ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อเซลล์และสปอร์ของ *Bacillus cereus* ในระหว่างการล้างใบเตยสด

EFFECT OF SODIUM HYPOCHLORITE ON *Bacillus cereus* CELLS AND SPORES DURING WASHING OF PANDAN LEAF

ศรินยา บุญสิทธิ์

SARINYA BOONSIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL-2021-FI-M-054-382

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF SODIUM HYPOCHLORITE ON *Bacillus cereus* CELLS AND SPORES DURING WASHING OF PANDAN LEAF

SARINYA BOONSIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT

SCHOOL OF FOOD INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2021

KMITL-2021-FI-M-054-382

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2021

SCHOOL OF FOOD INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อเซลล์และสปอร์ของ *Bacillus cereus* ในระหว่างการล้างใบเตยสด
นักศึกษา	นางสาวศรินยา บุญสิทธิ์
รหัสประจำตัว	58608023
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* ในใบเตยสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตขนมหวานขนมอบ โดยพบตัวอย่างก่อนการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปามีการปนเปื้อนของเชื้ออยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.41 – 3.86 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.28 – 3.62 log CFU/g และหลังการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปามีการปนเปื้อนของ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.23 – 3.68 log CFU/g โดยส่วนใหญ่พบในรูปของสปอร์ที่ทนความร้อนมีการปนเปื้อนตั้งแต่ช่วง 3.15 – 3.60 log CFU/g และจากการทดลองผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ต่อ *B. cereus* ในหลอด Leetheen broth (LB) ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/ml มีความเข้มข้นของ NaOCl 50 ppm ระยะเวลาสัมผัส 0-30 นาที ปริมาณ *B. cereus* -อยู่ในช่วง 3.42 – 3.68 log CFU/ml สามารถลดลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 1.10 – 5.79 และปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 3.51-3.56 log CFU/ml สามารถลดลงได้เพียงร้อยละ 1.13-1.40 ในขณะที่ LB ที่มีความเข้มข้นของ NaOCl 100 ppm ระยะเวลาสัมผัส 0-30 นาที ปริมาณเซลล์ *B. cereus* -อยู่ในช่วง 2.09 – 2.45 log CFU/ml สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 32.3 – 42.4 และปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 3.47-3.48 log CFU/ml สามารถลดปริมาณสปอร์ได้เพียงร้อยละ 1.40 – 2.80 ส่วน LB ที่มีปริมาณ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml ที่ NaOCl ความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลาสัมผัส 0-30 นาที ปริมาณ *B. cereus* -อยู่ในช่วง 6.29 – 6.31 log CFU/ml สามารถลดจำนวนลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.16 – 0.50 และ NaOCl ที่ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาสัมผัส 0-30 นาที ปริมาณเซลล์ *B. cereus* อยู่ในช่วง 5.26 – 5.30 log CFU/ml สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 16.1-16.8 และไม่สามารถลดปริมาณสปอร์ได้ จากผลค่าความเข้มข้นของ NaOCl ที่เหมาะสมจึงได้นำ NaOCl ความเข้มข้น 100 ppm ผสมกับน้ำ DI ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ในการล้างทำความสะอาดใบเตยสด (ชุดควบคุม)ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ตามธรรมชาติมีเชื้อเริ่มต้นใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปเซลล์ 3 log CFU/g พบว่า ใบเตยสดพบปริมาณเชื้อที่เหลือรอด 1.10±0.06 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 69.4 ขณะที่ใบเตยสดที่มีการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา พบปริมาณเชื้อที่เหลือรอด 2.30±0.06 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 36.0 แต่เมื่อทำการเติมเชื้อในรูปสปอร์ปริมาณ 3 log cfu/ml ลงในใบเตยสด และทำการล้างแช่ใบเตยในน้ำ DI ปลอดเชื้อที่มีการเติม NaOCl 100 ppm 10 นาที เทียบกับการล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที พบว่าหลังจากการล้างใบเตยสดด้วยน้ำ DI ปลอดเชื้อที่มีการเติม NaOCl 100 ppm พบปริมาณที่เหลือรอด 3.40±0.00 log CFU/ml สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 3.0 ขณะที่ใบเตยสดที่มีการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา พบปริมาณเชื้อที่เหลือรอด 3.50±0.06 log CFU/g ไม่สามารถลดปริมาณสปอร์ได้ เมื่อนำใบเตยสดที่มีการสร้างการปนเปื้อนปริมาณ เซลล์ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml (worst case) นำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำDI ปลอดเชื้อที่มี NaOCl 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ใบเตยสดพบปริมาณเชื้อที่เหลือรอด 4.40±0.05 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 37.0 ใบเตยสดที่มีการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา พบปริมาณเชื้อที่เหลือรอด 5.40±0.00 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 19.0- แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น NaOCl ในระดับเดียวกันไปล้างใบเตยที่มีการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในรูปสปอร์ ปริมาณ 6 log CFU/g พบว่า หลังจากการล้างใบเตยสดพบปริมาณที่เหลือรอด 6.30±0.00 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 1.16 ขณะที่ใบเตยสดที่มีการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา พบปริมาณเชื้อที่เหลือรอด 6.40±0.00 log CFU/g ไม่สามารถลดปริมาณสปอร์ได้ โดยพบเชื้อเหลือรอดบางส่วนในน้ำล้างใบเตยสด ซึ่งยืนยันว่า NaOCl มีผลในการฆ่าเชื้อ *B. cereus* ที่อยู่ในรูปเซลล์มากกว่าสปอร์ เมื่อตรวจสอบดูผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อลักษณะของ *B. cereus* ทั้งในรูปเซลล์และสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์ *B. cereus* ผนังเซลล์ฉีกขาดเสียหาย เกิดการบิดงอ ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ แต่ไม่มีผลในการทำลายโครงสร้างของสปอร์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์สามารถใช้ร่วมในการล้างใบเตยสดเพื่อลดการปนเปื้อนของเซลล์ *B. cereus* ได้เบื้องต้นก่อนนำในใบเตยสดไปใช้ในการผลิตอาหารมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้น้ำประปาเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effect of sodium hypochlorite on *Bacillus cereus* cells and spores during washing of pandan leaf
Student	Ms. Sarinya Boonsit
Student ID.	5860823
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

The study was to examine the contamination of *Bacillus cereus* cells and spores on pandan leaves used as raw material for the production of desserts and pastries. The results informed that those of pandan leaves before rinsing with tap water found *B. cereus* contamination at the level of 3.41 – 3.86 log CFU/g. Among this amount of *B. cereus* count, it was informed to be spores of *B. cereus* for 3.28 – 3.62 log CFU/g. From those of pandan leave samples after rinsing with tap water, the results informed *B. cereus* contamination for 3.23 – 3.68 log CFU/g with the spore count of *B. cereus* at level of 3.15 – 3.60 log CFU/g. The efficiency of sodium hypochlorite (NaOCl) on the initial amount of *B. cereus* at 3 log CFU/ ml in Leetheen broth (LB) was then investigated. It was informed that, LB with NaOCl 50 ppm and exposure time 0-30 min could reduced 3.42 – 3.68 log CFU/ ml of *B. cereus* cells with a range of 1.10 – 5.79 % and could reduce the same amount of *B. cereus* spores at level of 3.51-3.56 log CFU/ml with a range of 1.13-1.40 %, while LB with NaOCl 100 ppm and the same amount of *B. cereus* cells exposure time 0-30 min. could reduce *B. cereus* cells 2.09 – 2.45 log CFU/ml with a range of 32.3 – 42.4 % and reduce the same amount of *B. cereus* spores at level of 3.47-3.48 log CFU/ ml with a range of 1.40 – 2.80 %. The concurred results were also informed in LB with an initial amount of 6 log CFU/ml. *B. cereus* cells and NaOCl concentration of 50 ppm under 0-30 min exposured time. The results revealed that the higer amount of *B. cereus* could be reduced at level of 6.29-6.31 log CFU/ ml with a range of 0.16 – 0.50 %. and spores can't be reduced, while this same amount of *B. cereus* in LB with NaOCl concentration of 100 ppm under exposured time 0-30 min could reduce *B. cereus* at level of 5.26-5.30 log CFU/ ml with a range of 16.1-16.8 % and exhibited a little effect on high amount of *B. cereus* spores. When using the optimum results of NaOCl 100 ppm in De-ionizing (DI) water and washing the fresh pandan leaves for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 minutes, it was found that fresh pandan leaves with natural *B. cereus* cells contamination at 3 log CFU/ml. could be reduced and the cells was detected at 1.10±0.06 log CFU/ g (69.4 % of cells reduction), while the natural contamination of fresh pandan leaves could detect 2.30±0.06 log CFU/g (36.0 % of cells reduction) of *B. cereus* after using only tap water for washing. The effect of NaOCl on *B. cereus* spores was investigated by using the spiked samples of 3 log cfu/ml of *B. cereus* spores in fresh pandan leaves, then the samples were washed with DI water plus NaOCl 100 ppm compared to the washing step with tap water for 10 minutes. The results informed that DI water with NaOCl 100 ppm could reduce *B. cereus* spores to 3.40±0.00 log CFU/ ml (3 % reduction), while the samples which washing with tap water could not reduce any spores of *B. cereus* (Spores were detected at 3.50±0.06 log CFU/g.) The same results also revealed with the fresh pandan leaves which spiked with higher loaded of *B. cereus* cells (6 log cfu/g). The results showed that when spiked fresh pandan leaves samples were washed with DI water plus NaOCl 100 ppm for 10 min, *B. cereus* cells was detected at 4.40±0.05 log CFU/ g (37.0 % reduction), while the samples washed with tap water could detect *B. cereus* cells at 5.40±0.00 log CFU/ g (19.0 % reduction). But when using DI water plus NaOCl 100 ppm to wash spiked samples with 6 log cfu/g *B. cereus* spores for 10 min, the results revealed that spores of *B. cereus* could still detect at 6.30±0.00 log CFU/ g (1.16% reduction), while the samples washed with tap water for 10 min still could detect 6.40±0.00 log CFU/ g of *B. cereus* spores which meant NaOCl 100 ppm showed no effect on *B. cereus* spores. With aforementioned results, it was informed that NaOCl exerted more effect on *B. cereus* cells than spores. This exerted effect of NaOCl on *B. cereus* cells and spores was also confirmed by scanning electron microscopy (SEM), it was found that the *B. cereus* cells were torn, distorted, causing the changed of cell's shape while there was no change of *B. cereus* spores under the examination under SEM. According to all results in this study, nevertheless, it is insisted that sodium hypochlorite can be used for cleaning agent with water and shows a higher safety efficacy to reduce the *B. cereus* cells on pandan leaves than using water alone in a cleaning step.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ดร. กิตติชัย บรรจง อาจารย์คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจทานแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสมภพ วัฒนมณี สำนักคุณภาพและความปลอดภัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวินิจฉัยยืนยันเชื้อ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมอาหารทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และให้กำลังใจในการทำวิจัยนี้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ของข้าพเจ้าที่สนับสนุนและช่วยเหลือทางด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจอยู่เสมอ ทำให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จ ประโยชน์อันใดที่ได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ศรินยา บุญสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……III
กิตติกรรมประกาศ…….....V
สารบัญ……..…….…….....VI
สารบัญตาราง…….…….....VIII
สารบัญภาพ...…….…….....…….…….... X
บทที่ 1 บทนำ……1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……...……...……1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……...……2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย……...……3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……...……3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……4
2.1 ใบเตยสด (Pandan leaf……..……4
2.2 คลอรีน……..……..…….8
2.3 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus*……..……..15
2.4 การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Bacillus cereus*……..……...17
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....19
บทที่ 3 เครื่องมือ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย……..……...25
3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ……..……..25
3.2 เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ……...……..25
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี……...25
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์……..……26
3.5 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล……..……27
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์……...……35
4.1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในใบเตยสด……..…..35
4.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการสัมผัสและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์
ต่อการทำลายเซลล์ และสปอร์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง ……..……..40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* จากการล้างใบเตยสด ……..……....49

4.4 ผลการศึกษาลักษณะของใบเตยสด เซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* และการยับยั้งเซลล์และสปอร์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM) ……..……...…….. 53

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ…..……58

บรรณานุกรม……..…..61

ภาคผนวก……..…67

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี……..……68

ภาคผนวก ข การสร้างสภาวะการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* บนใบเตยสดและการล้างทำความสะอาด……..…….……...72

ภาคผนวก ค การตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี spot assay และการเตรียมสารละลายสปอร์ *B. cereus*…….……73

ภาคผนวก ง ศึกษาลักษณะโครงสร้างของใบเตยสดด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM)……74

ประวัติผู้เขียน…….....75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณค่าทางโภชนาการของใบเตยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม……..…..4

2.2 สารประกอบที่วิเคราะห์พบในใบเตยสด (Pandanus amaryllifolius)…… ……....6

2.3 ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ของอาหารดิบอื่นๆ นอกเหนือจากข้อ 1.1 – 1.4 อาหารที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือส่วนผสม และอาหารพร้อมปรุง เช่น เครื่องแกง ไส้กรอกอีสาน และหน่อไม้ เป็นต้น……..…..8

2.4 สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆที่ใช้ในอุตสาหกรรม……..…9

2.5 ระดับความไวของจุลินทรีย์ต่อการทำลายของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน…….10

2.6 ปริมาณคลอรีนที่ควรใช้กับพืชผักผลไม้ชนิดต่างๆ……...10

2.7 ปริมาณสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นสามารถทำลายเชื้อโรค……..….13

2.8 สรุปลักษณะของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *B. cereus* ……..…17

3.1 สัดส่วนของตัวอย่างผสมระหว่างสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปรคลอไรท์, Letheen Broth, น้ำ DI ปลอดเชื้อ และเชื้อ *B. cereus*……..30

4.1 การปนเปื้อนของเชื้อ B. cereus ก่อนและหลังการล้างทำความสะอาดใบเตยสดด้วยน้ำประปา……..36

4.2 ผลการยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus* จากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ……..……39

4.3 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/ml ในหลอดทดลอง……...……43

4.4 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/ml ในหลอดทดลอง……...……..…44

4.5 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/ml ในหลอดทดลอง……...…47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.6 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/ml ในหลอดทดลอง……48

4.7 ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัสนาน 10 นาที ต่อปริมาณการเหลือรอดเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* บนใบเตยสด และการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ในน้ำล้างที่ใช้ในการทำความสะอาดใบเตยสด ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/g.....51

4.8 ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัสนาน 10 นาที ต่อปริมาณการเหลือรอดเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* บนใบเตยสด และการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ในน้ำล้างที่ใช้ในการทำความสะอาดใบเตยสด ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/g.....52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของสารประกอบ 2-Acetyl-Pyrroline……..…….……7

2.2 โครงสร้างของสารประกอบ 3-Methyl-2(5H)-furanone…….…….……7

2.3 แสดงผลของ pH และการเปลี่ยนแปลงชนิดของคลอรีนอิสระคงเหลือ……..12

2.4 รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus* ……...….15

4.1 (ก) ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* เซลล์ และ(ข) ลักษณะสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*……35

4.2 ลักษณะโคโลนีของของเชื้อ *B. cereus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol – egg yolk – polymyxin (MYP) agar (ก) โคโลนีเชื้อจากใบเตยที่นับได้ก่อน Heat shock (ข) โคโลนีเชื้อที่นับได้จากใบเตยหลัง Heat shock (ค) หลังจากนำโคโลนีที่พบใน (ก) และ (ข) ทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะ(Hemolytic activity) ของเชื้อ *B. cereus* บนอาหาร Sheep Blood Agar……..……39

4.3 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ บริเวณด้านหน้าของใบ แสดงเส้นร่างแหและต่อมน้ำมันหอมระเหยของเตยหอมกำลังขยาย 5000 เท่า……54

4.4 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ บริเวณด้านหลังของใบ ของเตยหอมกำลังขยาย 5000 เท่า……..…….…54

4.5 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ ของเตยหอมที่ล้าง ทำความสะอาดด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า…...……...…55

4.6 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ ของเตยหอมที่ล้าง ทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า……...…….…...…55

4.7 (ก) รูปร่างเซลล์ของ *B. cereus* (ข) รูปร่างเซลล์ของ *B. cereus* ที่มี การเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า……..…56

4.8 (ก) รูปร่างสปอร์ของ *B. cereus* (ข) รูปร่างสปอร์ของ *B. cereus* ที่มี การเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า……..…56

4.9 รูปร่างเซลล์และสปอร์ของเชื้อ B. cereus ที่มีการเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์(NaOCl) 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 20000 เท่า……...……57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ข 1 การสร้างสภาวะการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับเชื้อ 6 log CFU/g 72
ข 2 การจำลองการล้างทำความสะอาดใบเตยสด.....72
ข 3 (ก) ผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ (ข) การตรวจยืนยัน
เชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธีการ spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP.....73
ข 4 สารละลายเชื้อ B. cereus (หลอดซ้าย) ที่ชะออกจากผิวหน้าอาหาร
เลี้ยงเชื้อ NA (หลอดขวา).....73
ง 1 ตัวอย่างใบเตยสดเพื่อเตรียมชิ้นส่วนขนาดเล็กขนาด 1 1 เซนติเมตร.....74
ง 2 ลักษณะปากใบพืช ต่อมน้ำมันหอมระเหย และเส้นร่างแหของเตยหอม
กำลังขยาย 500 เท่า.....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

เตยหอม (*Pandanus odorus Ridl.* หรือ *Pandanusam aryllifolius Roxb.*) เป็นพืชที่ใบมีกลิ่นหอมจากน้ำมันหอมระเหย Fragrant Screw Pine และสีเขียวจากใบเป็นสีของคลอโรฟิลล์ ใช้แต่งสีขนมได้ (ภูมิพิชญ์, 2535) ใบเตยจึงเป็นพืชที่คนไทยนิยมนำมาเป็นองค์ประกอบอาหารไทยหลายชนิด เช่น สังขยา ขนมชั้น รวมถึงเครื่องดื่ม เช่น น้ำใบเตย เป็นต้น

กลิ่นหอมของใบเตยเกิดจากสารเคมีที่เรียก 2-acetyl-1-pyrroline (C_6H_9NO) เรียกย่อๆว่า ACPY หรือ 2AP เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมคล้ายกับกลิ่นหอมของข้าวหอมมะลิหรือกลิ่นหอมของข้าวใหม่ และจะให้กลิ่นเมื่อผ่านความร้อน, 3-methyl-2(5H)-furanone เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมขณะที่เป็นใบสด และยังมีสารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมอื่นๆ คือ benzyl acetate, linalyl acetate, geraniol และ linalool (Jiang, 1999) สีเขียวจากใบเตยเป็นสารคลอโรฟิลล์ เมื่อต้มใบเตยกับน้ำ น้ำที่ได้จะมีสีเหลือง เนื่องจากสาร xanthophyll ละลายออกมา (อบเชย, 2543) เนื่องด้วยเตยหอมเป็นไม้ยืนต้นพุ่มเล็ก ขึ้นเป็นกอ ใบเดี่ยว เรียงสลับเวียนเป็นเกลียวขึ้นไปจนถึงยอดใบเป็นทางยาว และลำต้นติดกับใต้ดิน (ภูมิพิชญ์, 2535) เมื่อนำใบจากต้นซึ่งมีกลิ่นและสีที่ผู้บริโภคต้องการจากใบเตยมาใช้เป็นส่วนประกอบอาหาร อาจมีผลทำให้สิ่งปนเปื้อนที่มักพบจากดินปนเปื้อนมากับใบ มาสู่อาหารที่ผลิตได้ ถ้าผู้ผลิตไม่มีขั้นตอนการล้างทำความสะอาดใบเตยที่จะนำมาใช้ประกอบอาหารอย่างเหมาะสม โดยสิ่งปนเปื้อนที่มักพบจากโคนต้นของใบเตย มักได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ก่อโรคและสร้างสปอร์ เช่น เชื้อก่อโรค *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีโอกาสเหลือรอดจากกระบวนการผลิตอาหารที่มีการประกอบตั้งทิ้งเอาไว้ รวมทั้งการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม สุขลักษณะของผู้ขายที่ไม่ดีพอ วัตถุดิบหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม รวมทั้งกระบวนประกอบอาหารที่มีการใช้ความร้อนไม่สูงมากนัก สามารถทำให้เชื้อที่เหลือรอดเพิ่มจำนวนจนทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่ปลอดภัยได้

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) (New Zealand Government, 2016) สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน ความแห้งแล้งและสามารถมีชีวิตรอดจากการปรุงอาหาร(cooking) โดยสภาวะที่อยู่ในรูปสปอร์เมื่อมีการจัดเก็บในช่วงอุณหภูมิที่อันตราย (Temperature danger zone) สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน สร้างสารพิษและเป็นสาเหตุในการเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (ICMSF, 1996 and NZFSA, 2010) สามารถพบได้ตามธรรมชาติในอาหารหลายชนิด เช่น น้ำ ผัก ผลไม้ ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มธัญพืช เช่น ข้าว เป็นต้น (New Zealand Government, 2016) โดยสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ 2 แบบ คือทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช้า โดยทำให้เกิดอาการท้องเสีย (Diarrheal syndrome) ซึ่งมีระยะฟักตัวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคประมาณ 8 – 16 ชั่วโมง ระยะเวลาการแสดงอาการ (Incubation period) ของการเกิดโรคคือ 12 – 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค คือ 5-7 log CFU/g โดยทำให้เกิดการปวดเกร็งช่องท้องและถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ และทำให้เกิดอาการเร็ว และทำให้อาเจียน (Emetic syndrome) ซึ่งมีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 0.5 – 6 ชั่วโมง ระยะเวลาการแสดงอาการ (Incubation period) ของการเกิดโรคคือ 6 – 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค คือ 10^5 – 10^8 CFU/g โดยทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ วิงเวียน ครั่นเนื้อครั่นตัว (ศุภชัย, 2552)

เนื่องจากโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร มีผลิตภัณฑ์หลักซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขนมปังไส้สังขยาใบเตย วัตถุดิบที่ต้องนำมาใช้ผลิตของโรงงานจะมีองค์ประกอบของใบเตยเป็นส่วนสำคัญ โดยทางบริษัทดังกล่าวจะมีการสั่งซื้อใบเตยสดจากเกษตรกรโดยตรง ซึ่งจะเป็นลักษณะมาทั้งต้น และมีดินปนเปื้อนอยู่มาก ซึ่งอาจเป็นปัญหาเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์สังขยาที่ผลิต ดังรายงานการตรวจพบเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์สังขยาใบเตยที่ของสายรุ้ง (2558) ที่ตรวจพบวัตถุดิบใบเตยสดซึ่งเป็นวัตถุดิบกลุ่มเสี่ยงสูงที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* จำนวน 19 ตัวอย่าง จากการสุ่มเก็บ 20 ตัวอย่าง โดยพบอยู่ในช่วง 3.40±0.45 log CFU/g ดังนั้น การจัดเตรียมวัตถุดิบพวกใบเตยสดของโรงงานดังกล่าว จะต้องมีการเพิ่มขั้นตอนการทำความสะอาดใบเตยสดที่ได้จากการสั่งซื้อเป็นอย่างดี ทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ผิวนอกของใบเตย ซึ่งการล้างเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน มักทำโดยวิธีการล้างผัก และ ผลไม้โดยทั่วไป โดยนิยมใช้สารฆ่าเชื้อ คือสารละลายคลอรีน ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลินทรีย์ที่ผิวสัมผัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอุตสาหกรรมนิยมใช้สารละลายคลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้นช่วง 50 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะใช้ในรูปแบบคลอรีนเหลวหรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (สุมณฑา, 2547)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินหาเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในใบเตยสดที่สั่งซื้อเข้ามาเพื่อผลิตสังขยาในอุตสาหกรรมโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร รวมถึงทำการศึกษาประสิทธิภาพขั้นตอนการล้างใบเตยสดด้วยน้ำประปาและการใช้สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการล้างทำความสะอาดใบเตยสดเพื่อลดการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ก่อนนำใบเตยสดไปใช้ในการผลิตขนมหวานขนมอบของทางโรงงาน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในใบเตยสด จากโรงงานอุตสาหกรรม

1.2.2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาสัมผัสที่เหมาะสมในการลดปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อปริมาณและโครงสร้างเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างกระบวนการล้างใบเตยสด

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในใบเตยสด ยืนยันเชื้อเบื้องต้น โดยดูการสร้าง hemolysis ของเชื้อ *B.cereus* บน 5% sheep blood agar และส่งยืนยันผลที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1.3.2 นำเชื้อ *B.cereus* ที่แยกได้จากใบเตยสดที่ได้รับการยืนยันจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาทดสอบผลของการลดการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่ 3 ระดับ กับระยะเวลาในการสัมผัสที่ 6 ระดับ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ 2 ระดับ คือ 3 log CFU/ml และ 6 log CFU/ml ในหลอดทดลอง

1.3.3 ทำการตรวจสอบกระบวนการล้างทำความสะอาดใบเตยสดที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้น้ำประปาและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.3.2 ล้างทำความสะอาดใบเตยสดที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ ที่ระดับปริมาณเชื้อ 3 log CFU/g และใบเตยสดที่สร้างการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับปริมาณเชื้อ 6 log CFU/g รวมทั้งทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในน้ำประปาและน้ำที่มีสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการล้างทำความสะอาดใบเตยสด

1.3.4 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของใบเตยสด ใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* และผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ต่อเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงปริมาณการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในใบเตยสด

1.4.2 ทราบความเข้มข้นและระยะเวลาในการสัมผัสที่เหมาะสมของโซเดียมโปคลอไรท์ต่อการลดและยับยั้งเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

1.4.3 ทราบผลของความเข้มข้นและเวลาในการสัมผัสที่เหมาะสมของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการลดเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในระหว่างกระบวนการล้างใบเตยสด

1.4.4 ทราบกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ภายหลังการสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ใบเตยสด (Pandan leaf)

2.1.1 ข้อมูลทางพฤษศาสตร์

เตยหอม ชื่อวิทยาศาสตร์ (*Pandanus odorus* Ridl. และมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Pandanusam aryllifolius* Roxb.) เป็นไม้ยืนต้นพุ่มเล็ก ขึ้นเป็นกอในพื้นที่ชื้นแฉะ และริมน้ำ ลำต้นอยู่ใต้ดิน ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับเวียนเป็นเกลียวขึ้นไปจนถึงยอดใบเป็นทางยาว สีของใบเข้ม ค่อนข้างแข็งเป็นมัน ขอบใบเรียบ ใบมีกลิ่นหอมจากน้ำมันหอมระเหย Fragrant screw pine สีเขียวจากใบเป็นสีของคลอโรฟิลล์ ใช้แต่งสีขนมได้ (ภูมิพัฒน์, 2535) นอกจากนี้ยังมีกลิ่นหอมของใบเตยที่เกิดจากสารเคมีที่เรียก 2-acetyl-1-pyrroline (C_6H_9NO) เรียกย่อๆว่า ACPY หรือ 2AP , 3-methyl-2(5H)-furanone และยังมีสารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมอื่นๆ คือ benzyl acetate, linalyl acetate, geraniol และ linalool (Jiang, 1999)

นอกจากนี้ต้นเตยหอมยังมีสรรพคุณทางยา โดยพบว่าต้นและรากของเตยหอมสามารถเป็นยาขับปัสสาวะ และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ส่วนใบเตยมีสรรพคุณช่วยในการบำรุงหัวใจ ช่วยแก้หวัด แก้ไอ ดับพิษ แพทย์ไทยในสมัยโบราณนิยมนำใบเตยมาทำเครื่องดื่มสมุนไพร เพราะให้ความรู้สึกสดชื่นขณะดื่มมีคุณค่าทางอาหารและปลอดภัยต่อการบริโภค (วรางคณา, 2542) คุณค่าทางโภชนาการของใบเตยที่บริโภคได้ 100 กรัม (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของใบเตยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม

คุณค่าทางโภชนาการของใบเตยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม		
องค์ประกอบ	พลังงาน (กิโลแคลอรี่)	35.0
	ความชื้น (กรัม)	85.3
	โปรตีน (กรัม)	1.9
	ไขมัน (กรัม)	0.8
	คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	4.9
	เส้นใยอาหาร (กรัม)	5.2
เกลือแร่	แคลเซียม (มิลลิกรัม)	124.0
	ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	27.0
	เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.1

ที่มา : กรมอนามัย (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของใบเตยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม (ต่อ)

คุณค่าทางโภชนาการของใบเตยส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม		
วิตามิน	เบต้าเคโรทีน (มิลลิกรัม)	2.99
	วิตามินเอ (มิลลิกรัม)	0.5
	วิตามินบี 1	Trace
	วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.2
	วิตามินบี 3 (มิลลิกรัม)	1.20
	วิตามินซี (มิลลิกรัม)	8.00

ที่มา : กรมอนามัย (2535)

2.1.2 กลิ่นของใบเตย

ใบเตยมีสารหอมระเหยหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ทำให้ใบเตยมีกลิ่นหอมที่เฉพาะตัว โดยพบว่า องค์ประกอบหลักที่ทำให้ใบเตยมีกลิ่นหอมเกิดจากสารเคมีที่เรียกว่า 2-acetyl-1-pyrroline (C_6H_9NO) เรียกย่อๆว่า ACPY หรือ 2AP เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมเฉพาะตัว มีลักษณะกลิ่นคล้ายข้าวโพดคั่ว ซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และยังมีกลิ่นคล้ายกับกลิ่นหอมของข้าวหอมมะลิหรือกลิ่นหอมของข้าวใหม่ ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันที่พบในข้าวหอมมะลิ และจะให้กลิ่นเมื่อผ่านความร้อน ส่วนใบเตยสดประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด (ตารางที่ 2.2) แต่สารหลักที่พบในใบเตยสด คือ 3-methyl-2(5H)-furanone เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมขณะที่เป็นใบสด นอกจากนี้ยังมีสารหอมระเหยอื่นๆที่ให้กลิ่น คือ เบนซิลอะซีเตท (Benzyl acetate), ไลนาลิลอะซีเตท (Linalyl acetate), เจอร์รานิออล (Geraniol), ไลนาโลออล (linalool), แพนดานาไมน์ (Pandanamine) และยังประกอบไปด้วยสารที่ให้กลิ่นหอม คือ คูมาริน (Coumarin) และ เอทิลวานิลลิน (Ethyl vanillin) (Jiang, 1999) และสีเขียวที่เกิดจากใบเตยเป็นสารคลอโรฟิลล์ เมื่อนำใบเตยสดต้มกับน้ำ จะทำให้น้ำที่ได้จะมีสีเหลือง เนื่องจากสาร xanthophyll ละลายออกมา (อบเชย, 2543) และยังประกอบไปด้วยสารให้สีแอนโทไซยานิน นอกจากนี้เตยหอมยังประกอบด้วยสารแอนตี้ออกซิแดนซ์ คือ เบต้าแคโรทีน ที่มีความสามารถในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ โดยใช้กลไกทางฟิสิกส์ คืออนุมูลอิสระที่มีพลังงานสูงจะถ่ายเทพลังงานให้กับเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนในโครงสร้างสูง และดูดกลืนพลังงานได้ดี ได้ผลิตภัณฑ์ของออกซิเจนที่มีพลังงานต่ำลงและเบต้าแคโรทีนพลังงานสูง จากนั้นจะคายพลังงานออกมาในรูปของความร้อน ซึ่งสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ก็มีกลไกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน (ดวงจันทร์, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สารประกอบที่วิเคราะห์พบในใบเตยสด (*Pandanus amaryllifolius*)

สารประกอบ	ปริมาตร (ร้อยละ)
2-methyl-3-buten-2-one	0.44
toluene	0.16
3-hexanone	2.97
2-hexanone	2.65
3-methyl-3-pentanol	0.41
ethylbenzene	0.11
1,2 - dimethylbenzene	0.13
3-penten-2-ol	0.94
4-methyl-2-pentanol	6.13
1-methylcyclopentanol	1.00
3-methyl-2-pentanol	0.15
(E)-2-penten-1-ol	0.21
Hexyl formate	0.21
(Z)-4-hexen-1-ol	0.13
Acetic acid	0.44
2,5-hexanedione	0.14
3-methyl-2(5H)-furanone	73.07
Methyl-2-hydroxylbenzoate	0.18
Hexanoic acid	0.75
(E) – 3- hexanoic acid	0.85
3-hexenoic acid	0.19

ที่มา : ดัดแปลงจาก Jiang (1999)

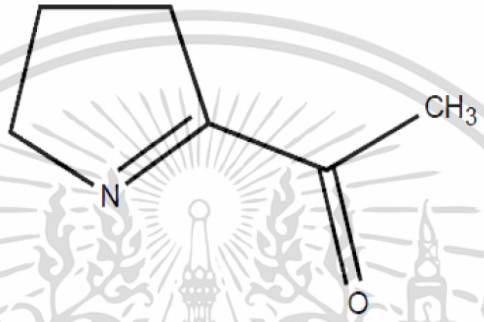
2.1.2.1 สารให้กลิ่นที่สำคัญในใบเตย

แม้ว่ากลิ่นของอาหารจะเกิดจากสารหอมระเหยหลายชนิด แต่จะมีสารหอมระเหยเพียงบางชนิดที่เป็นสารหอมระเหยที่สำคัญต่อกลิ่นอาหารชนิดนั้นๆ ซึ่งจะเรียกสารหอมระเหยนั้นว่าเป็น Key odor compounds สำหรับในเตยหอม สารหอมระเหยที่เป็นสารให้กลิ่นสำคัญ Takayama และคณะ (2001) ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สารหอมระเหย 2 – Acetyl – 1 – Pyrroline (2AP)

สารหอมระเหย 2 – Acetyl – 1 – Pyrroline (2AP) เป็นสารที่พบว่าเป็นองค์ประกอบหลักของกลิ่นใบเตย และข้าวหอมมะลิ 2AP จัดเป็นสารประกอบไนโตรเจนในกลุ่ม heterocyclic compounds มีสูตรโครงสร้าง C_6H_9NO มวลโมเลกุลเท่ากับ 111.143 มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน 5 เหลี่ยมที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอยู่ในวงแหวน มีหมู่ acetyl เกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 2.1 จากการที่สาร 2AP มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุลจึงแสดงสมบัติเป็นสภาพที่มีขั้ว (Polarity)

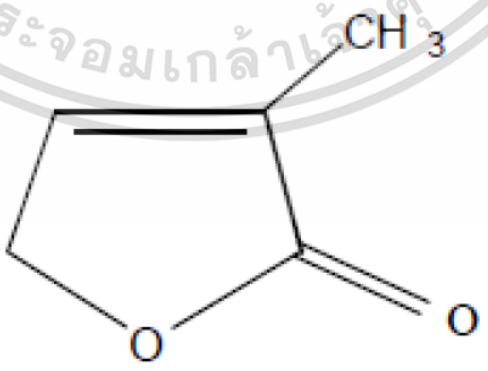


ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสารประกอบ 2 – Acetyl – 1 – Pyrroline

ที่มา : Buttery et al. (1982)

2. สารหอมระเหย 3 – methyl – 2(5H) – furanone

สารหอมระเหย 3 – methyl – 2(5H) – furanone มีโครงสร้างดังภาพที่ 2.2 สารนี้เกิดในอาหารที่ผ่านการแปรรูป เช่น ชีส, birch syrup และ fermented soy hydrolysate เป็นต้น กลิ่นของ 3 – methyl – 2(5H) – furanone มีลักษณะคล้ายกลิ่นคาราเมล กลิ่นหวาน กลิ่นคล้ายยา และกลิ่นน้ำผึ้ง แต่สำหรับในใบเตยมีรายงานว่าจะพบสารหอมระเหยชนิดนี้ในใบเตยสด



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของ 3 – methyl – 2(5H) – furanone

ที่มา : Bradbury et al. (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ใบเตยสดอ้างอิงเกณฑ์จากประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 อยู่ในกลุ่มของอาหารดิบ หมายถึง อาหารที่ยังบริโภคไม่ได้ ต้องผ่านการปรุงสุก หรือการเตรียมด้วยกรรมวิธีใดๆก่อนบริโภค แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ของอาหารดิบอื่นๆ นอกเหนือจากข้อ 1.1-1.4 อาหารที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือส่วนผสม และอาหารพร้อมปรุง เช่น เครื่องแกง ไส้กรอกอีสาน และหน่อไม้ เป็นต้น

จุลินทรีย์	ค่ามาตรฐาน
จำนวนจุลินทรีย์ CFU/กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
Escherichia coli MPN/กรัม	น้อยกว่า 100
Staphylococcus aureus CFU/กรัม	น้อยกว่า 100
Clostridium perfringens CFU/กรัม	น้อยกว่า 1,000
Bacillus cereus CFU/กรัม	น้อยกว่า 1,000
Salmonella spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
Vibrio cholerae / 25 กรัม	ไม่พบ

ที่มา : ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560)

2.2 คลอรีน

2.2.1 ประเภทของคลอรีน

คลอรีน คือ สารฆ่าเชื้อประเภท Germicide ชนิด Bacteriocide โดยไปมีผลในการทำลายเซลล์ปกติของเชื้อจุลินทรีย์ โดยไปมีผลในการลดจำนวนของจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัย คลอรีนเป็นธาตุตัวหนึ่งในกลุ่มฮาโลเจน (Halogen) โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆได้แก่ กลุ่มของก๊าซคลอรีน (Cl_2) สารประกอบไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) สารอนินทรีย์คลอรามีน (Inorganic chloramines) สารอินทรีย์คลอรามีน (Organic chloramines) และคลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide) ซึ่งมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน สารประกอบไฮโปคลอไรท์เกิดจากเกลือของคลอรีน ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) มีลักษณะเป็นของเหลวและแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) จะเป็นของแข็งสีขาวเรียกว่า Bleaching powder หรือ Chlorinate lime การนำสารประกอบคลอรีนมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีจุดประสงค์ที่แตกต่างกันเช่นใช้เป็นสารทำความสะอาดหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยมักเติมสารละลายคลอรีนในน้ำที่ใช้ในกระบวนการต่างๆ (มยุรฉัตรและคณะ, 2553)

การใช้สารประกอบคลอรีนเป็นสารสำหรับฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารได้ เนื่องจากเป็นสารเคมีประเภทที่เรียกว่า Generally Recognized As Safe (GRAS) และเป็นสารฆ่าเชื้อชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในรายชื่อของ The United Code of Federal Regulations for Use on Food Processing Equipment, Utensil, and Certain Other โดยระบุความเข้มข้นสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้คือ 2,000 ppm ซึ่งการนำคลอรีนมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งในส่วนที่เป็นอาหารและส่วนที่ไม่ใช่อาหาร แต่ยังมีความเกี่ยวเนื่องต่อไปยังความสะอาดของอาหาร เนื่องจากคลอรีนสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย โดยคลอรีนสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด แต่จะขึ้นอยู่กับปริมาณที่เหมาะสมที่ใช้นั้น โดยคลอรีนจะต้องนำมาละลายน้ำเพื่อใช้ในรูปสารละลายซึ่งเมื่อละลายน้ำแล้วสารคลอรีนจะแตกตัวให้ได้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-) อย่างไรก็ตามคลอรีนที่หลงเหลือจากการรวมตัวกับสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์แล้วเรียกว่าคลอรีนหลงเหลืออิสระ (Free residual chlorine หรือกรดไฮโปคลอรัส) ดังนั้นการเติมคลอรีนในน้ำใช้จึงเติมในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะทำให้เกิด Free residual chlorine ที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่าเชื้อ (สุมณฑา, 2547)

ตารางที่ 2.4 สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆที่ใช้ในอุตสาหกรรม

ชนิดของสาร	สูตรทางเคมี	สมบัติการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 21 ^oC
Gaseous chlorine	Cl_2	ร้อยละ 0.7
Hypochlorous acid	HOCl	ละลายน้ำได้ดีมาก
Sodium hypochlorite	NaOCl	ละลายน้ำได้ดีมาก
Calcium hypochlorite	$Ca(OCl)_2$	ละลายน้ำได้ปานกลาง
Chloramine-T	$H_3C\text{-}C_6H_4SO_2\text{-}N\text{-}NaCl$	ร้อยละ 15
Dichlorodiethyl-hydantion	$C_3H_6Cl_2N_2O_2$	ร้อยละ 1.2
Trichlorocyanuric acid	$Cl_3(NCO)_3$	ร้อยละ 1.2
Dichlorocyanuric acid	$Cl_2H(NCO)_3$	ร้อยละ 2.6
Chlorine dioxide	ClO_2	200 cm^3 per 100 ml

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cords and Dychdala (1993) cited by Davidson and Branen (1997)

สารประกอบคลอรีนอยู่ได้ทั้งในรูปก๊าซ ของเหลวและของแข็ง โดยในอุตสาหกรรมนิยมใช้คลอรีนในรูปของสารประกอบไฮโปคลอไรท์ ซึ่งเป็นเกลือของกรดไฮโปคลอรัส เนื่องจากเป็นสารฆ่าเชื้อที่ออกฤทธิ์ได้ดี ช่วยกำจัดกลิ่น และเสียค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก ซึ่งสารประกอบไฮโปคลอไรท์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิยมใช้ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อยู่ในรูปแบบสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 9.5 - 15 (Davidson, 1997)

2.2.2 สมบัติของคลอรีน

คลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน เป็นสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ฆ่าเชื้อหลังการล้างทำความสะอาด โดยได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคลอรีนมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ดังนี้

ตารางที่ 2.5 ระดับความไวของจุลินทรีย์ต่อการทำลายของคลอรีน และสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน

ชนิดจุลินทรีย์	ความไวต่อสารคลอรีน
แบคทีเรียแกรมบวก	มาก
แบคทีเรียแกรมลบ	มาก
แอซิด-ฟาสต์แบคทีเรีย	ปานกลาง
สปอร์แบคทีเรีย	พอใช้
ไวรัส	พอใช้ (ที่ความเข้มข้นสูง)
อะมีบา	พอใช้
เชื้อรา	ปานกลาง

ที่มา : ดัดแปลง Gardner and Peel (1991)

ตารางที่ 2.6 ปริมาณคลอรีนที่ควรใช้กับพืชผักผลไม้ชนิดต่างๆ

ผลผลิตทางการเกษตร	รูปแบบการใช้งาน	คลอรีนอิสระในน้ำ (ppm)
Broccoli, Cabbage, Cucumber	Sprayer over continuous belt	100-150
Carrots	Sprayer over continuous belt	100-150
	Flume	150-200
Corn	Sprayer over continuous belt	75-150
Celery	Sprayer over continuous belt	100-150
	Hydrocooler	100
Green chopped leafy	Sprayer over continuous belt	100-150
Lettuce romaine, Mushroom, Onion green	Sprayer over continuous belt	100-150

ที่มา : ดัดแปลงจาก Trevor (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ปริมาณคลอรีนที่ควรใช้กับพืชผักผลไม้ชนิดต่างๆ(ต่อ)

ผลผลิตทางการเกษตร	รูปแบบการใช้งาน	คลอรีนอิสระในน้ำ (ppm)
Pepper Chili	Sprayer over continuous belt	200-300
	Dump tank (prewashed)	300-400
Garlic, Spinach	Sprayer over continuous belt	75-150
Tomatoes	Flume	200-300
	Dump tank	100-200
Pumpkins	Sprayer over continuous belt	100-200

ที่มา : ดัดแปลงจาก Trevor (1997)

2.2.3 กลไกการสลายตัวของสารประกอบคลอรีน

ความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ของสารประกอบคลอรีนเกิดขึ้น เมื่อสารประกอบคลอรีนละลายในน้ำ โดยปฏิกิริยาดังสมการต่อไปนี้

ก๊าซคลอรีน

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HCl + HOCl$$

แคลเซียมไฮโปคลอไรท์

$$Ca(OCl)_2 + H_2O \longrightarrow HOCl + Ca(OH)_2$$

โซเดียมไฮโปคลอไรท์

$$NaOCl + H_2O \longrightarrow HOCl + NaOCl$$

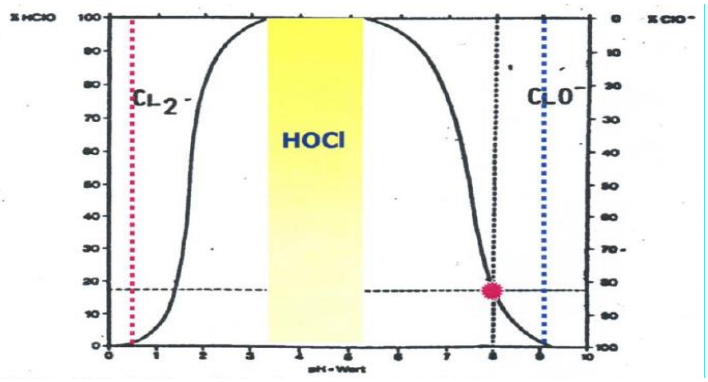
การแตกตัวของของสารประกอบคลอรีน จนได้กรดไฮโปคลอรัสนั้น ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีการจัดเตรียมและสมดุลระหว่างกรดไฮโปคลอรัสและไฮโปคลอไรท์อิออน โดยทั่วไปเมื่อมีการพูดถึงคลอรีนอิสระ (Free available chlorine) หมายถึงคลอรีนที่อยู่ในรูปก๊าซคลอรีน (Cl_2) กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-) ซึ่งปริมาณคลอรีนอิสระคงเหลือชนิดใดจะมากกว่า หรือน้อยกว่าจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (สุมณฑา, 2547) ดังนี้

1.ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีค่า pH น้อยกว่า 4 คลอรีนอิสระคงเหลือ จะอยู่ในรูปก๊าซคลอรีน (Cl_2)

2. ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีค่า pH อยู่ในช่วงระหว่าง 4-5 คลอรีนอิสระคงเหลือจะอยู่ในรูปกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ซึ่งเป็นช่วงที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

3. ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีค่า pH มากกว่า 5 คลอรีนอิสระคงเหลือ จะอยู่ในรูปไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 แสดงผลของ pH และการเปลี่ยนแปลงชนิดของคลอรีนอิสระคงเหลือ

ที่มา : การประปานครหลวง (มปป.)

คลอรีนอิสระในรูปกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคมากกว่าคลอรีนในรูปไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-) ถึง 100 เท่า ดังนั้นเพื่อให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคสูง ควรจะมีคลอรีนในรูปของ HOCl เหลืออยู่ในน้ำ ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกสำหรับการฆ่าเชื้อโรคในน้ำทั้งแบคทีเรียและไวรัส โดยทั่วไปปริมาณคลอรีนอิสระที่เหลืออยู่ในน้ำเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ต้องไม่ต่ำกว่า 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยที่ pH ของน้ำต้องไม่สูงกว่า 8 และความขุ่นต้องไม่เกิน 1 NTU (การประปานครหลวง, มปป.)

2.2.4 กลไกในการฆ่าเชื้อของสารประกอบคลอรีน

2.2.4.1 คลอรีนทำปฏิกิริยาที่บริเวณที่ห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ เช่นผนังเซลล์ (Cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เยื่อหุ้มสปอร์ (Spore coat) โดยคลอรีนจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลทำให้เกิดการสร้าง N-Chloro compounds ซึ่งจะไปมีผลรบกวนเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Metabolism) และไปทำลายทำให้การผ่านเข้าออกของสารภายนอกเซลล์และภายในเซลล์เสียสมดุล (Permeability) ทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงักและเซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Davidson et.al, 1997)

2.2.4.2 คลอรีนจะไปทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ หรือโปรโตพลาสซึม (Protoplasm) และส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์จุลินทรีย์ พบว่าจะไปทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Oxidation) กับส่วนโปรโตพลาสซึม (Protoplasm) ไปทำให้เกิดการตกตะกอนส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ และไปทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฟดริล (Sulfhydryl radical) ของโปรตีน เกิดผลิตภัณฑ์แบบที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (Irreversible product) ทำให้ส่งผลรบกวนการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.3 คลอรีนทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงทำให้ไปรบกวนส่วนที่เป็นเอนไซม์และระบบการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ปกติและยังสามารถทำลายตัวเอนไซม์ได้อีกด้วย (สุมณฑา, 2547)

2.2.5 กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารฆ่าเชื้อของสารประกอบคลอรีน

ตามกฎหมาย US.FDA ให้ใช้คลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อโดยตรงกับอาหารได้ไม่เกิน 200 ppm โดยไม่ต้องล้างด้วยน้ำที่มีคุณภาพตามมาตรฐานน้ำดื่ม ก่อนนำผลิตภัณฑ์มาบริโภค ซึ่งการใช้สารละลายคลอรีนจะมีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสารแขวนลอยและสิ่งสกปรกในน้ำ เนื่องจากคลอรีนจะไปจับกับสารแขวนลอยและสิ่งสกปรกก่อนที่จะไปจับกับจุลินทรีย์ดังนั้นถ้าน้ำมีสารแขวนลอยมากโอกาสที่คลอรีนจะไปจับกับสารแขวนลอยก็มีมากทาให้ไปจับกับจุลินทรีย์ได้น้อยลงทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลงนอกจากนี้บางครั้งพบว่าสารแขวนลอยไปห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ไว้ไม่ให้ถูกทำลายโดยคลอรีน อย่างไรก็ตามกรดไฮโปคลอรัสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ต่างๆจะก่อให้เกิดสารประกอบพวกฮาโลเจน (Halogenated compound) ได้แก่ ฟีนอลและคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง แต่พบว่าต้องใช้เวลาสะสมนานจึงจะทำให้หนูเป็นมะเร็ง (สุมณฑา, 2547)

สำหรับกฎหมายไทยอนุญาตให้มีการใช้โซเดียมไฮโปรคลอไรท์เป็นสารฆ่าเชื้อโดยปริมาณสูงสุดที่อนุญาตเมื่อเตรียมในสภาพพร้อมใช้งานได้สูงสุดที่ 100 ppm (มิลลิกรัมต่อลิตร คำนวณเป็นคลอรีนอิสระ) และปริมาณการตกค้างในอาหารคือ 1 ppm (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คำนวณเป็นคลอรีนอิสระ) (กระทรวงสาธารณสุข, 2562)

2.2.6 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของคลอรีนในน้ำ

ปัจจัยสำคัญที่ไปมีผลกระทบต่อกระบวนการฆ่าเชื้อในน้ำด้วยคลอรีน คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) รูปแบบและความเข้มข้นของสาร ชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการทำลาย สารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ อุณหภูมิของน้ำและระยะเวลาในการสัมผัสระหว่างคลอรีนกับเชื้อจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2. 7) (มยุรฉัตรและคณะ, 2553) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 2.7 ปริมาณสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นสามารถทำลายเชื้อโรค

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของสารละลายคลอรีน (ppm)	เวลาในการสัมผัส (นาที)
แบคทีเรีย	100	10
เชื้อวัณโรค	125	3-10

ที่มา : มยุรฉัตรและคณะ (2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ปริมาณสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นสามารถทำลายเชื้อโรค (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของสารละลายคลอรีน (ppm)	เวลาในการสัมผัส (นาที)
แบคทีเรีย	100	10
เชื้อวัณโรค	125	3-10
เชื้อรา	100	60
เชื้อไวรัสตับอักเสบบี	500	10
เชื้อไวรัส HIV	50	10
สปอร์ของแบคทีเรีย	ทำลายไม่ได้	

ที่มา : มยุรฉัตรและคณะ (2553)

2.2.6.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลาย

อัตราในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยคลอรีนจะขึ้นอยู่กับปริมาณกรดไอโปคลอรัสที่ไม่แตกตัว (HOCl) ที่อยู่ในน้ำและปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวจะเพิ่มขึ้นตามความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น (พีเอชของสารละลายลดลง) ซึ่งถ้า pH สูง คลอรีนอิสระจะอยู่ในรูปของ OCl^- ในเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างสูง ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคต่ำลงมาก

2.2.6.2 อุณหภูมิ (Temperature)

จะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของคลอรีนในน้ำด้วยเหตุผลหลัก 2 ประการ ได้แก่ ปริมาณชนิดของคลอรีนอิสระคงเหลือ กรณีที่อุณหภูมิของน้ำต่ำ คลอรีนอิสระคงเหลือจะอยู่ในรูปของ HOCl มาก ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง ในทางกลับกัน ถ้าอุณหภูมิของน้ำสูง คลอรีนอิสระคงเหลือจะอยู่ในรูปของ HOCl น้อย และอุณหภูมิสูงจะทำให้คลอรีนสลายตัวได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ เป็นอีกสาเหตุให้ประสิทธิภาพของคลอรีนต่ำลงไปด้วย หากสารละลายมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นทุกๆ 10 องศาเซลเซียส จะทำให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลงร้อยละ 50

2.2.6.3 ระยะเวลาในการสัมผัส (Contact Time)

ถ้าเวลาที่สัมผัสน้ำ (Contact time) นานขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคของคลอรีนสูงขึ้น ในทางกลับกัน ถ้าเวลาที่สัมผัสน้ำน้อยลงประสิทธิภาพจะต่ำลง

2.2.6.4 ความเข้มข้นของสารละลาย (Concentrate)

ถ้ายิ่งสารละลายคลอรีนมีความเข้มข้นของคลอรีนสูง ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคจะสูงขึ้น แต่จะมีปัจจัยของอื่นๆมาเกี่ยวข้อง เช่น ระยะเวลาสัมผัส อุณหภูมิ เป็นต้น

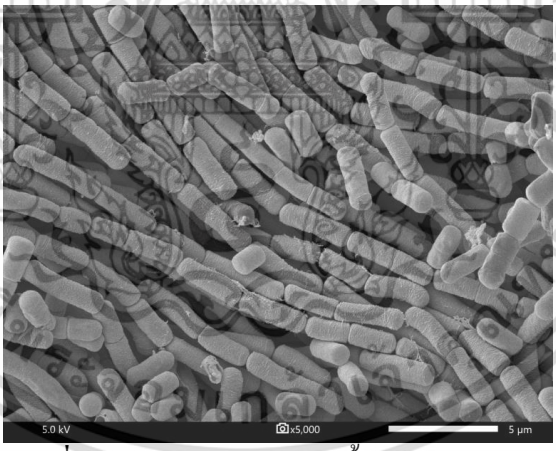
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.5 สารประกอบอินทรีย์ (Organic Compound)

ในกรณีที่น้ำมีสารอินทรีย์สูงจะทำให้คลอรีนมีประสิทธิภาพด้อยลง เนื่องจากคลอรีนที่เติมลงไปจะไปทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ก่อนทำให้เหลือคลอรีนที่จะไปฆ่าเชื้อน้อย นอกจากนี้ปฏิกิริยา ระหว่างคลอรีนกับสารอินทรีย์ในน้ำยังทำให้เกิดสารจำพวก THMs (Trihalomethane) ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแบคที่เรียที่สร้างสปอร์ (Spore-former bacteria) (ภาพที่ 2. 4) และก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) สามารถทนความร้อน ความแห้งแล้งและสามารถสร้างสารพิษได้ สามารถเจริญเติบโตและดำรงชีพในดิน (Soil saprophyte) มักเกี่ยวข้องกับอาหารประเภทธัญพืชและผัก (ศุภชัย, 2552) เมื่ออาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จัดเก็บในช่วงอุณหภูมิอันตราย (Temperature danger zone) สามารถงอกและเพิ่มจำนวน สร้างสารพิษและเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้บริโภคป่วยอาหารเป็นพิษได้ (NZFSA, 2010) โรคอาหารเป็นพิษมีลักษณะอาการ 2 ชนิด คือ กลุ่มอาการท้องเสีย ถ่ายเหลว เป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการช้า (Diarrheal syndrome) และกลุ่มอาการอาเจียน เป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการเร็ว (Emetic syndrome) (ศุภชัย, 2552)



ภาพที่ 2.4 รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus*

ที่มา : ภาพถ่ายเชื้อที่แยกจากเตยหอมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

2.3.1 ลักษณะและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus*

B. cereus มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ขนาดประมาณ 0.9 ไมครอน (ศุภชัย, 2552) มักจะอยู่เรียงกันเป็นสายสร้างสปอร์แบบ Ellipsoidal โดยตำแหน่งของสปอร์จะอยู่ตรงกลางหรือค่อนไปตรงปลายเซลล์สปอร์ไม่ใหญ่กว่าตัวเซลล์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella ชนิดรอบเซลล์ (peritrichous) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(facultative anaerobe) ความรุนแรงของเชื้อจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดย *B. cereus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 4-55 องศาเซลเซียส ช่วงค่า pH ที่สามารถเจริญ คือ 4.5 – 9.5 และช่วง pH ที่เหมาะสม คือ 6-7 มีค่า water activity (a_w) ต่ำสุด (ด้วยเกลือแกง) ที่เชื้อนี้เจริญได้คือ 0.93 (ICMSF, 1996)

2.3.2 ความรุนแรงในการก่อโรคและสารพิษจาก *B. cereus*

โดยทั่วไปสารพิษในแบคทีเรียจำแนกตามแหล่งกำเนิดได้ 2 ประเภทคือ exotoxin มักเกิดในกลุ่มแบคทีเรียสร้างสารพิษแกรมบวกและแกรมลบ และ endotoxin เกิดกับกลุ่มแบคทีเรียสร้างสารพิษแกรมลบ ซึ่งการเกิดโรคจาก *B. cereus* โดยทั่วไปแยกตามลักษณะอาการได้ 2 ลักษณะ (ICMSF, 1996) ดังนี้

2.3.2.1 ลักษณะอาการที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ

1) โรคอาหารเป็นพิษแบบท้องเสีย (Diarrheal type)

ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษชนิดทำให้เกิดอาการท้องเสีย (Diarrhealgenic enterotoxin) อาการที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงมากนักโดยจะมีระยะฟักตัวนานประมาณ 8-17 ชั่วโมง จึงทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน บางรายอาจมีอาการอาเจียน (23%) ไม่มีอาการไข้ โรคนี้เป็นนานเฉลี่ย 12-24 ชั่วโมง อาการที่เกิดจะคล้ายกันกับ *Clostridium perfringens* โดยจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาการคือ 5-7 log CFU/g อาหารที่มักจะเป็นต้นเหตุมีความหลากหลายได้แก่ อาหารพวกเนื้อ น้ำซุป น้ำซอสจนไปถึงอาหารประเภทผักและสลัด (Koriranta et al., 2000)

2) โรคอาหารเป็นพิษแบบอาเจียน (Emetic type)

ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษชนิดนี้อาการที่เกิดขึ้นรุนแรงและเฉียบพลันกว่าสารพิษชนิดแรกโดยจะเกิดอาการขึ้นหลังจากรับประทานไปแล้ว 1-5 ชั่วโมงโดยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน อาจมีอาการปวดท้องอย่างกะทันหัน 1 ใน 3 ของผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียร่วมด้วย อาการจะเป็นนานประมาณ 6-24 ชั่วโมงอาการที่เกิดจะคล้ายกันกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาการต้องมีปริมาณสูงกว่าชนิดแรกคือ 5-8 log CFU/g สาเหตุมักมาจากการบริโภคอาหารประเภทข้าวเป็นส่วนใหญ่ (Koriranta et al., 2000)

การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *B. cereus* สามารถสรุปได้จากสารพิษชนิดต่าง ๆ ตามอาการของโรคดังแสดงในตารางที่ 2.8 โดยโรคอาหารเป็นพิษแบบอาเจียน จะมีระยะเวลาการฟักตัวของโรคเร็วกว่าแบบท้องเสีย กล่าวคือ มีระยะเวลาการฟักตัวเพียงครึ่งชั่วโมงถึง 6 ชั่วโมง และแสดงอาการอาเจียนหลังจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษที่ผลิตจากเชื้อปนเปื้อนในอาหารในปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5-8 log CFU/g (ml) ไปแล้ว 6-24 ชั่วโมง ขณะที่แบบท้องเสียมีระยะฟักตัว 8-16 ชั่วโมง และมีระยะเวลาแสดงอาการของโรค หลังรับประทานอาหารที่มีเชื้อ 5 – 7 log.CFU/g (ml) ไปแล้วเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.8 สรุปลักษณะของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *B. cereus*

ลักษณะ	โรคอาหารเป็นพิษแบบท้องเสีย	โรคอาหารเป็นพิษแบบอาเจียน
ประเภทสารพิษ	โปรตีน ; enterotoxin : HbI, Nhe และ CytK	Cyclic peptide ; emetic toxin (cereulide)
ตำแหน่งการสร้างสารพิษ	ในลำไส้เล็กของคนหรือ host	ปรากฏในอาหาร
ปริมาณเชื้อที่ก่อโรค	5-7 log CFU/g (ml)	5-8 log CFU/g (ml)
ระยะเวลาฟักตัว	8-16 ชั่วโมง	0.5 -6 ชั่วโมง
ระยะเวลาแสดงอาการ	12-24 ชั่วโมง	6-24 ชั่วโมง
อาการ	ปวดเกร็งท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ	คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน ครั่นเนื้อครั่นตัว
อาหารที่เกี่ยวข้อง	อาหารประเภทโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ไข่ ขนมหวาน ซุป นมและผลิตภัณฑ์จากนม ผักสดและผลิตภัณฑ์จากผัก	อาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าว และผลิตภัณฑ์ข้าว ธัญพืช พาสต้า ก๋วยเตี๋ยว แป้งและผลิตภัณฑ์จากแป้ง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Granum (2007)

2.4 การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Bacillus cereus*

การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *B. cereus* พบได้ทั่วโลก เช่น ในเบลเยี่ยม เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2546 พบการเจ็บป่วยของเด็กจำนวน 5 คน (G7, G9, G10, B9, B14) จากการบริโภคสลัดพาสต้าที่มีการจัดเตรียมในวันศุกร์เพื่อไปปิกนิกในวันเสาร์ถัดไป โดยส่วนที่เหลือถูกเก็บไว้ในตู้เย็นจนกระทั่งเย็นวันจันทร์ได้นำสลัดพาสต้าออกมาให้กับเด็ก ๆ รับประทานอีกครั้ง แต่สลัดพาสต้า มีกลิ่นผิดปกติทำให้เด็กจำนวน 3 คน (B14, G10 และ G9) กินเพียงเล็กน้อย ผ่านไป 6 ชั่วโมงหลังมื้ออาหารเด็กผู้หญิงที่อายุน้อยที่สุด (G7) อายุ 7 ขวบเริ่มอาเจียน หายใจลำบาก ครอบครัวจึงนำส่งโรงพยาบาลท้องถิ่น และพี่ชายของเธอ (B9) ก็เริ่มอาเจียนเช่นกัน จึงต้องมีการเคลื่อนย้ายไปยังโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยใน Leuven ในระหว่างการเปลี่ยนโรงพยาบาล เด็กผู้หญิง G7 มีเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง มีอาการโคม่ามีเลือดออกกระจายและปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง จึงส่งผลให้เธอเสียชีวิตภายใน 20 นาทีเมื่อเกิดอาการ และหลังรับประทานอาหารเพียง 13 ชั่วโมง ส่วนเด็กผู้ชายอายุ 9 ปี (B9) ถูกย้ายไปที่แผนกผู้ป่วยหนักเด็ก นอกจากนี้เด็กผู้หญิง (G9 และ G10) ได้รับรักษาจนค่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หาย และเด็กผู้ชายอายุ 14 ปี (B14) รักษาภายใต้การสังเกตตัวอย่างเลือด โดยเด็กที่รอดชีวิตสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ภายใน 8 วัน (NCBI, 2005)

ในสหรัฐอเมริกา เดือนพฤษภาคม ค.ศ. 1989 เกิดการระบาดของโรค *B. gastroenteritis* ในแขก 140 คน ที่ได้เข้าร่วมงานเลี้ยงต้อนรับที่เมือง Napa รัฐแคลิฟอร์เนีย จากการสืบสวนเกิดจาก Cornish game hens ที่ให้บริการในงานเป็นพาหนะสำหรับส่งโรค (OR = 29, P = 0.0001) และในการระบาดครั้งนี้มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในหลายจุดระหว่างการเตรียมและการขนส่งอาหาร ในขณะที่มีการใช้ห้องครัวร้านอาหารที่ได้รับอนุญาต แต่สิ่งอำนวยความสะดวกไม่เพียงพอสำหรับการจัดงาน ปัจจุบันหน่วยงานที่ดูแลสุขภาพและความปลอดภัยของประชาชนรัฐแคลิฟอร์เนียไม่ได้ระบุถึงขอบเขตของการปฏิบัติงานด้านการจัดเลี้ยง เมื่อผู้ให้บริการด้านอาหารมีจำนวนเพิ่มขึ้นจะมีความต้องการการกำกับดูแลจากภาครัฐเพิ่มขึ้นเพื่อให้แน่ใจว่าการผลิตอาหารในปริมาณมากจะดำเนินการอย่างปลอดภัย (NCBI, 1992)

ในปี พ.ศ. 2552 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค รายงานการระบาดของเชื้อ *B. cereus* โดยพบเด็กอนุบาลจากโรงเรียนเอกชนแห่งหนึ่งจำนวน 20 กว่าราย เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลด้วยอาการอาเจียน ปวดท้อง ถ่ายเหลว ระหว่างวันที่ 18-22 ธันวาคม 2552 โดยมีการศึกษาลักษณะทางระบาดวิทยาเชิงพรรณนา และ retrospective cohort study ค้นหาสาเหตุของผู้ป่วยที่ยืนยันคือผู้ป่วยที่มีอาการและมีผลการเพาะเชื้อจากอุจจาระหรืออาเจียน ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* นอกจากนี้ยังมีการนำตัวอย่างอาเจียน อุจจาระ และอาหารที่สงสัย ส่งตรวจสอบที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งจากการสอบสวนพบว่าผู้ป่วยมีอาการอาเจียน (100%) ปวดท้อง (59%) ถ่ายเหลว (31%) และไข้ (26%) และได้ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในอาเจียน 3 ตัวอย่าง และพบในตัวอย่างน้ำพะโล้ที่เป็นอาหารกลางวันของนักเรียนในวันที่ 18 ธันวาคม 2552 ดังนั้นการระบาดครั้งนี้น่าจะมีสาเหตุจากเชื้อ *B. cereus* ชนิดที่ทำให้อาเจียน ที่ปนเปื้อนในไข่และหมูพะโล้ ซึ่งคณะผู้สอบสวนได้ให้ความรู้เรื่องสุขาภิบาลและการป้องกันโรคทางเดินอาหารและน้ำแก่ครูและแม่ครัว โดยเน้นการล้างมือก่อนการประกอบอาหาร การเสิร์ฟอาหารที่ปรุงสุกโดยทันที การสวมถุงมือขณะประกอบอาหาร การแยกภาชนะอาหารสดและอาหารปรุงสุกออกจากกัน (สำนักระบาดวิทยา, 2552)

จากผลการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่จำนวน 250 ตัวอย่าง คือไส้ครีม 126 ตัวอย่าง ไส้คัสตาร์ดครีม 120 ตัวอย่าง และเป็นไส้ครีมผสมคัสตาร์ดจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยพบว่าไส้ครีมสำหรับสอดไส้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ 126 ตัวอย่าง พบ *E. coli* อยู่ในระดับที่ไม่พอใจ 2 ตัวอย่าง (1.6%) และพบ 1 ตัวอย่าง (0.8%) มีแนวโน้มที่ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยจากเชื้อ *B. cereus* ส่วนตัวอย่างไส้คัสตาร์ดครีมสำหรับสอดไส้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ 120 ตัวอย่าง พบว่า 3 ตัวอย่าง (2.6%) อยู่ในระดับที่ไม่พอใจ 2 ตัวอย่าง (1.7%) มีแนวโน้มที่ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยจากเชื้อ *B. cereus* (NZFSA, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานการดำเนินการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในตัวอย่างเครื่องดื่มบรรจุภาชนะปิดสนิทที่ผลิตในกรุงเทพมหานครและจังหวัดอื่น ๆ ในเขตภาคกลาง ระหว่างเดือนตุลาคม 2549 ถึงเดือนมีนาคม 2551 รวมทั้งสิ้น 94 ตัวอย่าง (เป็นตัวอย่างจากผู้ผลิตเพื่อนำผลวิเคราะห์ไปขึ้นทะเบียนหรือเพื่อควบคุมคุณภาพ 92 ตัวอย่าง และจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด 2 ตัวอย่าง) ผลการตรวจวิเคราะห์ พบว่า เครื่องดื่มธัญพืชชนิดเหลวพร้อมบริโภคพบ *B. cereus* เกินเกณฑ์กำหนด 20.0% (3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 15 ตัวอย่าง) ได้แก่ น้ำเต้าหู้ นมเย็นผสมแมงลัก และน้ำนมข้าวโพด โดยปริมาณ *B. cereus* ที่ตรวจพบมากกว่า 1,100 ต่อมิลลิลิตร สำหรับเครื่องดื่มธัญพืชชนิดแห้งพบ *B.cereus* ในตัวอย่างร้อยละ 11.8 (4 ตัวอย่างจากทั้งหมด 34 ตัวอย่าง) ได้แก่เครื่องดื่มถั่วเขียวผงพบปริมาณ *B. cereus* 1,700 ต่อมิลลิลิตร งาดำผงพบ 950 ต่อมิลลิลิตร ธัญญาหารรวมพบ 440 ต่อมิลลิลิตร และนมแพะผงพบ 520 ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ เครื่องดื่มชนิดอื่นๆที่ไม่มีธัญพืชเป็นส่วนประกอบจำนวน 45 ตัวอย่าง แบ่งเป็นน้ำผลไม้จำนวน 22 ตัวอย่าง ตรวจพบ *B. cereus* 6 ตัวอย่างแต่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด เพราะปริมาณที่ตรวจพบน้อยกว่า 10 ต่อมิลลิลิตร เครื่องดื่มชนิดแห้งที่ไม่มีส่วนผสมของธัญพืชและเครื่องดื่มชนิดเหลวอื่นๆรวม 23 ตัวอย่าง ตรวจพบ *B. cereus* 2 ตัวอย่างแต่ผ่านเกณฑ์ ฯ เช่นกัน เพราะปริมาณที่พบน้อยกว่า 10 ต่อมิลลิลิตร (สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร, 2551)

ส่วนรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับสังขยาใบเตย ในปี 2556 มีรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคขนมปังสังขยาของนักเรียนโรงเรียนอนุบาลแห่งหนึ่งในเขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร จำนวน 166 ราย โดยมีผู้ป่วยจากการบริโภคขนมปังสังขยาจำนวน 22 คน เข้ารักษาตัวที่โรงพยาบาล โดยทุกรายมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดมวนท้อง ถ่ายเหลว ไม่มีไข้ จากการสอบถามครูและนักเรียน พบการบริโภคขนมปังสังขยามีรสเปรี้ยวกลิ่นเหม็น ผลการตรวจสอบตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ พบเชื้อ *S. aureus* และตรวจเชื้อทางทวารหนัก พบเชื้อ *S. aureus* จำนวน 4 ราย (สำนักระบาดวิทยา, 2556)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานการศึกษาการลดจำนวนเซลล์ของ *Salmonella* Typhimurium ในแตงกวาหั่นแว่น มะเขือเทศหั่นแว่น กะหล่ำปลีหั่นฝอย และแครอทหั่นฝอย ในสภาวะจำลองการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมสลัดผัก พบว่าหลังการจำลองการปนเปื้อนข้ามพบ *S.* Typhimurium บนผักทั้ง 4 ชนิดเป็น 6.94 ถึง 8.17 $\log_{10}$ CFU/g การล้างผักด้วยสารฆ่าเชื้อสองชนิดเปรียบเทียบระหว่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ปรับ pH 4 ด้วยกรดแอซีติก พบว่าสภาวะการล้างที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดจำนวนเชื้อในผักสด 4 ชนิด ดังนี้ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 50 ppm นาน 30 นาที ลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนผิวแตงกวาได้ 1.34 $\log_{10}$ CFU/g (99.51%) ลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนผิวมะเขือเทศได้ดีกว่า สามารถลดได้ 1.6 $\log_{10}$ CFU/g (97.22%) ภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 นาที และไม่ทำให้สีและผิวของมะเขือเทศเปลี่ยน การล้างกะหล่ำปลีหั่นฝอยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 200 ppm นาน 30 นาที ลดเซลล์ได้ 2.07 $\log_{10}$ CFU/g (99.1%) และไม่ทำให้สีของกะหล่ำปลีคล้ำ ส่วนการล้างแครอทหั่นฝอยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm 30 นาที ลดจำนวน *S.* Typhimurium ได้ดีกว่าโซเดียมคลอไรด์ คือทำลายเซลล์ได้ 2.43-3.73 $\log_{10}$ CFU/g (99.1%) (มนทกานติ์, 2545)

การศึกษาผลของการจุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ในมะละกอสุกตัดแต่งพร้อมบริโภคพันธุ์เรดมาราดอล โดยนำมะละกอพันธุ์เรดมาราดอลระยะสุกพร้อมบริโภคมาล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 200 ppm จากนั้นปอกเปลือกและตัดให้เป็นชิ้นขนาด 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปจุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 ppm เป็นเวลานาน 1 นาที เปรียบเทียบกับชิ้นมะละกอสุกที่ไม่จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ แล้วบรรจุชิ้นมะละกอลงในถาดโฟมหุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกโพลิไวนิลคลอไรด์ที่มีความหนา 10 ไมโครเมตร นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์ม อี โคไล แล็คติกแอซิดแบคทีเรีย ยีสต์และรา ในมะละกอสุกตัดแต่งพร้อมบริโภคทุกๆ 2 วัน ผลการทดลองพบว่าการจุ่มชิ้นมะละกอสุกตัดแต่งพร้อมบริโภคลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ทุกระดับความเข้มข้นสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์ม อี โคไล แล็คติกแอซิดแบคทีเรีย ยีสต์และราได้ โดยพบว่าการจุ่มชิ้นมะละกอลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด (ชลิดา และคณะ, 2560)

การศึกษาประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อลดปริมาณเชื้อ *E. coli* และ S. *typhimurium* ในต้นอ่อนทานตะวัน ผลการทดลองพบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 5% (v/v) สามารถลดปริมาณเชื้อที่ปลูกใส่ *E. coli* ได้เท่ากับ 0.77 และ 0.98 log CFU/g ส่วนเชื้อ *S. typhimurium* ลดได้เท่ากับ 0.02 และ 0.86 log CFU/g ตามลำดับ สำหรับไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6% (v/v) สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้เท่ากับ 0.37, 0.42 และ 0.50 log CFU/g และเชื้อ *S. typhimurium* ลดเท่ากับ 0.22, 0.96 และ 1.0 log CFU/g ตามลำดับ จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในต้นอ่อนทานตะวันได้ (เกรียงไกร และคณะ, 2559)

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมคลอไรท์ 50 ppm สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm และสารผสมเปอร์รอกซีแอซีติกและไฮโดรเจนเปอร์รอกไซด์ (สาร A) 80 ppm เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *E. coli* 4.16-6.32 และ 4.19-5.46 log10CFU/mL ซึ่งปนเปื้อนบนผักกาดหอม ผักกาดขาว ผักชี และสะระแหน่ การล้างผักด้วยน้ำประปาผสมสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ปรับพีเอช 4 ด้วยกรดแอซีติก ที่ 30±2 ° C 0-30 นาทีพบว่าสารละลายโซเดียมคลอไรท์ทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดบนผักกาดหอมและผักกาดขาวภายใน 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำลาย *E. coli* บนผักกาดหอม ผักชี และสะระแหน่ ได้หมดในเวลา 15 นาที สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดบนผักกาดหอม และทำลาย *E. coli* บนผักกาดหอม และสะระแหน่ได้หมดภายใน 15 นาทีสาร A ทำลาย *E. coli* บนผักทั้ง 4 ชนิดได้หมดใน เวลา 30 นาที สารประกอบคลอรีนทั้งสองไม่มีผลต่อสีและกลิ่นของผักกาดหอมและผักกาดขาว แม้ทำให้สีของผักสะระแหน่และผักชีคล้ำแต่กลิ่นผักไม่เปลี่ยน ส่วนสาร A ทำให้ผักกาดหอมและผักกาดขาวมีกลิ่นคล้ายกรด (วราภาและคณะ, 2544)

รายงานผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลา และการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย จากการประเมินคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย จากโรงงานขนาดเล็ก โดยแบ่งวัตถุดิบออกเป็น 2 ประเภท คือ วัตถุดิบที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ ใบเตยสด ไข่ไก่สด และกะทิพาสเจอร์ไรซ์ สุ่มเก็บตัวอย่างมาอย่างละ 20 รุ่น และวัตถุดิบที่มีความเสี่ยงต่ำ ได้แก่แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และน้ำตาลทราย สุ่มตัวอย่างมาอย่างละ 10 รุ่นการผลิต ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชี้บ่งคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้แก่ Aerobic Plate Count, Yeasts & Molds, Coliforms, *E.coli, S. aureus, Salmonella spp., B. cereus* และ *Clostridium perfringens* พบว่าใบเตยสดตรวจพบเชื้อก่อโรคปนเปื้อนได้แก่ *B. cereus* จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) ปริมาณ 3.40±0.45 log CFU/g และ *S. aureus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (10%) ปริมาณ 23-93 MPN/g และไข่ไก่สด ตรวจพบเชื้อก่อโรค *Salmonella spp.* จำนวน 4 ตัวอย่าง (20%) ในขณะเดียวกันได้สุ่มตัวอย่างสังขยาใบเตย มาจำนวน 20 รุ่นการผลิตๆละ 3 ถุง ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ตรวจพบ *B. cereus* จำนวน 9 ตัวอย่าง (45%) ปริมาณตั้งแต่ 2.0 ถึง 3.9 log CFU/g โดยในวันที่ 0 วัน พบ 3 ตัวอย่าง (15%) วันที่ 1 วัน พบ 5 ตัวอย่าง (25%) และวันที่ 2 พบ 9 ตัวอย่าง (45%) ในขณะที่ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella spp.* ที่ตรวจพบในวัตถุดิบโดยเชื้อ *B. cereus* ที่พบในใบเตยสดส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ที่ทนความร้อนสูง (สายรุ้ง, 2558)

รายงานการควบคุมปริมาณ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว พบว่า มีสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในปริมาณ 10-100 CFU/g โดยปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบ ได้แก่ ถั่วเหลือง แป้งสาลี และหัวเชื้อ *A.oryzae* และกระบวนการผลิต พบว่าความร้อนที่ใช้ในการต้มหรือนึ่งถั่วเหลืองและคั่วแป้งไม่สามารถลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ได้ เมื่อใช้สารทำความสะอาด 3 ชนิด คือ tri–sodium phosphate, sodium hypochorite และ calcium hypochorite และสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ Tween 80 และdialkyldimethylammonium chloride พบว่า sodium hypochorite และ calcium hypochorite เข้มข้น 200 ppm ลดเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ได้ดีที่สุด คือ 4.3 และ 2.9 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อหมักเต้าเจี้ยวด้วยถั่วเหลืองเตรียมโดยแช่ด้วย calcium hypochorite ความเข้มข้น 200 ppm แป้งสาลีฉายรังสีแกมมาและหรือแป้งสาลีที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่ระดับ 750 วัตต์ 15 นาที และเชื้อบริสุทธิ์ *A.oryzae* ไม่พบเชื้อ *B. cereus* ตลอดระยะเวลาหมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน (อลิสรา, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาประสิทธิภาพของรังสียูวี โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และการให้ความร้อนในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 บริเวณพื้นผิวของหัวหอมเขียวและผักโขม โดยมีปัจจัยในการศึกษา คือ ความเข้มของยูวี 12.5 - 500 mJ/cm^2 , โซเดียมไอโปคลอไรท์ 10-200 ppm และความร้อนอุณหภูมิตั้งแต่ 40-50 °C ผลที่ได้คือ ความเข้มของยูวี 125 mJ/cm^2 กับ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm ที่ 50 °C สามารถลดเชื้อได้มากกว่า 5 log cycle จากเชื้อเริ่มต้นสูงสุด 7.2 log CFU per spot และต่ำสุด 4.8 log CFU per spot หัวหอมเขียวลดลงจนเหลือเชื้อ 2.2 log CFU per spot ส่วนในผักโขมลดลงจนเหลือ 2.8 log CFU per spot (Durak et al., 2012)

การศึกษาประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ กรดฟูมาริกและความร้อนในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium DT104 และ *S. aureus* ในผักกาดหอมที่ตัดแต่งแล้ว พบว่า ในผักกาดหอมมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ 6-7 log CFU/g โดยใบด้านในปนเปื้อนน้อยกว่าด้านนอก 1-2 log CFU / g และพบว่า 70% ของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติสามารถกำจัดได้ด้วยการล้างกับ 0.85% NaCl ประมาณ 5 ครั้ง ส่วน *E.coli* O157:H7, *Sal. Typhimurium* DT104 และ *S. aureus* พบว่า กรดฟูมาริก 50 mM นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สามารถกำจัดเชื้อได้ 2 log CFU/g ส่วนการโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ 200 ppm รวมกับการใช้ความร้อน 50 °C นาน 1 นาที สามารถลดเชื้อก่อโรคได้ 94 – 98% (1.2 – 1.7 log cycle) (Kondo et al., 2005)

ศึกษาการแพร่กระจายของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* โดยวิธี standard plate count และ วิธี MPN ในซูชิ 40 และ 41 ตัวอย่าง ตามลำดับ ที่สุ่มตัวอย่างมาจากร้านค้าที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้า บริเวณอำเภอเมือง อำเภอศรีราชา และบริเวณใกล้มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 ผลการศึกษาพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในตัวอย่าง ซูชิ 14 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 35) ซึ่งมี 11 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 27.5) มีค่ามากกว่าเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2549 ส่วนการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในซูชิ พบว่า 12 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 29.26) มีการปนเปื้อนของ *B. cereus* ซึ่งมี 1 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 2.44) ที่มีแนวโน้มจะมีปริมาณเชื้อสูงเกินเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (สุดสายชล, 2554)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการล้างพริกขี้หนูสดสีแดงด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ความเข้มข้น 70, 100 และ 150 ppm เป็นเวลา 5 และ 10 นาที) และสร้างมาตรฐานการตรวจรับให้กับเครื่องจมูกอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic Nose) ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาการสัมผัสสารเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการลดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์ ราจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น พบว่าพริกมีกลิ่นคลอรีนมากขึ้น โดยสภาวะที่เหมาะสมในการล้างพริกขี้หนูคือที่ความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 5 นาที ในส่วนของการสร้างมาตรฐานการตรวจรับด้วยเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จมูกอิเล็กทรอนิกส์โดยใช้รูปแบบ SQC Model พบว่าเซ็นเซอร์ที่มีการตอบสนองต่อกลิ่นคลอรีนและความสดของวัตถุดิบคือ LY2/LG และ LY2/AA ตามลำดับ โดยสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 3 กลุ่ม คือ 1) พริกขี้หนูสด (ควบคุม) 2) พริกขี้หนูสดที่มีกลิ่นคลอรีนเล็กน้อยถึงปานกลาง (ยอมรับ) และ 3) พริกขี้หนูสดที่มีกลิ่นคลอรีนมาก (ไม่สามารถยอมรับได้) (พรรณจิรา และคณะ, 2555)

ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือกรดเพอร์ออกซีแอซีติกและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ผิวของผักและผลไม้สดที่แกะสลักเป็นรูปใบไม้ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ฟักทอง แครอท หัวไชเท้า แคนตาลูป และแตงกวาญี่ปุ่น โดยใช้สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 60 หรือ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 50 หรือ 75 มิลลิกรัมต่อลิตรและระยะเวลาในการแช่ 2 ระดับ คือ 3 หรือ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่น โดยภายหลังการแช่ลงในสารฆ่าเชื้อดังกล่าว ปล่อยให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที นำตัวอย่างผักและผลไม้สดที่แกะสลักจำนวน 1 ชิ้นต่อซ้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ผลการทดลอง พบว่า ผักและผลไม้สดที่แกะสลักแต่ละชนิดมีจุลินทรีย์เริ่มต้นแตกต่างกัน และภายหลังการแช่ในสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด พบว่าสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร แช่เป็นเวลา 3 นาที สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ในแครอทและหัวไชเท้าที่แกะสลักเป็นรูปใบไม้ และความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร แช่เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ในฟักทอง แคนตาลูป และแตงกวาญี่ปุ่นที่แกะสลักเป็นรูปใบไม้ได้มีประสิทธิภาพดีกว่าการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ทั้งสองความเข้มข้น (จอมขวัญ และคณะ, 2557)

รายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม) 100 150 200 และ 250 ppm ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์บนผิวมะละกอเส้นตัดแต่ง พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น มะละกอเส้นตัดแต่งในทุกชุดการทดลองมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ชุดการทดลองที่จุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อ Coliform และ *E. coli* น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมะละกอเส้นตัดแต่งพร้อมบริโภคที่จุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm ให้ผลดีที่สุดในการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (มัณฑนา และคณะ, 2553)

การศึกษาประสิทธิภาพแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ต่อการล้างผัก พบว่าหลังจากการจุ่มน้ำสามารถลดเชื้อ *E. coli* ในผักกาดหอมและบล็อกโคลี่ได้ประมาณ 1.5-1.8 $\log_{10}$ CFU/g จากปริมาณ *E.coli* เริ่มต้น 6.8 log 10 CFU/g เมื่อแช่ผักในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 50 mg/L เวลา 30 วินาที สามารถลดปริมาณ *E. coli* ของผักกาดหอมได้ 1.9-2.8 $\log_{10}$ CFU/g และบล็อกโคลี่ได้ 1.7-2.5 $\log_{10}$CFU/ g และเมื่อแช่ผักในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 mg/L ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับพบว่า สามารถลดปริมาณ *E. coli* ได้ประมาณ 2.4 $\log_{10}$ CFU/g ซึ่งพบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อความสามารถในการลดปริมาณ *E. coli* (Behrsing et al., 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษานี้คือเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคลอรีนและกรดเพอร์อีอกซีอะแซติก (PAA) ในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. และจุลินทรีย์ธรรมชาติในถั่วงอก นอกจากนี้ยังประเมินความต้านทานของเชื้อก่อโรคที่ไม่ดัดแปลงและกรดต่อการบำบัดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเหล่านี้ ถั่วงอกที่ไม่ได้เพาะเชื้อและเพาะเชื้อถูกยับยั้งด้วยคลอรีนที่ 106, 130 และ 170 ppm และ PAA ที่ 25, 51 และ 70 ppm เป็นเวลา 90 และ 180 วินาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยรวมแล้ว การลดของเชื้อได้เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น สำหรับ 180 วินาที การใช้คลอรีนที่ 170 ppm ลดลง 2.0, 1.3, 1.5, 0.9-logs และการใช้ PAA ที่ 70 ppm ส่งผลให้ *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. ไม่ได้ดัดแปลงและจุลินทรีย์ตามธรรมชาติตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าประสิทธิภาพของ PAA ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับคลอรีนอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเซลล์ที่ได้รับการปรับให้เป็นกรด การยับยั้งด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเหล่านี้มีประสิทธิภาพน้อยกว่าด้วยช่วงการลดคลอรีน 1.0-1.2-log สำหรับคลอรีนและการลดลง 1.1-1.6-log สำหรับ PAA เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการดัดแปลง ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ที่ดัดแปลงด้วยกรดมีความทนทานต่อ การบำบัดด้วยการฆ่าเชื้อ ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า PAA อาจใช้แทนคลอรีนในการฆ่าเชื้อถั่วงอก และควรใช้เชื้อก่อโรคที่ปรับกรดเพื่อออกแบบกลยุทธ์การฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ (Neo et al., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
เครื่องมือ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ใบเตยสดที่มีการตัดแต่งเบื้องต้นรับจากเกษตรกรที่เพาะปลูก จัดส่งไปยังโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร

3.2 เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ที่แยกได้จากใบเตยสดจากเกษตรกรเพาะปลูก ที่จัดส่งไปยังโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ในการยืนยันสายพันธุ์เชื้อบริสุทธิ์จากสำนักคุณภาพและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี

3.3.1 สารเคมี

3.3.1.1 Sodium Hypochlorite	(ฟิวเจอร์เคม, ไทย)
3.3.1.2 Ethanol (C_2H_5OH) 95 เปอร์เซ็นต์	(องค์การสุราไทย, ไทย)
3.3.1.3 Sodium chloride (NaCl)	(Merck, Germany)
3.3.1.4 น้ำปราศจากไอออน	(Elix, Germany)
3.3.1.5 Polymyxin B solution (sigma P1004)	(Sigma, USA)
3.3.1.6 Crystal violet	(Carlo Erba, Italy)
3.3.1.7 Iodine (I_2)	(Carlo Erba, Italy)
3.3.1.7 Safranin O	(Scharlau Chemie, Spain)
3.3.1.8 Malachite green oxalate ($C_{52}H_{54}N_4O_{12}$)	(Ajax Finechem, Australia)
3.3.1.9 Peptone	(Difco, USA)
3.3.1.10 Glucose	(Oxoid, England)
3.3.1.11 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	(Carlo Erba, Italy)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 ไข่ไก่	(CP, Thailand)
3.3.2.2 Agar	(Difco, USA)
3.3.2.3 Mannitol egg yolk-polymyxin agar (MYP) Agar	(Difco, USA)
3.3.2.4 Trypticase soy agar (TSA)	(Difco, USA)
3.3.2.5 Trypticase soy broth (TSB)	(Difco, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.6 Letheen Broth (Himedia, India)

3.3.2.7 Nutrient Agar (NA) (Difco, USA)

3.3.2.8 Butterfield's Phosphate Buffered (BPB) (Difco, USA)

3.3.2.9 Blood Agar (White Group Public, Thailand)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.4.1 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon ECLIPSE E200, China)

3.4.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL IT500HR, Japan)

3.4.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Ohaus Corp, USA)

3.4.4 เครื่องตีปั่น (Interscience, France)

3.4.5 เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ (Bio Lab, Thailand)

3.4.6 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus, Germany)

3.4.7 ตู้ปลอดเชื้อ (Astec Microflow, UK)

3.4.8 ตู้อบลมร้อน (Skadi, Netherland)

3.4.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

3.4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Tommy, Japan)

3.4.11 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Scientific Industries, USA)

3.4.12 ไมโครเวฟ (Hitachi, Thailand)

3.4.13 ตู้เย็น (Mitsubishi, Japan)

3.4.14 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาด 90× 15 มิลลิเมตร (Kartell, Italy)

3.4.15 ไมโครปิเปต และทิป (Gilson, France)

3.4.16 หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร (NEST Biotechnology, China)

3.4.17 หลอดทดลองมีฝาปิด ขนาด 16x150 มิลลิลิตร

3.4.18 กระบอกตวง ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.4.19 ขวดดูแรน ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.4.20 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.21 ขวดแบน ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.22 บีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.4.23 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ

3.4.24 ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.4.25 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4.26 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.4.27 แท่งแก้วงอ และแท่งแก้วสามเหลี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 ศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในใบเตยสด

3.5.1.1 ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดใบเตยสดของทางโรงงาน

นำใบเตยสดที่มีการตัดแต่งจากแหล่งปลูกที่มีการจัดการระดับหนึ่ง

↓

คลี่ใบเตยสดให้แยกออกจากกัน

↓

แช่ใบเตยสดทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที โดยใช้น้ำประปา 20 ลิตร ต่อการล้างใบเตย 10 กิโลกรัม

↓

ผึ่งใบเตยสดที่ผ่านการแช่น้ำให้สะเด็ดน้ำ

↓

สุ่มเก็บตัวอย่างใบเตยที่ผ่านการล้างทำความสะอาด รุ่นการผลิตละ 200 กรัม

เพื่อมาใช้เป็นตัวอย่างในข้อ 3.5.1.2

3.5.1.2 การเก็บตัวอย่างใบเตยสดเพื่อนำมาทำการทดลอง

สุ่มเก็บตัวอย่างใบเตยสดที่มีการตัดแต่ง จำนวน 10 ตัวอย่าง (ตัวอย่างก่อนการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจำนวน 5 ตัวอย่างและตัวอย่างหลังการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจำนวน 5 ตัวอย่าง จาก 5 รุ่นการผลิต) ในช่วงเดือนตุลาคม 2560 – เดือนมกราคม 2561 จากโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างประมาณ 200 กรัม เก็บรักษาในถุงพลาสติกปลอดเชื้อที่อุณหภูมิแช่เย็นประมาณ 5±1 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทางด้านจุลินทรีย์ภายใน 10 ชั่วโมง ที่ห้องปฏิบัติการสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.1.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. cereus* (BAM, 2012)

สุ่มตัวอย่างใบเตยสดทั้งก่อนและหลังการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาตัวอย่างละประมาณ 200 กรัม บรรจุในถุงปลอดเชื้อ ทำการตัดแต่งตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นสุ่มตัวอย่างจำนวน 25 กรัม เติม Butterfield's Phosphate Buffered (BPB) ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีปั่น เป็นเวลานาน 1 นาที นำมาทำการเจือจางแบบ 10 fold dilution จนถึงระดับ $1:10^6$ ด้วย Butterfield's Phosphate Buffered (BPB) ปิเปตตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate ลงบนจานเพาะเชื้อ MYP agar ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วรูปตัว (L) เกลี่ยตัวอย่างอาหารแต่ละระดับให้ทั่วจาน คว่ำจานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *B. cereus* ซึ่งโคโลนีจะมีสีชมพูและเกิด opaque zone รอบๆ โคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/ กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสปอร์ *B. cereus* (BAM, 2012)

นำตัวอย่างใบเตยที่เจือจางในระดับ 1 : 10 ในข้อ 3.5.1.3 ใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำหลอดที่มีตัวอย่างดังกล่าวไปทำการให้ความร้อน (Heat shock) ใน Water Bath เพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรียและตรวจนับปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดตัวอย่างดังกล่าวมาแช่เย็นในน้ำที่มีน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 2 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับ 1 : 10^6 และปิเปตตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate บนอาหาร Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วรูปตัว (L) เกลี่ยตัวอย่างอาหารแต่ละระดับให้ทั่วจาน คว่ำจานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีเฉพาะซึ่งโคโลนีจะมีสีชมพูและเกิด opaque zone รอบๆ โคโลนี ของ *B. cereus* บน อาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี

3.5.1.5 การตรวจยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus*

ตรวจยืนยันเชื้อเบื้องต้น โดยดูการสร้าง hemolysis ของเชื้อบน 5% sheep blood agar จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อดูการสลายเม็ดเลือดแดงของแกะ โดยลักษณะโคโลนี *B. cereus* จะมีโซนใสล้อมรอบโคโลนีโดยมีความกว้างของโซน 2-4 มิลลิเมตร และนำโคโลนีที่ให้ผลบวกของการสลายเม็ดเลือดแดงแกะ ทำการตรวจยืนยันชนิดสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* ที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.5.1.6 การเตรียมเชื้อ *B.cereus* ที่คัดแยกได้จากใบเตยสด

3.5.1.6.1 การเก็บเชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่ได้รับการยืนยันเพื่อระบุสายพันธุ์เชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มา Streak plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy Agar (TSA) Slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ 2 ครั้ง จนได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ก่อนนำไปเก็บรักษา stock culture ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส การเก็บเชื้อในรูปแบบ glycerol stock นั้นให้นำเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกได้ทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy Broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลวและกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ปริมาตรละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและจัดเก็บแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.6.2 การเตรียมเซลล์ของ *B. cereus*

1. นำเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกเก็บไว้ในข้อ 3.5.1มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSA Slant บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2. ทำการถ่ายเชื้อด้วย loop ปลอดเชื้อจำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ตรวจนับจำนวนเชื้อเริ่มต้น โดยทำการเจือจางด้วย BPB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และตรวจสอบปริมาณเซลล์ด้วยวิธี spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี คำนวณจะได้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นที่ $10^8 – 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำสารละลายเชื้อวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ค่า McFarland 0.5 (ประมาณ 6 log CFU/ml)

3.5.1.6.3 การเตรียมสปอร์ของ *B. cereus*

1. นำเชื้อ *B. cereus* ที่บริสุทธิ์ที่แยกเก็บไว้ในข้อ 3.5.1.6.1 ทำการถ่ายเชื้อด้วย loop ปลอดเชื้อจำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Slant นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นเติม BPB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร10 มิลลิลิตร ใช้ลูปขูดเชื้อบริเวณผิวหน้าอาหารออกให้หมด แล้วถ่ายสารละลายเชื้อลงในหลอดทดลองแล้วนำไปให้ความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่เย็นในน้ำที่มีน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว (Heat shock) นาน 2 นาที (ดัดแปลง ศักย์ศิล, 2559)

2. ตรวจนับจำนวนสปอร์เริ่มต้นโดยนำ Spore suspension ที่ได้จากข้อ 3.5.1.6.3 มาทำการเจือจางด้วย BPB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และ spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี คำนวณจะได้ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B.cereus* เริ่มต้นที่ $10^8 – 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และทดสอบลักษณะสัณฐานโดยการย้อมสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาในการสัมผัสที่เหมาะสมในการลดปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

ตารางที่ 3.1 สัดส่วนของตัวอย่างผสมระหว่างสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์, Letheen Broth, น้ำ DI ปลอดเชื้อ และเชื้อ *B. cereus*

ความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อ NaOCl (ppm)	Letheen Broth (ml)	น้ำ DI ปลอดเชื้อ (ml)	สารฆ่าเชื้อ NaOCl 100000 ppm (ml)	ปริมาณเชื้อ *B. cereus* (ml)
0	5	4	0.000	1
50	5	4	0.005	1
100	5	4	0.010	1

หมายเหตุ 1. น้ำ DI ปลอดเชื้อ คือ น้ำที่ผ่านกระบวนการขจัดอิออนของสารละลายทั้งหมด ทำให้บริสุทธิ์ที่ปราศจากเกลือแร่ ไม่มีสารใดๆหลงเหลืออยู่ในน้ำ

2. NaOCl คือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100,000 ppm (คลอรีนน้ำ 10%)

3.5.2.1 การทำลายเซลล์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

เตรียมเชื้อ *B. cereus* ในหลอด TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากข้อ 3.5.1.6.2 ได้เชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/ml ใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน TSB 9 มิลลิลิตร จะได้เชื้อ 7 log CFU/ml ทำการเจือจางต่อจนได้เชื้อเริ่มต้น 3 และ 6 log CFU/ml ดูดเชื้อเริ่มต้นใส่หลอดปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Letheen Broth, น้ำ DI ปลอดเชื้อ ปริมาตรรวม 9 มิลลิลิตร(ดัดแปลงจาก วลีพร, 2560) และเติมคลอรีนน้ำ 10% (100000 ppm) (ตารางที่ 3.1) เพื่อให้ได้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ppm โดยทิ้งให้มีการสัมผัสกันเป็นระยะเวลา 0 (สัมผัสโดยทันที), 5, 10, 15, 20, 25, 30 นาที เมื่อถึงเวลาที่กำหนด ทำการตรวจเชื้อที่เหลือรอด โดยนำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

3.5.2.2 การทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

เตรียมเชื้อในรูปของ Spore จากข้อ 3.5.1.6.3 (3และ 6 log CFU/ml) ดูดสปอร์เริ่มต้นใส่หลอดปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Letheen Broth, น้ำ DI ปลอดเชื้อ ปริมาตรรวม 9 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก วลีพร, 2560) และเติมคลอรีนน้ำ 10% (100000 ppm) (ตารางที่ 3.1) เพื่อให้ได้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ppm โดยทิ้งสัมผัสกันเป็นระยะเวลา 0 (สัมผัสโดยทันที), 5, 10, 15, 20, 25, 30 นาที และเติม Letheen broth ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 มิลลิลิตร เมื่อถึงเวลาที่กำหนด ทำการตรวจเชื้อที่เหลือรอด โดยนำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

3.5.3 ศึกษาผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จากการล้างใบเตยสด

3.5.3.1 การเตรียมตัวอย่างใบเตยสด

3.5.3.1.1 คัดใบเตยที่มีน้ำหนัก 30-35 กรัม หรือ 10-15 ใบต่อหนึ่งครั้งของการทดลอง โดยใบเตยสดที่คัดมาจะต้องมีขนาดของใบใกล้กัน

3.5.3.1.2 ใบเตยสดตามธรรมชาติที่มาจากเกษตรกรที่ทำการเพาะปลูก ที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ที่ระดับเชื้อ 3 log CFU/g

3.5.3.1.3 ใบเตยสดที่มีการสร้างการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ 6 log CFU/g (ดัดแปลงจาก ฐิตินันท์, 2555)

นำใบเตยสดที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (ตามข้อ 3.5.3.1.1) ล้างใบเตยสดด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร ต่อใบเตยสดที่มีน้ำหนัก 10-12 กรัม หรือ 3-5 ใบ ใช้เวลาในการแช่ 5 นาที โดยล้างเป็นจำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำใบเตยสดที่ผ่านการล้างผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำใบเตยสดจุ่มแช่ในบีกเกอร์ปลอดเชื้อที่มีสารละลายเชื้อ *B. cereus* ให้เป็น 7 log CFU/g เป็นเวลา 5 นาที นำขึ้นมาสะบัดเบาๆแล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะไม่เห็นหยดน้ำติดอยู่กับใบเตยสด จะได้เชื้อ *B. cereus* ติดอยู่บนใบเตยสดที่ระดับ 6 log CFU/g เพื่อเป็นตัวแทนเชื้อที่ระดับ Worst case

3.5.3.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm

ตวงโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (คลอรีนน้ำ 10%) ที่ความเข้มข้น 100,000 ppm มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ DI ปลอดเชื้อ 5 ลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ซึ่งจะต้องเตรียมและนำไปใช้งานโดยทันที

3.5.3.3 จำลองการล้างตัวอย่างใบเตยสดในห้องปฏิบัติการ

3.5.3.3.1 นำใบเตยสดตามธรรมชาติที่มาจากเกษตรกรเพาะปลูก ที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ที่ระดับเชื้อ 3 log CFU/g (ตามข้อ 3.5.3.1.2) จำนวน 10-15 ใบ หรือน้ำหนักประมาณ 30-35 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาปริมาตร 600 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และนำใบเตยสดขึ้นมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำตัวอย่างใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดตามวิธีข้างต้นประมาณ 25 กรัม และ ตัวอย่างน้ำประปาล้างทำความสะอาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปทดสอบการหลงเหลือเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอนข้อ 3.5.1.3 และ 3.5.1.4 ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3.3.2 นำใบเตยสดตามธรรมชาติที่มาจากเกษตรกรเพาะปลูก ที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ที่ระดับเชื้อ 3 log CFU/g (ตามข้อ 3.5.3.1.2) จำนวน 10-15 ใบ หรือน้ำหนักประมาณ 30-35 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm (ตามข้อที่ 3.5.3.2) แช่ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที และนำใบเตยสดขึ้นมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำตัวอย่างใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดตามวิธีข้างต้นประมาณ 25 กรัม และตัวอย่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้างทำความสะอาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปทดสอบการหลงเหลือเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอนข้อ 3.5.1.3 และ 3.5.1.4 ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.3.3.3 นำใบเตยสดที่มีการสร้างการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ 6 log CFU/g (เชื้อที่ระดับ Worst case) (ตามข้อ 3.5.3.1.3) จำนวน 10-15 ใบ หรือน้ำหนักประมาณ 30-35 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาปริมาตร 600 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และนำใบเตยสดขึ้นมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำตัวอย่างใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดตามวิธีข้างต้นประมาณ 25 กรัม และ ตัวอย่างน้ำประปาล้างทำความสะอาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปทดสอบการหลงเหลือเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอนข้อ 3.5.1.3 และ 3.5.1.4 ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.3.3.4 นำใบเตยสดที่มีการสร้างการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ 6 log CFU/g (เชื้อที่ระดับ Worst case) (ตามข้อ 3.5.3.1.3) ล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm (ตามข้อที่ 3.5.3.2) แช่ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที และนำใบเตยสดขึ้นมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำตัวอย่างใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดตามวิธีข้างต้นประมาณ 25 กรัม และตัวอย่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้างทำความสะอาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปทดสอบการหลงเหลือเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอนข้อ 3.5.1.3 และ 3.5.1.4 ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.4 ศึกษาโครงสร้างของใบเตยสด เซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* และผลโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* โดยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

เก็บตัวอย่างใบเตยสด ใบเตยที่ผ่านการล้างทำความสะอาด และเตรียมตัวอย่างเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* เพื่อนำไปศึกษาโครงสร้าง มีตัวอย่างและการเตรียม ดังนี้

3.5.4.1 เตรียมตัวอย่างเพื่อรอนำส่งวิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างใบเตยสดที่รับมาจากเกษตรกรเพาะปลูก ตัวอย่างใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ตามวิธีในขั้นตอนข้อ 3.5.3.3.1 และตัวอย่างใบเตยสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ตามวิธีในขั้นตอนข้อ 3.5.3.3.2 หั่นเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กขนาด 1x1 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งเป็นส่วนปลายใบ กลางใบ และโคนใบ เติมสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.4 เพื่อรักษาสภาพเซลล์

3.5.4.2 เตรียมตัวอย่างเพื่อรอนำส่งวิเคราะห์ โดยเตรียมเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามข้อ 3.5.1.6.2 และ ข้อ 3.5.1.6.3 ตามลำดับ นำเชื้อที่เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ (centrifuge) มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และเก็บส่วนที่เป็นตะกอนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.4 เพื่อรักษาสภาพเซลล์

3.5.4.3 เตรียมตัวอย่างเพื่อรอนำส่งวิเคราะห์ โดยเตรียมเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามข้อ 3.5.1.6.2 และ ข้อ 3.5.1.6.3 ตามลำดับ เติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm สัมผัสไว้เป็นเวลา 10 นาที และนำเชื้อที่เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ (centrifuge) มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และเก็บส่วนที่เป็นตะกอนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.4 เพื่อรักษาสภาพเซลล์

3.5.4.4 นำตัวอย่างข้อ 3.5.4.1 ตัวอย่างข้อ 3.5.4.2 และตัวอย่างข้อ 3.5.4.3 ส่งตัวอย่างเพื่อนำไปทดสอบลักษณะโครงสร้างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM-EDS (รุ่น IT500HR) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.5 การวางแผนการทดลอง

3.5.5.1 สำหรับการทดลองผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาในการสัมผัสที่เหมาะสมในการลดปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Factorial in Completely Randomized Design (CRD) ที่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 3 ระดับ คือ 0, 50 และ 100 ppm และระยะเวลาในการสัมผัส แบ่งเป็น 7 ระดับ คือ 0 (สัมผัสโดยทันที), 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที และมีผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์หรือสปอร์ *B. cereus* ที่ 3 log และ 6 log CFU/g วิเคราะห์ความแตกต่างข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistic package for social science (SPSS) version 21 (SPSS Institude Inc., Chicago, Il, USA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

-3.5.5.2 สำหรับการทดลองผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จากการล้างใบเตยสด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ที่ลดปริมาณเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ที่ 3 log และ 6 log CFU/g ได้มากที่สุด และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistic package for social science (SPSS) version 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(SPSS Institude Inc., Chicago, Il, USA) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

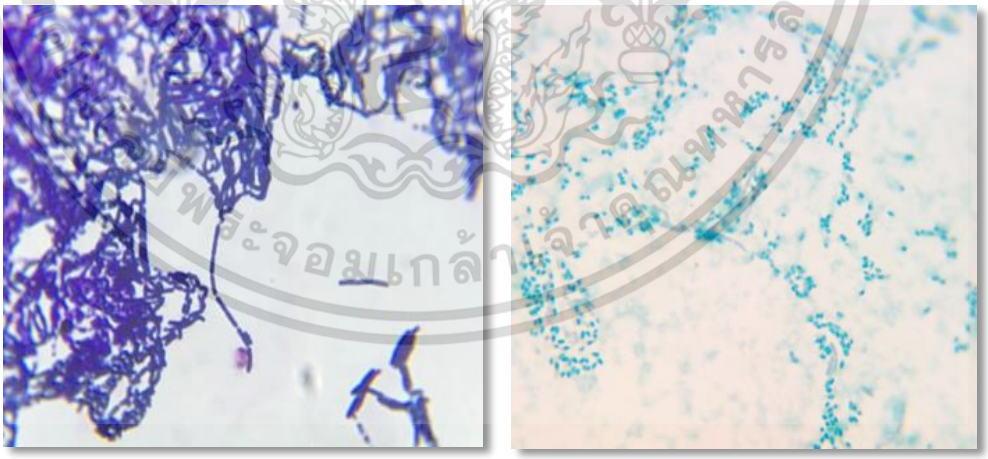
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในใบเตยสด

4.1.1 การปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus*

จากการทดสอบมีการสุ่มนำตัวอย่างใบเตยสดจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่มาจากการสุ่มตัวอย่างของโรงงานผลิตขนมหวานทั้งก่อนล้างทำความสะอาดและหลังล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา เพื่อนำมาเพาะเชื้อบนอาหาร MYP agar ผลตามตารางที่ 4.1 พบว่า ใบเตยสดก่อนการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจำนวน 5 ตัวอย่าง พบมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.41 – 3.86 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.28 – 3.62 log CFU/g และใบเตยสดหลังการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจำนวน 5 ตัวอย่าง พบมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.23 – 3.68 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.15 – 3.60 log CFU/g โดยส่วนใหญ่จะพบเชื้อในรูปของสปอร์ที่ทนความร้อน และเมื่อนำเชื้อที่ตรวจพบไปทดสอบทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและย้อมสปอร์เพื่อยืนยันลักษณะรูปร่างของเชื้อพบว่ามีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่ ย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต ตามภาพที่ 4.1 (ก) จึงจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก และโคโลนีส่วนใหญ่มีการสร้างเอนโดสปอร์รูปไข่และติดสีเขียวภายในเซลล์ ตามภาพที่ 4.1 (ก) (ข)



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.1 (ก) ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* และ (ข) ลักษณะสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ก่อนและหลังการล้างทำความสะอาดใบเตยสดด้วยน้ำประปา

ตัวอย่างใบเตยสด		จำนวนเชื้อ *B. cereus* ที่ตรวจพบในตัวอย่าง (log CFU/g)		ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *B. cereus*	
		Total	**Spores**	**ย้อมแกรม**	**ย้อมสปอร์**
รุ่นการผลิต 1	ก่อนการล้าง	3.56	3.52	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
	หลังการล้าง	3.43	3.32	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
รุ่นการผลิต 2	ก่อนการล้าง	3.41	3.28	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
	หลังการล้าง	3.23	3.15	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
รุ่นการผลิต 3	ก่อนการล้าง	3.54	3.48	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
	หลังการล้าง	3.46	3.41	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
รุ่นการผลิต 4	ก่อนการล้าง	3.71	3.59	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
	หลังการล้าง	3.68	3.53	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
รุ่นการผลิต 5	ก่อนการล้าง	3.86	3.62	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว
	หลังการล้าง	3.63	3.60	มีลักษณะเป็นแท่ง ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่	รูปไข่สีเขียว

จากการทดลองใบเตยจำนวน 10 ตัวอย่าง (100%) ที่มาจากการสุ่มตัวอย่างในอุตสาหกรรมโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar พบใบเตยสดก่อนการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปามีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.41 – 3.86 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.28 – 3.62 log CFU/g ซึ่งการตรวจพบเชื้อกลุ่ม *B. cereus* เป็นส่วนมากในใบเตยสดนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของสายรุ้ง (2558) ที่พบว่าใบเตยสดที่ใช้ในการผลิตไส้สังขยามีการปนเปื้อนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *B. cereus* จำนวน 19 ตัวอย่าง จากตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง โดยพบปริมาณการปนเปื้อน 3.40±0.45 log CFU/g และจากผลการทดลองการตรวจเชื้อ *B. cereus* ในใบเตยสดหลังการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาของโรงงานนี้ พบว่า ยังคงมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.23 – 3.68 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.15 – 3.60 log CFU/g โดยส่วนใหญ่จะพบเชื้อในรูปของสปอร์ที่ทนความร้อน ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการล้างทำความสะอาดใบเตยของโรงงานดังกล่าวใช้การล้างแบบจุ่มแช่ใบเตยทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วจึงนำขึ้นสะเด็ดน้ำ ซึ่งการล้างใบเตยในลักษณะดังกล่าวมีผลทำให้เซลล์เชื้อ และ สปอร์ของ *B. cereus* ซึ่งหลุดออกจากใบในขณะแช่ สามารถกลับติดในใบเตยได้อีกภายหลังจากนำใบเตยที่ผ่านการแช่นี้ขึ้นมาสะเด็ดน้ำ สอดคล้องกับรายงานการทำความสะอาดสมุนไพรที่นิยมใช้ทั่วไปด้วยน้ำเปล่า ของพิมพ์เพ็ญ และ สาทิป (2555) ซึ่งได้ทำการทดลอง พบว่า หลังจากการล้างขมิ้น ใบเตย และดอกอัญชัน ด้วยน้ำเปล่าเป็นเวลา 30 วินาที พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ลดลงเหลือ 4.76, 5.82 และ 4.79 log CFU/g หรือลดลงได้ 1.69, 1.59 และ 1.05 log CFU/g คือลดลง 97.93, 97.45 และ 91.01 จากปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น โดยพบว่าใบเตยมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูงสุดเนื่องจากเป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลูกได้ดีตามชายน้ำ มีลำต้นเตี้ย โคนต้นแช่อยู่ในดินโคลนแฉะ จึงมีโอกาสปนเปื้อนได้สูงมาก อีกทั้งส่วนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบคือ ใบซึ่งมีพื้นผิวสัมผัสมาก ลักษณะใบเป็นกาบ เรียงทับซ้อนกัน ทำให้ง่ายต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ และขั้นตอนการล้างเป็นเพียงการกำจัดสิ่งสกปรก และลดการปนเปื้อนที่พื้นผิวของวัตถุดิบ แต่การล้างพื้นผิวด้วยน้ำเปล่าหรือน้ำประปาสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่มากนัก ส่วนใหญ่ลดได้เพียง 1 log CFU/g เมื่อเทียบกับการใช้สารฆ่าเชื้อ และการผลิตน้ำประปาของการประปานครหลวงใช้มาตรฐานขององค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2536 น้ำต้องมีปริมาณคลอรีนอิสระตกค้างไม่น้อยกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรในท่อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในภายหลัง คลอรีนที่ตรวจพบในน้ำประปาคือคลอรีนตกค้างอิสระซึ่งอยู่ในช่วง 0.2 – 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (การประปานครหลวง, 2555)

เมื่อได้สุ่มนำเชื้อที่พบจากการศึกษานี้ไปตรวจสอบทางชีวเคมีกับสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า เชื้อที่สุ่มไปตรวจสอบได้รับการยืนยันว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* ซึ่งการตรวจพบเชื้อในรูปสปอร์ดังกล่าวมากในใบเตยสดและไม่สามารถล้างออกได้ง่าย เนื่องจากการล้างของโรงงานดังกล่าวเป็นการล้างแบบแช่น้ำเพียง 1 ครั้ง ซึ่งการล้างในลักษณะนี้สปอร์หรือเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่อาจหลุดออกจากใบได้ในขณะที่มีการแช่น้ำ แต่เมื่อนำใบเตยขึ้นจากน้ำล้างไปสะเด็ดน้ำก่อนนำมาใช้ในการผลิต เชื้อและสปอร์ที่หลุดออกอาจติดกลับเข้าในใบที่ล้างเพิ่มขึ้นอีก ได้ทำให้สปอร์ยังคงตรวจพบในปริมาณที่ไม่ต่างจากก่อนล้างทำความสะอาดใบเตยด้วยน้ำประปามากนัก ซึ่งจากการตรวจพบสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่มากในใบเตยดังกล่าวนี้ มีผลทำให้อาหารหรือขนมหลายชนิดที่มีใบเตยเป็นส่วนประกอบในการผลิตพบเชื้อนี้ ดังรายงานของสายรุ้ง (2558) ผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลา และการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย พบว่าได้สุ่มตัวอย่างสังขยาใบเตยมาจำนวน 20 รุ่นการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

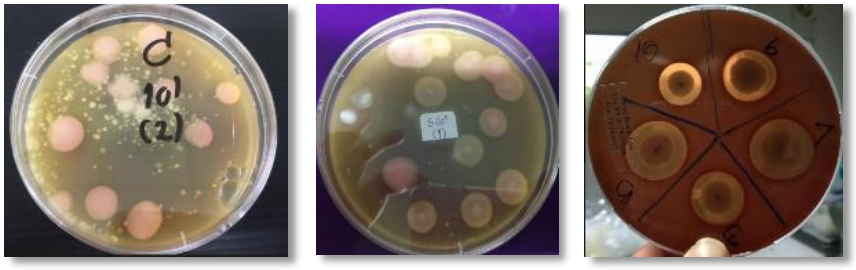
ตรวจพบมีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* จำนวน 9 ตัวอย่าง ปริมาณตั้งแต่ 2.0 ถึง 3.9 log CFU/g โดยในวันที่ 0 พบ 3 ตัวอย่าง, วันที่ 1 พบ 5 ตัวอย่างและวันที่ 2 พบ 9 ตัวอย่าง โดยเชื้อ *B. cereus* ที่พบในใบเตยสดส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ที่ทนความร้อนสูง

ดังนั้นการแปรรูปอาหารเพื่อการบริโภคจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการทำความสะอาดที่เหมาะสมโดยเติมสารฆ่าเชื้อลงในน้ำล้างจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวเพิ่มขึ้น เช่น การใช้สารฆ่าเชื้อคลอรีนในรูปของสารละลายไฮโปคลอไรด์ ปริมาณ 50-200 ppm (Active chlorine) (พิมพ์เพ็ญ และ สาทิป, 2555) เพื่อลดปริมาณเชื้อให้เหลือน้อยในระดับที่ความร้อนในการแปรรูปอาหารสามารถทำลายให้หมดไปได้ และควรพิจารณาศึกษาหาขั้นตอนการผลิตที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญจนเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ตามกฎหมายในหมวดขนมหวานหรือขนมไทยและหมวดขนมอบที่มีไส้หรือไม่มีไส้ มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว น้อยกว่า 100 CFU / g (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) รวมทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์ขนมหวานขนมอบควรมีการเพิ่มขั้นตอนกระบวนการทำความสะอาดวัตถุดิบก่อนการนำไปใช้งาน, การควบคุมและตรวจสอบอุณหภูมิความร้อน เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ, อุณหภูมิในจัดเก็บวัตถุดิบและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ซึ่งสามารถช่วยลดปริมาณการปนเปื้อนและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

4.1.2 ผลการทดลองการยืนยันเชื้อ *B. cereus*

เมื่อนำใบเตยสดมาทำการตรวจวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างหั่นหยาบ โดยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เติม BPB และตีผสมให้เข้ากันด้วย stomacher นาน 2 นาที ปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตดูลักษณะเฉพาะของเชื้อ *B. cereus* บนอาหาร MYP โดยสุ่มเลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP ที่เป็นโคโลนีสีเฉพาะ ขอบของโคโลนีกลม แบน หยัก นูน มีสีขาวขุ่น และวงขุ่นรอบโคโลนีอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพู ตามภาพที่ 4.2 (ก) และ (ข) เพื่อนำมายืนยันเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* ด้วยการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากโคโลนีที่คัดเลือกมาเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* จะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า – ฮีโมไลซิส เกิดเคลียร์โซนใสรอบๆโคโลนีกว้างประมาณ 2-4 มิลลิเมตร ตามภาพที่ 4.2 (ค) และนำโคโลนีที่ต้องสงสัยยืนยันสายพันธุ์ที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของของเชื้อ *B. cereus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol – egg yolk – polymyxin (MYP) agar (ก) โคโลนีเชื้อจากใบเตยที่นับได้ก่อน Heat shock (ข) โคโลนีเชื้อที่นับได้จากใบเตยหลัง Heat shock (ค) หลังจากนำโคโลนีที่พบใน (ก) และ (ข) ทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะ(Hemolytic activity) ของเชื้อ *B. cereus* บนอาหาร Sheep Blood Agar

ตารางที่ 4.2 ผลการยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus* จากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Test items	**Code of sample**					
	PD1-PB	PD2-PB	PD4-PB	PD5-PB	PD8-PB	PD10-PB
Gram stain	+	+	+	+	+	+
NO_2	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+
V-P test	+	+	+	+	+	+
Glucose fermentation	+	+	+	+	+	+
Hemolyse	++	++	++	++	++	++
Rhizoid Growth	-	-	-	-	-	-
Tyrosine	+	+	+	+	+	+
Toxin crystal	-	-	-	-	-	-
Growth 43°C	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ สุ่มเลือกโคโลนีที่ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อดูการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep Blood Agar โดยสุ่มโคโลนี เพื่อยืนยันสายพันธุ์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากการตรวจสอบโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP โดยนำโคโลนีที่สงสัยโดยมีลักษณะเฉพาะของโคโลนี กลม แบน หยัก นูน มีสีขาวขุ่น และวงขุ่นรอบโคโลนี เนื่องจากมีการสร้างเอนไซม์เลซิทิเนส ซึ่งลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* ที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่เกิดการหมักแมนนิทอล โดยนำมาเพาะเลี้ยงใน TSA และทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (แบบเบต้า – ฮีโมไลซิส บนอาหาร sheep agar blood) โดยจะต้องมีเคลียร์โซนรอบโคโลนีขนาดใหญ่มากกว่า 2 มิลลิเมตร ส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์ที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเมื่อทดสอบการย้อมแกรม (Gram stain) ให้ผลเป็นบวก (+) เพราะเซลล์ติดสีม่วง มีลักษณะเป็นรูปแท่ง จึงจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก และเมื่อทดสอบการย้อมสปอร์พบว่าสปอร์เป็นวงรีติดสีเขียว เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test) ของเชื้อ พบว่าให้ผลเป็นบวก (+) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยเจริญแผ่ออกจากแนว stab เมื่อนำมาทดสอบการเกิดออกซิไดซ์ของไนเตรทให้ผลบวกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ (สีส้ม) สามารถเจริญและเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส สามารถย่อยสลายไทโรซีน สามารถสร้าง Acetyl methyl – carbinol (Voges-Proskauer (VP)) ให้ผลเป็นบวก (+) สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้แบบ Strongly Hemolysis ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อ และสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการสร้าง protein toxin crystal และไม่มีการเจริญแบบไรซอยด์ (Rhizoid growth) (ตารางที่ 4.2)

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในใบเตยสด โดยนำโคโลนีที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar เพื่อทดสอบยืนยันสายพันธุ์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ตารางที่ 4.2) จึงได้คัดเลือกเชื้อ *B. cereus* รหัส PD8-PB เพื่อนำไปทดสอบในการทดลองต่อไป เนื่องจากการเกิดลักษณะเคลียร์โซนรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar มีขนาดความกว้างมากกว่า 4 มิลลิเมตร และมีขนาดเคลียร์โซนใหญ่กว่าเชื้อรหัสอื่นๆ

4.2 ศึกษาระยะเวลาในการสัมผัสและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการทำลายเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในใบเตยสดจากโรงงานผลิตขนมหวานขนมอบแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร ตรวจพบมีการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ศึกษาระยะเวลาในการสัมผัสและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการทำลายเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในหลอดทดลอง โดยดูดเซลล์และสปอร์ เชื้อเริ่มต้นที่ 3 log CFU/ml และ 6 log CFU/ml ใส่หลอดปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย Letheen Broth และน้ำ DI ปลอดเชื้อ ปริมาตรรวม 9 มิลลิลิตร และเติมคลอรีนน้ำ 10% (100000 ppm) (ตารางที่ 3.1) เพื่อให้ได้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ppm ทิ้งให้มีการสัมผัสกันเป็นระยะเวลา 0 (สัมผัสโดยทันที), 5, 10, 15, 20, 25, 30 นาที โดยมีผลการทดลอง ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อเซลล์เชื้อ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

ผลการทดลองในตารางที่ 4.3 ที่ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/ml พบว่าหลอดที่ไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm ในช่วงเวลา 0-30 นาทีปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที พบเชื้ออยู่ในช่วง 3.42 -3.58 log CFU/g สามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 1.10 – 5.79 และที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที พบเชื้ออยู่ในช่วง 2.09 -2.45 log CFU/g สามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 32.3 – 42.4 ซึ่งสภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถลดปริมาณเซลล์ของเชื้อได้คือ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 15 นาที

ผลการทดลองในตารางที่ 4.4 ที่ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml พบว่าหลอดที่ไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm ในช่วงเวลา 0-30 นาที ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที พบเชื้ออยู่ในช่วง 6.29 -6.31 log CFU/g สามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ0.16 – 0.50 ในระยะเวลาในการสัมผัสที่ 20 - 30 นาที และที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที พบเชื้ออยู่ในช่วง 5.26 – 5.30 log CFU/g สามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 16.1 – 16.8 ซึ่งสภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถลดปริมาณเซลล์ของเชื้อได้คือ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 30 นาที

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* โดยการจำลองวิธีการฆ่าเชื้อในหลอดทดลองนั้นสารประกอบในกลุ่มคลอรีนเป็นสารที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งคลอรีนจะไปมีผลต่อกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยคลอรีนเข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับ DNA ในส่วนของเบสพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) ทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์และไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ นอกจากนี้สารคลอรีนยังเข้าไปทำปฏิกิริยาที่หมู่อะมิโนในโปรตีนที่บริเวณห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเอนคลอโร (N-chloro compound) ที่เป็นพิษและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายส่งผลต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารภายนอกเซลล์และภายในเซลล์เสียสมดุล และส่งผลให้สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) ทำให้เซลล์ขาดสารอาหาร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตโดนขัดขวางจนหยุดชะงัก ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Davidson et.al, 1997) นอกจากนี้คลอรีนยังเข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับโปรโตพลาสมของเซลล์ (cell membrane) ทำให้โปรตีนของเซลล์จุลินทรีย์เกิดการตกตะกอน เนื่องจากเข้าไปทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฮดริล (sulfhydryl redical) ของโปรตีนและของเอนไซม์ ทำให้กระบวนการเผาผลาญกลูโคสของเซลล์หยุดชะงัก เซลล์จึงขาดพลังงาน ทำให้ส่งผลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการเมตาบอลิซึมเสียผิดปกติ รวมทั้งรบกวนระบบการทำงานของเอนไซม์ (สุมณฑา, 2547) สอดคล้องกับงานวิจัยของ อลิสรา (2546) รายงานการควบคุมปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว พบว่า มีสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในปริมาณ 10-100 CFU/g โดยปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบ ได้แก่ ถั่วเหลือง แป้งสาลี และหัวเชื้อ *A.oryzae* และกระบวนการผลิต พบว่าความร้อนที่ใช้ในการต้มหรือนึ่งถั่วเหลืองและคั่วแป้งไม่สามารถลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ได้ เมื่อใช้สารทำความสะอาด 3 ชนิด คือ tri–sodium phosphate, sodium hypochorite และ calcium hypochorite และสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ Tween 80 และ dialkyldimethylammonium chloride พบว่า sodium hypochorite และ calcium hypochorite เข้มข้น 200 ppm ลดเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ได้ดีที่สุด คือ 4.3 และ 2.9 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อหมักเต้าเจี้ยวด้วยถั่วเหลืองเตรียมโดยแช่ด้วย calcium hypochorite ความเข้มข้น 200 ppm แป้งสาลีฉายรังสีแกมมาและหรือแป้งสาลีที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่ระดับ 750 วัตต์ 15 นาที และเชื้อบริสุทธิ์ *A.oryzae* ไม่พบเชื้อ *B. cereus* ตลอดระยะเวลาหมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน เช่นเดียวกับ Kondo และคณะ (2005) รายงานการศึกษาประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium DT104 และ *S. aureus* ในผักกาดหอมที่ตัดแต่งแล้ว พบว่า ในผักกาดหอมมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ 6-7 log CFU / g โดยใบด้านในปนเปื้อนน้อยกว่าด้านนอก 1-2 log CFU / g โดยพบว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm ร่วมกับการใช้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สามารถลดเชื้อก่อโรคได้ร้อยละ 94 – 98 (1.2 – 1.7 log cycle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/ml ในหลอดทดลอง

ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ NaOCl (ppm)	ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอด (log CFU/ml)													
	0 นาที	ร้อยละการลดลง	5 นาที	ร้อยละการลดลง	10 นาที	ร้อยละการลดลง	15 นาที	ร้อยละการลดลง	20 นาที	ร้อยละการลดลง	25 นาที	ร้อยละการลดลง	30 นาที	ร้อยละการลดลง
0	3.62 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.62 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.63 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.63 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.63 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.64 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.63 ± 0.01^{Aa}	0.00
50	3.58 ± 0.02^{Ab}	1.10	3.56 ± 0.01^{Aa}	1.66	3.52 ± 0.02^{Bb}	3.03	3.47 ± 0.03^{Cb}	4.41	3.45 ± 0.01^{Cb}	5.00	3.44 ± 0.01^{CDb}	5.50	3.42 ± 0.00^{Db}	5.79
100	2.45 ± 0.02^{Ac}	32.3	2.38 ± 0.07^{Ab}	34.3	2.21 ± 0.04^{Bc}	39.1	2.12 ± 0.05^{Cc}	41.6	2.11 ± 0.03^{Cc}	41.9	2.10 ± 0.05^{Cc}	42.3	2.09 ± 0.05^{Cc}	42.4

หมายเหตุ : 0 นาที หมายถึง ระยะเวลาที่สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์สัมผัสโดยทันที, NaOCL หมายถึง โซเดียมไฮโปคลอไรท์, การทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ A-D ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเดียวกันต่อระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก a-c ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อระยะเวลาสัมผัสเดียวกัน ต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

$$\text{ร้อยละการลดลงของเชื้อ} = \frac{[\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)}} \times 100$$

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/ml ในหลอดทดลอง

ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ NaOCl (ppm)	ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอด (log CFU/ml)													
	0 นาที[ns]	ร้อยละการลดลง	5 นาที	ร้อยละการลดลง	10 นาที	ร้อยละการลดลง	15 นาที	ร้อยละการลดลง	20 นาที	ร้อยละการลดลง	25 นาที	ร้อยละการลดลง	30 นาที	ร้อยละการลดลง
0	6.32 ± 0.03^{Aa}	0.00	6.31 ± 0.02^{Aa}	0.00	6.31 ± 0.02^{Aa}	0.00	6.31 ± 0.02^{Aa}	0.00	6.32 ± 0.02^{Aa}	0.00	6.32 ± 0.02^{Aa}	0.00	6.32 ± 0.02^{Aa}	0.00
50	6.31 ± 0.02^{Aa}	0.16	6.31 ± 0.01^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.02^{Aa}	0.16	6.30 ± 0.01^{Aa}	0.16	6.30 ± 0.02^{Aa}	0.32	6.29 ± 0.02^{Aa}	0.50	6.29 ± 0.02^{Aa}	0.50
100	5.30 ± 0.02^{Ab}	16.1	5.29 ± 0.01^{ABb}	16.2	5.29 ± 0.01^{ABCb}	16.2	5.28 ± 0.01^{ABCDb}	16.3	5.27 ± 0.01^{BCDb}	16.6	5.27 ± 0.02^{CDb}	16.6	5.26 ± 0.01^{Db}	16.8

หมายเหตุ : 0 นาที หมายถึง ระยะเวลาที่สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์สัมผัสโดยทันที, NaOCL หมายถึง โซเดียมไฮโปคลอไรท์, การทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ A-D ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเดียวกันต่อระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก a-b ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อระยะเวลาสัมผัสเดียวกัน ต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

$$\text{ร้อยละการลดลงของเชื้อ} = \frac{[\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml}} \times 100$$

4.2.1 ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อสปอร์เชื้อ *B. cereus* ในหลอดทดลอง

ผลการทดลองในตารางที่ 4.5 ที่ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/ml พบว่าหลอดที่ไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm ในช่วงเวลา 0-30 นาที ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที พบปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 3.51 – 3.56 log CFU/g สามารถลดจำนวนสปอร์ลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 1.13 – 1.40 และที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที พบปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 3.47 - 3.48 log CFU/g สามารถลดจำนวนสปอร์ลงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 1.40 -2.80 ซึ่งสภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถลดปริมาณสปอร์ของเชื้อได้คือ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัส 10 นาที

ผลการทดลองในตารางที่ 4.6 ที่ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml พบว่าหลอดที่ไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm และหลอดที่มีการเติมสารฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 ppm ในระยะเวลาในการสัมผัส 0-30 นาที ปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ที่เหลือรอดอยู่ที่ 6.29 -6.30 log CFU/g ซึ่งผลของระยะเวลาในการสัมผัสและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งปริมาณสปอร์ที่มีจำนวนลดลงบางส่วนอาจเนื่องมาจากสปอร์บางส่วนอาจจะยังเป็นสปอร์อิสระ (free endorspore) ที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้การทนต่อสภาวะแวดล้อมได้โดยไม่ต้องมีน้ำและอาหาร ทำให้ทนต่อความร้อนได้สูง ทนต่อความแห้งแล้ง การแช่เยือกแข็งลดลง

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสปอร์จะสามารถทำลายได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อคลอรีนได้มากกว่าเซล์ 10-10000 เท่า (Davidson, 1997) และการสร้างสปอร์เริ่มจากการแบ่ง DNA ในเซลล์ปกติของแบคทีเรีย (Vegetative cell) ซึ่งเป็นเซลล์แม่ (Mother cell) โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่จะพัฒนาเป็นสปอร์ เรียก forspore จะเริ่มสร้างผนังหุ้ม (Spore coat) ขึ้นภายในหลังจากนั้นเซลล์แม่จะหุ้มสปอร์ไว้ภายในเซลล์ ผนังหุ้มสปอร์จะพัฒนาให้หนาและแข็งแรงขึ้นโดยแคลเซียมจากภายนอกเซลล์จะแพร่เข้าไปในเซลล์ และน้ำภายในเซลล์จะถูกขับออกมา เมื่อสปอร์พัฒนาเต็มที่ เซลล์แม่จะสลายไป สปอร์ที่เป็นอิสระ (Free endorspore) จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์แม่ ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมได้โดยไม่ต้องมีน้ำและอาหาร ทำให้ทนต่อความร้อนได้สูง ทนต่อความแห้งแล้ง การแช่เยือกแข็ง (พิมเพ็ญและคณะ, มปป.) นอกจากนี้โครงสร้างของเอนโดสปอร์จะประกอบด้วยชั้นต่างๆ จำนวน 5 ชั้น ซึ่งประกอบไปด้วย ชั้นสปอร์บอดี (Spore body) ผนังสปอร์ (Spore wall) สปอร์คอร์เทกซ์ (Spore cortex) สปอร์โคท (Spore coat) และเอกโซสปอเรียม (Exosporium) ซึ่งชั้นสปอร์คอร์เทกซ์ เป็นชั้นที่มีปริมาตรมากที่สุด โดยมีถึงประมาณครึ่งหนึ่งของสปอร์ทั้งหมด และหนาที่สุด เป็นชั้นที่ทนต่อความร้อนได้ดีที่สุดประกอบด้วยเกลือแคลเซียมของกรดไดพิโคลินิก (Dipicolonic acid) และชั้นสปอร์โคท เป็นชั้นที่ทนทานมาก มีความหนาและเหนียวมาก ซึ่งชั้นนี้จะปกป้องการย่อยด้วยไลติกเอนไซม์ เพราะประกอบไปด้วยสารเคราติน และซีสทีนจึงทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมระหว่างพอลิเพปไทด์ ทำให้สปอร์ทนต่อการซึมผ่านสารได้ดี (ปิยะนุช, 2564) ซึ่งกลไกของคลอรีนจะทำให้เยื่อหุ้มสปอร์เกิดการฉีกขาด ซึ่งคลอรีนจะเข้าไปทำให้สปอร์เกิดการสูญเสียแคลเซียมอิออน กรดไดพิโคโลนิก (Dipicolonic acid) และสารพันธุกรรม (RNA และ DNA) ส่งผลให้สปอร์มีอัตราการงอกลดลง(Davidson, 1997) แต่ปริมาณของคลอรีนต้องมีความเข้มข้นและการแตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัสมากเพียงพอที่จะทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของเอนโดสปอร์ได้

ดังนั้นช่วงสภาวะที่เหมาะสมที่ได้คัดเลือกนำไปทดสอบการจำลองการล้างทำความสะอาดใบเตยสดในการทดลองต่อไป คือสภาวะความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm สัมผัสเป็นระยะเวลา 10 นาที เนื่องด้วยช่วงเวลาสัมผัสสารฆ่าเชื้อ 10 นาที ทำให้เกิดการตกค้างของกลิ่นที่เกิดขึ้นที่มาจากสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์อยู่ในปริมาณที่ไม่ส่งผลต่อกลิ่นในผลิตภัณฑ์ จากผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์สุดท้ายตามอายุสินค้าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่จะต้องไม่พบ *B. cereus* เกิน 1000 CFU/g (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) และเวลาของขั้นตอนการล้างทำความสะอาดสอดคล้องกับการทำงานรูปแบบเดิมของทางโรงงานที่มีการทำความสะอาดใบเตยสดด้วยน้ำประปา และที่ปริมาณสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ทำให้ปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* ที่เหลือรอดสามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้ร้อยละ 39.1 และร้อยละ 16.2 จากปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/ml และปริมาณเซลลเริ่มต้นที่ 6 log CFU/ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 3 log CFU/ml ในหลอดทดลอง

ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ NaOCl (ppm)	ปริมาณสปอร์ *B. cereus* ที่เหลือรอด (log_{10} CFU/ml)													
	0 นาที	ร้อยละการลดลง	5 นาที	ร้อยละการลดลง	10 นาที	ร้อยละการลดลง	15 นาที	ร้อยละการลดลง	20 นาที	ร้อยละการลดลง	25 นาที	ร้อยละการลดลง	30 นาที	ร้อยละการลดลง
0	3.56 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.57 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.58 ± 0.03^{Aa}	0.00	3.56 ± 0.02^{Aa}	0.00	3.56 ± 0.01^{Aa}	0.00	3.57 ± 0.02^{Aa}	0.00	3.56 ± 0.03^{Aa}	0.00
50	3.56 ± 0.02^{Aa}	0.00	3.53 ± 0.03^{Aa}	1.13	3.54 ± 0.03^{Aa}	1.12	3.54 ± 0.03^{Aa}	0.56	3.53 ± 0.03^{Aa}	0.84	3.52 ± 0.03^{Ab}	1.40	3.51 ± 0.03^{Aab}	1.40
100	3.48 ± 0.01^{Ab}	2.25	3.52 ± 0.01^{Ab}	1.40	3.49 ± 0.02^{Bb}	2.51	3.49 ± 0.02^{Bb}	2.00	3.48 ± 0.01^{Bb}	2.24	3.47 ± 0.02^{Bc}	2.80	3.47 ± 0.01^{Bb}	2.53

หมายเหตุ : 0 นาที หมายถึง ระยะเวลาที่สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์สัมผัสโดยทันที, NaOCL หมายถึง โซเดียมไฮโปคลอไรท์, การทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ A-B ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเดียวกันต่อระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก a-b ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อระยะเวลาสัมผัสเดียวกัน ต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

$$\text{ร้อยละการลดลงของเชื้อ} = \frac{[\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)}} \times 100$$

ตารางที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาในการสัมผัสต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 6 log CFU/ml ในหลอดทดลอง

ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ NaOCl (ppm)	ปริมาณสปอร์ *B. cereus* ที่เหลือรอด (log CFU/ml)													
	0 นาที	ร้อยละการลดลง	5 นาที	ร้อยละการลดลง	10 นาที	ร้อยละการลดลง	15 นาที	ร้อยละการลดลง	20 นาที	ร้อยละการลดลง	25 นาที	ร้อยละการลดลง	30 นาที	ร้อยละการลดลง
0	6.30 ± 0.0^{Aa}	0.00	6.31 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.31 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.31 ± 0.00^{Aa}	0.00
50	6.30 ± 0.0^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.16	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.16	6.29 ± 0.00^{Aa}	0.16	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.16
100	6.30 ± 0.0^{Aa}	0.00	6.29 ± 0.00^{Aa}	0.32	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.00	6.29 ± 0.00^{Aa}	0.16	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.16	6.29 ± 0.00^{Aa}	0.16	6.30 ± 0.00^{Aa}	0.16

หมายเหตุ : 0 นาที หมายถึง ระยะเวลาที่สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์สัมผัสโดยทันที, NaOCL หมายถึง โซเดียมไฮโปคลอไรท์, การทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเดียวกันต่อระยะเวลาที่แตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p > 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่เหลือรอดต่อระยะเวลาสัมผัสเดียวกัน ต่อปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p > 0.05$)

$$\text{ร้อยละการลดลงของเชื้อ} = \frac{[\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)}} \times 100$$

4.3 ศึกษาผลของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* จากการล้างใบเตยสด

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาในการสัมผัส ซึ่งได้สภาวะในการนำมาทดสอบในกระบวนการล้างคือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm และระยะเวลาในการสัมผัส 10 นาที เพื่อทดสอบการล้างใบเตยสดที่มีการปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติที่ 3 log CFU/g และใบเตยสดที่มีการสร้างสภาวะการปนเปื้อนของเชื้อที่ 6 log CFU/g โดยมีการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำที่มีการผสมกับคลอรีนน้ำ 10% (100000 ppm) จนได้สารละลายที่ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการล้างทำความสะอาด เพื่อดูการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในใบเตยสด โดยมีผลการทดลอง ดังนี้

ผลการทดลองตารางที่ 4.7 ปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/g อยู่ที่ 3.60±0.06 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 2.30±0.06 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 36.1 พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 1.10±0.06 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 1.10±0.06 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 69.4 พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 1.10±0.06 log CFU/ml และปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/g อยู่ที่ 3.50±0.06 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 3.50±0.06 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.70±0.11 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอด 3.40±0.00 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 3.00 พบสปอร์มีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณสปอร์ คือ 0.50±0.06 log CFU/ml

ผลการทดลองตารางที่ 4.8 ปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/g อยู่ที่ 6.40±0.00 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 5.40±0.00 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 15.6 พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.80±0.10 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 4.40±0.05 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 31.3 พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.50±0.20 log CFU/ml และปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* เริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6 logCFU/g อยู่ที่ 6.4±0.00 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 6.4±0.00 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.80±0.00 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอด 6.30±0.00 log CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 1.56 พบสปอร์มีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณสปอร์ คือ 0.60±0.10 log CFU/ml

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่สามารถกำจัดเชื้อที่มีการยึดเกาะได้หมดเนื่องจากเตยหอมเป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลูกได้ดีตามชายน้ำ มีลำต้นเตี้ย โคนต้นแช่อยู่ในดินโคลนแฉะ จึงมีโอกาสปนเปื้อนได้สูงมาก อีกทั้งส่วนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบคือ ใบซึ่งมีพื้นผิวสัมผัสมาก ลักษณะใบเป็นกาบ เรียงทับซ้อนกัน ทำให้ง่ายต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ และขั้นตอนการล้างเป็นเพียงการกำจัดสิ่งสกปรก และลดการปนเปื้อนที่พื้นผิวของวัตถุดิบ รวมทั้งเชื้อ *B. cereus* เป็นเชื้อแกรมบวกซึ่งมีผนังเซลล์หนา และเป็นชั้นของ pepticoglycan รวมทั้งมีสปอร์ที่เป็นสภาวะการหยุดเจริญเติบโตชั่วคราว ที่ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมในหลากหลายรูปแบบ เช่น การใช้รังสียูวี การใช้สารเคมี การแช่แข็ง และจะกลับมาการงอกของสปอร์จะเพิ่มได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารอาหาร ทำให้อยู่รอดได้นาน ทำให้การควบคุมสปอร์เริ่มต้นทำได้ยาก ดังนั้นการควบคุมหลักจึงเป็นเพียงการป้องกันไม่ให้สปอร์งอกและเพิ่มจำนวนจนกระทั่งเป็นอันตรายได้ (พิมพ์เพ็ญและคณะ, มปป.) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองข้อ 4.2.2 ที่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ในเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่มีการเตรียมไว้ พบว่า เซลล์มีการบิดงอ เสียรูป เหี่ยวและตายเนื่องจากโซเดียมไอโปคลอไรท์ไปมีผลที่เยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนของเชื้อ (สุมณฑา, 2547) ส่วนสปอร์ยังคงมีรูปร่างรี ลักษณะภายนอกคล้ายเส้นเชือกที่ถักเป็นรังนก รูปร่างคงเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเอนโดสปอร์ประกอบไปด้วยชั้นต่างๆ 5 ชั้น ซึ่งมีบางชั้นที่หนา และทนทานได้มาก (ปิยะนุช, 2564)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัสนาน 10 นาที ต่อปริมาณการเหลือรอดเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* บนใบเตยสด และการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ในน้ำล้างที่ใช้ในทำความสะอาดใบเตยสด ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/g

	เชื้อเริ่มต้นก่อนนำไปล้างทำความสะอาด (log CFU/g)	**เชื้อที่เหลือรอดบนใบเตยสดหลังล้างด้วยน้ำประปา (log CFU/g)**	**ร้อยละการลดลงของเชื้อ**	**เชื้อที่เหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้างใบเตยสด (log CFU/ml)**	**เชื้อที่เหลือรอดบนใบเตยสดหลังล้างด้วย NaOCl (log CFU/g)**	**ร้อยละการลดลงของเชื้อ**	**เชื้อที่เหลือรอดในน้ำล้าง NaOCl (100 ppm) ที่ใช้ล้างใบเตยสด (log CFU/ml)**
ปริมาณเชื้อทั้งหมด	3.60 ± 0.06^{A}	2.30 ± 0.06^{B}	36.1	1.10 ± 0.06^{C}	1.10 ± 0.06^{C}	69.4	0.60 ± 0.06^{D}
ปริมาณสปอร์	3.50 ± 0.06^{a}	3.50 ± 0.06^{ab}	0.00	0.70 ± 0.11^{c}	3.40 ± 0.00^{b}	3.00	0.50 ± 0.06^{d}

หมายเหตุ

NaOCl หมายถึง สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite

ตัวอักษร A-D ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณสปอร์ที่เหลือรอด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

$$\text{ร้อยละการลดลงของเชื้อ} = \frac{[\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)}} \times 100$$

ตารางที่ 4.8 ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาในการสัมผัสนาน 10 นาที ต่อปริมาณการเหลือรอดเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* บนใบเตยสด และการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ในน้ำล้างที่ใช้ในทำความสะอาดใบเตยสด ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/g

	เชื้อเริ่มต้นก่อนนำไปล้างทำความสะอาด (log CFU/g)	**เชื้อที่เหลือรอดบนใบเตยสดหลังล้างด้วยน้ำประปา (log CFU/g)**	**ร้อยละการลดลงของเชื้อ**	**เชื้อที่เหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้างใบเตยสด (log CFU/ml)**	**เชื้อที่เหลือรอดบนใบเตยสดหลังล้างด้วย NaOCl (log CFU/g)**	**ร้อยละการลดลงของเชื้อ**	**เชื้อที่เหลือรอดในน้ำล้าง NaOCl (100 ppm) ที่ใช้ล้างใบเตยสด (log CFU/ml)**
ปริมาณเชื้อทั้งหมด	6.40 ± 0.00^{A}	5.40 ± 0.00^{B}	15.6	0.80 ± 0.10^{D}	4.40 ± 0.05^{C}	31.3	0.50 ± 0.20^{E}
ปริมาณสปอร์	6.40 ± 0.00^{a}	6.40 ± 0.00^{a}	0.00	0.80 ± 0.00^{c}	6.30 ± 0.00^{b}	1.56	0.60 ± 0.10^{d}

หมายเหตุ

NaOCl หมายถึง สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) , การทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวอักษร A-E ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยของปริมาณสปอร์ที่เหลือรอด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ร้อยละการลดลงของเชื้อ $= \frac{[\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)}} \times 100$

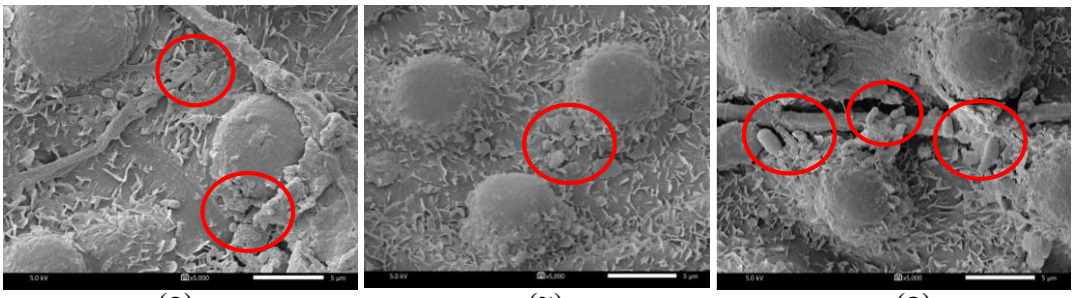
4.4 ลักษณะของใบเตยสด เซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* และการยับยั้งเซลล์และสปอร์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

4.4.1 ลักษณะของใบเตยสดด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

เมื่อศึกษากระบวนการล้างทำความสะอาดใบเตยสดด้วยการใช้น้ำประปา และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm เป็นระยะเวลาในการสัมผัส 10 นาที จึงได้นำใบเตยสดที่ยังไม่มีการล้างทำความสะอาด ใบเตยสดที่ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา และใบเตยที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 100 ppm หั่นเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กขนาด 1x1 เซนติเมตร โดยแบ่งใบเตยสดเป็นส่วนปลายใบ กลางใบ และโคนใบ เติมสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.4 เพื่อรักษาสภาพเซลล์ เพื่อนำไปทดสอบลักษณะโครงสร้างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM-EDS (รุ่น IT500HR) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีผลการทดลอง ดังนี้

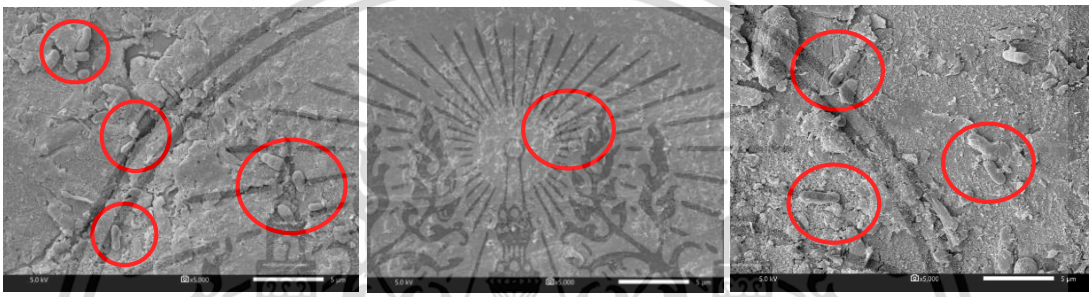
จากการส่องกราดโดยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM) ดังภาพที่ 4.3 (ก) (ข) (ค) และ 4.4 (ก) (ข) (ค) พบว่ามีการยึดเกาะของเชื้อ *B. cereus* บริเวณระหว่างเส้นร่างแหของใบของเตยหอม และรอบๆต่อมน้ำมันหอมระเหย โดยช่องว่างระหว่างต่อมน้ำมันหอมระเหย เส้นร่างแหของใบเป็นที่ยึดเกาะที่ดีสำหรับเชื้อจุลินทรีย์และหากส่วนของใบมีการยึดเกาะของดินหรือคราบฝุ่นสกปรก ยิ่งทำให้พบเชื้อบริเวณดังกล่าวชุกชุมยิ่งขึ้น ทั้งส่วนด้านหน้าและด้านหลังของใบ สอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 4.1.1 ที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อ *B. cereus* จะพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ เศษวัสดุที่กำลังย่อยสลาย รวมถึงอากาศซึ่งเชื้อจะติดไปกับพวกฝุ่นดินด้วย จึงทำให้พบในพืชผลทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ นมและผลิตภัณฑ์จากนม รวมถึงเนื้อสัตว์ โดยเชื้อที่ผลิตสารพิษที่ทำให้เกิดอาการอาเจียน ส่วนเชื้อที่ทำให้เกิดการท้องเสียจะเจอได้ดีในอาหารจำพวกข้าว หรือมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก (Granum, 2007) และยังสอดคล้องกับรายงานผลร่วมของสารละลายฆ่าเชื้อและความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และการยืดอายุการเก็บรักษาโหระพาที่สภาวะต่างๆที่มีการรายงานโครงสร้างจุลภาคของใบโหระพา โดยพบการยึดเกาะของเชื้อ *S.* Typhimurium ระหว่างช่องว่างบนพื้นผิวของก้านใบ และรอบๆต่อมน้ำมันหอมระเหยที่แพร่กระจายอยู่ทั่วไปบนใบ และช่องว่างระหว่างต่อมน้ำมันและพื้นผิวใบโดยรอบเป็นที่ยึดเกาะที่ดีสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบการยึดเกาะที่ร่างแหใบมากกว่าปากใบของโหระพา และเนื่องด้วยโหระพาเป็นพืชอายุสั้น ทำให้เสื่อมคุณภาพได้ง่ายจากการสูญเสียปริมาณน้ำภายในเซลล์ เซลล์คุมบนปากใบจะปิดลงเมื่อต้องเผชิญกับเชื้อจุลินทรีย์ และทำให้เกิดการยึดเกาะของเชื้อได้ยาก (ดุสิดา, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.3 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ บริเวณด้านหน้าของใบ แสดงเส้นร่างแหและต่อมน้ำมันหอมระเหยของเตยหอมกำลังขยาย 5000 เท่า

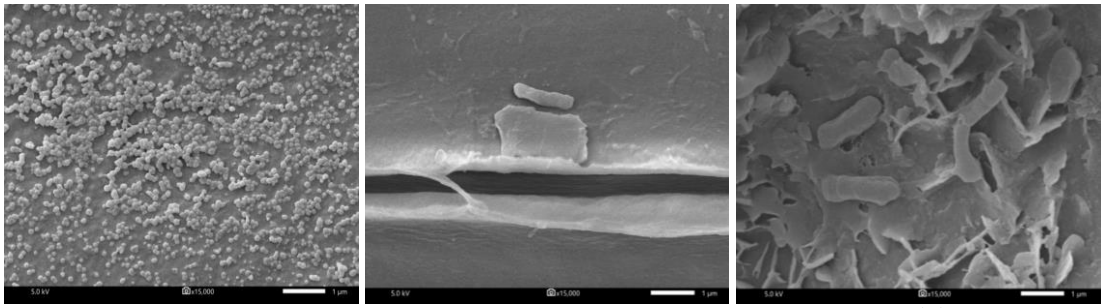


(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.4 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ บริเวณด้านหลังใบ ของเตยหอม ที่กำลังขยาย 5000 เท่า

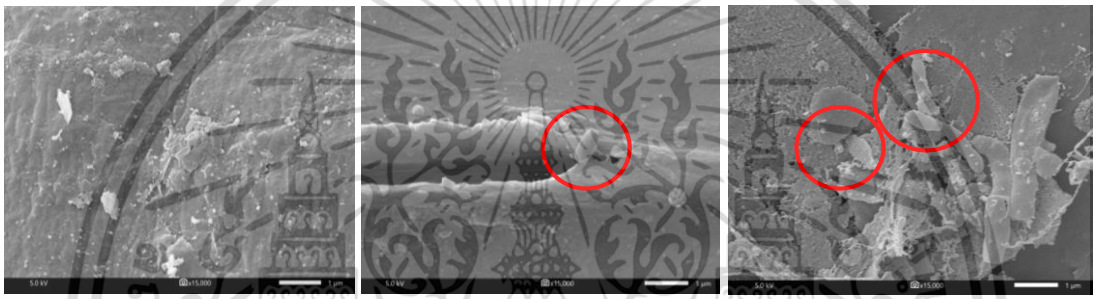
จากการส่องกราดโดยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM) ดังภาพที่ 4.5 (ก) (ข) (ค) มีการนำใบเตยสดที่ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยเกิดการแตกตัวกระจายเป็นอนุภาคเล็กๆ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจะสะสมอยู่ในผนังเซลล์ เป็นสารที่สามารถละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่โดยส่วนใหญ่จะมีสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหย (Calo et.al, 2015) และจะเห็นได้ว่าส่วนของปากใบจะปิดลง เนื่องจากเซลล์คุมที่อยู่ข้างปากใบ (grade cell) ซึ่งมีผนังด้านที่ติดกับปากใบหน้ากว่าด้านอื่นๆ เมื่อมีโพแทสเซียมไอออนในเซลล์คุมเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีความเข้มข้นของสารละลายมากขึ้น น้ำจากเซลล์ที่อยู่ติดกันจึงมีการออสโมซิส เข้าสู่เซลล์คุม ทำให้เซลล์คุมเต่งมากขึ้น เมื่อมีการล้างทำความสะอาดปริมาณน้ำภายในใบจะมาก ทำให้มีการคายน้ำออกมาก เซลล์ในใบขาดน้ำ แรงดันเต่งในเซลล์ของใบลดลงและทำให้ปากใบปิดลง (Biology, 2014) ส่งผลให้ปากใบปิดยึดเกาะเชื้อได้ยาก และ ภาพที่ 4.6 (ก) (ข) (ค) มีการนำใบเตยสดที่ล้างทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที พบว่า พื้นผิวใบไม่เห็นเส้นร่างแหและต่อมน้ำมันหอมระเหย และจะพบเชื้อจุลินทรีย์ยังคงมีการเกาะบนผิวใบเล็กน้อย และเชื้อจุลินทรีย์บางส่วนจะถูกกำจัดออกและจุลินทรีย์บางเซลล์ได้รับความเสียหาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.5 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ ของเตยหอม ที่ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า



(ก) (ข) (ค)

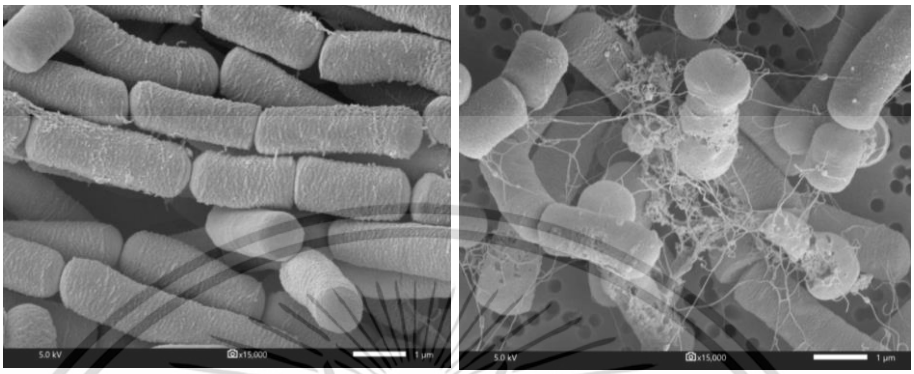
ภาพที่ 4.6 (ก) รูปส่วนโคนใบ (ข) รูปส่วนกลางใบ (ค) รูปส่วนปลายใบ ของเตยหอม ที่ล้างทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า

4.4.2 ลักษณะเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* และการยับยั้งเซลล์และสปอร์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

จากการศึกษาผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์กับระยะเวลาในการสัมผัสต่อเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในหลอดทดลอง เพื่อดูการเหลือรอดหลังจากเชื้อได้สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 ppm ต่อระยะเวลาในการสัมผัส 0(สัมผัสโดยทันที), 5, 10, 15, 20, 25, 30 นาที ในการทดลองนี้จึงได้เตรียมเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ตามข้อ 3.5.1.6.2 และ ข้อ 3.5.1.6.3 ตามลำดับโดยนำเซลล์และสปอร์ที่เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ (centrifuge) มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและเก็บส่วนที่เป็นตะกอนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ เตรียมเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ตามข้อ 3.5.1.6.2 และ ข้อ 3.5.1.6.3 ตามลำดับ เติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm สัมผัสไว้เป็นเวลา 10 นาที และนำเชื้อที่เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ (centrifuge) มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น

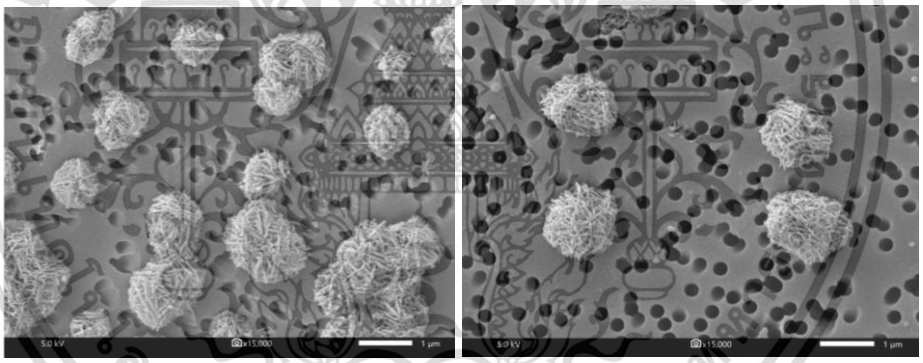
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทส่วนใสทิ้ง และเก็บส่วนที่เป็นตะกอนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.4 เพื่อนำไปทดสอบลักษณะโครงสร้างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM-EDS (รุ่น IT500HR) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีผลการทดลอง ดังนี้



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.7 (ก) รูปร่างเซลล์ของ *B. cereus* (ข) รูปร่างเซลล์ของ *B. cereus* ที่เติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า



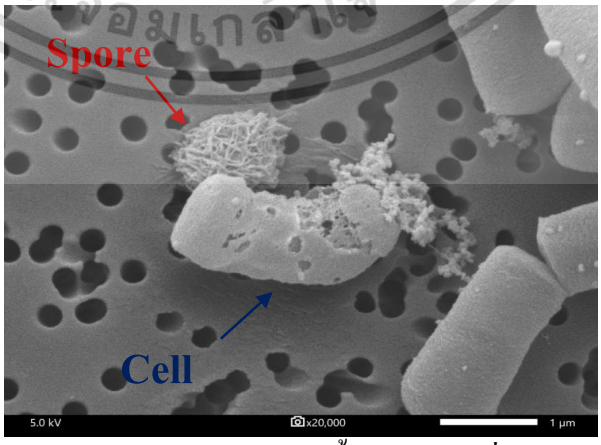
(ก) (ข)

ภาพที่ 4.8 (ก) รูปร่างสปอร์ของ *B. cereus* (ข) รูปร่างสปอร์ของ *B. cereus* ที่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 15000 เท่า

ผลการตรวจสอบลักษณะการยับยั้งเซลล์และสปอร์เชื้อ *B. cereus* ของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ *B. cereus* ที่คัดแยกได้จากใบเตยสดมีลักษณะเป็นรูปท่อนสมบูรณ์ ผนังเซลล์เรียบ ไม่มีรอยฉีกขาด (ภาพที่ 4.7 (ก)) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์ *B. cereus* ในหลอดที่มีเชื้อ *B. cereus* ร่วมกับการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สัมผัสเป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่4.7 (ข)) ลักษณะของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยพื้นผิวของเซลล์ขรุขระ ผนังเซลล์มีการฉีกขาดเสียหาย ลักษณะของเซลล์มีการบิดงอ ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไปทำให้ลักษณะเซลล์ไม่สมบูรณ์ ส่วนลักษณะโครงสร้างของสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีลักษณะรีคล้ายไข่ ผิวเป็นเส้นคล้ายรังนก (ภาพที่ 4.8 (ก)) และเมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ที่มีการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โครงสร้างของสปอร์ มีลักษณะรีคล้ายไข่ ผิวเป็นเส้นคล้ายรังนก ยังคงมีลักษณะคงเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 4.8 (ข)) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ *B. cereus* ที่พบเนื่องจากการทำงานของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) ที่ประกอบไปด้วยโซเดียม (Na^+) และไฮโปคลอไรท์ (OCl^-) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเมื่อเกิดการรวมตัวกับน้ำจะทำให้มีการแตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัส (Hypochlorus acid (HClO)) ซึ่งไปมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ส่วนที่มีการห่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เยื่อหุ้มสปอร์ (Spore coat) โดยคลอรีนทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลทำให้เกิดการสร้าง N-Chloro compounds รบกวนเมตาบอลิซึมของเซลล์ และมีผลให้คุณสมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกทำให้การดูดซึมสารละลายของผนังเซลล์เสียไป (Permeability damage) ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ทำให้เกิดการรั่วไหลของไอออนจากนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่าย และส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ หรือโปรโตพลาสม่า และส่วนที่เป็นโปรตีน พบว่า คลอรีนจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น กับส่วนโปรโตพลาสม่าของเซลล์ ไปตกตะกอนส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์และทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฟดริลของโปรตีน เกิดผลิตภัณฑ์แบบที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (Irreversible product) ทำให้เกิดการรบกวนการทำงานของเซลล์ รวมถึงไปมีผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์และสามารถทำลายตัวเอนไซม์ได้ ส่งผลให้สปอร์เกิดการฉีกขาด (Wei et al., 1985) ส่วนการทำลายสปอร์คือ กลไกที่ทำลายผนังเซลล์ ทั้งนี้เป็นเพราะเกิดการสูญเสียแคลเซียมไอออน กรดไดนิโคลินิค (RNA/DNA) และสปอร์สามารถทนต่อคลอรีนได้มากกว่าเซลล์ 10-10000 เท่า (Davidson, 1997) สอดคล้องกับผลความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 ppm และระยะเวลาในการสัมผัส 0 (สัมผัสโดยทันที), 5, 10, 15, 20, 25, 30 นาที ซึ่งสารฆ่าเชื้อสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลล์ของ *B. cereus* ได้บางส่วน แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสปอร์ของเชื้อได้ (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 รูปร่างเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่มีการเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 100 ppm เป็นเวลา 10 นาที ที่กำลังขยาย 20000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบเตยที่ผ่านการตัดแต่งโคนจำนวน 10 ตัวอย่าง ในอุตสาหกรรมโรงงานผลิตขนมหวานแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร พบใบเตยสดก่อนการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปามีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.41 -3.86 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.28 – 3.62 log CFU/g และจากตรวจเชื้อ *B. cereus* ในใบเตยสดหลังการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาของโรงงานนี้ พบว่า ยังคงมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3.23 – 3.68 log CFU/g อยู่ในรูปของสปอร์ตั้งแต่ช่วง 3.15-3.60 log CFU/g ซึ่งปริมาณเชื้อที่มีการตรวจพบในใบเตยสดของทางโรงงานมีจำนวนสปอร์จัดว่าอยู่ในปริมาณที่สูง

ผลของสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ 0 ppm 50 ppm และ 100 ppm กับระยะเวลาในการสัมผัส 0 (สัมผัสโดยทันที) – 30 นาที ต่อเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ที่ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/ml พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ppm เวลาสัมผัส 10-30 นาที สามารถลดเชื้อลงได้ในช่วงร้อยละ 1.10-5.79 และที่ความเข้มข้น 100 ppm เวลาสัมผัส 0-30 นาที สามารถลดเชื้อลงได้ในช่วงร้อยละ 32.3-42.4 และที่ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ppm เวลาสัมผัส 20-30 นาที สามารถลดเชื้อลงได้ในช่วงร้อยละ 0.16 – 0.50 และที่ความเข้มข้น 100 ppm เวลาสัมผัส 0-30 นาที สามารถลดเชื้อลงได้ในช่วงร้อยละ 16.1-16.8 และที่ปริมาณสปอร์ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/ml พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ppm เวลาสัมผัส 0-30 นาที สามารถลดสปอร์ได้ร้อยละ 0.56-1.40 และที่ความเข้มข้น 100 ppm เวลาสัมผัส 0-30 นาที สามารถลดสปอร์ลงได้ในช่วงร้อยละ 2.25-2.80 และที่ปริมาณสปอร์ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml ไม่สามารถลดปริมาณสปอร์ลงได้ จึงได้คัดเลือกช่วงสภาวะที่ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที ที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/ml ลงได้ร้อยละ 39.1 และสามารถลดปริมาณสปอร์ลงได้ร้อยละ 2.51 และที่ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/ml สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ร้อยละ 16.2 และ ไม่สามารถลดจำนวนสปอร์ลงได้

ผลของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จากการล้างใบเตยสดที่ปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/g อยู่ที่ 3.60±0.06 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 2.30±0.06 log CFU/ พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 1.10±0.06 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 1.10±0.06 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้าง ปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 1.10±0.06 log CFU/ml และปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 3 log CFU/g อยู่ที่ 3.50±0.06 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 3.50±0.06 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.70±0.11 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอด 3.40±0.00 log CFU/g พบสปอร์มีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณสปอร์ คือ 0.50±0.06 log CFU/ml และปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/g อยู่ที่ 6.40±0.00 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 5.40±0.00 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง ปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.8±0.10 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 4.40±0.05 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง ปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.50±0.20 log CFU/ml และปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* เริ่มต้น 6 log CFU/g อยู่ที่ 6.40±0.00 log CFU/g บนใบเตยสด พบว่า หลังจากการล้างโดยการแช่ในน้ำประปา ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เหลือรอด 6.40±0.00 log CFU/g พบเชื้อมีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำประปาที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณเชื้อทั้งหมด คือ 0.80±0.00 log CFU/ml และเมื่อนำใบเตยสดแช่ด้วยสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ระยะเวลา 10 นาที ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอด 6.30±0.00 log CFU/g พบสปอร์มีการหลุดออกจากผิวใบและเหลือรอดในน้ำผสมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้าง โดยพบปริมาณสปอร์ คือ 0.60±0.10 log CFU/ml

ผลการตรวจสอบลักษณะการยับยั้งเซลล์และสปอร์เชื้อ *B. cereus* ของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ *B. cereus* มีลักษณะเป็นรูปท่อนสมบูรณ์ ผนังเซลล์เรียบ ไม่มีรอยฉีกขาด เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์ *B. cereus* ในหลอดที่มีเชื้อ *B. cereus* ร่วมกับการเติมสารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm สัมผัสเป็นเวลา 10 นาที พบว่าผนังเซลล์มีการฉีกขาดเสียหาย บิดงอ ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไปทำให้ลักษณะเซลล์ไม่สมบูรณ์ และพบการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ บนพื้นผิวของใบระหว่างเส้นร่างแห และต่อมน้ำมันหอมระเหย

ดังนั้นการแปรรูปอาหารเพื่อการบริโภคที่มีใบเตยสดเป็นส่วนประกอบจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการล้างทำความสะอาดใบเตยสดที่เหมาะสม เพื่อลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนให้เหลือน้อยในระดับที่ความร้อนในการแปรรูปอาหารสามารถทำลายเชื้อ เพื่อลดปัญหาอันตรายต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้ใบเตยสดเป็นองค์ประกอบในการผลิตอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ปรับปรุงกระบวนการล้างทำความสะอาดใบเตยหลังการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้วเสร็จให้นำมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยโอโซน เพื่อลดและกำจัดเชื้อเริ่มต้นที่มาจากใบเตยก่อนนำมาใช้งานได้เพิ่มขึ้น

5.2.2 กระบวนการผลิตไส้ขนมหวานที่มีใบเตยเป็นองค์ประกอบ เช่นไส้สังขยาใบเตย ควรต้องมีการควบคุมกระบวนการผลิตที่ดี เช่น การควบคุมอุณหภูมิหม้อกวน และระยะเวลาในการให้ความร้อน รวมทั้งควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและส่วนผสมที่ใช้ โดยกำหนดค่ามาตรฐานที่ทางโรงงานยอมรับได้จากผู้ผลิตวัตถุดิบ เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนเข้าโรงงาน ตลอดจนการเก็บรักษาใบเตยสดที่ใช้งาน รวมถึงการควบคุมอุณหภูมิไส้กวนและระยะเวลาในการใช้งาน รวมทั้งสภาวะการจัดเก็บ และการขนส่งไส้เพื่อนำไปผลิตผลิตภัณฑ์ของทางโรงงาน โดยขั้นตอนการปฏิบัติดังกล่าวจะช่วยในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มาจากกระบวนการผลิตได้

5.2.3 ในการทดลองการใช้สารฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปรคลอไรท์เมื่อได้ผลการทดลองเบื้องต้นมาใช้ในกระบวนการล้างทำความสะอาด และเป็นข้อมูลในการกำหนดวิธีการทำความสะอาดที่เหมาะสมกับทางโรงงาน รวมทั้งการจัดเก็บของวัตถุดิบใบเตยสดที่เหมาะสม และควรมีการวิเคราะห์ข้อมูลในแง่ของคุณภาพ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ รวมถึงด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัสต่อการยอมรับของผู้บริโภคหากมีการใช้สารเคมีที่อาจส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติเมื่อนำวัตถุดิบไปทำไส้ขนม จะทำให้งานวิจัยมีความครบถ้วนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

5.2.4 ในการทดลองเป็นการใช้สารฆ่าเชื้อในกลุ่มคลอรีน เพื่อเป็นข้อมูลให้กับทางโรงงานพัฒนาต่อยอดเกี่ยวกับการใช้สารเคมีตัวอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2562. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 412 เรื่อง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อที่ใช้สาหรับอาหาร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2562/E/278/T_0034.PDF. 19 พฤศจิกายน 2562.

การประปานครหลวง. 2555. ค่าคลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร). รอบรู้เรื่องประปา. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก https://www.mwa.co.th/index_answer.php?wcad=4&wtid=5112&t=&filename=. 22 มีนาคม 2561.

การประปานครหลวง. มปป. ผลของ pH และการเปลี่ยนแปลงชนิดของคลอรีนอิสระคงเหลือ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://www.mwa.co.th/ewt_dl_link.php?nid=440. 5 มิถุนายน 2564.

เกรียงไกร พัทยากร, อรัญญา พรหมกูล และ วรรณทิชา เศวตบวร. 2559. ผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการลดปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ในต้นอ่อนทานตะวัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 47(2): 265-268.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2560. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารฉบับที่ 3. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/sdm_downloads/dmsc-micro/. 22 มีนาคม 2561.

กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2535. คุณค่าทางโภชนาการอาหารไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2529. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จอมขวัญ สุวรรณรักษ์, พุดกรอง พันธุ์อุโมงค์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2557. ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อกรดเพอร์ออกซีแอซีติกและ สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผิวของผักและ ผลไม้สดแกะสลัก. วารสารวิชาการและงานวิจัย มทร.พระนคร. 8(2). 92-106.

ฐิตินันท์ ชยาวัชรกุล. 2555. ประสิทธิภาพไอกรดน้ำส้มสายชูหมัก เอทานอล และสารร่วมต่อการลดลงของ *Klebsiella pneumonia* ในผักชี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดุสิดา ถิระวัฒน์ และเสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร. 2557. ผลร่วมของสารละลายฆ่าเชื้อและความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และการยืดอายุการเก็บรักษาโหระพาที่สภาวะต่างๆ. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2546. พืชผักผลไม้ไทยมีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยาเตยหอมและแตงกวา. งานศูนย์บริการวิชาการและฝึกอบรมฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่.

ชลิดา ฉิมวารี, พนิดา บุญฤทธิ์ธงไชย และ จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล. 2560. ผลของการจุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ในมะละกอสุกตัดแต่งพร้อมบริโภคพันธุ์เรดมาราดอล. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 48(3): 253-256.

ปิยะนุช เนียมทรัพย์. 2564. สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.biotech.mju.ac.th/Upload/Document/973_BI330_bacterial%20structure_1.61.pdf. 11 กรกฎาคม 2564.

พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์, ศิววรรณ พูลพันธุ์, พัชรีภรณ์ เงินมาก, จิราพร สมนึก และศรรัก พงษ์สุวรรณ. 2555. การลดจุลินทรีย์ในพริกขี้หนูสดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และการสร้างมาตรฐานการตรวจรับสำหรับเครื่องจมูกอิเล็กทรอนิกส์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43(2): 81-84.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. มปป. สปอร์ของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1430/bacterial-spore. 11 กรกฎาคม 2564.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และสาทิป รัตนภาสกร. 2555. การล้างและการเตรียมวัตถุดิบก่อนการแปรรูป. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องการพัฒนากระบวนการผลิตต้นแบบชาสมุนไพรคุณภาพสูงในระดับวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 17-24.

ภูมิพัฒน์ สุชาวรรณ. 2535. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา. อักษราพิพัฒน์. กรุงเทพฯ. 7. 14 – 15.

มยุรฉัตร เบี้ยกลาง, วราลักษณ์ ตังคณะกุล, ชัยวัฒน์ พลูศรีกาญน์, วินัย วุฒติวิโรจน์, รัตนา ธีระวัฒน์, พรชัย เกิดศิริ, ปฏิคม วิวัฒนาคม และโอภาส การย์กวินพงษ์. 2553. การเปรียบเทียบการตรวจคลอรีนอิสระจากน้ำอุปโภคบริโภค ณ ท่าอากาศยานสุวรรณภูมิกับการตรวจทางจุลชีววิทยา. สำนักโรคติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.

มัณฑนา บัวหนอง และ ศิริชัย กัลป์ยาณรัตน์. 2553. ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์บนผิวมะละกอเส้นตัดแต่ง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41(1): 417-420.

มนทกานติ์ บุญยการ และวราภา มหากาญจนกุล. 2545. การป้องกันการปนเปื้อนข้ามของ *Salmonella* Typhimurium ระหว่างการเตรียมสลัดผักโดยสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน. บทความการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4-7 กุมภาพันธ์ 2545: 286-293.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวิวรรณ พรหมเจริญ. 2545. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารพิษของ *Bacillus cereus* ในน้ำพริก. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วันวิสาข์ ริมประนาม. 2543. การประเมินความเสี่ยงของเชื้อจุลินทรีย์ในผักแปรรูปพร้อมบริโภค. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วลีพร วสิกรัตน์. 2560. ผลของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Anatum และ *Salmonella* Corvallis บนพื้นผิวสแตนเลสสำหรับตัดแต่งเนื้อสุกร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดและบริการอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วราภา มหากาญจนกุล และ ณัฐวุฒิ มาสกรานต์. มปป. การลดปริมาณ *Listeria monocytogenes* ปนเปื้อนบนผักด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

วราภา มหากาญจนกุล ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และวชิราภรณ์ เทียมพันธ์.2544. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณ จุลินทรีย์ทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในผักใบ. บทความการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 5-7 กุมภาพันธ์ 2544: 410-416.

วรางคณา สมพงษ์. 2542. การผลิตน้ำใบเตยผงโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง. รายงานวิจัยภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. ปทุมธานี.

ศักย์ศิล อภิรักษ์นภานนท์. 2559. ผลของกรดอะซิติก และอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ในข้าวซูชิ. ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ. 2552. ความปลอดภัยของอาหาร FOOD SAFETY. ตีรณสาร.กรุงเทพฯ.

สายรุ้ง พวงบุรี. 2558. ผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลา และการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *Bacillus cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สิริพร สธนเสาวภาคย์, สุพรรณี จิตพินิจยล และวรรณี สมพร. 2534. การศึกษาจุลินทรีย์ในอาหารพร้อมบริโภค. วารสารอาหาร. 21. 212-205.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2547. การสุขาภิบาลอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ : 93-109.

สุดสายชล หอมทอง. 2015. การแพร่กระจายของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ในซูชิ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16(1): 69-76.

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2551. รายงานประจำปี 2550 เรื่อง การปนเปื้อน *Bacillus cereus* ในเครื่องดื่มบรรจุภาชนะที่ปิดสนิท. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_food/inc_001_000.asp?counterSP=4. 11 กันยายน 2563.

สำนักระบาดวิทยา. 2552. การสอบสวนการระบาดของอาหารเป็นพิษ โรงเรียนอนุบาลแห่งหนึ่ง กรุงเทพมหานคร ธันวาคม พ.ศ. 2552. Outbreak, Surveillance and Investigation Reports. OSIR December 2012. 5(2): 9-15.

สำนักระบาดวิทยา. 2556. สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในรอบสัปดาห์. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 44(22): 343-344.

อลิสรา เรืองขำ. 2546. การควบคุมปริมาณ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

อบเชย วงศ์ทอง. 2543. การผลิตขนมไทย. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Behrsing, J., Winkler, S., Franz, P. and Premier, R. 2000. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. Journal Postharvest Biology and Technology. 19(2). 187-192.

Biology. 2014. เซลล์คุมการปิดเปิดของปากใบพืช (Guard cell). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://biology.ipst.ac.th/?p=802. 11 กรกฎาคม 2564.

Bradbury, L.M.T., S.A. Gillies, D.J. Brushett, D.L.E. Waters, and R.J. Henry. 2008. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. Plant Molecular Biology. 68: 439–449.

Buttery, R. G., RG, B., LC, L. and BO, J. 1982. 2-Acetyl-1-Pyrroline : an important aroma component of cooked rice. Journal of Chemistry and Industry. 4. 958-959.

Calo, J.R., Crandall, P., O'Bryan, C.A. and Ricke, S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food system: A review. Journal Food Control. 54: 111-119.

Davidson P.M. and A.L. Branen (eds.). 1997. Antimicrobials in Foods. New York : Marcel Dekker, Inc. 798.

Durak, M. Z., Churey, J. J. and Worobo, R. W. 2012. Efficacy of UV, acidified sodium hypochlorite, and mild heat for decontamination of surface and infiltrated *Escherichia coli* O157: H7 on green onions and baby spinach. Journal of food protection. 75. 1198-1206.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Garner, J.F. and M. M. Peel. 1991. Introduction to Sterilization, Disinfection and Infection Control. 2 nd ed. New York: Churchill Livingstone. 264.

Granum, P. E., Doyle, M. P. and Beuchat, L. R. 2007. *Bacillus cereus*. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, DC. 445-455.

Jiang, J. 1999. Volatile composition of pandan leaves (Pandanus amaryllifolius). In Flavor chemistry of ethnic foods. Springer, Boston, MA. 105-109.

Kondo, N., Murata, M. and Isshiki, K., 2005. Efficiency of Sodium Hypochlorite, Fumaric Acid, and Mild Heat in Killing Native Microflora and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium *DT104*, and *Staphylococcus aureus* Attached to Fresh-Cut Lettuce. Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University.

Koriranta, A. and Lounatmaa, K. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infection. Journal Microbes and infection. 2 : 189-198.

Neo, S.Y., Lim, P.Y., Phua, L.K., Khoo, G.H., Kim, S.J., Lee, S.C., and Yuk, H.G.. 2013. Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *salmonella* spp. on mung bean sprouts. Food Microbiology. 36: 475-480.

New Zealand Food Safety Authority (NZFSA). 2007. Microbiological Quality of Bakery Products. [Online]. Available: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/ Microbiological_Quality – investigates_Relationship.pdf. April 25, 2017.

New Zealand Food Safety Authority (NZFSA). 2010. *Bacillus cereus*. [Online]. Available: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/ Industry/ Bacillus_cereus-Spore_Forming.pdf. September 20, 2017.

New Zealand Food Safety Authority (NZFSA) . 2010. *Bacillus cereus.* [Online]. Available: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile-Science_Research.pdf. April 25, 2017.

New Zealand Government. 2016. Risk Profile : *Bacillus cereus* in Dairy Products. [Online]. Available: https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/14149/send. September 22, 2018.

Puangburee, S., Jindaprasert, A., Vattanamanee, S., Wongsommart, D. and Swetwiwathana, A. 2016. Microbiological Safety of Thai pandan custard filled products and their ingredients. In International Food Research Journal 23(4). 1808 – 1811.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Takayama, H.T. Ichikawa, M. Kitajima, M.G. and Aimi, N. 2001. Isolation and characterization of two new alkaloids norpandamarilactonine-A and –B, from *Pandanus amaryllifolius* by spectroscopic and synthetic methods. Journal Natural Products. 64: 1224-1225.

Trevor, S. 1997. Chlorination in the production and postharvest handling of fresh fruits and vegetables. In University of California-Davis. Vegetable Research and Information Center Food Safety. [Online]. Available http://www. vric.ucdavis.edu. September 22, 2020.

The International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). 1996. *Bacillus cereus.* In Microorganisms in Foods 5 Microbiological Specifications on Food Pathogens. p. 20 – 35. Suffolk: Great Britain.

U.S. Food and Drug Administration. 2012. BAM – *Bacillus cereus*. Chapter 14. [Online]. Available: https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm. April 25, 2017.

US National Library of Medicine National Institutes of Health (NCBI). 1992. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning-are caterers supervised sufficiently. [Online]. Available https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1403681/. September,26 2019.

US National Library of Medicine National Institutes of Health (NCBI). 2005. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. Journal of clinical Microbiology. 43(8): 4277-4279.

Wei, C.I., D.L. Cook and J.R. Krik. 1985. Use of chloine compounds in the food industry. Journal Food Technology. 39(1): 107-115.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar (Difco, U.S.A)

Beef extract	1.0	กรัม	Peptone	10.0	กรัม
Mannitol	10.0	กรัม	NaCl	10.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม	Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร			

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอช เทสารละลายที่ได้ลงใน ฟลาส์ก 500 มิลลิลิตร ให้ได้ ฟลาส์กละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเข้าฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.1 เตรียมสารละลาย Polymyxin B solution

ละลายผง Polymyxin B sulfate 1 MU (sigma P1004) ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ 0.2 ไมโครเมตร เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บรักษาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้งาน

ก.1.2 Egg yolk emulsion, 50 %

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 70 % ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่แล้วทำการแยกไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (Normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยผสมในอัตราส่วน 1: 1 ปิดฝาเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ก.1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร MYP agar มา 225 มิลลิลิตร (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) เติม polymyxin B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 50 % Egg yolk emulsion ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จะได้อาหาร MYP agar ที่มี polymyxin B 100,000 IU/L

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase Soy Agar (TSA) (Difco,USA)

Trypticase peptone (Tryptone)	15.0	กรัม
Phytone peptone (Soytone)	5.0	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Final pH	7.3 $\pm$ 0.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase (Tryptic) Soy Agar (TSA) 40.0 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวดดูแรนปิดฝา (สำหรับเทใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จานละ 15 มิลลิลิตร) หรือใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (Difco,USA)

Trypticase peptone	17.0	กรัม
Phytone peptone	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Final pH	7.3 $\pm$ 0.2	

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase Soy Broth (TSB) 30.0 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวดดูแรนปิดฝา หรือใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (Difco,USA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวดดูแรนปิดฝา (สำหรับเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15 มิลลิลิตร) หรือใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ leetheen broth (Himedia, India)

Peptic digest of animal tissue	20.0	กรัม
Casein enzyme hydrolysate	5.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lecithin	0.70	กรัม
Final pH	7.3 $\pm$ 0.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งส่วนผสม 42.8 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.6 น้ำยาเจือจาง Buttlefild's PhosPhate Buffered (BAM R11, 2001)

ก.6.1 การเตรียมสารละลายสต็อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล และปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บในตู้เย็น

ก.6.2 การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต็อก 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นตวงใส่ขวดปริมาตร 450 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 50 กรัม) หรือ ตวงใส่ขวดปริมาตร 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 กรัม) และดูด 9 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.7 สีย้อมแกรม Crystal violet

ก. 7.1 เตรียมสารละลาย A

Crystal violet (85%)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

ก. 7.2 เตรียมสารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	กรัม

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B หากเกิดตะกอนให้กรองก่อนใช้ และถ้าสีเข้มเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1: 10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

ก.8 สีย้อมแกรม Gram's iodine solution

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	กรัม

ละลาย iodine และ potassium iodine ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บในขวดแก้วทึบแสง

ก.9 สีย้อมแกรม Safranin O counterstrain (Stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์ 95% จนสีละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.10 สี Malachite green

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	กรัม

ละลายเกล็ด Malachite green ในน้ำกลั่นแท่งคนจนสีละลายหมดเทใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การสร้างสภาวะการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* บนใบเตยสดและการล้างทำความสะอาด

ข.1 การสร้างสภาวะการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* บนใบเตยสด (ฐิตินันท์, 2555)

ใบเตยสดที่มีน้ำหนัก 10-12 กรัม หรือ 3-5 ใบ ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร ใช้เวลาในการแช่ 5 นาที โดยล้างเป็นจำนวน 3 ครั้ง

↓

ผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลา 30 นาที

↓

นำใบเตยสดจุ่มแช่ในบีกเกอร์ปลอดเชื้อที่มีสารละลายเชื้อ *B. cereus* (7 log CFU/g) เป็นเวลา 5 นาที

↓

ผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะไม่เห็นหยดน้ำติดบนใบ

ภาพ ข1 การสร้างสภาวะการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับเชื้อ 6 log CFU/g

ข.2 การจำลองการล้างทำความสะอาดใบเตยสด

ใบเตยสดปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ตามธรรมชาติที่ระดับเชื้อ 3 log CFU/g และที่สร้างสภาวะการปนเปื้อนที่ระดับเชื้อ 6 log CFU/g จำนวน 10-15 ใบ หรือน้ำหนักประมาณ 30-35 กรัม

↓

ล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm เป็นระยะเวลา 10 นาที

↓

นำใบเตยสดขึ้นมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ

ภาพ ข2 การจำลองการล้างทำความสะอาดใบเตยสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี spot assay และการเตรียมสารละลายสปอร์ *B. cereus*

ข.3 วิธีการตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี spot assay (ดัดแปลง วลีพร, 2560)

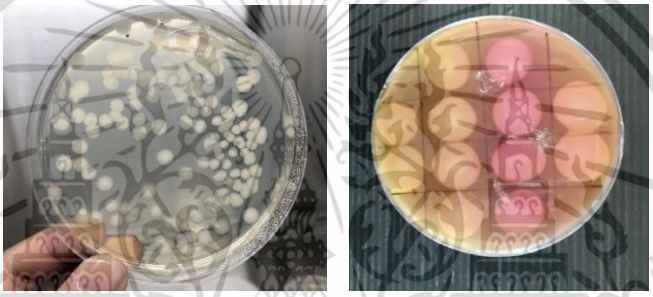
เขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (ปราศจากเชื้อ)

↓

กดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ MYP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของโคโลนีเชื้อ B. cereus บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP มีลักษณะกลม แบน หยักนูน มีสีขาวขุ่น และวงขุ่นรอบโคโลนี



(ก) (ข)

ภาพ ข3 (ก) ผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ (ข) การตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธีการ spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP

ข.4 การเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* (ดัดแปลง ศักย์ศิล, 2559)

ถ่ายเชื้อด้วย loop ปลอดเชื้อจำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Slant บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

↓

เติม BPB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร10 มิลลิลิตร ใช้ลูปขูดเชื้อบริเวณผิวหน้าอาหารออกให้หมด

↓

ถ่ายสารละลายเชื้อลงในหลอดทดลองแล้วนำไปให้ความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นลงทันที

ภาพ ข4 สารละลายเชื้อ *B. cereus* (หลอดซ้าย) ที่ชะออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (หลอดขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ศึกษาลักษณะโครงสร้างใบเตยสด ด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

นำตัวอย่างใบเตยสดที่ หั่นเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กขนาด 1x1 เซนติเมตร

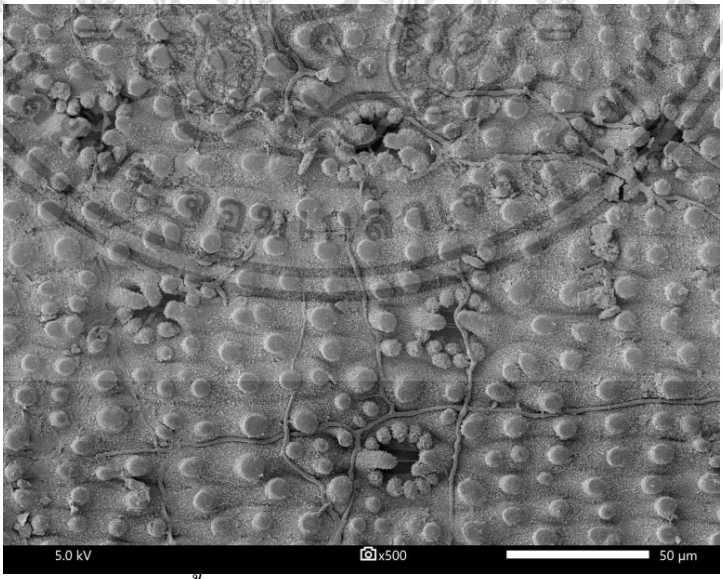
↓

เติมสารละลายเพื่อรักษาสภาพเซลล์ ด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.4

↓

ทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด Scanning electron microscope (SEM)

ภาพ ง1 ตัวอย่างใบเตยสดเพื่อเตรียมชิ้นส่วนขนาดเล็กขนาด 1x1 เซนติเมตร



ภาพ ง2 ลักษณะปากใบพืช ต่อมน้ำมันหอมระเหย และเส้นร่างแหของเตยหอม กำลังขยาย 500 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ศรินยา บุญสิทธิ์
วัน เดือน ปีเกิด	20 มกราคม พ.ศ. 2532
ที่อยู่	131/251 วีคอนโด ถนนฉลองกรุง แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10520
E-mail	sarinyaboonsit05@gmail.com
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 จบการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
ประสบการณ์ทำงาน	พ.ศ. 2554 – 2555 ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิชาการอาหารและยา หน่วยกำกับดูแลหลังออกสู่ตลาด (Post Maketing) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2555 – 2556 ตำแหน่ง Quality Assurrence officer บริษัท ซูกิชิ อินเตอร์กรุ๊ป จำกัด พ.ศ. 2557 – ปัจจุบัน ตำแหน่ง Quality System บริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน)
การนำเสนอผลงาน	นำเสนอโปสเตอร์ เรื่องการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ในใบเตยสดที่ได้จากอุตสาหกรรมโรงงานผลิตขนมหวานแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ “มศว. วิจัย” ครั้งที่ 12 ปีพุทธศักราช 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้