สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547

เรื่อง

ผลของการปรับตัวต่อกรดของเชื้อ *Salmonella* ต่อความอยู่รอดในระหว่างการหมักแหนม

(Effect of acid adaptation of *Salmonella* on its survival during Nham fermentation)

โดย

ผศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QR
201
.S25
ส8675

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....58926

วัน,เดือน,ปี.....17 ก.พ. 2549

b.....11493124

i.....

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Agona SAP 08947/02, *Salmonella* Rissen DMST 7097 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่ปรับพีเอชให้เป็นกรด โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในชั่วโมงที่ 0, 8, 24, 48, 72 และ 96 ของการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าเชื้อ *Salmonella* ทั้งสามซีโรไทป์ใน TSB ที่พีเอช 5.5 สามารถอยู่รอดได้ดีกว่าที่พีเอช 4.5 และ 5.0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) *S.* Rissen สามารถอยู่รอดใน TSB ที่พีเอช 5.5 ได้ดีที่สุดตามด้วยเชื้อ *S.* Agona และ *S.* Typhimurium จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *S.* Rissen และ *S.* Typhimurium มาศึกษาผลของการปรับตัวต่อกรดที่พีเอช 5.5 ต่อการอยู่รอดระหว่างการหมักใน Nham model broth (NMB) ในสภาพที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 ผลการทดลองพบว่าเซลล์ของ *S.* Rissen ที่ปรับตัวต่อกรดมีความต้านทานต่อสภาพเครียดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ของ *S.* Rissen ที่ไม่ได้ปรับตัวต่อกรด อย่างไรก็ตาม การปรับตัวต่อกรดของ *S.* Typhimurium ไม่มีผลช่วยเพิ่มการอยู่รอดของเชื้อซีโรไทป์นี้ตลอดระยะเวลาการหมักใน NMB ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ซีโรไทป์ที่ต่างกันของ *Salmonella* มีผลทำให้เชื้อทนต่อสภาพเครียดได้ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนแบคทีเรียแลคติกใน NMB ได้ลดลงและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมงแรกและค่อยๆเพิ่มขึ้นหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นและจำนวนเชื้อ *Salmonella* ที่ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Effect of acidic pH on growth of *Salmonella* Agona SAP 08947/02, *Salmonella* Rissen DMST 7097 and *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 in acidified TSB was investigated. The number of viable cells at hour 0, 8, 24, 48, 72 and 96 of incubation at 37°C was measured. All three serotypes of *Salmonella* in TSB at pH 5.5 showed greater survival than those in TSB at pH 4.5 and 5.0 ($P<0.05$). *S.* Rissen exhitbited the greatest survival in TSB at pH 5.5, followed by *S.* Agona and *S.* Typhimurium. Therefore, *S.* Rissen and *S.* Typhimurium were selected to study the effect of acid adaptation at pH 5.5 on survival of these *Salmonella* during fermentation in Nham model broth (NMB) in the presence of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* TISTR 050 and *Pediococcus acidilactici* TISTR 051). The results showed that acid-adapted cells of *S.* Rissen had increased tolerance towards stresses in NMB during 48 hours of fermentation ($P<0.05$), compared to nonadapted cells. However, acid adaptation did not enhance the survival of *S.* Typhimurium throughout the 96 hour fermentation in NMB. This indicates that different serotypes of *Salmonella* affect different resistance to stresses. In addition, the number of lactic acid bacteria slightly decreased during the first 24 hours and gradually increased after 48 hours of fermentation in NMB. The number of these bacteria related to increased total acidity and decreased *Salmonella* number during fermentation.

คำสำคัญ (Keywords): การปรับตัวต่อกรด (acid adaptation) ซาลโมเนลลา (*Salmonella*) แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) แหนม (Nham)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. บทนำ

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Salmonellosis) ที่พบในหลายๆ ประเทศ การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *Salmonella* ที่ผ่านมาเกี่ยวข้องกับการบริโภคอาหารหมักหลายชนิด (Johnson, 1991; Moore, 2004) สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทยโดยเฉพาะแหนมก็พบเชื้อชนิดนี้ปนเปื้อนเช่นกัน เชื้อ *Salmonella* หลายซีโรไทป์ที่ได้มีการรายงานว่าแยกได้จากแหนม เช่น *S.* Agona, *S.* Anatum, *S.* Derby, *S.* Give, *S.* London, *S.* Panama, *S.* Rissen, *S.* Senftenberg และ *S.* Stanley (สุรีย์, 2539; สุรีย์ และคณะ, 2545) Tuitemwong และคณะ (2004) พบว่าแหนมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน มีจำนวน *Salmonella* 1.0×10^{1}–5.0×10^{2} CFUต่อกรัม ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ *Salmonella* ที่พบในแหนมอยู่ในช่วง 105-195 CFU ต่อแหนม 25 กรัม ดังนั้นการพบเชื้อชนิดนี้จึงเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของผู้บริโภคที่นิยมรับประทานแหนมที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในแหนมส่วนใหญ่มาจากเนื้อหมูที่ใช้เป็นวัตถุดิบ สุรีย์ และคณะ (2545) รายงานการพบเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อหมูสดทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ ถึงแม้ว่าในกระบวนการผลิตแหนม จะมีการเติมส่วนผสมต่างๆเช่น กระเทียม เกลือไนไทรต์และไนเทรตรวมทั้งมีกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการหมักโดยแบคทีเรียแลคติก ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ แต่ก็ยังพบว่ามี *Salmonella* อยู่รอดในแหนมได้ อาจเป็นไปได้ว่า เชื้อชนิดนี้สามารถปรับตัวต่อกรดในแหนม ดังการรายงานของ Leyer และ Johnson (1992) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลการปรับตัวต่อกรดของ *Salmonella* spp. ต่อการอยู่รอดในเนยแข็ง โดยทดลองให้เชื้อ *Salmonella* spp. ปรับตัวต่อกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอช 5.8 พบว่า เซลล์ที่มีการปรับตัวต่อกรดสามารถต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยกรดอินทรีย์ในเนยแข็ง และนมเปรี้ยวได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด

การปรับตัวต่อกรด สามารถทำให้เชื้อการเกิดการป้องกันข้าม (cross-protection) ต่อสภาพเครียดอื่นๆ ซึ่งหมายถึงการปรับตัวต่อกรดสามารถทำให้เซลล์สร้างโปรตีนเฉพาะบางอย่างขึ้นมา ซึ่งมีผลทำให้เชื้อต้านทานต่อสภาพเครียดชนิดอื่นที่ไม่ใช่กรดได้ด้วย ทำให้อัตราการอยู่รอดสูงขึ้น Tosun และ Gönül (2003) ได้ศึกษาผลการปรับตัวต่อกรดไฮโดรคลอริกของ *S.* Typhimurium ที่พีเอช 5.8 ± 0.1 พบว่า นอกจากการปรับตัวต่อกรดจะมีผลทำให้เซลล์ทนต่อกรดที่รุนแรงมากขึ้นได้ แล้วยังช่วยทำให้เซลล์ทนต่อสภาพเครียดอื่นๆ เพิ่มขึ้นอีกด้วย เช่น ความร้อน เกลือ และกรดอินทรีย์ ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาเพื่อยืนยันว่า การปรับตัวต่อกรดของ *Salmonella* สามารถช่วยเพิ่มการอยู่รอดของเชื้อชนิดนี้ในระหว่างการหมักแหนม และ มีผลทำให้เกิดการป้องกันข้ามต่อส่วนผสมในแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์

Salmonella 3 ซีโรไทป์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Salmonella* Rissen DMST 7097 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 ได้จากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และ *Salmonella* Agona SAP 08947/02 เป็นเชื้อที่แยกได้จากแหนม และแบคทีเรียแลคติก 2 ชนิดที่ใช้ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Tryptic Soy Broth/ Tryptic Soy Agar (TSB/ TSA, pH 7.3±0.2, Difco Laboratories), Nutrient Agar (NA, pH 6.8 ±0.2, Difco), deMan Rogosa Sharpe Medium (MRS, pH 6.5±0.2, Difco) และ Nham Model Broth (NMB, pH 6.0, a_w 0.97) ประกอบด้วยเนื้อสกัด 10.0 กรัม เปปโตน 10.0 กรัม กลูโคส 10.0 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 25.0 กรัม กรดแอสคอร์บิก 0.5 กรัม โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟส 3.0 กรัม โซเดียมไนไตร์ท 0.125 กรัม โซเดียมไนเตรท 0.5 กรัม กระเทียมปราศจากเชื้อ 50.0 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร (Swetwiwathana และคณะ, 1999)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1. การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Agona, *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium ในอาหารเหลวที่ปรับพีเอชให้เป็นกรด

2.2.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อ *S.* Agona, *S.* Rissen และ *S.* Typhimurium ที่เก็บไว้ลงในหลอดอาหาร NA หลอดใหม่แต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้ออีก 2 ครั้ง บ่มในสภาวะเดิม เขี่ยเชื้อมาลากบนผิวหน้าอาหาร NA ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่สภาวะเดิม จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารจำนวน 8 โคโลนีลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ทำให้เซลล์อยู่ในรูปสารแขวนลอยด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นของเชื้อทั้ง 3 ซีโร ไทป์ ให้เท่ากันด้วย McFarland Standard เบอร์ 4

2.2.1.2 การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Agona, *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium ในอาหารเหลวที่มีพีเอชเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรีย *Salmonella* จากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร TSB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าพีเอชให้ได้ 4.5, 5.0 และ 5.5 ด้วยกรดแลคติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 8, 24, 48, 72 และ 96 ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร TSA คัดเลือกเชื้อที่อยู่รอดได้ดีที่สุด และเชื้อที่อยู่รอดได้น้อยที่สุด รวมทั้งเลือกค่าพีเอชที่ทำให้เชื้ออยู่รอดได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาการปรับตัวต่อกรดในขั้นต่อไป ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2.2 การศึกษาผลการปรับตัวต่อกรดของ *Salmonella* ต่อการอยู่รอดในระหว่างการหมักแหนม

2.2.2.1 การเตรียมเซลล์ของ *Salmonella* ที่ไม่ปรับตัวต่อกรดและที่ปรับตัวต่อกรด

ทำการเตรียมเซลล์ของ *Salmonella* 2 ซีโรไทป์ที่คัดเลือกจากผลการทดลองในข้อ 2.2.1.2 ตามวิธีการในข้อ 2.2.1.1 จะได้เซลล์ที่ไม่ได้ปรับตัวต่อกรด ส่วนการเตรียมเซลล์ปรับตัวต่อกรด ทำตามวิธีการข้อ 2.2.1.1 ในขั้นแรกเมื่อได้สารแขวนลอยของเซลล์ *Salmonella* ทั้งสองซีโรไทป์แล้ว ปิเปตเชื้อแต่ละซีโรไทป์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TSB (ที่มีค่า พีเอชเป็นกรด 1 ระดับที่คัดเลือกได้) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซล เซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความ เร็ว 5500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง และเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากันด้วย McFarland Standard เบอร์ 4

2.2.2.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติก

เขี่ยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 และ *P. acidilactici* TISTR 051 ลงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้ออีก 2 ครั้ง เขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็ม ลงในอาหาร เหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ 2ครั้ง ด้วยสารละลาย เปปโตนความเข้มข้น 0.1% ทำให้เซลล์อยู่ในรูปสารแขวนลอยด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.2.3 การปรับตัวต่อกรดต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* ในระหว่างการหมักแหนม

การทดลองนี้ได้จำลองการหมักแหนมทั้งหมด 4 ชุดในอาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก (*L. plantarum* และ *P. acidilactici*) โดยในแต่ละชุด เติมเซลล์ของ*Salmonella* ชนิดต่างกันลงไปดังนี้ ในชุดที่1) เติมเซลล์ของ *S.* Rissen ที่ปรับตัวต่อกรด ชุดที่ 2) เติมเซลล์ของ *S.* Rissen ที่ไม่ได้ปรับตัวต่อกรด ชุดที่ 3) เติมเซลล์ของ *S.* Typhimurium ที่ปรับตัวต่อกรด และชุดที่ 4) เติมเซลล์ของ *S.* Typhimurium ที่ไม่ได้ปรับตัวต่อกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดลอง โดยเติมสารแขวนลอยของเซลล์ *Salmonella* ชนิดต่างกันแต่ละซีโรไทป์จากข้อ 2.2.2.1 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในอาหาร NMB ปริมาตร 140 มิลลิลิตรที่เติมเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก (ความเข้มข้น 10^7-10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากข้อ 2.2.2.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แต่ละชุดจะได้ความเข้มข้นของ *Salmonella* เป็น 10^7-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ตรวจนับจำนวน *Salmonella* ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร TSA หาจำนวนแบคทีเรียแลคติกบนอาหาร MRS ด้วย เทคนิค pour plate และวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดใน NMB ตามวิธีการของอรุณี (2541) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2.2.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การทดลองในข้อ 2.2.1.2 และ 2.2.2.3 วางแผนการทดลองแบบ Split-Plot Design นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan Multiple Range Test และ Analysis of Variance ด้วยโปรแกรม SPSS

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลของพีเอชต่อการอยู่รอดของ *S.* Agona, *S.* Rissen และ *S.* Typhimurium ในอาหารเหลวที่ปรับพีเอชให้เป็นกรด

จำนวนเซลล์ของ *S.* Agona ใน TSB ที่พีเอช 5.0 และ 5.5 เพิ่มขึ้นประมาณ 2 log CFUต่อมิลลิลิตร จากจำนวนเริ่มต้นประมาณ 7 log CFUต่อมิลลิลิตร หลังบ่มนาน 8 ชั่วโมง (รูปที่ 1 (ก)) ส่วนที่พีเอช 4.5 จำนวนเซลล์ลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 24 จำนวนเซลล์ที่แต่ละค่าพีเอชแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$) ในชั่วโมงที่ 8 จากนั้นจำนวนเซลล์ที่พีเอช 5.0 และ 4.5 ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และ24 ตามลำดับ จนถึงชั่วโมงที่ 48 จึงค่อนข้างคงที่ถึงชั่วโมงที่ 96 แต่ที่พีเอช 5.5 จำนวนเซลล์ลดลงหลังชั่ว โมงที่ 8 แต่ลดน้อยกว่าที่พีเอชอีก 2 ระดับในทุกช่วงเวลาที่ตรวจสอบ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 96 จำนวนเซลล์ใน TSB ที่พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.5 ลดลงประมาณ 6, 5 และ 4 log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แสดงว่า *S.* Agona อยู่รอดใน TSB ที่พีเอช 5.5 ได้ดีที่สุด

สำหรับการอยู่รอดของ *S.* Rissen ใน TSB (รูปที่ 1 (ข)) พบว่าใน TSB ที่พีเอช 4.5 จำนวนเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 48 แล้วเพิ่มจำนวนขึ้นอีกจนถึงชั่วโมงที่ 72 จากนั้นจำนวนเซลล์ลดลงจนตรวจไม่พบในชั่วโมงที่ 96 ส่วนที่พีเอช 5.0 และ 5.5 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น

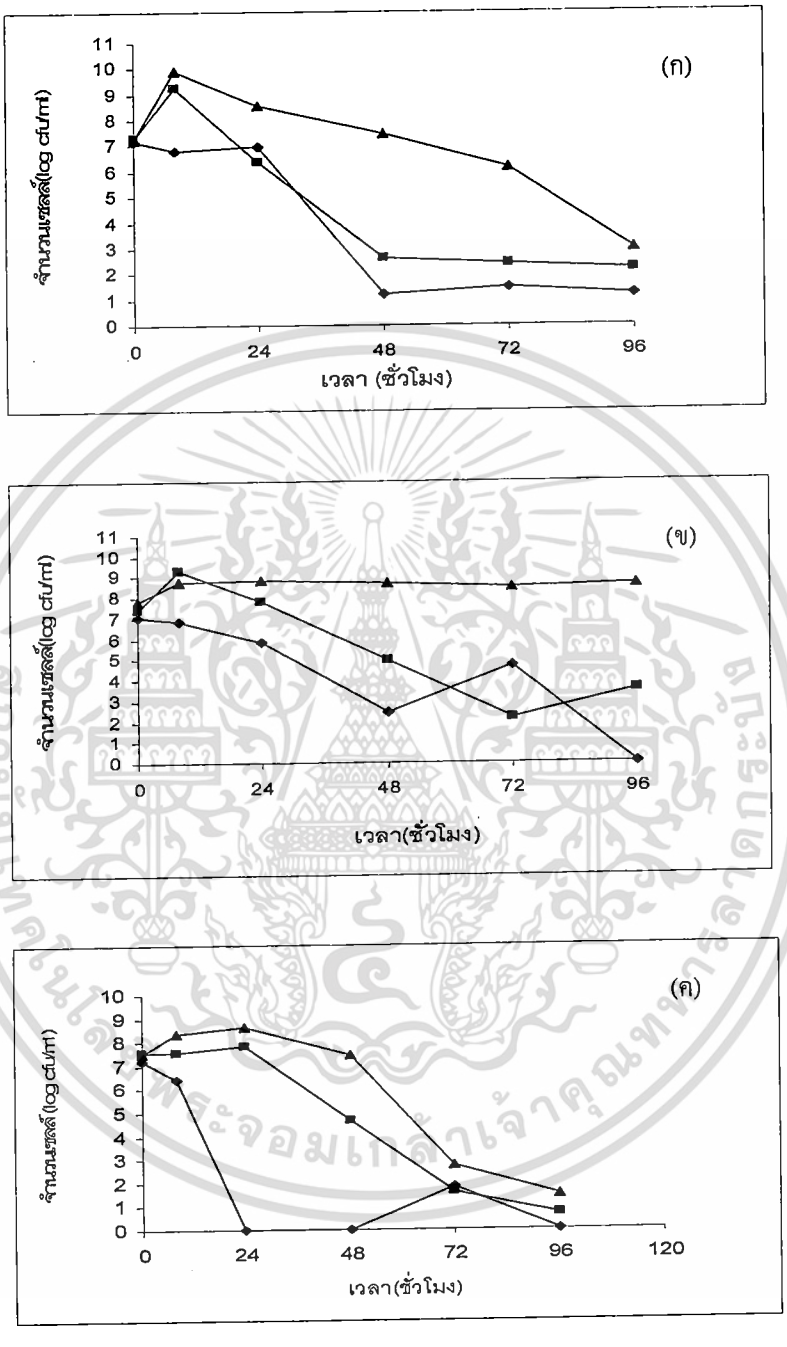
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 8 จากนั้นจำนวนเซลล์ที่พีเอช 5.5 คงที่จนถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 8 log CFUต่อมิลลิลิตร ส่วนที่พีเอช 5.0 หลังจากชั่วโมงที่ 8 จำนวนเซลล์ได้ลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 แล้วเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งจนถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 4 log CFUต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ที่พีเอช 4.5 ไม่มีความแตกต่างกับที่พีเอช 5.0 ในทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่จำนวนเซลล์ที่ทั้ง 2 ระดับพีเอชน้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่พีเอช 5.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกช่วงเวลาที่ทดสอบ แสดงว่า *S.* Rissen สามารถอยู่รอดใน TSB ที่พีเอช 5.5 ได้ดีกว่าที่พีเอช 5.0 และ 4.5

การอยู่รอดของ *S.* Typhimurium ใน TSB แสดงดังรูปที่ 1 (ค) จะเห็นว่าที่พีเอช 4.5 จำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วจนตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตในชั่วโมงที่ 24 ส่วนที่พีเอช 5.0 จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 โดยมีจำนวนเซลล์มากกว่าที่พีเอช 4.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งพบว่าจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 7 log CFUต่อมิลลิลิตร ส่วนที่พีเอช 5.5 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 แล้วค่อยๆลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเซลล์ที่พีเอช 5.5 มีมากกว่าที่พีเอช 5.0 และ 4.5 ในทุกช่วงเวลาแต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) เฉพาะในชั่วโมงที่ 8, 24 และ 48

การที่ *Salmonella* ทั้งสามซีโรไทป์อยู่รอดได้ต่ำที่สุดที่พีเอช 4.5 นั้น เนื่องจากความเป็นกรดที่มากเกินไป มีผลทำให้ภายในเซลล์มีสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์อาจถูกยับยั้งหรือเสียสภาพได้ เมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547) ดังนั้นที่พีเอช 4.5 จึงเป็นอันตรายต่อเซลล์มากกว่าที่พีเอช 5.0 และ 5.5 จึงทำให้มีเซลล์ที่บาดเจ็บ และตายมากกว่าที่พีเอชอื่นนอกจากนี้การปรับตัวต่อกรดที่พีเอช 5.5 ยังทำให้เซลล์ถูกเหนี่ยว นำให้ทนกรดได้โดยการตอบสนองของเซลล์ที่เรียกว่า ATR (Acid Tolerance Response) ได้ อีกด้วย (Foster และ Hall, 1991) เมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *Salmonella* ทั้งสามซีโรไทป์ที่พีเอช 5.5 พบว่า *S.* Rissen สามารถอยู่รอดที่ระดับพีเอชนี้ได้ดีกว่า *S.* Agona และ *S.* Typhimurium ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากธรรมชาติของ *S.* Rissen ที่สามารถต้านทานต่อสภาพเครียดได้ดีกว่าอีกสองซีโรไทป์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Matsushita และคณะ (2001) ซึ่งพบว่า *S.* Rissen จากเนื้อหมูสามารถต้านทานต่อยา cefotaxime และ tobramycin ได้ดี ในขณะที่ *S.* Agona และ *S.* Typhimurium ไวต่อยาสองชนิดนี้ เช่นเดียวกับที่ Nanasombat และ Lohasupthawee (2005) ได้รายงานไว้ว่า *S.* Rissen เป็น *Salmonella* ซีโรไทป์ที่ต้านทานต่อสารสกัดจากเครื่องเทศได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับซีโรไทป์อื่น ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อ *S.* Rissen ซึ่งอยู่รอดได้ดีที่สุด และ *S.* Typhimurium ที่อยู่รอดได้น้อยที่สุด และระดับพีเอชที่ 5.5 มาใช้ในการปรับตัวขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ผลของพีเอชที่เป็นกรดต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Agona (ก), *Salmonella* Rissen (ข) และ *Salmonella* Typhimurium (ค) ในอาหาร TSB ที่มีค่าพีเอช 4.5 (♦), 5.0 (■) และ 5.5 (▲)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

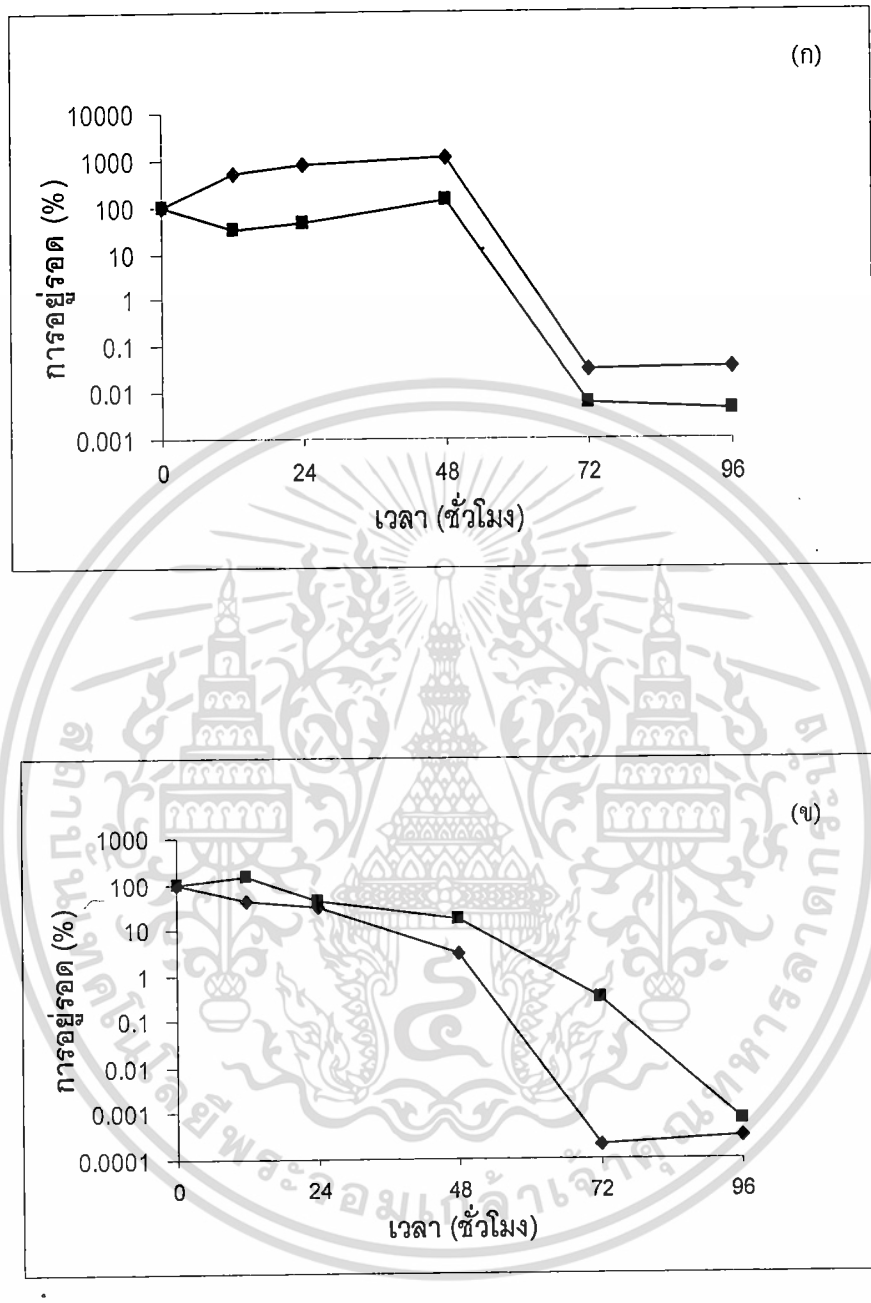
3.2 ผลการปรับตัวต่อกรดของ *Salmonella* ต่อการอยู่รอดในระหว่างการหมักแหนม

จากผลการศึกษาการอยู่รอดของ *S.* Rissen และ *S.* Typhimurium ที่มีการปรับตัวและไม่มีการปรับตัวต่อกรดใน TSB ที่พีเอช 5.5 ระหว่างการหมักใน NMB ที่เติมแบคทีเรียแลคติก (รูปที่ 2 (ก)) พบว่า เซลล์ของ *S.* Rissen ที่มีการปรับตัวต่อกรด มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากกว่าเซลล์ไม่มีการปรับตัวต่อกรดเฉพาะในชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 48 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงว่าการปรับตัวต่อกรดของ *S.* Rissen มีผลทำให้เกิดการป้องกันข้ามต่อส่วนผสมใน NMB ในช่วง 2 วันแรกของการหมัก ส่วนการอยู่รอดของ *S.* Typhimurium ใน NMB พบว่าเซลล์ที่ปรับตัวต่อกรดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับตัวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 48 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (รูปที่ 2 (ข)) หลังจากนั้น เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ปรับตัว และไม่ปรับตัวต่อกรดลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 96 แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเซลล์ที่ปรับตัว และไม่ปรับตัวของ *Salmonella* ทั้งสองซีโรไทป์ พบว่าเชื้อ *S.* Rissen สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีกรดและสารอื่นๆ ใน NMB ได้ดีกว่า *S.* Typhimurium

เหตุที่การปรับตัวต่อกรดของ *S.* Rissen มีผลช่วยให้เกิดการป้องกันข้ามต่อสารยับยั้งหลายชนิดใน NMB รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการหมัก อาจเนื่องมาจากธรรมชาติของเชื้อซีโรไทป์นี้ ที่สามารถต้านทานต่อสารยับยั้งได้ดี ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการพบ *Salmonella* อยู่รอดได้ในแหนม ซึ่งสอดคล้องกับ การรายงานที่ว่า เซลล์ของ *Salmonella* มีการตอบสนองต่อกรด (ATR) ในช่วงพีเอชระหว่าง 5.5-6.5 ซึ่งมีผลทำให้เซลล์ต้านทานต่อสภาพที่เป็นกรดสูงขึ้น (พีเอช 3.0-4.0) ได้ดีรวมทั้งต้านทานต่อสภาพเครียดชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่กรดได้ด้วย เซลล์ที่ปรับตัวต่อกรดอาจมีการสร้าง acid shock inducible proteins (ASPs) ในเซลล์ (Foster และ Hall, 1991; Foster, 1995) อย่างไรก็ตาม สำหรับเชื้อ *S.* Typhimurium ไม่พบว่าการปรับตัวต่อกรดช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของ *S.* Typhimurium ใน NMB อาจเป็นเพราะใน NMB มีส่วนผสมที่มีฤทธิ์ยับยั้งหลายชนิดเช่น กระเทียม เกลือไนไทรต์ เกลือไนเทรตโซเดียมคลอไรด์ ประกอบกับมีสารที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการหมักโดยแบคทีเรียแลคติกเกิดขึ้นหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และอื่นๆ (Kröckel, 1995) สารเหล่านี้อาจทำให้เซลล์ *S.* Typhimurium เกิดการบาดเจ็บเกินกว่าที่จะปรับตัวเพื่ออยู่รอดได้ เซลล์ที่ปรับตัวต่อกรดจึงมีจำนวนน้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับตัว ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Leyer และ Johnson (1993) ที่พบว่าการทำให้ *S.* Typhimurium ปรับตัวต่อกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอช 5.8±0.1 ระยะเวลาหนึ่ง ช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ จากสภาพเครียดอื่น ๆ ได้แก่ ความร้อน เกลือ ระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดส สารคริสตอลไวเล็ต และพอลิไมซิน บี อาจเป็น ไปได้ว่า *S.* Typhimurium ที่ปรับตัวต่อกรดในการทดลองนี้อาจไม่สร้าง ASPs ที่จะมีผลช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

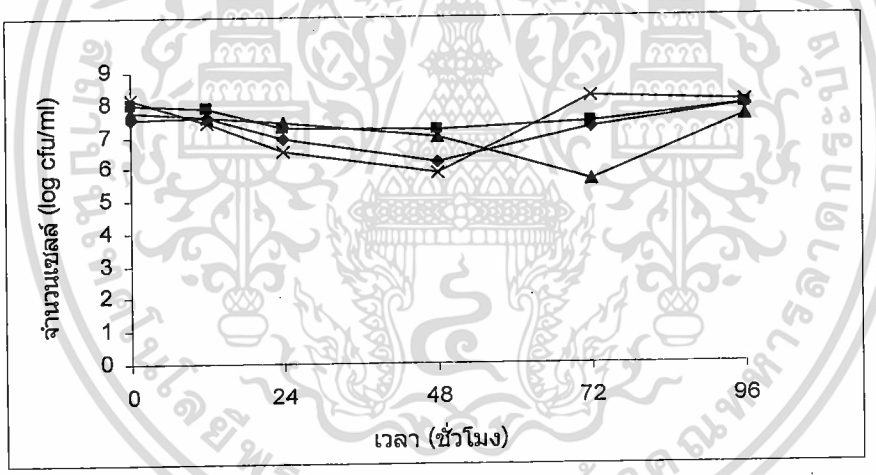
58926



รูปที่ 2 การอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen (รูป ก) และ *Salmonella* Typhimurium (รูป ข) ที่ปรับตัวต่อกรดและไม่ปรับตัวต่อกรดใน Nham model broth โดย ♦ แสดงถึงเซลล์ที่ปรับตัวต่อกรด และ■ แสดงถึงเซลล์ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด

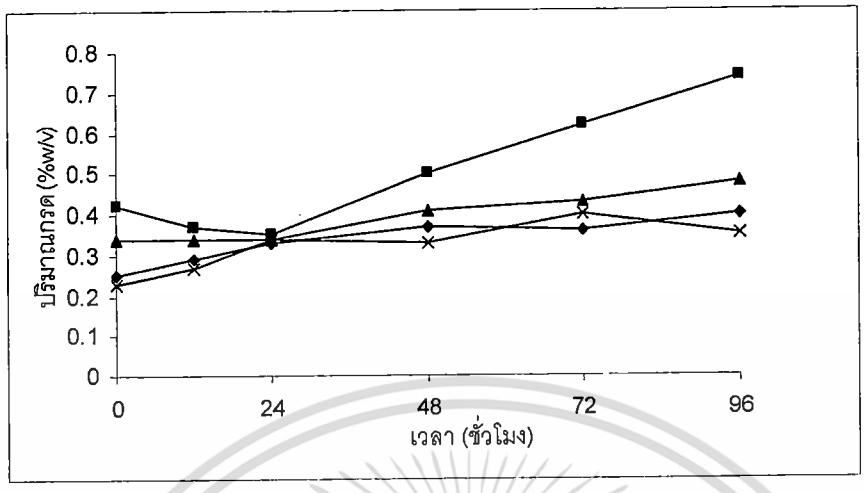
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* และ *P. acidilactici* ใน NMB พบว่า จำนวนเชื้อทั้งสองในการทดลองทุกชุด ลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังรูปที่ 3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเจริญและใช้สารอาหารร่วมกับ *Salmonella* ทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญและสร้างกรดได้น้อยในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก (รูปที่ 4) จากนั้นจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสร้างกรดได้มากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวน *Salmonella* ที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากหมักนาน 96 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียแลคติกและปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างที่เติมเชื้อ *S.* Rissen ที่ไม่ได้ปรับตัวต่อกรดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ



รูปที่ 3 ปริมาณของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในระหว่างการหมักใน Nham model broth โดย ♦ แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Rissen ที่ปรับตัวต่อกรด ■ แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Rissen ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด ▲ แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Typhimurium ที่ปรับตัวต่อกรดและ × แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Typhimurium ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักใน Nham model broth โดย ♦ แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Rissen ที่ปรับตัวต่อกรด ■ แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Rissen ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด ▲ แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Typhimurium ที่ปรับตัวต่อกรดและ × แสดงถึงตัวอย่างที่มีการเติม *Salmonella* Typhimurium ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญของ *S.* Agona SAP 08947/02, *S.* Rissen DMST 7097 และ *S.* Typhimurium DMST 0562 ในอาหาร TSB พบว่า *Salmonella* ทั้งสามซีโรไทป์ สามารถอยู่รอดใน TSB ที่พีเอช 5.5 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ 5.0 และ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *Salmonella* ทั้งสามซีโรไทป์ใน TSB ที่พีเอช 5.5 พบว่า *S.* Rissen สามารถอยู่รอดได้ดีที่สุดและ *S.* Typhimurium อยู่รอดได้น้อยที่สุด สำหรับการศึกษาผลของการปรับตัวต่อกรดต่อการอยู่รอดของ *S.* Rissen และ *S.* Typhimurium ระหว่างการหมักใน NMB ในสภาพที่มีแบคทีเรียแลคติก พบว่าการปรับตัวต่อกรดของ *S.* Rissen มีผลช่วยให้เกิดการป้องข้ามต่อสารยับยั้งต่างๆใน NMB ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เนื่องจากเซลล์ที่ปรับตัวต่อกรดของ *S.* Rissen มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่าเซลล์ไม่ปรับตัวต่อกรด ซึ่งต่างกับเชื้อ *S.* Typhimurium ที่การปรับตัวต่อกรดไม่มีผลช่วยส่งเสริมการอยู่รอดใน NMB เนื่องจากเซลล์ที่ปรับตัวต่อกรดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ปรับตัวต่อกรด ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า ซีโรไทป์ของ *Salmonella* มีผลต่อการต้านทานการยับยั้งของส่วนผสม และสารยับยั้งที่เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากปฏิกิริยาการหมัก สำหรับจำนวนของแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อพบว่ามีจำนวนลดลงเล็กน้อยในช่วงแรก และค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังการหมัก 48 ชั่งโมง ซึ่งมีความสัมพันธ์ กับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นและจำนวนเชื้อ *Salmonella* ที่ลดลง

เอกสารอ้างอิง

[1] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

[2] สุรีย์ นานาสมบัติ. การเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar และ MSRV กับ differential medium ชนิดอื่นๆ สำหรับตรวจหา *Salmonella* ในอาหารที่มีค่าวอเตอร์แอ็คติวิตี้สูงและอาหารที่มีค่าวอเตอร์แอ็คติวิตี้ต่ำ. รายงานการวิจัย ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ, 2539.

[3] สุรีย์ นานาสมบัติ วาริพินทุ ประเสริฐศิลป์ Hla Shian กฤษณา ไกรสินธุ์ และ ดุษณี ธนะบริพัฒน์. ประสิทธิภาพของ enzyme-linked immunosorbent assay ชนิดใหม่สำหรับตรวจหา *Salmonella* อย่างรวดเร็วในอาหาร. รายงานการวิจัย องค์การเภสัชกรรม. กรุงเทพฯ, 2545.

[4] อรุณี เทอดเทพพิทักษ์. คู่มือปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี, 2541

[5] Foster, J.W. "Low pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Salmonella* Typhimurium." **Crtical Rev. Microbiol.**, 1995, 21, 215-237.

[6] Foster, J. W., and Hall, H.K. " Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella* typhimurium." **J. Bacteriol.**, 1991, 173, 5129 – 5135.

[7] Johnson, E. A. Microbiological safety of fermented foods, pp. 135-169. In G. Zeikus and E. A. Johnson. Mixed Cultures in Biotechnology. McGraw-Hill, Inc., USA., 1991.

[8] Kröckel, L. "Bacterial fermentation of meats, pp. 69-109" In G. Campbell-Platt, and P. E. Cook. Fermented Meat. Blackie Academic & Professional, London, 1995.

[9] Leyer, G.J., and Johnson, E.A. "Acid Adaptation Promotes Survival of *Salmonella* spp. in cheese." **Appl. Environ. Microbiol.**, 1992, 58(5), 2075-2080.

[10] Leyer, G.J., and Johnson, E.A. "Acid Adaptation Induces Cross-Protection against Environmental Stresses in *Salmonella typhimurium*." **Appl. Environ. Microbiol.**, 1993, 59(6), 1842-1847.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[11] Matsushita, S., Kawamura, M., Takahashi, M., Yokoyama, K., Konishi, N., Yanagama, Y., Kai, A., Yamada, S., Morozumi, S., and Kudoh, Y. "Serovar-Distribution and Drug–Resistance of *Salmonella* Strains Isolated from Domestic and Imported Cases during 1995-1999 in Tokyo." **Kansenshogaku Zasshi.**, 2001, 75(2), 116-123.

[12] Moore, J. E. "Gastrointestinal Outbreaks Associated with Fermented Meats" **Meat Sci.**, 2004, 67, 565-568.

[13] Nanasombat, S., and Lohasupthawee, P. "Antibacterial Activity of Crude Ethanolic Extracts and Essential oils of Thai Spices against Salmonellae and Other Enterobacteria" **Int. J. Food Microbiol.** (In Press), 2005.

[14] Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N., and Fischer, A. "Controlling the Growth of *Salmonella* Anatum in Nham." **Fleischwirtschaft.**, 1999, 9, 124-128.

[15] Tosun, H., and GÖnÜl, S. A. "Acid Adaptation Protects *Salmonella* Typhimurium From Environmental Stresses." **Turk J Biol.**, 2003, 27, 31-36.

[16] Tuitemwong, P., Osiriphun, S., Pongpoolponsak, A., and Tuitemwong, K. "Quantitative Risk Assessment of *Salmonella* spp. In Fermented Pork Sausage (Nham)." plantpro.doae.go.th/world fermentedfood/poster.htm, 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้