^2	8.0×10^2	-	-	$+^c$	-	-
4	สินสมุทร	5.0×10^6	5.2×10^4	-	-	-	$+^c$	-	-	-
5	ดวงพลอย	4.0×10^5	4.5×10^4	-	-	7.0×10^2	-	$+^c$	-	-
6	แสงทิพย์ 1	4.4×10^5	8.0×10^3	7.0×10^2	-	-	-	-	-	-
7	ราษฎร์บูรณะ	8.0×10^5	3.2×10^4	-	5.0×10^2	-	-	-	-	-
8	นางเลิ้ง	1.2×10^5	1.0×10^5	-	-	-	-	$+^c$	-	-
9	พรานนก	1.1×10^6	3.3×10^5	7.0×10^2	9.0×10^2	1.0×10^2	-	-	-	-
10	วงเวียนใหญ่	7.3×10^5	4.2×10^5	5.0×10^2	1.1×10^3	-	-	-	-	-
11	ท่าดินแดง	1.5×10^5	2.2×10^4	-	-	-	-	-	-	-
12	เจริญนคร	5.6×10^6	3.2×10^4	-	1.2×10^4	-	-	-	-	-
13	โต้รุ่งหัวหมาก	$9.8\ 10^6$	5.4×10^4	1.6×10^2	2.2×10^3	-	-	$+^c$	-	-
14	สินสมุทร	1.7×10^5	2.5×10^4	-	7.0×10^2	-	$+^c$	$+^c$	-	-
15	แฮปปี้แลนด์	3.9×10^5	1.3×10^4	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ TPC = จุลินทรีย์ทั้งหมด Lactics = แบคทีเรียแลกติกโดยรวม

$+^c$ = พบจุลินทรีย์แต่ไม่ต้องนับจำนวน - = ไม่พบจุลินทรีย์

ตารางที่ 7.1 (ต่อ)

ลำดับ	ตลาดสด	TPC (Cfu / g)	Lactics (cfu / g)	*E. coli* (cfu / g)	*B. cereus* (cfu / g)	*S. aureus* (cfu / g)	*Salmonella* sp.	*Cl. perfringens*	*V. cholerae*	*V. parahaemolyticus*
16	โพธิ์แก้ว	2.2×10^5	2.0×10^4	-	-	-	-	-	-	-
17	เอกมัย	7.6×10^5	2.8×10^4	5.5×10^2	3.2×10^2	-	-	-	-	-
18	บ้านหม้อ	8.2×10^5	4.5×10^4	-	-	-	-	$+^c$	-	-
19	ยอดพิมาน	1.0×10^6	1.6×10^4	4.2×10^2	1.2×10^3	2.4×10^2	-	-	-	-
20	แสงทิพย์	7.9×10^5	2.7×10^3	-	-	-	-	-	-	-
21	สนามเป้า	3.2×10^5	5.0×10^3	-	1.0×10^3	-	-	-	-	-
22	ใหม่บางแค	6.0×10^5	4.7×10^4	-	-	-	-	-	-	-
23	จันทร์สโมสร	9.0×10^6	3.2×10^4	2.5×10^4	3.2×10^2	-	$+^c$	-	-	-
24	ลำสาสี	2.4×10^5	2.5×10^4	-	-	-	-	$+^c$	-	-
25	ปีระกา	5.4×10^6	5.0×10^3	-	1.2×10^3	-	-	-	-	-
26	หนองจอก	8.5×10^5	7.2×10^4	-	3.0×10^4	6.0×10^2	-	-	-	-
27	จตุจักร	1.8×10^6	3.0×10^5	-	-	-	-	-	-	-
28	โพธิ์สามต้น	1.6×10^6	5.3×10^5	-	-	-	-	-	-	-
29	ท่าเตียน	6.3×10^5	3.2×10^5	-	-	-	-	-	-	-
30	สี่แยกบ้านแขก	6.5×10^5	4.2×10^4	2.4×10^2	2.4×10^3	-	-	$+^c$	-	-

หมายเหตุ TPC = จุลินทรีย์ทั้งหมด Lactics = แบคทีเรียแลกติกโดยรวม

$+^c$ = พบจุลินทรีย์แต่ไม่ต้องนับจำนวน - = ไม่พบจุลินทรีย์

ตารางที่ 7.2 จุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียแลกติกโดยรวม และจุลินทรีย์ก่อโรคในปูดองน้ำปลาที่จำหน่ายในตลาดสดบริเวณกรุงเทพมหานคร

ลำดับ	ตลาดสด	TPC (cfu / g)	Lactics (cfu / g)	*E. coli* (cfu / g)	*B. cereus* (cfu / g)	*S. aureus* (cfu / g)	*Salmonella* sp.	*Cl. perfringens*	*V. cholerae*	*V. parahaemolyticus*
1	กล้วยน้ำไท	7.2×10^7	3.6×10^7	-	1.8×10^4	4.0×10^2	-	-	-	-
2	หัวตะเข้	5.2×10^6	3.0×10^5	6.3×10^3	3.0×10^4	-	-	-	-	-
3	บางกะปิ 2	2.8×10^7	5.7×10^6	-	8.0×10^3	-	-	-	-	-
4	สินสมุทร	9.3×10^7	5.2×10^6	4.5×10^3	-	-	$+^c$	-	-	-
5	พรานนก	7.0×10^7	4.5×10^6	4.8×10^2	-	-	-	-	-	-
6	แสงทิพย์ 2	3.4×10^6	8.0×10^5	-	2.6×10^4	1.6×10^2	-	$+^c$	-	-
7	ปีระกา	6.0×10^8	3.2×10^6	7.0×10^2	5.4×10^3	-	-	-	-	-
8	นางเลิ้ง	8.2×10^7	1.0×10^6	-	3.6×10^3	-	-	-	-	-
9	ท่าเตียน	5.6×10^7	3.3×10^6	-	9.0×10^2	-	-	-	-	-
10	วงเวียนใหญ่	4.3×10^7	4.2×10^6	5.0×10^2	-	8.0×10^3	$+^c$	$+^c$	-	-

หมายเหตุ TPC = จุลินทรีย์ทั้งหมด Lactics = แบคทีเรียแลกติกโดยรวม

$+^c$ = พบจุลินทรีย์แต่ไม่ต้องนับจำนวน - = ไม่พบจุลินทรีย์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 7.3 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ในอาหารเหลว MRS น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ และน้ำสกัดปูดองน้ำปลา

ชนิดโปรไบโอติค	อาหารเหลว MRS						น้ำสกัดปูดองน้ำเกลือ							น้ำสกัดปูดองน้ำปลา						
	0 ชม	12ชม	18 ชม	24 ชม	36 ชม	48ชม	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24ชม	30 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	18 ชม	24 ชม	36 ชม	40 ชม	48 ชม
Control	0	0	0	0	0	0	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
L. plantarum	0	0	0	0	0	0	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
L. acidophilus	0	0	0	0	0	0	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
L. pla + L. acid	0	0	0	0	0	0	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72

หมายเหตุ *L. pla + L. acid* =จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *L. acidophilus*

ตารางที่ 7.4 ค่าพีเอชและปริมาณกรดในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา

ชนิดโปรไบโอติค	ปูดองน้ำเกลือ										ปูดองน้ำปลา									
	พีเอช					ปริมาณกรด(%)					พีเอช					ปริมาณกรด(%)				
	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม
Control	6.82	6.72	6.30	6.24	6.36	0.00	0.04	0.04	0.04	0.09	6.80	6.47	6.54	6.59	6.60	0.00	0.04	0.04	0.04	0.09
L. plantarum	6.82	6.62	6.30	6.24	6.31	0.00	0.04	0.04	0.09	0.09	6.80	6.54	6.44	6.53	6.35	0.04	0.04	0.04	0.09	0.09

ตารางที่ 7.5 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในปูดองน้ำเกลือและปูดองน้ำปลา (หน่วย : เปอร์เซ็นต์)

ชนิดโปรไบโอติค	ปูดองน้ำเกลือ										ปูดองน้ำปลา									
	น้ำเกลือ					ตัวปู					น้ำปลา					ตัวปู				
	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม	0 ชม	12 ชม	24 ชม	36 ชม	48 ชม
Control	17.16	16.71	16.25	15.73	15.34	0.64	3.78	6.34	9.01	11.54	27.63	26.85	26.26	25.87	25.42	0.66	8.63	10.50	12.80	15.15
L. plantarum	17.16	16.71	16.25	15.73	15.34	0.64	3.78	6.34	9.01	11.54	27.63	26.85	26.26	25.87	25.42	0.66	8.63	10.50	12.80	15.15