ผลของน้ำส้มสายชูในสภาวะของเหลวและไอต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus*

Effect of liquid-phase and vapor phase vinegar on survival of *Geobacillus stearothermophilus*

ปิยารัตน์ หนันสีสุข
รวิสรา วงศ์ษา

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของน้ำส้มสายชูในสภาวะของเหลวและไอต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus*

Effect of liquid-phase and vapor phase vinegar on survival of *Geobacillus stearothermophilus*

จัดทำโดย

ปิยารัตน์ หนันสีสุข รหัสนักศึกษา 58080115

รวิสรา วงศ์ษา รหัสนักศึกษา 58080129

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

1

10/ก.ค./62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของน้ำส้มสายชูในสภาวะของเหลวและไอต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus*
ชื่อนักศึกษา	ปิยารัตน์ หนันสีสุข รหัสนักศึกษา 58080115 รวิสรา วงศ์ษา รหัสนักศึกษา 58080129
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของการซึมผ่านของน้ำส้มสายชูในสภาวะของเหลวและไอต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* การทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลของน้ำส้มสายชูในสภาวะไอนั้น เชื้อเริ่มต้นจะอยู่ที่ 5 log CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ไม่สามารถยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์ได้แต่ในสภาวะของเหลวที่ความเข้มข้นกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชู 8% เชื้อสามารถทนน้ำส้มสายชู และ Glacial acetic acid ในสภาวะของเหลวที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% ได้ และสามารถทนอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อเริ่มต้นจะอยู่ที่ 5 log CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง เชื้อจะลดลงเหลือ 4 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 12 จะเหลือเชื้อประมาณ 3 log CFU/ml และจะยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect of liquid-phase and vapor phase vinegar on survival of *Geobacillus stearothermophilus*
Student name	Piyarart Nanseesuk Student ID 58080115 Rawisara Wongsa Student ID 58080129
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology Food
Year	2019
Advisor	Assist.Prof.Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

The purpose of this research is to study an effect of vinegar in liquid phase and vapor phase on the survival of *Geobacillus stearothermophilus*. For 24 hour liquid-phase exposure, 8% acetic acid completely inhibited *G. stearothermophilus*. After 60 min of vapor-phase exposure, 8% Acetic acid not completely inhibited *G. stearothermophilus* spread on PCA . In addition, the temperature resistance of *G. stearothermophilus* was studied by incubating at 60°C. The results shown that in the liquid phase, the survival of *G. stearothermophilus* was 5 log CFU/ml. After 6 hours, the survival was reduced to 4 log CFU/ml was 12 hours. As a vapor phase, the survival of *G. stearothermophilus* was 6 log CFU/ml. After 60 minutes, the survival of *G. stearothermophilus* is not reduced .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาจาก ศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโดยได้ให้ แนวคิด คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่คอยช่วยเหลือทำให้รายงานฉบับนี้สำเร็จ ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมถึงทุกคนในครอบครัวของคณะผู้จัดทำ ในการเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ทำให้คณะผู้จัดทำมีแรงใจในการทำงานวิจัยและไม่ท้อถอยนอกจากนั้นยังคอยสนับสนุนการทำงานวิจัยนี้มาโดยตลอด รวมถึงขอบคุณสมาชิกในคณะผู้จัดทำทุกคนที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันเสมอ จึงทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนการจัดทำเล่มปัญหาพิเศษนี้ ทั้งด้านต้นแบบการจัดทำเล่มปัญหาพิเศษ รวมถึงการจัดทำรูปเล่ม

ปิยารัตน์ หนันสีสุข

รวิสรา วงศ์ษา

31 กรกฎาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II
กิตติกรรมประกาศ..... III
สารบัญ..... IV
สารบัญตาราง..... VI
สารบัญภาพ..... VII
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 2
2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 2
2.2 สารที่ใช้ในการยับยั้ง..... 4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 8
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 8
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 9
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง..... 9
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 12
4.1 การทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้น..... 12
4.2 การทดสอบสภาวะการอยู่รอดและการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
G. stearothermophilus..... 13
4.3 การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์และสปอร์
ของเชื้อ *G. stearothermophilus*..... 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 16

บรรณานุกรม.....17

ภาคผนวก.....21

ภาคผนวก ก.....22

ภาคผนวก ข.....23

ภาคผนวก ค.....24

ภาคผนวก ง.....25

ประวัติผู้เขียน.....26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนการรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ
ของแบคทีเรีย *G.stearothermophilus* เมื่อสัมผัสกับไอน้ำส้ม
สายชูจากข้าวไร่ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% เป็นระยะเวลา
60 นาที.....13

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนการรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ
ของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ที่ผ่านการทดสอบ
ด้วยน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่และหัวน้ำส้มที่ความเข้มข้นกรด
อะซิติก 8% ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* 4

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกรดแอซิติก 5

รูปที่2.3 แสดงกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ 6

รูปที่ 3.1 การแสดงการเจือจางเป็นลำดับส่วน 10

รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *G. stearothermophilus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ทำการบ่มเป็น เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 12

รูปที่ 4.2 ลักษะโคโลนีของเชื้อ *G. stearothermophilus* เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15

รูปที่ 4.3 ลักษะเซลล์ของเชื้อ *G. stearothermophilus* จากกล้องจุลทรรศน์ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ที่ถูกแบ่งแยกสกุลออกมาจาก *Bacillus stearothermophilus* นี้เป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อน ที่สร้างเอนโดสปอร์ สปอร์ของ Bacillus จะทนต่อความร้อน สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆได้ดี ซึ่งเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะส่วนใหญ่แบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และสายพันธุ์ Geobacillus นี้เจริญสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียอาหารกระป๋อง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อหาวิธีที่เชื้อรอดชีวิตอยู่ได้และหาวิธีที่จะจะยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* ได้ในสภาวะที่เหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ

1.2.2 เพื่อศึกษาเวลาที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ

1.2.3 เพื่อศึกษาถึงสภาวะการอยู่รอดของเชื้อ

1.2.4 เพื่อศึกษา รูปร่าง ลักษณะ การเกิดสปอร์ ของเชื้อ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ

1.3.2 ทราบเวลาที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ

1.3.3 ทราบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อ

1.3.4 ทราบ รูปร่าง ลักษณะ การเกิดสปอร์ ของเชื้อ Geobacillus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.2.1 *Geobacillus stearothermophilus*

Geobacillus stearothermophilus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นแท่งและเป็นแบคทีเรียทนความร้อนที่สร้างสปอร์ (thermophile bacteria) โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียนี้สอดคล้องกับคุณสมบัติที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป นั่นคือพวกมันมีชั้น peptidoglycan ที่หนารอบๆเมมเบรนของไซโตพลาสซึม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 55-65 องศาเซลเซียส (Burgess et al. ,2017) *G. stearothermophilus* ค้นพบครั้งแรกในปี 1920 แรก ซึ่งแยกได้จากข้าวโพดแบบครีมบรรจุกระป๋อง และตั้งว่า '*Bacillus stearothermophilus*' ต่อมาถูกจัดประเภทใหม่ในฐานะสมาชิกของสกุล Geobacillus ในปี 2001 ทำให้ Geobacillus เป็นที่รู้จักว่าเป็นแบคทีเรียที่ทนร้อนในสกุล Bacillus สปอร์ของ Geobacillus มักพบมากที่ช่องระบายความร้อนจากปล่องไฮโดรเทอร์มอล รวมถึงสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ดินที่เย็นและตะกอนทะเลในมหาสมุทรที่เย็นจัด (Zeigler, 2005) Geobacillus มีบทบาทสำคัญในการเน่าเสียของอาหารโดยเฉพาะนมและผลิตภัณฑ์จากนมเพราะสามารถอยู่รอดได้ในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ เนื่องจากทนความร้อนได้ Geobacillus จึงเป็นเชื้อปนเปื้อนที่พบบ่อยในอุตสาหกรรมนมและอาหาร (David J. Studholme,2014) แบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างสปอร์ภายใต้สภาวะไม่เอื้ออำนวยได้เนื่องจากมีวิธีการปกป้องตัวมันเองโดยพวกมันสามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospores) และสามารถพักอยู่ในระยะนี้ได้เป็นเวลานานจนกระทั่งสภาพการเจริญเติบโตดี *Geobacillus stearothermophilus* จึงถูกนำไปใช้เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของห้องปฏิบัติการและเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (BI)

สปอร์ของ *Geobacillus stearothermophilus* ได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งในการต้านทานความร้อนที่สุดในหมู่แบคทีเรียที่สร้างสปอร์แอโรบิกและทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารกระป๋อง 35% ระหว่างบ่มที่ 55 ° C การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและจำลองชะตากรรมของสปอร์ผู้รอดชีวิตที่ผ่านการบำบัดด้วยความร้อนของ *G. stearothermophilus ATCC 12980* ในสภาพแวดล้อมที่ป้องกันการเจริญเติบโต สปอร์ *G. stearothermophilus* ได้รับการบำบัดด้วยความร้อนในสี่สภาวะที่แตกต่างกันเพื่อลดจำนวนหนึ่งหรือสองทศนิยม สปอร์ที่ผ่านการให้ความร้อนจะถูกเก็บไว้ในสารอาหารที่อุณหภูมิและ pH ต่างกันภายใต้สภาวะที่ป้องกันการเจริญเติบโต ผลการศึกษาพบว่าสปอร์ *G. stearothermophilus* ที่รอดชีวิตจากความร้อนจะตายระหว่างการเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่ป้องกันการเติบโต พบว่ามีประชากรย่อยสองกลุ่มที่แตกต่างกันในระหว่างการไม่ยับยั้งความร้อน พวกมันจะแตกต่างกันตามระดับของความต้านทานต่อความเครียด การ

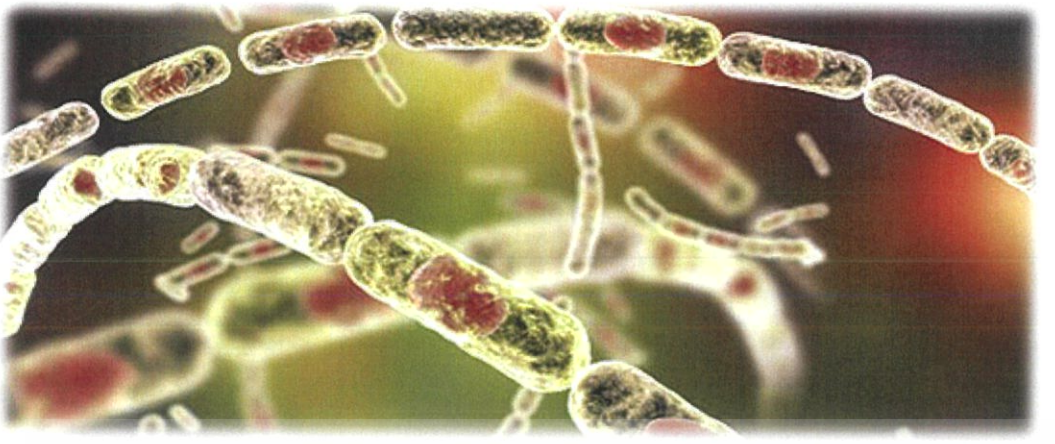
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดเก็บและสัดส่วนของแต่ละประชากรย่อยสามารถมอดูเลตโดยเงื่อนไขการรักษาความร้อน ในที่สุดความทนทานต่อความเครียดในการจัดเก็บภายใต้สภาวะการป้องกันการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิในตู้เย็นและค่า pH เป็นกลางโดยไม่คำนึงถึงเงื่อนไขการรักษาความร้อน ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสปอร์ถูกยับยั้งเนื่องจากการรักษาความร้อนสามารถทำได้โดยการจัดเก็บภายใต้เงื่อนไขที่ป้องกันการเจริญเติบโต (Mtimet N, et al. 2015.)

Geobacillus stearothermophilus ได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความรับผิดชอบสูงที่สุดในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ในการควบคุมแบคทีเรียที่ก่อตัวสปอร์ที่มีความต้านทานสูงเหล่านี้ความเข้มในการรักษาความร้อนอาจเกี่ยวข้องกับสภาวะที่เป็นอันตรายสำหรับการงอกและผลพลอยได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและ pH อย่างต่อเนื่องต่ออัตราการเติบโตของ *G. stearothermophilus ATCC 12980* ความสามารถในการสร้างสปอร์การต้านทานความร้อนในการตอบสนองต่อสภาวะสปอร์ต่างๆและความสามารถในการฟื้นตัว การตรวจสอบฟีโนไทป์ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิและ pH ที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อและประมาณความต้านทานความร้อนที่ 115 ° C การผลิตสปอร์ที่มากที่สุดและความต้านทานความร้อนสูงสุดเกิดขึ้นที่สภาวะอุณหภูมิและค่า pH ทำให้มีอัตราการเติบโตสูงสุด

การศึกษาจำนวนมากได้ตรวจสอบบทบาทของเงื่อนไขการสร้างสปอร์เช่นอุณหภูมิ, pH, ขนาดหัวเชื้อ, สารอาหารและแร่ธาตุ (Guizelini et al., 2012; Leguerinel et al, 2007; Penna et al., 2003; 2000; 1998) ผลผลิตของสปอร์และความต้านทานความร้อนของสปอร์ *G.stearothermophilus* การศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของสารอาหารและปริมาณแร่ธาตุของอาหารการสร้างสปอร์ต่อความต้านทานความร้อนได้แนะนำสูตรของสื่อต่างๆเพื่อให้ได้ค่า D สูง จากการศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับสปอร์ของ *B. weihenstephanensis* และ *B. licheniformis* พบว่าความต้านทานความร้อนสูงสุดนั้นได้มาจากสปอร์ที่ผลิตที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต นอกจากนี้ช่วงอุณหภูมิ, pH และความชื้น (aw) ช่วยให้การสร้างสปอร์สอดคล้องกับช่วงอุณหภูมิ, pH และการเจริญเติบโตของการเจริญ (Mtimet N et al., 2015.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

ที่มา : https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-geobacillus-stearothermophilus/

2.2 สารที่ใช้ในการยับยั้ง

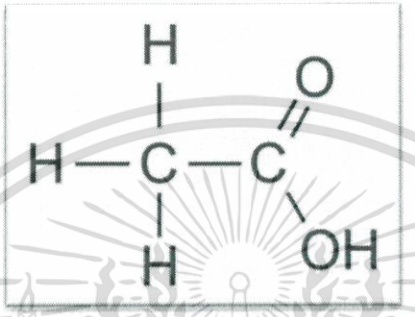
2.2.1 น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชู (vinegar) เกิดจากกระบวนการหมักโดยน้ำตาลในอาหาร ขั้นแรกยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นหมักแอลกอฮอล์ต่อไปจนกลายเป็นน้ำส้มสายชูด้วยแบคทีเรียอะซิติก คำว่า “vinegar” มาจากคำในภาษาฝรั่งเศส แปลว่า ไวน์เปรี้ยว (Charles W. Bamforth,2005) โดยการผลิตน้ำส้มสายชูหมักสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ต่างๆ และเมล็ดธัญพืช น้ำส้มสายชูหมัก หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำวัตถุดิบที่เหมาะสม ได้แก่ ธัญพืช ผลไม้ น้ำตาล หรือกากน้ำตาล มาหมักกับส่าเหล้า แล้วนำมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ

น้ำส้มสายชูมีกรดอะซิติก (Acetic acid) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์หรือสารประกอบเคมีอินทรีย์ที่พบได้ในธรรมชาติมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีลักษณะใส ไม่มีสี มีกลิ่นฉุนที่เป็นเอกลักษณ์ มีรสเปรี้ยว ระเหยง่าย ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ กลีเซอรีน มีความเสถียร ผลึกของกรดอะซิติกจะมีความบริสุทธิ์สูงมากเรียกว่า หัวน้ำส้มหรือกรดกลาเซียอะซิติก (Glacial acid) ที่ได้จากการสกัดทางเคมี หัวกรดน้ำส้มนั้นสามารถนำไปเจือจางเพื่อทำน้ำส้มสายชูเทียม กรดอะซิติกนำมาผลิตน้ำส้มสายชูที่ใช้ในการปรุงอาหารให้มีรสเปรี้ยวและช่วยในการถนอมอาหารและไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายถ้าใช้ในปริมาณตามที่กระทรวงสาธารณสุขควบคุมไว้ กรดอะซิติกยังได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัยสามารถใช้ได้ภายใต้การควบคุม (GRAS, generally recognized as safe) (Tullio Venditti et al.,2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะซิติกสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ได้โดยแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนที่ผนังเซลล์แปรสภาพหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยได้มีสมมติฐานว่า กรดจะไปรบกวนการสร้าง ATP ด้วยการลดระบบขนส่งอิเล็กตรอนหรือยับยั้งการขนส่งสารเมทาบอไลท์ไปยังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการแทรกซึมของกรดอะซิติกจะสูงมาก เมื่ออยู่ในรูปกรดที่ไม่แตกตัว เนื่องจากละลายไขมันได้ดี (Chen et al.,2016)



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกรดแอซิติก

ที่มา: นิรนาม (2007)

น้ำส้มสายชูจึงจัดเป็นสารทางชีวภาพที่ปลอดภัยและส่วนประกอบที่สำคัญคือกรดอะซิติก ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีทั้งด้านความปลอดภัยและมีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Sholberg, et al. 2000; Kilonzo-Nthenge, 2006; Chang and Fang, 2007; Sengun and Karapinar, 2004; Krusong et al., 2015).

จากการศึกษาพบว่าเมื่อสมัย 400 ปีก่อนคริสตการ น้ำส้มสายชูหมัก มักจะใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและใช้สำหรับป้องกันการติดเชื้อ ผู้เชี่ยวชาญทางการแพทย์ชาวกรีกโบราณฮิปโปเครติสใช้น้ำส้มสายชูหมักเพื่อรักษาแผล, การอักเสบ, ไอและการติดเชื้อ (Budak and others 2014)

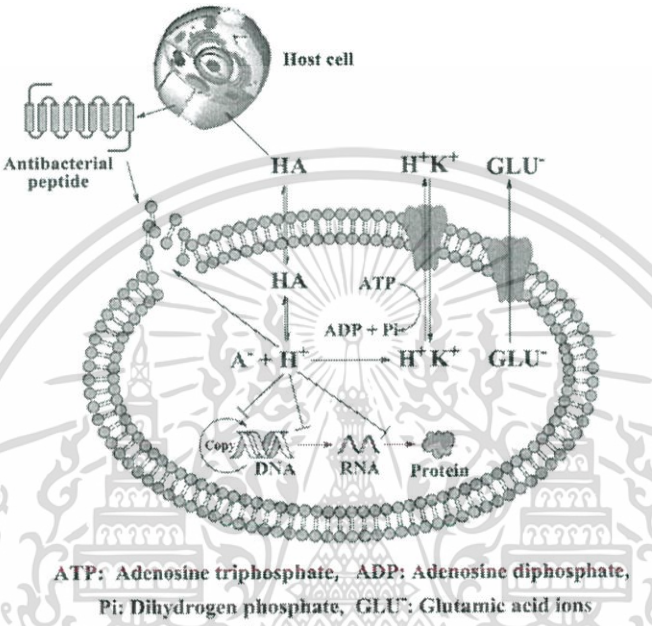
หนังสือย่อทางการแพทย์จีนของ Materia Medica ซึ่งประพันธ์ขึ้นในราชวงศ์หมิง (ศตวรรษที่ 16) ยังแสดงให้เห็นถึงบันทึกการใช้น้ำส้มสายชูสำหรับรักษาโรคติดเชื้อ Ascaris, การฆ่าเชื้อโรคในห้องคลอด,การถนอมเนื้อสัตว์และอื่น ๆ (Xu et al., 2003)

Krusong et al. (2015) พบว่าประสิทธิภาพของของเหลวและไอระเหยของน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโพดฝักอ่อน สามารถควบคุมการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวในสตรอเบอรี่ได้ โดยพบว่าการรมไอ ด้วยน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโพดฝักอ่อนหรือการรมไอด้วยน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโพดฝักอ่อนกลิ่นสตรอเบอรี่ช่วยลดการเน่าเสียได้อย่างมีนัยสำคัญ และทำการทดลองโดยการลงเชื้อ *Botrytis cinerea* ลงในสตรอเบอรี่อายุการเก็บรักษาสตรอเบอรี่ที่สุก โดยการรมไอด้วยน้ำส้มสายชูหมักจำกข้าวโพดฝักอ่อนกลิ่นสตรอเบอรี่ ถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยืดระยะเวลาออกไป 7 วัน ในส่วนของการรมไอด้วยน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโพดฝักอ่อน สามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาได้นานถึง 11 วัน

Sapers และคณะ (2003) รายงานว่าไอของกรดกลาเซียอะซิติกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ E.coli ในแอปเปิล ได้ถึง 3.5 log10 CFU/g



รูปที่2.3 แสดงกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์

ที่มา : Zhang and others , 2011

Venditti และคณะ (2017) พบว่าไอกรดอะซิติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียขององุ่นได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 ไมโครลิตรต่อลิตร

Moyls และคณะ (1996) ได้ศึกษาการรมไอด้วยกรดอะซิติกที่ 8 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการรักษาองุ่นและสตรอเบอร์รี่ในสภาพ MAP (modified atmosphere packaging) ที่อุณหภูมิ 0 °c เป็นเวลา 74 วัน สามารถลดการเกิดโรคเน่าเสียขององุ่น จาก 94% ให้เหลือเพียง 2% ส่วนสตรอเบอร์รี่สามารถลดการเกิดโรคเน่าเสียได้ ด้วยการใช้กรดอะซิติกที่ 5.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 5 °c เป็นเวลา 14 วัน

นฤมล นกพรหม และคณะ (2015) ศึกษาผลการรมมะขามหวานด้วยไออะซิติกเข้มข้น 99.5% ร่วมกับการใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Aspergillus sp. ในมะขามหวานได้อย่างสมบูรณ์ ยังพบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงด้านคุณภาพของมะขาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลการใช้น้ำส้มสายชูในสภาพของเหลวและในสภาพไอของน้ำส้มสายชูต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ในผักชีสด พบว่าการใช้กรดอะซิติกในสภาพของเหลวที่มากกว่า 2.4% (v/v) สามารถยับยั้ง *Klebsiella pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าหลังจาก 50 นาทีที่สัมผัสกับไออะซิติก 8% *Klebsiella pneumoniae* จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เช่นกัน

Bayoï และคณะ (2014) ได้ศึกษากิจกรรมของกรดอะซิติกต่อสปอร์ *Bacillus stearothermophilus* หลังจากการปรับสภาพความร้อนก่อนการรักษา ขั้นแรกจะนำสปอร์ของเชื้อไปแช่ในกรดอะซิติก 0.4% pH4.5 ก่อน จะเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของสปอร์เมื่อได้รับให้ความร้อนโดยการบ่มและการรักษาด้วยกรดอะซิติกกับสปอร์ที่ควบคุมโดยไม่ได้บ่มและไม่ได้รักษาด้วยกรดอะซิติก ผลแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของสปอร์ที่ได้รับการบ่มนั้นมากกว่าสปอร์ควบคุมที่ไม่ได้รับการบ่มและรักษาด้วยกรดอะซิติก 0.4% ที่ pH 4.5 และพบว่าการลดลงของเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวจะเด่นชัดมากขึ้นตามระยะเวลาของการรักษาด้วยกรดที่มีค่า 43% สำหรับ *B. stearothermophilus* แสดงให้เห็นถึง "ความต้านทานต่อกรดที่เกิดจากความร้อน" แต่ปรากฏการณ์นี้ได้ถูกเน้นมากขึ้นสำหรับการบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °c ในระหว่าง 3 ชั่วโมง การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าความร้อนที่ไม่ร้อนจัดอาจมีบทบาทสำคัญในการป้องกันจุลินทรีย์ต่อสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 Plate count agar (PCA)

3.1.2 Trypticase soy broth (TSB)

3.1.3 Peptone

3.1.4 Acetic acid หรือ กรดน้ำส้ม 8%

3.1.5 Glacial acetic acid 8%

3.1.6 แอลกอฮอล์ 95 %

3.1.7 แอลกอฮอล์ 70 %

3.1.8 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N (NaOH)

3.1.9 ฟีนอล์ฟทาลีน

3.1.10 สีย้อม Gram Crystal violet

3.1.11 สีย้อม Gram safranin O

3.1.12 สีย้อม Gram iodine

3.1.13 สีย้อมสปอร์ Malachite green

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 จานเพาะเชื้อ

3.2.2 ลังใส่จานเพาะเชื้อ

3.2.3 ขวด M + ฝาปิด

3.2.4 กระบอกตวง (Cylinder)

3.2.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

3.2.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.7 ขวดแก้วใส่แอลกอฮอล์

3.2.8 ตู้ชีวนิรภัย

3.2.9 ตู้บ่มเชื้อ

3.2.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.2.11 แท่งแก้วคนสาร

3.2.12 บีกเกอร์ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.13 ไฟแช็ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.14 ถุงมือกันร้อน

3.2.15 บิวเรต

3.2.16 ขาตั้งบิวเรต

3.2.17 หนังยางรัดของ

3.2.18 ถุงร้อน/ถุงพลาสติก

3.2.19 หลอดทอลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร + ฝาปิด

3.2.20 ชั้นวางหลอด 50 ช่อง

3.2.21 ปิเปต 10 mL.

3.2.22 ไมโครปิเปต 200, 1000 µL

3.2.23 ไมโครปิเปตทิป(สีเหลือง สีฟ้า)

3.2.24 กล่องเก็บไมโครปิเปตทิป

3.2.25 เครื่อง vortex

3.2.26 Loop เขี่ยเชื้อ

3.2.27 แท่งแก้วสามเหลี่ยม(spreader)

3.2.28 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร

3.2.29 เครื่องเขย่า

3.2.30 กล้องจุลทรรศน์

3.2.31 แผ่นสไลด์

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

ทำการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างเชื้อที่แยกไว้แล้วโดยการใช้ Loop เขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อออกมา Streak ลงในหลอดอาหาร PCA แล้วบ่มไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อในหลอดนั้นมาลงใน อาหาร TSB ที่มีปริมาณ 30 มิลลิลิตรแล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าต่อที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

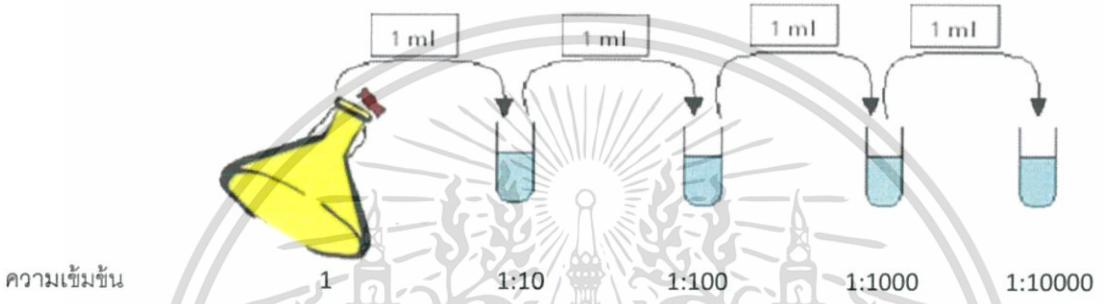
3.3.2 การเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

ได้ลองทำการทดลองใช้ Acetic acid และ Glacial acetic acid ที่ความเข้มข้น 5% 6% 7% 8% 9% และ 10% พบว่าที่ความเข้มข้น 8% ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงใช้ Acetic acid และ Glacial acetic acid ที่ความเข้มข้น 8% ซึ่งก่อนใช้จะทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของกรดโดยการปิเปตตัวอย่างสาร 6 มล. ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N เมื่อได้ความเข้มข้นที่เป็น 8% หลังจากนั้นจึงปิเปตใส่ในหลอดทอลอง หลอดละ 9 มล. จำนวน 7 หลอด โดยสารทั้ง 2 อย่างนี้ทำเช่นเดียวกันทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อจุลินทร์ *Geobacillus stearothermophilus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 3.3.1 มาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน โดยใช้การ น้ำ Peptone 9 มล. ต่อ เชื้อ 1 มล. จากนั้นนำแต่ละลำดับส่วนนั้นมา Spread Plate โดยการใช้ไมโครปิเปต ที่ปรับค่าเป็น 100 µL ดูดแต่ละความเข้มข้น ลงในจานเพาะเชื้อที่มี PCA อยู่ในนั้นแล้ว แล้วทำการทำการเกลี่ยตัวอย่างเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม จากนั้นนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนี



รูปที่ 3.1 การแสดงการเจือจางเป็นลำดับส่วน

3.3.4 การทดสอบสภาวะการอยู่รอดและการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

การทดสอบการอยู่รอดของเชื้อด้วยการรมไอด้วย Acetic acid 8% เป็นเวลา 60 นาที โดยเริ่มจากการนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 3.3.1 มาทำการ Spread Plate โดยการใช้ไมโครปิเปต ที่ปรับค่าเป็น 100 µL ดูดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่มี PCA อยู่ในนั้นแล้ว แล้วทำการทำการเกลี่ยตัวอย่างเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัว L จากนั้นนำไปเข้าตู้รมไอ โดยการเปิดฝาเพลทไว้ก่อน เมื่อครบเวลาที่กำหนดก็ทำการปิดเพลท แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลด้วยการนับโคโลนี

การทดสอบการอยู่รอดของเชื้อด้วยการใช้ของเหลว โดยการใช้ Acetic acid และ Glacial acetic acid 8% ซึ่งเริ่มจากการนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 3.3.1 มาใส่ลงในสารข้อที่ 3.3.2 และเก็บหลอดตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 ออกมาทันที หลอดตัวอย่างที่เหลือนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 25 30 35 40 45 50 55 และ60 นาที จากนั้นจับเวลาและเก็บหลอดตัวอย่างออกมาเมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ จากนั้นทำเช่นเดียวกับชั่วโมงที่ 0 โดยนำหลอดตัวอย่างนั้นมาเจือจางเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับส่วน แล้วทำวิธีการ Spread Plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลด้วยการนับโคโลนี

3.3.6 การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ

ทำการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างเชื้อที่แยกไว้แล้วโดยการใช้ Loop เขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อออกมา Streak ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PCA อยู่ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเกิดสปอร์ จากนั้นนำมาสักเกตรูปร่าง ลักษณะการเกิดโคโลนี และทำการย้อมสีสปอร์ โดยเริ่มจาก 1.นำเชื้อมาทำการ smear ลงบนแผ่นสไลด์

2.ปล่อยสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์

3.หยดสี malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมบริเวณที่มีเชื้อ

4.นำสไลด์ไปวางไว้ที่มีไอของน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที

5.ทิ้งสไลด์ให้เย็น ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง

6.เติมสี safranin ลงไป ทิ้งไว้นาน 30-60 วินาที

7.ล้างด้วยน้ำและซับให้แห้ง

8.นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100× สังเกตดูการติดสีเขียวของสปอร์ ในขณะที่เซลล์ติดสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้น

จากการนำเชื้อจุลินทร์ *Geobacillus stearothermophilus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 3.3.1 มาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน จากนั้นนำแต่ละลำดับส่วนนั้นมา Spread Plate ดูดแต่ละความเข้มข้น ลงในจานเพาะเชื้อ PCA แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีเพื่อใช้คำนวณต่อไปเป็นหน่วย CFU/ml

4

รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *G. stearothermophilus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ทำการบ่มเป็น เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

จากการทดลองพบว่าในการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการนำเชื้อไปเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการใส่เชื้อในหลอดอาหารแล้วไปบ่มปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณเชื้อที่มากกว่า ผลการทดลองทุกครั้งจะไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อที่แน่นอนได้ แต่พบว่ามีเชื้ออยู่ที่ 10^5- 10^7 ตรวจผลการทดลองด้วยการนับโคโลนี ซึ่งจะพบว่าอยู่ในช่วง 25 ถึง >300 โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของสภาวะการอยู่รอดและการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

จากการศึกษาเป็นการทดสอบการอยู่รอดของเชื้อด้วยการรมไอด้วยการใช้น้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 8% เป็นเวลา 60 นาที โดยเริ่มจากการนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการ Spread Plate จากนั้นนำไปเข้าตู้รมไอ โดยการเปิดฝาเพลทไว้ก่อน เมื่อครบเวลาที่กำหนดก็ทำการปิดเพลท แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลด้วยการนับโคโลนี

ตารางที่ 4.1 จำนวนการรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *G.stearothermophilus* เมื่อสัมผัสกับไอน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% เป็นระยะเวลา 60 นาที

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)	ระยะเวลาในการรมไอ (นาที)	จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ (CFU/ml)	% การยับยั้ง
10^6	0	>300	0
	20	>300	0
	25	>300	0
	30	>300	0
	35	>300	0
	40	>300	0
	45	>300	0
	50	>300	0
	55	>300	0
	60	>300	0

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 แสดงผลจากการรมไอน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ซึ่งพบว่าการรมไอน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% เป็นระยะเวลา 60 นาทีนั้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาจำนวนการรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ ทดลองโดยใส่เชื้อตัวอย่างลงในหลอดที่มีกรดอะซิติก 8 % หลอดทดลองที่มีกรดแกลเซียลอะซิติก 8% จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับส่วนทันที จากนั้นนำมาSpread plateบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 25 30 35 40 45 50 55 และ60 นาที เมื่อครบตามเวลากำหนดให้เก็บหลอดตัวอย่างในเวลาต่างๆมาเจือจางและทำการspread plate เช่นเดียวกับชั่วโมงที่ 0

ตารางที่ 4.2 จำนวนการรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ที่ผ่านการทดสอบด้วยน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่และหัวน้ำส้มที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% ที่อุณหภูมิ 60˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

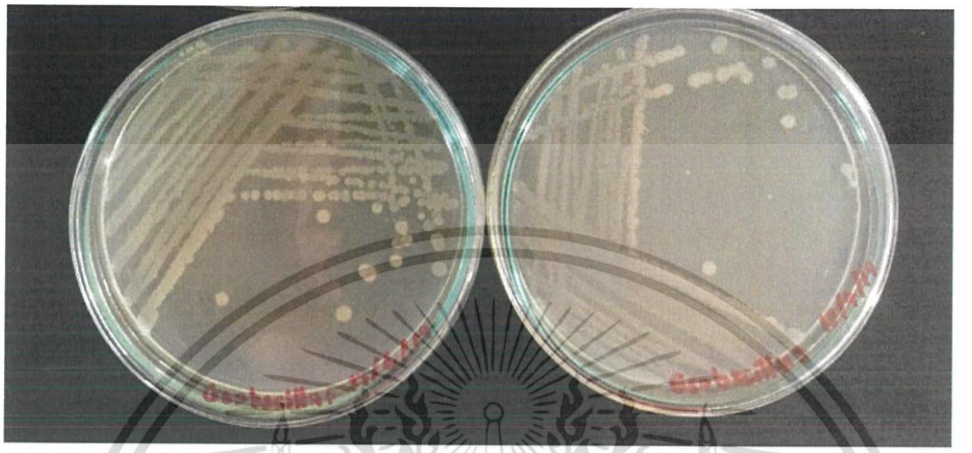
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	น้ำส้มสายชูจากข้าวไร		Glacial acetic acid 8%	
	เชื้อที่รอดชีวิต (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)	เชื้อที่รอดชีวิต (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
0	5.06±0.07	0.00	5.04±0.04	0.00
6	4.64±0.40	22.73	4.52±0.31	24.66
9	4.39±0.41	26.90	4.18±0.31	30.40
12	3.79±0.61	36.85	3.77±0.58	37.10
15	3.59±0.60	40.25	3.32±0.70	44.70
18	3.28±0.49	45.31	1.67±0.49	72.09
21	1.06	82.36	1.00	83.33
24	0.0	100.00	0.0	100.00

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบกับของเหลว 2 ชนิด คือ น้ำส้มสายชูจากข้าวไร่และหัวน้ำส้มโดยที่ใช้ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA โดยมีเชื้อในชั่วโมงที่ 0 5.06 log CFU/ml และ 5.04 log CFU/ml โดยกำหนดระยะเวลาในการสัมผัสของเหลวที่ 0 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 60˚C ตลอดเวลาในการสัมผัสของเหลว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* สามารถควบคุมการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ได้ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

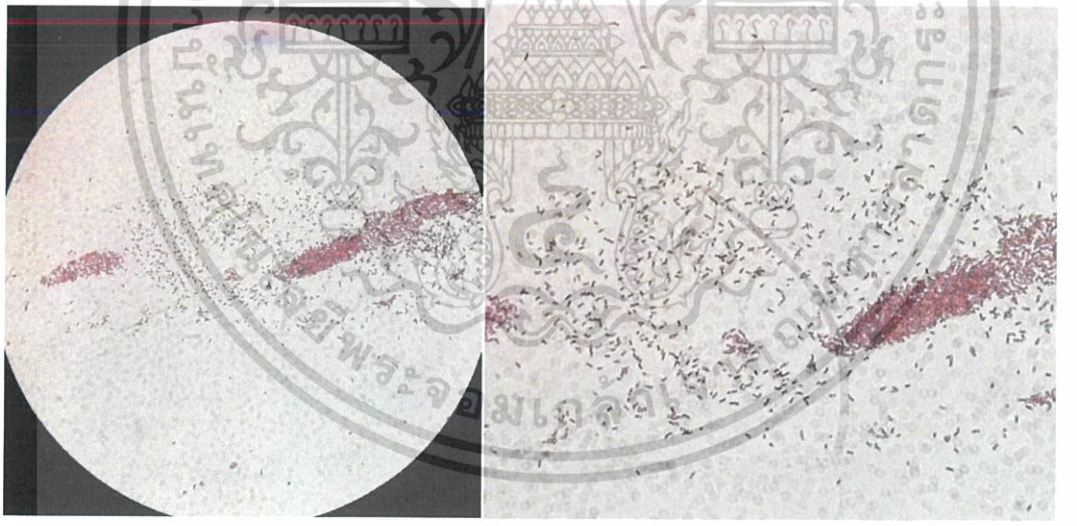
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษารูปร่างลักษณะเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *G. stearothermophilus*

จากการศึกษาได้ทำการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างเชื้อที่แยกไว้แล้วโดยการใช้เทคนิค Cross Streak ลงในจานเพาะเชื้อ PCA จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเกิดสปอร์ จากนั้นนำมาสังเกตรูปร่าง ลักษณะการเกิดโคโลนี และทำการย้อมสีสปอร์เพื่อดูลักษณะของสปอร์



รูปที่ 4.2 ลักษะโคโลนีของเชื้อ ***G. stearothermophilus*** เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.3 ลักษะเซลล์ของเชื้อ *G. stearothermophilus* จากกล้องจุลทรรศน์

จากการทดลองจะพบว่าเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* มีลักษะเป็นโคโลนี กลม สีขาวขุ่น เมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลล์ของเชื้อมีรูปร่างเป็นแท่ง แกรมบวก และเมื่อทำการย้อมดูสปอร์จะสังเกตเห็นว่าสปอร์ติดสีเขียว และตัวเซลล์ติดสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาการรมไอน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ซึ่งพบว่าการรมไอน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% เป็นระยะเวลา 60 นาทีนั้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ได้

การศึกษาน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่และหัวน้ำส้มโดยที่ใช้ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% โดยมีเชื้อในชั่วโมงที่ 0 คือ 5.06 log CFU/ml และ 5.04 log CFU/ml โดยกำหนดระยะเวลาในการสัมผัสของเหลวที่ 0 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C ตลอดเวลาในการสัมผัสของเหลว ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* สามารถควบคุมการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ได้ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ก่อนการทดลองควรตรวจสอบค่าความเข้มข้นของสาร Acetic acid และ Glacial acetic acid ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนก่อนการใช้งาน

5.2.2 ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ การชั่งน้ำหนักควรมีค่าที่แน่นอนและมีค่าใกล้เคียงกันทุกครั้ง

5.2.3 ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาการหาวิธีการที่ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

5.2.4 เนื่องจากในการทดลองใช้เวลาที่ 24 ชม.ในการยับยั้งเชื้อที่สมบูรณ์โดยใช้น้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 8% ควรศึกษาและประยุกต์ใช้เพิ่มเติมเกี่ยวกับน้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้นกรดอะซิติกที่มากกว่า 8% เพื่อหาระยะเวลาการยับยั้งเชื้อที่เร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ ดร. นิธิยา รัตนาปนนท์. 2012. **น้ำส้มสายชูหมัก**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4025/%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%AA%E0%B9%89%E0%B8%A1%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B8%8A%E0%B8%B9%E0%B8%AB%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%81

นฤมล นกพรหม, ขนิษฐา สุทินเผือก, อลิษา สุนทรวัฒน์, นิธิภัทร บุญปก และ เฉลิมชัย วงษ์อารีย์. 2015. **การรมด้วยไอของกรดอะซิติกร่วมกับการอบลมร้อนต่อคุณภาพของมะขามหวานพันธุ์สีทอง**. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 46: 873-876

สุวิทย์ แว่นเกตุ. **ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biological Indicator)**. 2015. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.cssd-gotoknow.org/2015/02/biological-indicator.html

อังคณา สุวรรณกูฏ. **รมยากับการค้าข้าว** . [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://doa.go.th/pibai/pibai/n16/v_6-july/ceaksong.html.

Sam Timko. ***Geobacillus stearothermophilus***. 2010. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Geobacillus_stearothermophilus

David J. Studholme. **Some (bacilli) like it hot: genomics of Geobacillus species.** 2014. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://www.academia.edu/16905763/Some_bacilli_like_it_hot_genomics_of_Geobacillus_species

Wickham Laboratories Ltd. ***Geobacillus stearothermophilus***. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-geobacillus-stearothermophilus/

J Dairy Sci. ***Bacillus stearothermophilus NEUF2011.*** 2008. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_stearothermophilus_NEUF2011

Bamforth, C.W. and Cook, D.J., 2005. Food, fermentation and micro-organisms (pp. 154). Oxford, UK:: Blackwell Science.

Bayoï, J.R., Djoulde, D.R., Kamga, P.B., Nyegue, M., Olugu, S.V., Bakary, D. and Etoa, F.X., 2014. Activity of acetic acid on Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis spores after sublethal heat pretreatments. International Journal of Innovation and Scientific Research, 10(2), pp.570-575.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Budak NH, Aykin E, Seydim AC, Greene AK, Guzel-Seydim ZB. 2014. Functional properties of vinegar. J Food Sci 79:R757–64.

Burgess, S.A., Flint, S.H., Lindsay, D., Cox, M.P. and Biggs, P.J., 2017. Insights into the Geobacillus stearothermophilus species based on phylogenomic principles. BMC microbiology, 17(1), p.140.

Chang, J. M., and Fang, T. J. 2007. Survival of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella enterica serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against E. coli O157: H7. Food Microbiology, 24:745-751

Chen, H., Chen, T., Giudici, P. and Chen, F., 2016. Vinegar functions on health: Constituents, sources, and formation mechanisms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(6), pp.1124-1138.

Davidson, P. M., and Juneja, V. K. 1990. Antimicrobial agents. Food additives., 83:137.

Ho, C.W., Lazim, A.M., Fazry, S., Zaki, U.K.H.H. and Lim, S.J., 2017. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. Food Chemistry, 221, pp.1621-1630.

Kotzekidou, P., 2014. Geobacillus stearothermophilus (Formerly Bacillus stearothermophilus). Encyclopedia of Food Microbiology, pp.129-134.

Krusong, W., Jindaprasert, A., Laosinwattana, C., and Teerarak, M. 2015. Baby corn fermented vinegar and its vapour control postharvest decay in strawberries. New Zealand journal of crop and horticultural science, 43: 193-203.

Krusong, W., Teerarak, M. and Laosinwattana, C., 2015. Liquid and vapor-phase vinegar reduces Klebsiella pneumoniae on fresh coriander. Food Control, 50, pp.502-508.

Madrera, R. R., Lobo, A. P., and Alonso, J. J. M. 2010. Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits. Food research international, 43:70-78.

Moyls, A.L., Sholberg, P.L. and Gaunce, A.P., 1996. Modified-atmosphere packaging of grapes and strawberries fumigated with acetic acid. HortScience, 31(3), pp.414-416.

Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A.G., Venaille, L., Leguérinel, I., Coroller, L. and Couvert, O., 2015. Modeling the behavior of Geobacillus stearothermophilus ATCC 12980

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food microbiology, 48, pp.153-162.

Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltaraus, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. and Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov. and Geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans to Geobacillus as the new combinations G. stearothermophilus, G. th. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 51(2), pp.433-446.

Sapers, G.M., Walker, P.N., Sites, J.E., Annous, B.A. and Eblen, D.R., 2003. Vapor-phase decontamination of apples inoculated with Escherichia coli. Journal of Food Science, 68(3), pp.1003-1007.

Sengun, I.Y. and Karapinar, M., 2004. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of Salmonella typhimurium on carrots (Daucus carota L.). International journal of food microbiology, 96(3), pp.301-305.

Sholberg, P. L., Haag, P., Hocking, R., & Bedford, K. (2000). The use of vinegar vapor to reduce postharvest decay of harvested fruit. Journal of Horticultural Science, 35, 898-903.

Sholberg, P. L. 2009. Control of postharvest decay by fumigation with acetic acid or plant volatile compounds. Fresh Produce, 3(Special issue 1), 80-86.

Studholme, D.J., 2015. Some (bacilli) like it hot: genomics of Geobacillus species. Microbial biotechnology, 8(1), p.40.

Trunet, C., Ngo, H. and Coroller, L., 2019. Quantifying permeabilization and activity recovery of Bacillus spores in adverse conditions for growth. Food microbiology, 81, pp.115-120.

Venditti, T., Ladu, G., Cubaiu, L., Myronycheva, O. and D'hallewin, G., 2017. Repeated treatments with acetic acid vapors during storage preserve table grapes fruit quality. Postharvest biology and technology, 125, pp.91-98.

Xu Q, Ao Z, Tao W. 2003. Progress in vinegar function study. China Condiment 12:11–23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zeigler, D.R., 2005. Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus Geobacillus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(3), pp.1171-1179

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. 1. Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5 g
Yeast extract	2.5 g
Dextrose	1 g
Agar	15 g

Final pH 7.0 ± 0.2 ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 15 นาที

ก. 2. Trypticase (Tryptic) Soy Broth

Trypicase peptone	17 g
Phytone peptone	3 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2.5 g
Glucose	2.5 g
น้ำกลั่น	1 L

Final pH 7.3 ±0.2 ละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในฟลาสก์หรือหลอดที่มีฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อ ใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 15 นาที

ก. 3. Peptone water 0.1 %

Peptone	1 g
น้ำกลั่น	1 L

ละลายให้เข้ากัน นำเข้าฆ่าเชื้อ ใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสีย้อม

ข. 1.Gram Crystal violet

Solution A (Stock)

Crystal violet (90% day content)	2 g
95 % Ethanol	20 ml

Solution B

Ammonium oxalate	0.8 g
น้ำกลั่น	80 ml

เจือจาง Solution A ลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วผสมกับสาร Solution B ตั้งไว้ 24 ชม. แล้วกรองก่อนใช้

ข. 2.Gram iodine

Iodine	2 g
Potassium iodide (KI)	4 g
น้ำกลั่น	300 ml

ละลาย KI ในน้ำกลั่น บด iodine แล้วละลายในสารละลาย KI กวนจนละลายหมด เก็บในขวดสีชา

ข. 3. Gram safranin O

Safranin o	0.25 g
95 % Ethanol	10 g
น้ำกลั่น	90 ml

ละลายสีใน ethanol (กวนด้วยแท่งแก้วหรือ magnetic bar)แล้วเติมน้ำกลั่น กรองก่อนใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

ค. 1. การเตรียมสารละลาย NaOH 0.01 N

ชั่ง NaOH 40.0 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร ละลายจนหมดจะได้สารละลาย NaOH 1 N จากนั้นดูดสารละลาย 1 N NaOH มา 10 มิลลิลิตรใส่ลงในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย NaOH 0.01N

ค. 2. การเตรียม Standard Potassium Hydrogen Phthalate ($KHC_8H_4O_4$)

อบ $KHC_8H_4O_4$ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 คืน แล้วรีบนำออกมาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Dessicator) ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจากนั้นแบ่ง $KHC_8H_4O_4$ มาชั่ง 3 ซ้ำๆละประมาณ 0.01 กรัม (ใช้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ห่อแยกกันไว้

ค. 3.การเทียบมาตรฐาน NaOH (standardize)

นำ $KHC_8H_4O_4$ ที่ชั่งน้ำหนักไว้ทั้ง 3 ห่อมาใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร 3 ใบนำ $KHC_8H_4O_4$ จากฟลาสก์ ใบที่ 1 เติมน้ำกลั่น (ต้มให้เดือด ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง) จำนวน 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนสารละลายหมด หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยดลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วรีบทำการไทเทรตด้วย 0.01 N NaOH บันทึกปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรต (ทำ Control เทียบกับน้ำกลั่นที่ไม่มี $KHC_8H_4O_4$ จำนวน 50 มิลลิลิตร) เสร็จแล้วดำเนินการกับ $KHC_8H_4O_4$ อีก 2 ฟลาสก์ที่เหลือทำตามลำดับทำนองเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว นำค่าปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไป ไปคำนวณหาความเข้มข้นมาตรฐานโดยใช้สูตร

$$\text{Normality} = \frac{(gm.KHC_8H_4O_4)(1000)}{(ml.NaOH)(204.229)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ลักษณะสัณฐานของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ที่ใช้ในการทดลอง

ง 1. ตารางแสดงภาพลักษณะสัณฐานของเชื้อ Geobacillus stearothermophilus ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ Geobacillus stearothermophilus	
ภาพตัวอย่างเชื้อที่ทำการแยกไว้	
ภาพลักษณะโคโลนี	
ภาพที่ได้จากการส่องดูสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวปิยารัตน์ หนันสีสุข
วันเดือนปีเกิด	20 มีนาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น
สถานที่ปัจจุบัน	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปี 2558 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเทพศิรินทร์ร่มเกล้าแผนการเรียน วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ ปี 2558 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประวัติการทำงาน	บริษัท ซีพีเอฟ ฟู้ด แอนด์ เบฟเวอร์เรจ จำกัด

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววิสรา วงศ์ษา
วันเดือนปีเกิด	6 มีนาคม 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดศรีสะเกษ
สถานที่ปัจจุบัน	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปี 2558 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนห้วยทับทันวิทยาคม แผนการเรียน วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ ปี 2558 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประวัติการทำงาน	ปี2558 พนักงานชั่วคราว บริษัท ซีพีแรม จำกัด ปี2561 แผนก QC, QA บริษัท ไทย สพิริท อินดัสทรี จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้