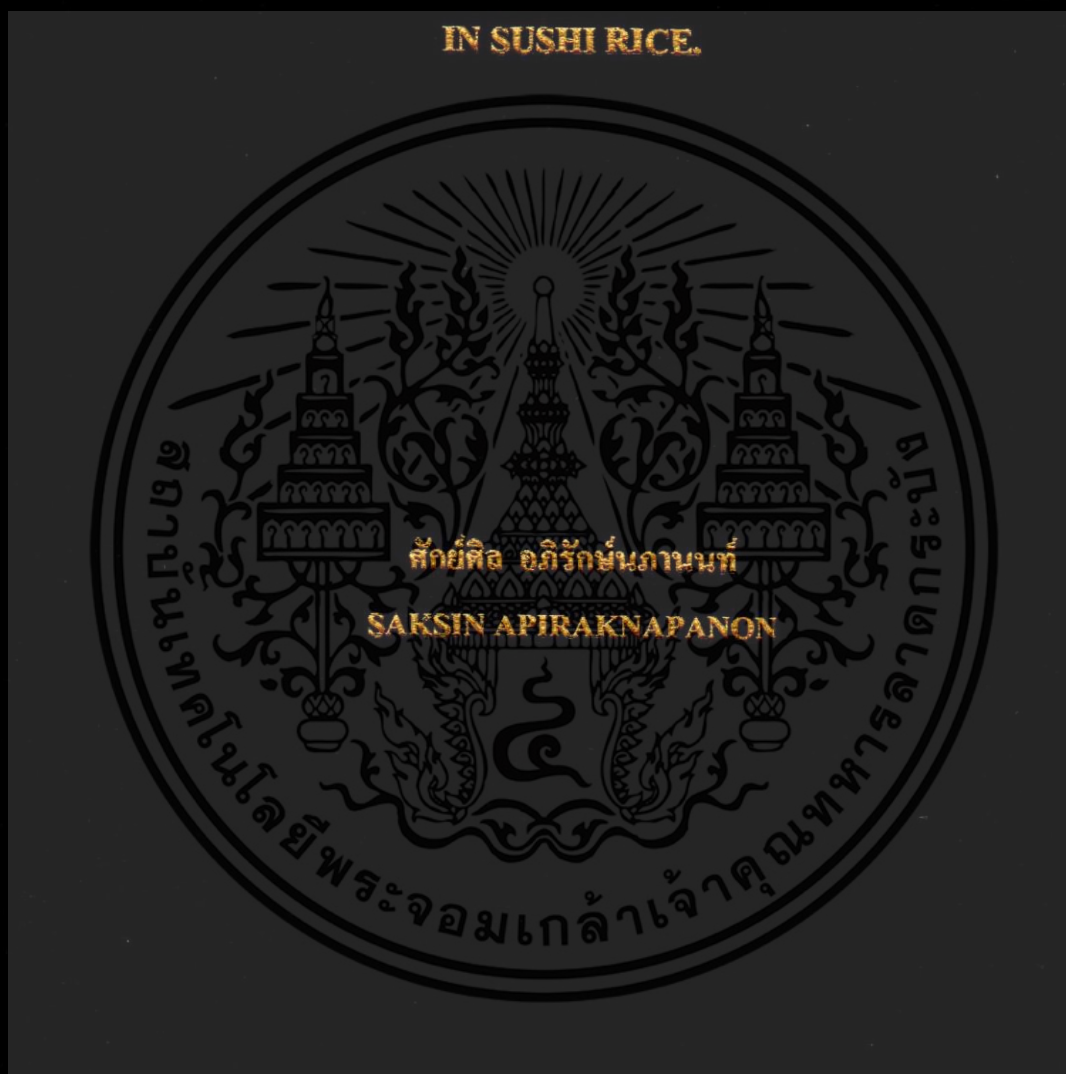


ผลของกรดอะซิติก และอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus cereus* ในข้าวซูชิ

EFFECT OF ACETIC ACID AND TEMPERATURE ON *Bacillus cereus*

IN SUSHI RICE.



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AI-M-054-263

ผลของกรดอะซิติก และอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus cereus* ในข้าวซูชิ

EFFECT OF ACETIC ACID AND TEMPERATURE ON *Bacillus cereus*
IN SUSHI RICE.



ศักดิ์ศิลป์ อภิรักษ์นภานนท์

SAKSIN APIRAKNAPANON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AI-M-054-263

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**EFFECT OF ACETIC ACID AND TEMPERATURE ON *Bacillus cereus*
IN SUSHI RICE.**



SAKSIN APIRAKNAPANON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY
KING MONGKULT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2016

KMITL-2016-AI-M-054-263

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2016

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของกรดอะซิติกและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus cereus* ในข้าวซูชิ
EFFECT OF ACETIC ACID AND TEMPERATURE ON *BACILLUS CEREUS*
IN SUSHI RICE

ชื่อนักศึกษา นายศัศย์ศิลป์ อภิรักษ์นภานนท์
รหัสประจำตัว 56608024
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

| คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ | ลายมือชื่อ |
|----------------------------|---|
| รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ |  |
| ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ | |
| ดร.กิตติชัย บรรจง | |
| รศ. ดร.ประภาพร ขอไพบุลย์ | |

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 16 ธันวาคม 2559 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่... ๒๒ ...เดือน... ๖๓... พ.ศ... ๒๕๕๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ผลของกรดอะซิติก และอุณหภูมิต่อการเจริญของ <i>Bacillus cereus</i> ในข้าวซูชิ |
| นักศึกษา | นายศักร์ศิล อภิรักษ์นภานนท์ |
| รหัสนักศึกษา | 56608024 |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| สาขาวิชา | การจัดการความปลอดภัยอาหาร |
| พ.ศ. | 2559 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ |

บทคัดย่อ

จากการสุ่มตรวจเชื้อ *Bacillus cereus* ในซูชิหน้าไข่กุ้งและข้าวซูชิในร้านค้าตามตลาดนัดย่านลาดกระบังจำนวน 5 ร้าน พบการปนเปื้อนเชื้อร้อยละ 80 ในตัวอย่างซูชิ และร้อยละ 53 ในตัวอย่างข้าวซูชิ และเมื่อนำตัวอย่างที่พบเชื้อมาเทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อ *B. cereus* สูงกว่าเกณฑ์กำหนดคิดเป็นร้อยละ 50 และร้อยละ 37.5 ของตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิที่พบการปนเปื้อนทั้งหมดตามลำดับ ค่า pH ของซูชิและข้าวซูชิอยู่ในช่วง 4.91-5.80 และ 4.50-5.30 ตามลำดับ และค่า aw ของตัวอย่างทั้งสองประเภทอยู่ในช่วงเดียวกันคือ 0.97-0.99 ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดี การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth ที่ปรับกรดอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5, 5.0 และ 5.5 และเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในทุกระดับ pH และที่ pH 4.5 กับ 5.5 ของทั้งสองอุณหภูมิสามารถยับยั้งหรือลดจำนวนเชื้อลงได้ในเวลา 24 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 5.5 นั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และการทดลองในข้าวนั้นพบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งเชื้อได้เช่นเดียวกัน แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสที่ pH 5.0 และ 5.5 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น ผู้ผลิตจึงควรปรับ pH ของซูชิให้มีค่าต่ำกว่า 4.5 และควรเก็บรักษาวัตถุดิบไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ รวมไปถึงการนำระบบการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหารเข้ามาประยุกต์ใช้ในกิจการเพื่อลดจำนวนเชื้อเริ่มต้น ก็จะสามารถช่วยให้ซูชิที่ผลิตนั้นปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้

| | |
|-----------------------|---|
| Thesis Title | Effect of acetic acid and temperature on <i>Bacillus cereus</i> in Sushi rice |
| Student | Mr. Saksin Apiraknapanon |
| Student ID | 56608024 |
| Degree | Master of Science |
| Program | Food Safety Management |
| Year | 2016 |
| Thesis Advisor | Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwivathana |

Abstract

From the surveillance results, sushi and sushi rice were collected from the market and found *Bacillus cereus* at 80% and 53% of total samples respectively. The count from contaminated samples that higher than the standard criterion coded by Microbiological criterion of food and food contact, Department of medical science, Ministry of public health were 50% and 37.5% of total samples of sushi and sushi rice respectively. The pH range of sushi was 4.91 – 5.80 whereas sushi rice was 4.50 – 5.30. The a_w of sushi and sushi rice were in the same range (0.97 – 0.99 a_w) which was suitable for bacterial growth. The experiment of storage conditions was conducted. *B. cereus* was enumerated in TSB at different pH (4.5, 5.0 and 5.5) and temperature (4°C and 35°C). The result showed that *B. cereus* was reduced when stored at 4°C in every pH values. The count in TSB was reduced only pH values of 4.5 and 5.0 when stored at 35°C. The experiment of storage conditions in cooked rice was also performed. The result showed that there was no reduction of *B. cereus* in cooked rice when stored at 35°C in every pH values. The count was reduced only pH values of 5.0 and 5.5 when stored at 4°C. It can be concluded that sushi producer should adjust pH of Sushi below 4.5 and store the raw materials at low temperature to avoid the growth of *B. cereus*. This rule can also apply for GMP system in the production process for consumer safety.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อดิสร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำชี้แนะ และช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ดร.กิตติชัย บรรจง กรรมการสอบหัวข้อและ โครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ และรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้เสนอแนะการอภิปรายผลจนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณคุณสมภพ วัฒนมณี สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวินิจฉัยยืนยันเชื้อ

ขอขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท คณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกสาขา ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและการอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.ดวงกมล เจริญวงศ์ และคุณพรณชรินทร์ ศรีทธา ที่ให้คำชี้แนะและการสนับสนุนในการศึกษา และการทำงานวิจัยอย่างเต็มที่ตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และคุณญาติ อภิรักษ์นภานนท์ พี่สาวที่เป็นแบบอย่างที่ดี และคอยให้กำลังใจตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้บิดามารดา ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ศักดิ์ศิลป์ อภิรักษ์นภานนท์

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | II |
| กิตติกรรมประกาศ..... | III |
| สารบัญ..... | IV |
| สารบัญตาราง..... | VII |
| สารบัญภาพ..... | VIII |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 2.1 ชูชิ..... | 4 |
| 2.1.1 ประวัติของชูชิ..... | 4 |
| 2.1.2 ประเภทของชูชิ..... | 5 |
| 2.2 ข้าว..... | 6 |
| 2.2.1 ข้าวอินดิกา..... | 7 |
| 2.2.2 ข้าวจาปอนิกา..... | 7 |
| 2.2.3 ข้าวจาวานิกา..... | 7 |
| 2.3 <i>Bacillus cereus</i> | 7 |
| 2.3.1 สภาวะการเจริญ และการเหี่ยวรอด..... | 7 |
| 2.3.2 แหล่งที่มา..... | 8 |
| 2.3.3 การสร้างสปอร์..... | 9 |
| 2.3.4 สารพิษ..... | 9 |
| 2.3.5 <i>Bacillus cereus</i> ในข้าว..... | 10 |
| 2.3.6 การทนความร้อนของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในข้าว..... | 11 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| 2.3.7 อุบัติการณ์จากเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> | 12 |
| 2.3.8 กฎหมายที่เกี่ยวข้อง | 13 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ..... | 15 |
| 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... | 15 |
| 3.1.1 จุลินทรีย์ทดสอบ..... | 15 |
| 3.1.2 เครื่องมือ | 15 |
| 3.1.3 อุปกรณ์ | 16 |
| 3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ | 16 |
| 3.1.5 สารเคมี | 16 |
| 3.1.6 วัสดุดิบ | 17 |
| 3.2 วิธีการทดลอง..... | 17 |
| 3.2.1 สํารวจปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> ค่า pH และ a_w | 17 |
| 3.2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อปริมาณเชื้อในอาหารเหลว | 18 |
| 3.2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อปริมาณเชื้อในข้าวซูชิ | 19 |
| 3.2.4 การวางแผนการทดลองและการประเมินผลทางสถิติ..... | 20 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... | 21 |
| 4.1 ผลสำรวจปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> ค่า pH และ a_w | 21 |
| 4.2 ผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อปริมาณเชื้อในอาหารเหลว | 27 |
| 4.3 ผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อปริมาณเชื้อในข้าวซูชิ | 32 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... | 37 |
| 5.1 สรุปผลการทดลอง..... | 37 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ..... | 38 |
| บรรณานุกรม | 39 |

สารบัญ (ต่อ)

| | |
|--|----|
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี | 45 |
| ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายสปอร์และเซลล์ | 49 |
| ภาคผนวก ค การทดสอบยืนยันเชื้อ <i>B. cereus</i> | 53 |
| ประวัติผู้เขียน | 56 |



สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.1 ผลสำรวจปริมาณ <i>B. cereus</i> , pH และ a_w | 24 |
| 4.2 ปริมาณ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น | 28 |
| 4.3 ปริมาณ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น | 29 |
| 4.4 ปริมาณ <i>B. cereus</i> ในตัวอย่างข้าว เมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น | 32 |
| 4.5 ปริมาณ <i>B. cereus</i> ในตัวอย่างข้าว เมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น | 34 |
| ค.1 รายการการทดสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ <i>B. cereus</i> | 55 |



สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.1 เปรียบเทียบปริมาณ <i>B. cereus</i> ในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิ..... | 21 |
| 4.2 เปรียบเทียบค่า pH ในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิ..... | 22 |
| 4.3 เปรียบเทียบค่า a_w ในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิ..... | 22 |
| 4.4 ร้านจำหน่ายซูชิย่านลาดกระบัง แสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะ และวิธีการปฏิบัติที่ไม่ดี..... | 26 |
| 4.5 แสดงปริมาณเชื้อใน TSB เมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น. | 28 |
| 4.6 แสดงปริมาณเชื้อใน TSB เมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น. | 30 |
| 4.7 แสดงปริมาณเชื้อในตัวอย่างข้าวเมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น..... | 33 |
| 4.8 แสดงปริมาณเชื้อในตัวอย่างข้าวเมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น..... | 34 |
| ข.1 สารละลายเชื้อที่ชะจาก NA slant | 50 |
| ข.2 การนำสารละลายเชื้อ ไปให้ความร้อนด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส..... | 51 |
| ข.3 สปอร์ของเชื้อ <i>B. cereus</i> เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์..... | 51 |
| ข.4 การทำ serial dilution เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อ..... | 52 |
| ค.1 โชนใสของเชื้อ <i>B. cereus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep Blood Agar..... | 54 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ซูชิคืออาหารญี่ปุ่น ซึ่งในอดีตคือเนื้อปลาที่หมักกับข้าว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการถนอมเนื้อปลาโดยใช้กรดที่เกิดจากการหมักข้าว และในการรับประทานจะเก็บไว้เพียงเนื้อปลา และทิ้งส่วนที่เป็นข้าวไป แต่ในปัจจุบัน “ซูชิ” คือชื่อรวมๆ ที่ใช้เรียกรายการอาหารที่ทานคู่กันกับ “ข้าวซูชิ” ซึ่งเป็นข้าวญี่ปุ่น หุงสุกและเติมน้ำส้มสายชู และอาจจะมีการปรุงรสเพิ่มเติมโดยใช้เกลือ น้ำตาล หรือเหล้าหวานปรุงอาหาร(มิริน) (Feng, 2012) โดยรายการอาหารที่นำมากินคู่กันกับข้าวซูชินี้จะถูกเรียกรวมๆว่าซูชิทั้งหมด จึงทำให้มีซูชิหลายรูปแบบแตกต่างกันไปตามวัตถุดิบที่นำมากินหรือวิธีการจัดวาง เช่น “มาคิซูชิ” (Makizushi) ใช้เรียกซูชิม้วน ที่จะใช้สาหร่ายห่อข้าวซูชิอยู่ด้านนอก และมีไส้เป็นกับข้าวตรงกลาง, “นิกิริซูชิ” (Nigirizushi) ใช้เรียกซูชิที่ใช้มือกด โดยจะมีหน้าซึ่งเป็นกับข้าวซึ่งมักจะ เป็นปลาดิบหรืออาหารทะเลดิบ กดติดกับข้าวซูชิป้ายวาซาบิ (Wasabi) ด้านล่าง หรือ “ชิราชิซูชิ” (Chirashizushi) ซึ่งจะคล้ายกับอาหารจานเดียวของประเทศไทย คือเป็นข้าวที่มีกับข้าวโปะอยู่ ด้านหน้าและเสิร์ฟในชาม เพียงแต่ข้าวที่ใช้จะเป็นข้าวซูชิเท่านั้น (Guthrie, 2016)

ปัจจุบันซูชิได้แพร่หลายออกไปยังหลายประเทศทั่วโลก โดยในประเทศไทยนั้น ความนิยมอาหารญี่ปุ่นเช่นซูชินี้ได้เพิ่มจำนวนมากขึ้น จนทำให้มีผู้ประกอบการได้เปิดร้านซูชิเพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้ามากขึ้นเรื่อยๆ โดยในปีพ.ศ. 2558 นั้น มีจำนวนร้านอาหารญี่ปุ่นใน กรุงเทพมหานครจำนวนกว่า 1,500 ร้าน (JRO, 2015) โดยนอกจากร้านอาหารญี่ปุ่นตามห้างสรรพสินค้า หรือภัตตาคารย่านใจกลางเมืองแล้ว ยังมีร้านอาหารญี่ปุ่นที่จำหน่ายตามริมทาง หรือตามตลาดนัดแหล่งชุมชนต่างๆ โดยสนนราคาซูชิตามร้านเหล่านี้มีราคาไม่ถึงสิบบาทต่อชิ้น ด้วยภาพลักษณ์ของตัวสินค้าที่ดูสดใหม่ ประกอบกับกระแสอาหารเพื่อสุขภาพในปัจจุบัน จึงทำให้ซูชิเป็นอาหารที่ค่อนข้างได้รับความนิยมของวัยรุ่นและคนวัยทำงานในเมืองของยุคนี้

จากความนิยมในตัวอาหารทำให้เกิดร้านซูชิขึ้นเป็นจำนวนมากและราคาที่ถูกลง แต่ก่อให้เกิดผลกระทบอีกด้าน คือคุณภาพของตัวซูชิที่ไม่ได้ผลิตขึ้นมาสดๆก่อนนำไปบริโภค แต่ถูกผลิตขึ้นมาเป็นจำนวนมากก่อนที่จะนำไปกระจายตามแหล่งชุมชนต่างๆ ประกอบกับสภาพการผลิตและจำหน่ายที่อาจจะไม่เหมาะสม และพฤติกรรมผู้บริโภคของผู้บริโภคที่ไม่ได้รับประทานซูชิ

ในทันทีที่ซื้อดังเช่นตามร้านอาหารในห้างสรรพสินค้า แต่ซื้อเพื่อนำไปบริโภคในภายหลังในที่พัก เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาของบริษัทฯ เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เอกสารนี้แล้ว บริษัทฯ ไม่สามารถรับผิดชอบต่อเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาศัย โดยอาหารกลุ่มนี้จะไม่มีการอุ่นให้ความร้อนก่อนการบริโภค ซึ่งปัจจัยทั้งหลายเหล่านี้ได้เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรือปนเปื้อนมาในภายหลังจากสิ่งแวดล้อม และจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเพิ่มจำนวนจนก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยได้มีการสำรวจว่าพบเชื้อ *Escherichia coli* ในซูชิที่จำหน่ายในกรุงเทพฯ (ไทยรัฐออนไลน์, 2556) หรือเชื้อก่อโรคเช่น *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* (สุคสายชล หอมทอง และคณะ, 2554) ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษต่อผู้บริโภคได้

Bacillus cereus คือเชื้อก่อโรคที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และมักพบอยู่ในวัตถุดิบประเภทธัญพืช เช่น ข้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตซูชิ *B. cereus* สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการปรุงอาหารโดยปกตินั้น ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อให้หมดไปได้ ประกอบกับซูชิที่ขายตามตลาดนั้นส่วนใหญ่ได้มีการหุงข้าวมาก่อน แล้วจึงมาขึ้นเป็นซูชิที่หน้าร้านเพื่อให้ลูกค้าเลือกซื้อต่อไป ซึ่งระยะเวลาตั้งแต่หุงข้าวจนกระทั่งลูกค้าบริโภคซูชิ นั้น อาจนานพอที่จะให้สปอร์ของเชื้อที่เหลือรอดจากกระบวนการหุงต้มงอกเป็นเซลล์และเพิ่มจำนวนจนกระทั่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น การควบคุมเชื้อ *B. cereus* จึงควรมุ่งเน้นการควบคุมสปอร์ที่หลงเหลือจากการหุงต้ม ไม่ให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนโดยการใช้ปัจจัยอื่นๆเข้ามาควบคุมแทน เช่น ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) อุณหภูมิ, และความเป็นกรดต่าง (pH) (Rob *et al.*, 2004)

ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของอุณหภูมิ และความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวปรับกรดที่ใช้ในการผลิตซูชิ เพื่อเป็นข้อมูลในการผลิต ขนส่ง หรือจัดเก็บซูชิ โดยยังคงความปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสำรวจปริมาณเชื้อ *B. cereus*, pH และ a_w ในตัวอย่างซูชิหน้าไขกุ้ง และข้าวซูชิ

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บและรอกำหนดอายุซูชิ รวมถึงความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อเซลล์ และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อุณหภูมิแช่เย็น (4 ± 2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (35 ± 2 องศาเซลเซียส)

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ และความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวซูชิที่ผลิตขึ้นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 และ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus*, pH และค่า water activity (a_w) ในตัวอย่างซูชิหน้าไข่กุ้ง และข้าวซูชิ และศึกษาถึงแนวโน้มความเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสให้เพื่อเป็นตัวแทนของอุณหภูมิที่ใช้ผลิตและวางจำหน่ายของซูชิ และทำการคัดแยกเชื้อ *B. cereus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างส่งยืนยันผลที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

นำเชื้อที่ผ่านการยืนยันสายพันธุ์แล้วมาศึกษาผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 4 ± 2 และ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นตัวแทนของซูชิที่วางจำหน่ายในสถานะแช่เย็น และในสภาวะปกติ (อุณหภูมิห้อง) ที่ pH 4.5, 5.0 และ 5.5 เพื่อให้ครอบคลุมช่วง pH ที่ปลอดภัย จนถึงช่วง pH ตามปกติของซูชิ ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $4 \log \text{CFU/g}$ ทั้งในรูปของเซลล์และสปอร์ จากนั้นจึงนำเชื้อมาศึกษาผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในข้าวอุณหภูมิ 4 ± 2 และ 35 ± 2 องศาเซลเซียส และ pH 5.0 และ 5.5 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $4 \log \text{CFU/g}$ ทั้งในรูปของเซลล์และสปอร์โดยใช้วิธีการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ในการศึกษาปริมาณของเชื้อที่คงอยู่, เหลือรอด หรือเพิ่มจำนวนในแต่ละสภาวะการทดสอบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงปริมาณเชื้อ *B. cereus*, pH และ a_w ในซูชิ และข้าวซูชิที่จำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน

1.4.2 ทราบถึงผลของกรดอะซิติกที่ pH ต่างๆ และอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อและสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเหลวและข้าวซูชิ เพื่อเป็นข้อมูลให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการจัดเก็บอาหารประเภทนี้ต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชูชิ

2.1.1 ประวัติของชูชิ

ในช่วงศตวรรษที่ 7 เหล่าผู้คนที่อาศัยอยู่ในหุบเขาในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทำการคิดค้นวิธีการถนอมอาหารโดยการหมักดองขึ้น ชาวญี่ปุ่นได้นำเทคนิคเดียวกันนี้มาใช้ถนอมอาหารเช่นเดียวกัน โดยการนำปลาที่ทำความสะอาดมาอัดในภาชนะโดยแทรกข้าวและเกลือไว้เป็นชั้นๆ และนำก้อนหินหนักๆมากดทับ คลุมด้วยวัสดุบางอย่างอีกชั้นหนึ่งและรอจนกว่าปลาจะถูกหมักจนได้ที่พร้อมทาน ในระหว่างขั้นตอนนี้ ข้าวที่ถูกหมักพร้อมเกลือและปลาจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก และเมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้น ปลาจะถูกนำมารับประทานเพียงอย่างเดียวโดยทิ้งส่วนของข้าวที่ใช้หมักไว้ ชูชิที่ถูกผลิตโดยกระบวนการนี้ถูกเรียกว่า “นาระชูชิ” (Naresushi) แต่กระบวนการหมักนี้กินเวลาเป็นอย่างมาก โดยใช้เวลาดังแต่ 2 เดือนขึ้นไปถึงกว่าหนึ่งปี และสูญเสียข้าวไปในกระบวนการผลิตอย่างไม่เกิดประโยชน์อีกด้วย (Feng, 2012)

หลังจากนั้นจะถึงศตวรรษที่ 19 การผลิตชูชิได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยเปลี่ยนแปลงหลักๆมากมาย ในยุคโมโรมาชิ (Muromashi period - ค.ศ.1336-1573) ได้ถือกำเนิด”โอชิชูชิ” (Oshizushi) ขึ้น โดยตัดทิ้งกระบวนการหมักที่กินเวลาออกไป และใช้น้ำส้มสายชูเข้ามาแทน ต่อมาในยุคอาซูชิ-โมโนยามะ (Azuchi-Monoyama – ค.ศ.1573-1063) ได้มีการพัฒนาชูชิที่ใช้เวลาในการหมักเพียงครั้งเดียวหรือที่เรียกกันว่า นามานาริ (Namanari) ชูชิในยุคต้นๆนี้มีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์นัก โดยได้มีการบรรยายถึงกลิ่นไว้ว่า มีกลิ่นคล้ายกับบลูชีส ผสมกับปลาและข้าวหมักกับน้ำส้มสายชู(Ashkenazi and Jeanne, 2003) (Feng, 2012)

ในช่วงกลางศตวรรษที่ 17 มีหมอนามว่ามัทซึโมโตะ โยชิชิ (Matsumoto Yoshichi) ได้มีความคิดที่จะนำน้ำส้มสายชูเติมลงในข้าวชูชิ ผลลัพธ์ก็คือชูชิที่มีรสเปรี้ยวที่เป็นที่น่าพึงพอใจและให้ความรู้สึกสดชื่นเมื่อรับประทาน และระยะเวลาในการผลิตชูชิได้ถูกพัฒนาให้ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในช่วงปี ค.ศ. 1820 ฮานายะ โยเฮย์ (Hanaya Yohei) แห่งเอโดะ (โตเกียวในปัจจุบัน) ได้พัฒนาชูชิให้มีลักษณะใกล้เคียงกับชูชิในปัจจุบัน โดยเสิร์ฟปลาดิบคู่กับข้าวชูชิและทานเป็นอาหารว่าง และทำสดๆในร้านชูชิที่เป็นรถเข็น การจำหน่ายชูชิในร้านรถเข็นนี้ได้รับความนิยมจนช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่สอง และถือเป็นต้นกำเนิดของซูชิบาร์ และร้านอาหารซูชิสาขานานในปัจจุบัน

(Feng, 2012)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบัน ซูชิเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมไปทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย ซูชิไม่ได้จำกัดอยู่แค่เพียงในภัตตาคารหรือร้านในห้างสรรพสินค้าเท่านั้น แต่ยังสามารถหาได้ตามริมถนน แหล่งชุมชน ตลาด หรือตลาดนัด โดยร้านซูชิประเภทนี้ที่พบมากจะเป็นร้านแผงลอย ซึ่งอาจทำซูชิกันที่แผงร้านนั้นเลยหรืออาจเตรียมมาก่อนและมาจัดวางที่ร้าน หรืออาจเตรียมมาบางส่วน และนำมาจัดหน้าและวางจำหน่ายที่ร้านภายหลัง ซึ่งโดยลักษณะของพื้นที่ที่จำกัดจึงทำให้เกิดความไม่สะดวกในการรักษาความสะอาดของอุปกรณ์และผู้เตรียม ซึ่งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อน หรือเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคบางชนิดได้ เช่น เชื้อที่มาจากร่างกายมนุษย์ที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการผลิต เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* หรือเชื้อโรคที่มากับวัตถุดิบ เช่น *Bacillus cereus* จากในข้าวเป็นต้น และเมื่อซูชิถูกทำเสร็จและจัดวางแล้ว จะอยู่ในสภาพพร้อมบริโภค ซึ่งหมายความว่าซูชินี้จะไม่ผ่านกระบวนการทำลายเชื้อใดๆหลังจากการผลิต ซึ่งถ้าหากกระบวนการผลิตมีการปนเปื้อน หรือวัตถุดิบไม่สะอาด หรือถูกจัดวางและเก็บไว้อย่างไม่ถูกสุขลักษณะเป็นเวลานานๆ ปัจจัยเหล่านี้จะเอื้อให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรสดังกล่าว และอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

2.1.2 ประเภทของซูชิ (Guthrie, 2016)

ซูชิ คือ เมนูอาหารอะไรก็ตาม ที่รับประทานร่วมกันกับข้าวซูชิ (ข้าวที่ปรุงรสด้วยน้ำส้มสายชู และอาจใส่เครื่องปรุงอื่นๆเพิ่มเติม เช่น น้ำตาล เกลือ มิริน เป็นต้น) โดยซูชิจะมีชื่อเรียกแบ่งย่อยอีกหลายประเภท ตามวิธีการเตรียมและรูปลักษณ์ภายนอก ดังนี้

2.1.2.1 มากิซูชิ (Makizushi) หมายถึง ซูชิม้วน (rolled sushi) โดยทั่วไปจะเป็นข้าวซูชิ ม้วนด้วยสาหร่าย แต่อาจจะเป็นอาหารอย่างอื่นที่นำมาม้วนแทนสาหร่ายได้ เช่น ไข่เจียว ฟองเต้าหู้ แดงกวาง เป็นต้น และมากิซูชิเอง ยังสามารถแบ่งย่อยออกได้อีกหลายประเภท เช่น โฮโซมากิ (Hosomaki) คือซูชิม้วนแบบบาง, ชูมากิ (Chumaki) คือซูชิม้วนแบบกลาง ฟูโตมากิ (Futomaki) คือซูชิม้วนแบบหนา อุระมากิ (Uramaki) คือซูชิม้วนกลับ โดยการม้วนกลับเอาข้าวมาอยู่ด้านนอก และสาหร่ายอยู่ด้านในแทน และ เทมากิ (Temaki) คือซูชิม้วนเป็นรูปโคน

2.1.2.2 นิกิริซูชิ (Nigirizushi) หรือซูชิที่ใช้มือกด โดยทั่วไปแล้วจะนำข้าวซูชิมากดด้วยมือให้เป็นรูปสี่เหลี่ยม ทาวาซาบิบางๆ และปิดทับด้วยหน้าหรือที่เรียกว่า “เนตะ” (Neta) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเป็นแซลมอน หรือทูน่า หรืออาหารทะเลอื่นๆ

2.1.2.3 ชิราชิซูชิ (Chirashizushi) หรือซูชิกระจัดกระจาย (Scattered sushi) หรือ สลัดข้าวซูชิ (Sushi rice salad) คือซูชิที่เสิร์ฟชาม ประกอบไปด้วยข้าวซูชิ และกับข้าวที่วางโปะอยู่ด้านบน เรียกว่า “กู” (gu) โดยชิราชิซูชิเป็นที่นิยมในญี่ปุ่นมาก เนื่องจากเตรียมได้ง่ายและไม่ต้องมีการเย็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบแผนใดๆ สิ่งที่แตกต่างกันจากซูชิอื่นๆอีกอย่างคือ ชิราชิซูชินี้ ไม่นิยมนำเนื้อสัตว์มาวางเป็นหน้า แต่จะใช้อย่างอื่นแทน เช่น ผัก ไข่ เต้าหู้ทอด รวมไปถึงของที่ไม่นิยมใช้ในซูชิประเภทอื่นด้วย เช่น ข้าวโพดอ่อน รากบัว หน่อไม้ เป็นต้น

2.1.2.4 อินาริซูชิ (Inarizushi) คือข้าวซูชิห่อด้วยเต้าหู้ทอดปรุงรส โดยเต้าหู้ทอดนี้จะถูกทอดสองครั้งที่อุณหภูมิ 110-120 องศาเซลเซียส และ 180-200 องศาเซลเซียส

2.1.2.5 โอชิซูชิ (Oshizushi) หรือซูชิกด หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ฮาโกะซูชิ (Hako-sushi) หรือซูชิกล่อง โดยจะเตรียมซูชิประเภทนี้ในแม่พิมพ์ไม้ที่เรียกว่า โอชิบาโกะ (Oshibako) โดยจะใส่หน้าและข้าวซูชิลงในแม่พิมพ์นี้ และใช้ฝาของแม่พิมพ์กดจนเป็นก้อนอยู่ตัว โดยซูชิจะมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมเหมือนตัวแม่พิมพ์

2.2 ข้าว (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2559)

ข้าว เป็นธัญญาหารหลักของชาวโลก จัดเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกับ หญ้าซึ่งนับได้ว่า เป็นหญ้าที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลกและมีความหลากหลายทางชีวภาพ สามารถปลูกขึ้นได้ง่ายมีความทนทานต่อทุก สภาพภูมิประเทศในโลกไม่ว่าจะเป็นถิ่นแห้งแล้งแบบทะเลทราย พื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึง หรือแม้กระทั่ง บนเทือกเขาที่หนาวเย็น ข้าวยังสามารถงอกงามขึ้นมาได้อย่างทรหดอดทน

ข้าวชนิดแรกที่มนุษย์รู้จักนำมากินคือ ข้าวป่า จาก หลักฐานที่พบทำให้สันนิษฐานได้ว่าเมื่อประมาณ 16,000-13,000 ปีที่แล้ว ยุคน้ำแข็งใกล้สิ้นสุดลง สัตว์ใหญ่หลายชนิดเริ่มสูญพันธุ์ไป มนุษย์จึงต้องลดบทบาทการล่าสัตว์แล้วหันมาสะสมข้าวป่า และพืช เพื่อเป็นอาหาร นาย Richard S. Macheish นักโบราณคดีชาวอเมริกัน ผู้ซึ่งทำการศึกษาสถานที่ทางประวัติศาสตร์ของจีนแผ่นดินใหญ่ในปีพ.ศ. 2536 มีหลักฐานที่ยืนยันได้ว่า ประเทศจีน คือ แหล่งกำเนิด ของการปลูกข้าว เพราะได้พบร่องรอยของข้าวป่าที่มีอายุถึง 16,000 ปี และข้าวที่ปลูกอายุกว่า 9,000 ปี โดยพิจารณาจากการขุดพบหลักฐานข้าวใหม่ที่ดีอยู่กับเศษภาชนะรวมทั้งเศษดินข้าวสมัยโบราณ ที่ขุดได้จากถ้ำ 2 แห่งในหุบเขาเมืองหนานชาง (Nanchang) เมืองหลวงของมณฑลเจียงซี (Jianxi) ซึ่งอยู่ทางตะวันตกเฉียงใต้ของจีน จุดเริ่มต้นของการเพาะปลูกข้าวของมนุษย์ จากวัฒนธรรมลู่ชาน ของประเทศจีน และวัฒนธรรมฮัวบิเนียนของประเทศเวียดนามบริเวณที่ราบลุ่มแม่น้ำตอนเหนือของอินเดีย ตอนล่าง ด้านตะวันออกของเซิงเขาหิมาลัย ซึ่งการเพาะปลูกใช้วิธีการปลูกคล้ายกับการทำไร่เลื่อนลอย

หลังจากนั้นวิวัฒนาการปลูกข้าวจากการทำไร่เลื่อนลอย มาเป็นการทำนาหว่าน ประมาณ 9,000

ปีก่อน และพัฒนาสู่การทำนาแบบปักดำ ซึ่งพบหลักฐานในวัฒนธรรมบ้านเชียงของไทย เมื่อราวเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5,000 ปีที่ผ่านมา หลักฐานการค้นคว้าที่ค้นพบ ข้าวป่าในช่วงแรกจะมีก้าน และใบเดี่ยวแต่ที่ปลูกใหม่มีถึง 5 ก้านเป็นการแสดงให้เห็นว่า ในช่วงเวลาดังกล่าว มนุษย์เริ่มเข้าใจว่าหากปลูกข้าวลงดินเองจะเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า แสดงให้เห็นถึงความเป็นมนุษย์ในการพัฒนาการเกษตรเพื่อดำรงชีวิต สายพันธุ์ของพืชตระกูลข้าว ที่มีอยู่บนโลกนี้มีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่รู้จักและนำมาปลูกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ *Oryza Savita* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrina* ที่นิยมเพาะปลูก ในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ปลูกและซื้อขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดจะเป็นข้าวจากทวีปเอเชีย แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะและพื้นที่ปลูกได้ดังนี้

2.2.1 ข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ตั้งชื่อมาจากแหล่งที่ ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อน ตั้งแต่จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา และแพร่กระจายไปทั้งเขตอุษาคเนย์ตั้งแต่หลัง พ.ศ. 1000 ทั้งเขตลุ่มน้ำอิรวดี และต่อมาแพร่ขยายเพาะปลูกในทวีปอเมริกา เฉพาะในเมืองไทย ข้าวอินดิกานิยมเพาะปลูก ในบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แทนข้าวเหนียวที่เคยปลูก ซึ่งคนไทยสมัยนั้นเรียกข้าวอินดิกาที่มาจากต่างประเทศว่า “ข้าวของเจ้า” แล้วเรียกกันสั้นลงเหลือเพียง “ข้าวเจ้า” มาถึงทุกวันนี้

2.2.2 ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวเหนียวเมล็ดป้อม กลมรี มีแหล่งกำเนิดจากทางภาคเหนือ แล้วผ่าน มาทางลุ่มแม่น้ำโขง ในสมัยก่อนพุทธศตวรรษที่ 20 หลังจากนั้นลดจำนวนลงไปแพร่หลาย ในเขตอบอุ่นที่ ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา

2.2.3 ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่สันนิษฐานว่าเป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่าง ข้าวอินดิกาและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนักเพราะให้ผลผลิตต่ำ

2.3 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus คือแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ สามารถพบได้ตามธรรมชาติในอาหารหลายชนิด สร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้สองแบบ คือ ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการอาเจียนและทำให้ท้องเสีย (Rob *et al.*, 2004)

2.3.1 สภาวะการเจริญ และการเหลือรอด

อุณหภูมิ – *B. cereus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 4 - 55 องศาเซลเซียส (Ministry for Primary Industries, 2015) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือช่วง 30-37 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ที่เจริญในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส มักจะเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค และสายเอนไซม์เป็นเอกลักษณ์ที่สังเคราะห์กับกระบวนการเชิงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผชิญ อุณหภูมิเป็นเชิงประโยชน์ด้านการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ที่ผลิตสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียจะสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ขึ้นไป และสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการอาเจียนจะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ขึ้นไป (Pielaat *et al.*, 2005)

ตัวเซลล์จะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน และสปอร์สามารถทนความร้อนได้ในระดับปานกลาง ความสามารถในการทนความร้อนจะขึ้นอยู่กับสถานะของอาหาร เช่น อาหารที่มีปริมาณไขมันมาก จะทำให้เชื้อสามารถทนความร้อนได้มากยิ่งขึ้น(ในน้ำมันถั่วเหลือง ค่า D ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เท่ากับ 30 นาที) หรืออาหารที่มี a_w ต่ำจะทำให้เชื้อสามารถทนความร้อนได้มากขึ้นเช่นกัน สปอร์จะทนทานต่อความร้อนแห้งมากกว่าความร้อนชื้น สารพิษที่ทำให้เกิดอาการอาเจียนสามารถทนความร้อนสูงได้(สามารถเหลือรอดได้ที่อุณหภูมิ 126 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 90 นาที) แต่สารพิษที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย จะถูกทำให้หมดความเป็นพิษที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Rob *et al.*, 2004)

ความเป็นกรดต่าง (pH) – pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 4.3 และ pH สูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 9.3 และกรดอะซิติก 0.1% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตาม สารพิษที่ก่อให้เกิดอาการอาเจียนสามารถทนค่า pH ที่รุนแรงได้มากกว่าตัวเซลล์มาก (pH 2-11) (Rob *et al.*, 2004)

ความต้องการอากาศ – *B. cereus* สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) แต่จะเจริญดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และความสามารถในการผลิตสารพิษจะลดลงเมื่อเชื้อเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Rob *et al.*, 2004) โดยเชื้อจะสามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการอาเจียนได้ที่สภาวะมีออกซิเจนเท่านั้น (Ministry for Primary Industries, 2015)

ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) – ช่วงต่ำสุดของค่า a_w ที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 0.912-0.950 แต่สปอร์ของเชื้อสามารถเหลือรอดในอาหารแห้งเป็นระยะเวลาต่างๆได้ โดยสามารถอยู่ได้ถึง 48 สัปดาห์ โดยที่จำนวนไม่เปลี่ยนแปลงในตัวอย่างซีเรียล ที่ a_w 0.27-0.28 (Jaquette and Beuchat, 1998)

2.3.2 แหล่งที่มา

B. cereus เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ เศษวัสดุที่กำลังย่อยสลาย รวมถึงอากาศซึ่งเชื้อจะติดไปกับพวกฝุ่นดินด้วย ดังนั้น *B. cereus* จึงสามารถพบได้ในหลายๆผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ เนื้อสัตว์ รวมไปถึงนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม โดยเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษทำให้อาเจียนจะเจริญได้ดีในผลิตภัณฑ์ประเภทผัก และผลไม้ ส่วนสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษทำให้อาเจียนจะเจริญได้ดีในอาหารจำพวกข้าว และอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก (Rob *et al.*, 2004)

ด้วยความสามารถในการสร้างสปอร์ซึ่งจะทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นระยะเวลาอันยาวนาน ทั้งสภาวะแห้งในขั้นตอนการจัดเก็บ หรือความร้อนในขั้นตอนการแปรรูป หรือแม้กระทั่งสามารถปนเปื้อนข้ามมาจากสิ่งแวดล้อมกลับมายังผลิตภัณฑ์หลังการแปรรูปได้ จึงทำให้การผลิตอาหารพร้อมบริโภคจะต้องมีการควบคุมเชื้อชนิดนี้โดยเฉพาะ เนื่องจากสามารถพบได้ตลอดห่วงโซ่อุปทาน (Rob *et al.*, 2004)

นอกจากสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมและวัตถุดิบแล้ว คนและสัตว์ยังสามารถเป็นพาหะของเชื้อ *B. cereus* ได้อีกด้วยโดยติดตามตามตัว และปนเปื้อนกลับเข้าสู่ห่วงโซ่อุปทาน และเชื้อยังสามารถก่อโรคนานชนิดในสัตว์ได้อีกด้วย เช่น โรคเต้านมอักเสบในวัว เป็นต้น (Rob *et al.*, 2004)

2.3.3 การสร้างสปอร์

โดยทั่วไปสปอร์จะถูกสร้างเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอาหารจำกัด โดยสปอร์จะเป็นรูปแบบของเชื้อที่หยุดการเจริญเติบโตชั่วคราว และจะสามารถงอกและเพิ่มจำนวนได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอีกครั้ง

สปอร์จะสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้หลากหลายรูปแบบ เช่น การแช่แข็ง การทำแห้ง สภาวะความดันสูง รังสี แสงอัลตราไวโอเล็ต(Ultra Violet, UV) สารเคมี และความร้อน การงอกของสปอร์จะถูกกระตุ้นโดยการเพิ่มสารอาหาร หรือการให้ความร้อนที่ไม่สูงมาก และจากการที่เชื้อ *B. cereus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและสามารถอยู่รอดได้อย่างยาวนาน การควบคุมจำนวนสปอร์เริ่มต้นจึงไม่สามารถกระทำได้ ดังนั้น การควบคุมหลักจึงอยู่ที่การป้องกันไม่ให้สปอร์งอกและเพิ่มจำนวนจนกระทั่งเป็นอันตรายได้ เช่น การแปรรูปอาหารด้วยความร้อน และทำให้เย็นทันทีเมื่ออาหารเสร็จ และให้ความร้อนอย่างทั่วถึงอีกครั้งก่อนนำไปบริโภค เป็นต้น (Setlow and Johnson, 1997)

2.3.4 สารพิษ

B. cereus สามารถผลิตสารพิษที่ออกอาการแตกต่างกันได้สองแบบ คือก่อให้เกิดอาการท้องร่วงและอาการอาเจียน จากข้อมูลอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้นนั้น อาหารที่เกี่ยวข้องกับอาการท้องร่วงจะค่อนข้างมีความหลากหลาย เช่น ผักและสลัด จนถึงอาหารประเภทเนื้อ แต่ในทางตรงกันข้าม อาหารที่เกี่ยวข้องกับอาการอาเจียนมักจะเป็นอาหารประเภทข้าว หรืออาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก

2.3.4.1 สารพิษที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสีย

โรคอาหารเป็นพิษแบบอาการท้องเสีย เกิดขึ้นจากการที่เชื้อ *B. cereus* ได้ผลิตสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ในลำไส้เล็ก (Granum, 1997) โดยสารพิษชนิดนี้สามารถถูกสร้างในอาหารได้เช่นกัน เช่น เต้าหู้ (Wong, 1997) อย่างไรก็ตาม อาการของโรคที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้เกิดจากสารพิษที่ถูกสร้างขึ้นในอาหารเป็นหลัก เนื่องจากสารพิษชนิดนี้ จะเสื่อมสภาพลงเรื่อยๆเมื่ออยู่ใน

ระบบทางเดินอาหาร และอีกสาเหตุหนึ่งคือปริมาณเชื้อที่สามารถผลิตสารพิษจนก่อให้เกิดโรคได้นั้น สูงกว่าปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้ ซึ่งหมายความว่าอาหารที่มีเชื้อในปริมาณสูงขนาดนั้น จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของอาหารจนไม่สามารถบริโภคได้ ด้วยเหตุผลเหล่านี้ จึงเชื่อได้ว่ามีปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในระดับหนึ่ง ที่มากพอที่จะเหลือรอดจนเข้าไปอยู่ในลำไส้เล็ก และก่อให้เกิดโรคได้ แต่ไม่มากพอที่จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของอาหารจนเกิดการเสื่อมเสีย

สารพิษชนิดนี้ค่อนข้างที่จะไม่คงตัว และจะหยุดการทำงานเมื่อถูกให้ความร้อนเกิน 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และจะไม่เสถียรเมื่ออยู่นอกช่วง pH ที่ 4-11 (จะเสื่อมสภาพเมื่ออยู่ในสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร) และไวต่อเอนไซม์โปรติโอไลติกด้วย (Jensen and Moir, 1997)

2.3.4.2 สารพิษที่ก่อให้เกิดอาการอาเจียน

สารพิษชนิดนี้จะถูกผลิตมาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจะสามารถตรวจพบสารพิษชนิดนี้ได้เมื่อมีเชื้อในปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิตรขึ้นไป จากการศึกษาอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้น ทำให้ทราบว่าปริมาณเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดอาการอาเจียนนี้จะอยู่ในช่วง 10^3 ถึง 5×10^5 เซลล์ต่อกรัม โดยมีค่ากลางอยู่ที่ 10^7 เซลล์ต่อกรัม (Notermans and Batt, 1998) สารพิษชนิดนี้ทนความร้อน โดยสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 126 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จึงทำให้สารพิษชนิดนี้เหลือรอดจากความร้อนในระดับที่ใช้ในการประกอบอาหารได้ และยังทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH อีกด้วย โดยช่วง pH ที่สารพิษจะยังคงตัวคือ pH 2-11 (Johnson, 1984)

2.3.5 *Bacillus cereus* ในข้าว

เนื่องจาก *B. cereus* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และมักจะพบได้ในผลิตภัณฑ์ประเภทธัญพืช เช่น ข้าวด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณที่พบนั้นจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของข้าว วิธีการผลิตและเก็บรักษาข้าว รวมไปถึงสุขลักษณะในการผลิตด้วย

ตัวอย่างเช่น การสำรวจ *B. cereus* ในร้านอาหารจีนแห่งหนึ่งในสหรัฐอเมริกา พบเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในข้าวสารทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ นอกจากนั้นแล้วยังพบการปนเปื้อนในข้าวหลังจากหุงแล้วอีกด้วย สาเหตุมาจากการทำความสะอาดที่ไม่เพียงพอในกระทะ ไม้พายหรือช้อนที่ใช้การประกอบอาหาร (Bryan *et al.*, 1981)

การศึกษาหา *B. cereus* ในข้าวสุก ในร้านอาหารในประเทศอังกฤษ พบว่าตัวอย่างข้าวที่แหล่งจำหน่ายส่วนใหญ่ (ร้อยละ 94) ไม่พบเชื้อ *B. cereus* ($<10^2/g$) และมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้น (ร้อยละ 1) ที่พบเชื้อในปริมาณที่ยอมรับไม่ได้ ($>10^5/g$) และพบว่าปริมาณของเชื้อที่พบในข้าวสุกนั้น มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเชื้อที่มีในข้าวดิบ โดยพบว่าตัวอย่างข้าวจากประเทศอินเดียมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาไม่ดีเท่ากับตัวอย่างข้าวที่มาจากแหล่งอื่น (Nichols *et al.*, 1999) มีการศึกษาที่

คล้ายคลึงกันในประเทศอังกฤษ โดยเก็บตัวอย่างข้าวสุกจากร้านอาหารแบบไม่ทานที่ร้าน (takeaways) และร้านแซนวิชบาร์ พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ (ร้อยละ 87) พบว่ามีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่น่าพอใจ และพบตัวอย่างที่มี *B. cereus* มากกว่า 10^5 อยู่ร้อยละ 3.1 สาเหตุมาจากการหุงข้าวจำนวนมากล่วงหน้าและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาให้ความร้อนอีกครั้ง และพบว่าการแช่เย็นข้าวที่หุงแล้วก่อนนำมาให้ความร้อนซ้ำ ทำให้เชื้อเกิดความต้านทานต่อความร้อนมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีคุณภาพที่แย่ลง (Little *et al.*, 2002)

การสำรวจข้าวดิบจำนวน 507 ตัวอย่าง ในประเทศไอร์แลนด์ โดยเก็บตัวอย่างจาก โรงแรม, ร้านอาหาร, ร้านอาหารท้องถิ่น, แผงขายอาหาร และโรงพยาบาล พบว่าส่วนใหญ่ (ร้อยละ 97.4) อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ ($<10^3$ CFU/g) และมีตัวอย่างร้อยละ 1.2 อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สามารถยอมรับได้ ($>10^5$ CFU/g) (Food Safety Authority of Ireland, 2003)

สำหรับซูชิ ซึ่งเป็นอาหารที่มีข้าวเป็นองค์ประกอบหลัก มีรายงานการพบ *B. cereus* ด้วยเช่นกัน โดยในช่วงปีค.ศ. 2006-2007 ประเทศออสเตรเลียได้มีการสำรวจซูชิที่วางจำหน่ายในช่วงฤดูหนาว (มิถุนายน-สิงหาคม) พบเชื้อ *B. cereus* มีปริมาณในช่วง 10^2 - 10^3 โคโลนีต่อกรัมร้อยละ 1 ช่วง 10^3 - 10^4 โคโลนีต่อกรัมร้อยละ 0.2 และมากกว่า 10^4 โคโลนีต่อกรัมขึ้นไปร้อยละ 0.4 แต่การสำรวจในช่วงฤดูร้อน (ธันวาคม-กุมภาพันธ์) จะพบการแพร่ระบาดของเชื้อมากกว่า โดยจะพบเชื้อในช่วง 10^2 - 10^3 โคโลนีต่อกรัมร้อยละ 2.7 ช่วง 10^3 - 10^4 โคโลนีต่อกรัมร้อยละ 0.3 และมากกว่า 10^4 โคโลนีต่อกรัมขึ้นไปร้อยละ 1 (NSW Food Authority, 2008) และในปีค.ศ. 2014 ที่ประเทศอิตาลีมีการสำรวจเชื้อ *B. cereus* ในซูชิด้วยเช่นกัน โดยพบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างร้อยละ 7.89 โดยปริมาณที่พบอยู่ในช่วง $50 - 10^4$ โคโลนีต่อกรัม (Muscolino *et al.*, 2014)

ในประเทศไทย ได้มีการสำรวจเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างซูชิที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี พบว่ามี 1 ตัวอย่าง (2.44%) ที่มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณเชื้อสูงเกินกว่าเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (สุดสายชล หอมทอง และคณะ, 2554)

2.3.6 การทนความร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* ในข้าว

สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะแห้ง จึงสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในเมล็ดข้าวแม้ว่าจะผ่านการเก็บมานานถึง 48 สัปดาห์ ประเด็นสำคัญคือ สปอร์สามารถเหลือรอดและเจริญเติบโตจนกระทั่งสร้างสารพิษได้แม้จะผ่านกระบวนการหุงต้มแล้วก็ตาม

Gilbert และคณะ (1974) ได้ทำการทดลองหาค่า D ของสปอร์ในน้ำพบว่า ค่า D_{95} จะอยู่ในช่วง 5-36 นาที และ D_{100} จะอยู่ในช่วง 1.2-7.5 นาที Penna และ Moraes (2002) ได้ทดลองหาค่า D ในข้าว พบว่าค่า $D_{97.8}$ จะประมาณ 3.5 นาที ซึ่งถ้าหากการหุงข้าวใช้เวลาประมาณ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จะสามารถลดจำนวนสปอร์ลงได้ ประมาณ 10^2 - 10^3 สปอร์

B. cereus สามารถเพิ่มจำนวนในข้าวได้ถึง 10^7 เซลล์ต่อกรัม ภายในระยะเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส (Harmon and Kautter, 1991) และ 10^9 เซลล์ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Shelef and Liang, 1982) และจากการทดลองนำสปอร์จำนวนเล็กน้อย (140 หรือ 680 ต่อกรัม) ใส่งในข้าวแล้วทำการหุงเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 10 องศาเซลเซียส แต่จะเริ่มมีการเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส โดยจะเพิ่มจำนวนจนถึง 10^7 - 10^8 เซลล์ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในเวลา 33 ชั่วโมง (Gilbert et al., 1974) และถึงแม้จะเก็บข้าวที่อุณหภูมิต่ำ เชื่อจะยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ โดยที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เชื่อจะเพิ่มจำนวนประมาณ 10^4 - 10^8 เซลล์ต่อกรัม ในระยะเวลา 10 วัน (Ultee et al., 2000)

2.3.7 อุบัติการณ์จากเชื้อ *Bacillus cereus*

ในปีค.ศ. 1975 คนงานในโรงงานผลิตพลาสติกในฟินแลนด์เกิดอาการป่วยจำนวน 18 ราย หลังรับประทานอาหารกลางวัน โดยมีอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง และอาเจียน หลังการตรวจสอบพบเชื้อ *B. cereus* ในข้าว และเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารกลางวัน (Markku et al., 1976)

ในปีค.ศ. 1977 ได้มีผู้ป่วยจำนวน 211 คนมีอาการป่วยหลังจากทานข้าวกลางวัน ซึ่งประกอบไปด้วยข้าวปั้น, มากิซุชิ และ อินาริซุชิ ซึ่งหลังการตรวจสอบพบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างข้าวปั้น 4.7×10^8 โคโลนีต่อกรัม, มากิซุชิ 1.3×10^4 โคโลนีต่อกรัม และ อินาริซุชิ 3.7×10^4 โคโลนีต่อกรัม และพบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยถึงร้อยละ 85.7 อีกด้วย (Yasukawa et al., 1979)

ในปีค.ศ. 1993 ได้มีเด็กในศูนย์รับเลี้ยงเด็กเกิดอาการป่วยจำนวน 14 ราย โดยมีอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง และท้องร่วง หลังจากรับประทานข้าวผัดไก่ทอดเป็นอาหารกลางวัน เมื่อตรวจอาหารกลางวันที่เหลือ และอาเจียนจากเด็กที่ป่วย พบเชื้อ *B. cereus* (CDC, 1994)

อย่างไรก็ตาม รายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ *B. cereus* อาจจะน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากในคนที่มิสภาพร่างกายปกติแล้ว อาการของโรคอาจจะไม่รุนแรง หรือเกิดอาการแค่ระยะสั้นๆ จึงอาจไม่ได้มีการบันทึกเป็นรายงานไว้ (FDA, 2012)

เนื่องจาก *B. cereus* พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม จึงสามารถปนเปื้อนเข้ามาจากสภาพแวดล้อมสู่อาหารและก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้หากมีการจัดการหลังการผลิตหรือการจัดเก็บผลิตภัณฑ์ที่ไม่ดี

ปีค.ศ. 2010 พบการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยจากเชื้อ *B. cereus* อย่างผิดปกติใน National University Hospital ของประเทศสิงคโปร์ จึงได้นำมาสู่การสืบสวนหาสาเหตุพบว่า รอบๆ โรงพยาบาลมีการก่อสร้างตึกและรถไฟฟ้าใต้ดิน ซึ่งในช่วงที่มีการระบาดได้มีการขุดเจาะในชั้นดินลึก จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อปะปนมาในอากาศภายในโรงพยาบาล ประกอบกับการจัดการ

ในการซักล้างผ้าที่ใช้ในโรงพยาบาลไม่ถูกสุขลักษณะ จึงทำให้เชื้อปนเปื้อนในผ้าและก่อให้เกิดโรค เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แก่ผู้ป่วยในที่สุด ซึ่งหลังการสืบสวนหาสาเหตุได้ดำเนินการทำการอบรมการจัดการในการซักรีดล้างใหม่ซึ่งทำให้จำนวนผู้ป่วยลดลงจนอยู่ในระดับปกติ (Balm *et al.*, 2012)

2.3.8 กฎหมายที่เกี่ยวข้อง

กฎหมายในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับอาหารประเภทซูชิได้แก่ ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร โดยในข้อ 2.2.4 ได้กล่าวถึงอาหารปรุงสุกทั่วไป เช่น อาหารปรุงสำเร็จ (ประเภทข้าวแกง, ก๋วยเตี๋ยว, ขนมจีน) ยำ, ไข่กรอก, หมูยอ, ปูอัด, ปลาหมึกปรุงรส และซูชิ โดยกำหนดให้พบเชื้อ *B. cereus* ได้น้อยกว่า 100 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

ในขณะที่ต่างประเทศ - สหราชอาณาจักรได้แบ่งเกณฑ์เป็นช่วงปริมาณเชื้อ โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ พึงพอใจ (Satisfactory) คือปริมาณเชื่อน้อยกว่า 10^3 CFU/g, ปานกลาง (Moderate) คือปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^3 CFU/g ขึ้นไปจนถึง 10^5 CFU/g และไม่พึงพอใจ (Unsatisfactory) คือปริมาณเชื้อมากกว่า 10^5 CFU/g ขึ้นไป (Health Protection Agency, 2009)

ประเทศออสเตรเลีย ได้กำหนดเกณฑ์เกี่ยวกับปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในอาหารประเภทซูชิ โดยแบ่งตามปริมาณเชื้อที่พบออกเป็น 4 ระดับ คือ พึงพอใจ (Satisfactory) คือพบเชื่อน้อยกว่า 10^2 CFU/g, เล็กน้อย (Marginal) คือพบเชื้อตั้งแต่ 10^2 CFU/g ขึ้นไปจนถึง 10^3 CFU/g, ไม่พึงพอใจ (Unsatisfactory) คือพบเชื้อตั้งแต่ 10^3 CFU/g ขึ้นไปจนถึง 10^4 CFU/g และอาจเป็นอันตราย (Potentially Hazardous) คือพบเชื้อตั้งแต่ 10^4 CFU/g ขึ้นไป โดยที่ระดับไม่พึงพอใจ (Unsatisfactory) ขึ้นไปกำหนดว่าต้องมีการหาสาเหตุว่ามาตรการที่ใช้ควบคุมการจัดเตรียมอาหาร และสุขลักษณะในการเตรียมอาหารที่ใช้อยู่ที่นั่นเพียงพอหรือไม่ (FSANZ, 2001)

ซึ่งจะเห็นได้ว่าเกณฑ์ปริมาณของเชื้อ *B. cereus* ในต่างประเทศนั้นจะมากกว่าของประเทศไทยทั้งสิ้น แต่อย่างไรก็ตาม มีแนวทางปฏิบัติสำหรับการเตรียม และจัดวางซูชิของออสเตรเลียได้แนะนำให้ผู้ประกอบการได้นำไปใช้ โดยแนวทางปฏิบัติที่น่าสนใจได้แก่ กฎ 2 ชั่วโมง/4 ชั่วโมง (4 hour / 2 hour rule) โดยกำหนดให้อาหารพร้อมบริโภคที่มีแนวโน้มว่าจะก่อให้เกิดอันตรายนั้น จะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยอาหารที่เก็บนอกช่วงอุณหภูมินี้จะต้อง (FSANZ, 2001), (NSW, 2007)

- ภายในเวลา 2 ชั่วโมง จะต้องใช้อาหารนั้นให้หมด หรือนำไปแช่เย็นในทันที หรือ
- ภายในเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 4 ชั่วโมง จะต้องใช้อาหารนั้นทันที และห้ามนำกลับไปแช่เย็นอีก หรือ
- หากเก็บไว้เกินกว่า 4 ชั่วโมง อาหารนั้นจะต้องถูกทำลาย โดยห้ามนำกลับไปใช้ หรือแช่เย็นอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนอกจากนี้ ยังแนะนำให้จัดเตรียมข้าวซูชิให้มีค่า pH ต่ำกว่า หรือเท่ากับ 4.6 เพื่อยับยั้ง เชื้อก่อโรคอีกด้วย (NSW, 2007)

ซึ่งจากตรงนี้จะเห็นได้ว่า การป้องกันไม่ให้อาหารเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคนั้น ไม่จำเป็นที่จะต้องควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นเพียงอย่างเดียว แต่การควบคุมปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค เช่น อุณหภูมิ, เวลา และ pH สามารถป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคในอาหาร เพิ่มจำนวนจนเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้เช่นเดียวกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 จุลินทรีย์ทดสอบ

3.1.1.1 เชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากตัวอย่างที่ทำการสำรวจ

3.1.2 เครื่องมือ

3.1.2.1 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น BX53, Japan)

3.1.2.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น ML01/1602, Switzerland)

3.1.2.3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP 3100 S, Germany)

3.1.2.4 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น Practum313-1S, Germany)

3.1.2.5 เครื่องตีปั่นอาหาร (Interscience รุ่น VAR.SPEED 050715738, France)

3.1.2.6 เครื่องตีปั่นอาหาร (Seward รุ่น Stomacher400, United Kingdom)

3.1.2.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Genie2 รุ่น G-560E, United States)

3.1.2.8 เครื่องวัดพีเอช (Inolab รุ่น pH Level1, Germany)

3.1.2.9 เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aqualab รุ่น 4TE, United States)

3.1.2.10 เครื่องวัดพีเอช (Eutech รุ่น pH 510, Singapore)

3.1.2.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Labconco รุ่น Logic, United States)

3.1.2.12 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Liebherr รุ่น FKS 2600 Index 20E/001, Germany)

3.1.2.13 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Mettler รุ่น BE400, Germany)

3.1.2.14 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Kendro รุ่น B6420, France)

3.1.2.15 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Binder รุ่น KB53, Germany)

3.1.2.16 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Binder รุ่น BD720, Germany)

3.1.2.17 ไมโครเวฟ (Panasonic รุ่น NN-GD6925, Japan)

3.1.2.18 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy รุ่น ES-315, Japan)

3.1.2.19 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy รุ่น SX-700, Japan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์

- 3.1.3.1 ปีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร
- 3.1.3.2 กระบอกตวงขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.3.3 ไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร(Biohit, Proline 50-200µl)
- 3.1.3.4 ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร(Biohit, Proline 100-1000µl)
- 3.1.3.5 ทิปสำหรับไมโครปิเปตขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร
- 3.1.3.6 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.3.7 หลอดฝาเกลียวขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร
- 3.1.3.8 ขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.1.3.9 ขวดคูแรนขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.3.10 ลวดเขี่ยเชื้อ
- 3.1.3.11 เข็มเขี่ยเชื้อ
- 3.1.3.12 แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม
- 3.1.3.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.3.14 แผ่นสไลด์
- 3.1.3.15 ข้อนตักตัวอย่าง

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.4.1 Blood Agar (Clinag, Thailand)
- 3.1.4.2 Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar (Difco, United States)
- 3.1.4.3 Tryptic Soy Broth (Oxoid, United Kingdom)
- 3.1.4.4 Tryptic Soy Agar (Oxoid, United Kingdom)
- 3.1.4.5 Nutrient Agar (Difco, United States)
- 3.1.4.6 Plate Count Agar (Oxoid, United Kingdom)

3.1.5 สารเคมี

- 3.1.5.1 Di-sodium hydrogen phosphate [Na_2HPO_4] (Merck, Germany)
- 3.1.5.2 Crystal violet (Merck, Germany)
- 3.1.5.3 Gram Iodine (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.4 Safranin O (Merck, Germany)

3.1.5.5 Kanamycin (Meiji, Thailand)

3.1.5.6 Malachite green (Merck, Germany)

3.1.5.7 เอทานอล 95% (องค์การสุราสรรพสามิต, ไทย)

3.1.6 วัตถุดิบ

3.1.6.1 ข้าวญี่ปุ่น (เคนอิชิ ไม, ไทย)

3.1.6.2 Rice Vinegar 4.2% (Tamanoi, Japan)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 สํารวจปริมาณเชื้อ *B. cereus* ค่า pH และ a_w ในซูชิหน้าไข่กุ้งและข้าวซูชิ

ทำการซื้อตัวอย่างซูชิหน้าไข่กุ้ง และข้าวซูชิจากร้านค้าในตลาดนัดย่านลาดกระบังในช่วงเวลาประมาณ 5-6 โมงเย็นจำนวน 5 ร้าน ร้านละ 3 ซ้ํา ขนส่งตัวอย่างโดยใส่ในกระเป๋าเก็บความเย็น และใส่ Ice Pack เพื่อควบคุมอุณหภูมิ และนำตัวอย่างกลับมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างซูชิ หรือข้าวมาตีปนให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งตัวอย่างเพื่อทำการวัดค่า pH, a_w และวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *B. cereus* ต่อไป

3.2.1.1 การวัดค่า pH (ดัดแปลงจาก AFDO, 2004)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัมลงในถุงใส่ตัวอย่าง จากนั้นเติมนํ้ากลั่น 30 มิลลิลิตรและตีปนจนกระทั่งเป็นของเหลวข้นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปวัดค่า pH โดยใช้ pH Meter ทำการวัดซ้ำ 2 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.2.1.2 การวัดค่า a_w (Decagon Devices, 2016)

ตัดตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใส่ลงในตลับใส่ตัวอย่าง โดยเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วกันตลับ และระมัดระวังไม่ให้ตัวอย่างมากเกินครึ่งหนึ่งของตลับ จากนั้นนำตลับใส่ในเครื่องวัดค่า a_w เพื่อทำการวัดค่า ทำการวัด 2 ซ้ําแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.2.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *B. cereus* (จุไรรัตน์ รุ่งโรจน์รักษ์ และคณะ, 2536)

เตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างซูชิ หรือข้าวมาตีปนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วชั่งตัวอย่าง 25 กรัมลงในถุงใส่ตัวอย่าง เติมนํ้าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 225 มิลลิลิตร ตีคนให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomacher 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} และเตรียมตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} โดย

การดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer

ทำการวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} โดยการดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PREYA (Phenol Red Egg Yolk Agar เติมนยาปฏิชีวนะ Kanamycin) จำนวน 3 จาน ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ให้ดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PREYA 1 จาน และที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ให้ดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PREYA 1 จาน ทำ 2 ซ้ำในทุกระดับความเจือจาง ทำการเกลี่ยตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วโดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับเชื้อ *B. cereus* โดยสังเกตลักษณะโคโลนีสีชมพู และมีโซนจุ่มรอบๆโคโลนี

ทำการยืนยันเชื้อ โดยการเก็บเชื้อจาก PREYA และนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep Blood Agar โดยใช้เข็มเก็บเชื้อ จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยลักษณะโคโลนี *B. cereus* จะมีโซนใสล้อมรอบโคโลนีโดยมีความกว้างของโซน 2-4 มิลลิเมตร และนำเชื้อที่ให้ผลบวกไปส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์ที่ ฝ่ายจุลชีววิทยา สำนักมาตรฐานและความปลอดภัยอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป และนำเชื้อที่ผ่านการยืนยันสายพันธุ์แล้วมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิ และ pH ที่มีผลต่อปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารเหลว

3.2.2.1 เตรียมสปอร์ของ *B. cereus* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar Slant (NA) ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้น เติมนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วย vortex mixer 1 นาที แล้วถ่ายสารละลายเชื้อลงในหลอดทดลองแล้วนำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็นอย่างรวดเร็ว (Heat Shock) แล้วจึงนำไปย้อมสปอร์ และหาปริมาณสปอร์ต่อไป

3.2.2.2 เตรียมเซลล์ของ *B. cereus* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

3.2.2.3 ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยใช้ น้ำส้มสายชูหมักจากข้าว ให้ได้ pH 5.5, 5.0 และ 4.5 ตามลำดับ

3.2.2.4 นำสปอร์จาก 3.2.2.1 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.2.2.3 โดยคำนวณให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^4 CFU/ml แล้วทำการคูดตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตรจำนวน 16 หลอด

3.2.2.5 นำหลอดตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส จำนวน 8 หลอดต่อระดับ pH และบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส จำนวน 8 หลอดต่อระดับ pH เช่นเดียวกัน

3.2.2.6 ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 หลอด นำมาหาจำนวนเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการตรวจนับโคโลนีและบันทึกผลทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.2.7 ทำการทดลอง 3.2.2.4 - 3.2.2.5 โดยใช้เซลล์จากข้อ 3.2.2.2 แทนสปอร์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.2.8 ควบคุมคุณภาพการทดลอง โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH แล้วในข้อ 3.2.2.3 มาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมกับตัวอย่าง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการควบคุมคุณภาพจำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนำมา pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อดูความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากผลการทดสอบพบว่ามิโคโลนีเกิดขึ้นแสดงว่ามีเชื้อปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ทำการปฏิเสธผลการทดลองในรอบนั้นทั้งหมด และทำการทดลองใหม่

3.2.2.9 ทำการทดสอบยืนยันเชื้อ โดยการสุมนำเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA จำนวน 10 โคโลนี นำมา streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP โดยโคโลนีของเชื้อ *B. cereus* จะต้องมีสีชมพู และมีโซนขุ่นรอบๆ โคโลนี

3.2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิ และ pH ที่มีผลต่อปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวซูชิ

3.2.3.1 ทำการหุงข้าวญี่ปุ่นโดยใช้อัตราส่วนตามที่ผู้ผลิตแนะนำ (ข้าว 1 ส่วนต่อน้ำ 1.2 ส่วน) โดยใช้ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการปรับ pH โดยใช้ น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวให้ได้ pH 5.0 และ 5.5

3.2.3.2 ทำการชั่งตัวอย่างข้าวลงในถุงเตรียมตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อถ่วงละ 10 กรัมจำนวน 17 ถุงต่อระดับ pH

3.2.3.3 นำสปอร์จาก 3.2.2.1 ใส่ลงในตัวอย่างข้าวจำนวน 16 ถุง โดยคำนวณให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^4 CFU/g ปิดปากถุงให้สนิทด้วยคลิปปิดปากถุง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส จำนวน 8 ถุงต่อระดับ pH และ 35 ± 2 องศาเซลเซียส จำนวน 8 ถุงต่อระดับ pH เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำตัวอย่างข้าวที่ไม่ได้ทำการใส่สปอร์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของการทดลอง

3.2.3.4 ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 ถูง นำมาหาจำนวนเชื้อโดยเจือจางตัวอย่างโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 มิลลิลิตร ตีปั่นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีและบันทึกผล ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.3.5 ทำการทดลอง 3.2.3.1-3.2.3.4 โดยใช้เซลล์จากข้อ 3.2.2.2 แทนสปอร์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.3.6 ควบคุมคุณภาพการทดลอง โดยนำตัวอย่างข้าวที่ปรับ pH แล้วในข้อ 3.2.3.1 ที่ยังไม่ได้ใส่เชื้อ มาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมกับตัวอย่าง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาหาจำนวนเชื้อโดยเจือจางตัวอย่างโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 มิลลิลิตร ตีปั่นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อดูความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากผลการทดสอบพบว่าพบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่ามีเชื้อปนเปื้อนในตัวอย่าง ให้ทำการปฏิเสธผลการทดลองในรอบนั้นทั้งหมด และทำการทดลองใหม่

3.2.3.7 ทำการทดสอบยืนยันเชื้อ โดยการสูบน้ำเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA จำนวน 10 โคโลนี นำมา streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP โดยโคโลนีของเชื้อ *B. cereus* จะต้องมียีสชมพู และมีโซนรอบๆโคโลนี

3.2.3.8 นำผลการทดลองที่ได้มาประเมินปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus*

3.2.4 การวางแผนการทดลองและการประเมินผลทางสถิติ

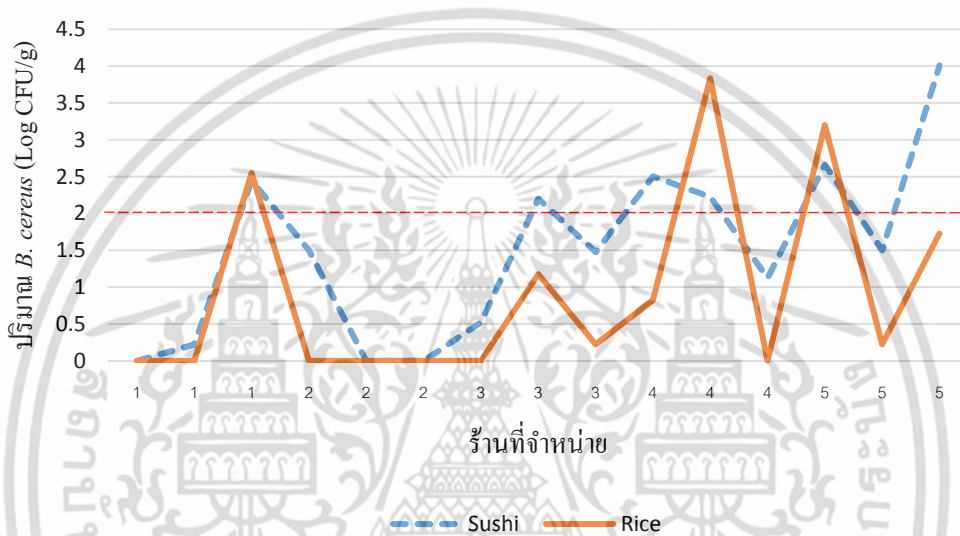
3.2.4.1 วางแผนการทดลองในข้อ 3.2.2 แบบ Factorial in CRD และนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) โดยศึกษาปัจจัย pH และอุณหภูมิที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.2.4.2 วางแผนการทดลองในข้อ 3.2.3 แบบ Factorial in CRD และนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) โดยศึกษาปัจจัย pH และอุณหภูมิที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

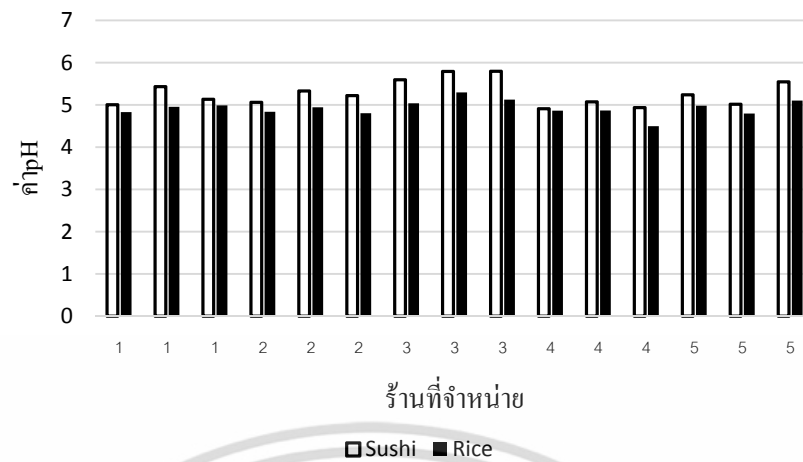
4.1 การสำรวจปริมาณเชื้อ *B. cereus* ค่า pH และ ค่า a_w ในตัวอย่างซูชิหน้าไข่กุ้งและข้าวซูชิ



ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณ *B. cereus* ในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิจากร้านในตลาดนัดย่านหัวตะเข้(ร้านที่1.) ตลาดนัดย่านสนามบินสุวรรณภูมิ(ร้านที่2.และ3.) และตลาดนัดย่านนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง(ร้านที่4.และ5.)

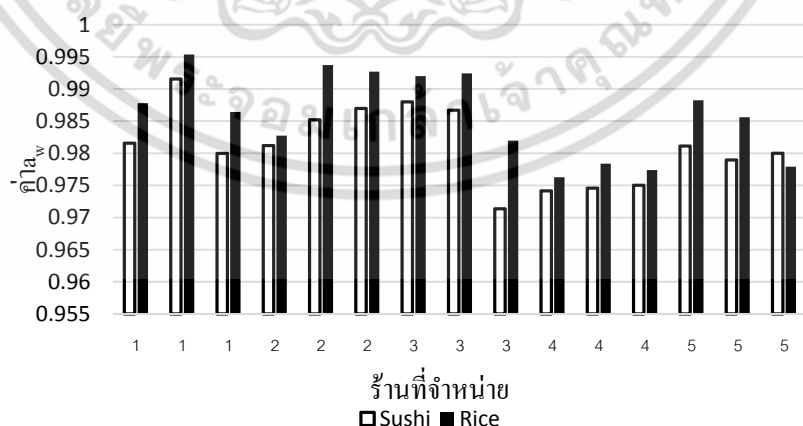
จากการสำรวจตัวอย่างซูชิหน้าไข่กุ้งในร้านค้าย่านลาดกระบังจำนวน 5 ร้าน ร้านละ 3 ซ้ำ รวม 15 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) มีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* โดยระดับการปนเปื้อนอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.22 Log CFU/g ไปจนถึง 4.01 Log CFU/g โดยร้อยละ 50 ของตัวอย่างที่ปนเปื้อน เกินเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำหนด ซึ่งกำหนดให้อาหารปรุงสุกทั่วไปรวมถึงซูชิ จะพบเชื้อ *B. cereus* ได้ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อกรัม (2 Log CFU/g) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) และในตัวอย่างข้าวซูชิ (ตารางที่ 4.1) พบว่าตัวอย่างร้อยละ 53 มีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* โดยระดับการปนเปื้อนอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.22 Log CFU/g ไปจนถึง 3.83 Log CFU/g โดยร้อยละ 37.5 ของตัวอย่างที่ปนเปื้อนเกินเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำหนด (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบค่า pH ในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิจากร้านในตลาดนัดย่านหัวตะเข้(ร้านที่1.) ตลาดนัดย่านสนามบินสุวรรณภูมิ(ร้านที่2.และ3.) และตลาดนัดย่านนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง (ร้านที่4.และ5.)

ค่า pH ของตัวอย่างซูชิอยู่ในช่วงตั้งแต่ 4.91 – 5.80 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งถือเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (ทิพพร อยู่วิทยา, 2551) สำหรับค่า pH ของตัวอย่างข้าวซูชิโดยเฉลี่ยต่ำกว่าซูชิเล็กน้อย โดยค่า pH อยู่ในช่วงตั้งแต่ 4.50 - 5.30 ซึ่งมีเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้นที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 ในขณะที่ตัวอย่างที่เหลือมีค่า pH สูงกว่า 4.6 ทั้งสิ้น จึงอาจพิจารณาได้ว่าเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ เช่นเดียวกับกับซูชิ



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบค่า a_w ในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิจากร้านในตลาดนัดย่านหัวตะเข้(ร้านที่1.) ตลาดนัดย่านสนามบินสุวรรณภูมิ(ร้านที่2.และ3.) และตลาดนัดย่านนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง (ร้านที่4.และ5.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า a_w ของตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิอยู่ในช่วง 0.97-0.99 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งจัดว่าสูงและเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี รวมไปถึงเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคด้วย (วราวุฒิ ครุส่ง, 2551)

จากการเปรียบเทียบค่าปริมาณเชื้อ ค่า pH และ ค่า a_w ที่ได้จากการทดลองในแต่ละร้านที่จำหน่ายเพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันระหว่างร้านหรือไม่พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดยกเว้นค่า pH ของตัวอย่างซูชิในร้านที่ 3 ที่เฉลี่ยแล้วมีค่าสูงกว่าซูชิที่จำหน่ายในร้านอื่นเล็กน้อยและค่า a_w ของตัวอย่างในร้านที่ 4 ที่มีค่าต่ำกว่าร้านอื่นแต่ยังคงจัดอยู่ในช่วง a_w ที่สูงและไม่มีความกระทบต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (วราวุฒิ ครุส่ง, 2551)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลสำรวจปริมาณ *B. cereus*, pH และ a_w ในตัวอย่างซูชิหน้าไข่กุ้งและข้าวซูชิ

| ร้านที่จำหน่าย | ตำราจครั้ง | ปริมาณ <i>B. cereus</i> (Log CFU/g) | | pH | | a_w | |
|----------------|------------|-------------------------------------|----------|------|----------|-------|----------|
| | | ซูชิ | ข้าวซูชิ | ซูชิ | ข้าวซูชิ | ซูชิ | ข้าวซูชิ |
| 1 | 1 | 0.00 | 0.00 | 5.00 | 4.83 | 0.982 | 0.988 |
| | 2 | 0.22 | 0.00 | 5.43 | 4.95 | 0.992 | 0.995 |
| | 3 | 2.44* | 2.55* | 5.13 | 4.99 | 0.980 | 0.986 |
| 2 | 1 | 1.50 | 0.00 | 5.06 | 4.84 | 0.981 | 0.983 |
| | 2 | 0.00 | 0.00 | 5.33 | 4.94 | 0.985 | 0.994 |
| | 3 | 0.00 | 0.00 | 5.22 | 4.80 | 0.987 | 0.993 |
| 3 | 1 | 0.52 | 0.00 | 5.59 | 5.04 | 0.988 | 0.992 |
| | 2 | 2.20* | 1.18 | 5.79 | 5.30 | 0.987 | 0.992 |
| | 3 | 1.48 | 0.22 | 5.80 | 5.13 | 0.971 | 0.982 |
| 4 | 1 | 2.50* | 0.82 | 4.91 | 4.86 | 0.974 | 0.976 |
| | 2 | 2.23* | 3.83* | 5.07 | 4.87 | 0.975 | 0.978 |
| | 3 | 1.12 | 0.00 | 4.93 | 4.50 | 0.975 | 0.977 |
| 5 | 1 | 2.66* | 3.20* | 5.24 | 4.98 | 0.981 | 0.988 |
| | 2 | 1.50 | 0.22 | 5.02 | 4.80 | 0.979 | 0.986 |
| | 3 | 4.01* | 1.73 | 5.55 | 5.10 | 0.980 | 0.978 |

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง

*เกินเกณฑ์มาตรฐานทางจุลชีววิทยาของอาหารปปรุงสุกทั่วไป ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและโภชนาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2553)

จากผลการสำรวจปริมาณ *B. cereus* ในซูชิของการทดลองนี้ดังตารางที่ 4.1 พบปริมาณเชื้อค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการสำรวจในที่อื่นๆ เช่น การสำรวจในอำเภอเมืองและอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ซึ่งพบเชื้อเพียงร้อยละ โดยพบเชื้อที่ปริมาณน้อยกว่า 2 Log CFU/g ทั้งสิ้น (สุคสายชล หอมทองและคณะ, 2554) หรือการสำรวจในประเทศออสเตรเลียในช่วงปีค.ศ. 2006-2007 ซึ่งสำรวจตัวอย่างจำนวน 404 ตัวอย่างและพบว่าตัวอย่างร้อยละ 96 อยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ (น้อยกว่า 2 Log CFU/g) (NSW Food Authority, 2008) หรือการสำรวจในปีค.ศ. 2012 ซึ่งมีตัวอย่างถึงร้อยละ 98.6 ที่มีปริมาณเชื้อในระดับที่น่าพึงพอใจ (Victoria's hub for health services and business, 2012) และการสำรวจในฮ่องกง ซึ่งทำการสำรวจซูชิจำนวน 98 ตัวอย่างพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ(น้อยกว่า 3 Log CFU/g) (Centre for Food safety, 2015)

ปัจจัยหนึ่งที่น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณเชื้อของการสำรวจครั้งนี้สูงกว่าการสำรวจในการศึกษาอื่นๆ คือค่า pH ซึ่งค่า pH ของซูชิในการสำรวจครั้งนี้มีค่าค่อนข้างสูง คืออยู่ในช่วง 4.91-5.80 และเฉลี่ยอยู่ที่ 5.27 ซึ่งในการสำรวจของออสเตรเลียในปีค.ศ. 2006-2007 พบว่าซูชิจะมีค่า pH ที่แตกต่างกันไปในแต่ละหน้า เช่น หน้าแครอทจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.81-4.95 หน้าผักคองจะอยู่ในช่วง 4.61-4.77 และหน้าปลาจะอยู่ในช่วง 5.07-5.69 และได้รายงานไว้ที่ระดับ pH สูงๆ จะพบการเจริญของเชื้อก่อโรคอย่างช้าๆ (NSW Food Authority, 2008) ซึ่งถ้าหากค่า pH นี้ถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เท่ากับหรือต่ำกว่า 4.6 ได้จะสามารถควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังเช่นการสำรวจในฮ่องกง ซึ่งตัวอย่างร้อยละ 98 มีค่า pH ที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4.6 ทั้งสิ้น และมีเพียงสองตัวอย่างเท่านั้นที่มีค่า pH เท่ากับ 4.7 ซึ่งส่งผลให้การสำรวจนั้นพบเชื้อในปริมาณที่ระดับที่น่าพึงพอใจทั้งหมด (Centre for Food safety, 2015)

เช่นเดียวกันกับซูชิ ตัวอย่างข้าวซูชิของการสำรวจครั้งนี้พบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับกับการสำรวจอื่น โดยการสำรวจตัวอย่างข้าวซูชิในประเทศออสเตรเลียจำนวน 74 ตัวอย่าง (NSW Food Authority, 2008) พบปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ(น้อยกว่า 2 Log CFU/g) ถึงร้อยละ 98.6 และค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 4.4 ซึ่งต่ำกว่าของการสำรวจในครั้งนี้เช่นกัน ส่วนค่า a_w ของทั้งสองการทดลองให้ผลสอดคล้องกัน คืออยู่ในช่วง 0.95-1.00 จึงไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลของตัวอย่างซูชิ และข้าวซูชิพบว่า ร้อยละ 60 ของตัวอย่างซูชิจะพบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* มากกว่าตัวอย่างข้าวซูชิ และมีตัวอย่างเพียงร้อยละ 20 เท่านั้น ที่พบการปนเปื้อนในข้าวซูชิมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาจากรูปร่างของกราฟแล้วพบว่ากราฟของตัวอย่างทั้งสองชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อที่พบในตัวอย่างซูชิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และตัวอย่างข้าวซูชิมีความสัมพันธ์กันแต่จะแตกต่างกันในแง่ของปริมาณเท่านั้น ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ปริมาณเชื้อที่พบในซูชิมากกว่าข้าวซูชิเป็นเพราะในซูชิจะมีส่วนประกอบอื่นด้วยเช่น หน้า(ไข่กุ้ง) สาหร่าย มายองเนส และต้องผ่านกระบวนการห่อหรือปั้น ซึ่งองค์ประกอบ และขั้นตอนที่มากกว่านี้อาจทำให้ซูชิเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อมากขึ้น นอกจากนี้ ส่วนอื่นๆของซูชิที่นอกเหนือจากข้าวยังช่วยลดความเป็นกรดในซูชิ จึงทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนได้รับผลกระทบจากความเป็นกรดน้อยลง และมีโอกาสเหลือรอดในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้มากขึ้น



ภาพที่ 4.4 ร้านจำหน่ายซูชิย่านตลาดกระบุง แสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะ และวิธีการปฏิบัติที่ไม่ดี

นอกจากปัจจัยภายในของตัวซูชิอย่าง pH และ a_w แล้ว ปัจจัยภายนอกอย่างอุณหภูมิ สุขลักษณะในการผลิตและวางจำหน่ายมีผลต่อปริมาณเชื้อเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อ *B. cereus* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม สามารถปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์ และเพิ่มจำนวนได้หากสภาวะเหมาะสม ซึ่งร้านจำหน่ายซูชิขนาดเล็กตามริมถนนหรือในตลาด มักจะมีการจัดการเกี่ยวกับสุขลักษณะที่ไม่ดี ดังภาพที่ 4.4 แสดงให้เห็นถึงการจัดวางซูชิที่เตรียมล่วงหน้าเป็นจำนวนมากลงในถาดที่ไม่มีวัสดุปิดคลุม ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ และผู้จำหน่ายไม่ได้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอย่างผ้าคลุมผม ผ้าปิดปาก และถุงมือ (ภาพที่ 4.4 ซ้าย และภาพที่ 4.4 กลาง) และแม้ว่าจะมีการใช้อุปกรณ์ในการหยิบจับซูชิ แต่อุปกรณ์นั้นถูกรับ-ส่งให้ลูกค้าโดยใช้มือเปล่าหยิบด้านที่สัมผัสกับซูชิ(ภาพที่ 4.4 ขวา) ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนเป็นการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เชื้อเกิดการปนเปื้อน และเพิ่มจำนวนจนก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการสำรวจซึ่งทำให้ทราบว่าซูชิและข้าวซูชิในการสำรวจครั้งนี้มีปริมาณมากกว่าการสำรวจอื่น และมีแนวโน้มที่จะมีปริมาณมากจนก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ อีกทั้งสภาวะการจัดจำหน่ายและสุขลักษณะของผู้จำหน่ายยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อและเพิ่มจำนวนของเชื้อ นอกจากนี้ พฤติกรรมในการผลิตและบริโภคของซูชิตามตลาดนัดยังแตกต่างไปจากการบริโภคซูชิโดยทั่วไป ซึ่งมักจะผลิตและบริโภคทันทีในระยะเวลาอันสั้น แต่ซูชิตามตลาดนัดนี้จะถูกเตรียมไว้ก่อนเป็นปริมาณมาก และผู้บริโภคมักจะมารับประทานในทันทีที่ซื้อ แต่จะนำกลับไปรับประทานที่บ้านเป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้เชื้อก่อโรคมิระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนจนสามารถก่อให้เกิดอันตรายได้จากปัญหาที่พบในทั้งหมดนี้จึงสมควรทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและจัดการกับอาหารประเภทนี้ต่อไป

4.2 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *B. cereus* ในรูปของเซลล์และสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

จากขั้นตอนการสำรวจจะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่พบในตัวอย่างมีปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับกับการสำรวจในงานวิจัยอื่น ซึ่งหากผู้บริโภคซื้อและไม่ได้บริโภคในทันที หรือเก็บในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจจะก่อให้เกิดอันตรายได้ และจากการศึกษาพบว่าค่า pH ของซูชิในงานวิจัยนี้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับผลการสำรวจของงานวิจัยอื่นซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ อีกปัจจัยหนึ่งคืออุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บซูชิหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูชิ ซึ่งที่อุณหภูมิค่าจะลดจำนวนเชื้อได้โดยการเพิ่มเวลาที่เชื้อใช้ในการแบ่งตัว (generation time) รวมไปถึงเพิ่มเวลาในระยะแลคเฟส (lag phase) ของเชื้อด้วย (EFSA, 2005) และในแนวทางการปฏิบัติสำหรับการเตรียมและการจัดวางซูชิของออสเตรเลียยังได้แนะนำให้ทำการเก็บซูชิไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียสอีกด้วย (NSW, 2007) นอกจากนี้ เนื่องจากเชื้อ *B. cereus* เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งเซลล์และสปอร์ของเชื้ออาจมีรูปแบบการเจริญเติบโตในสภาวะหนึ่งที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นความแตกต่างของลักษณะเชื้อเริ่มต้นนี้จึงเป็นอีกประเด็นที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ด้วย

4.2.1 ผลของ pH 4.5, 5.0 และ 5.5 และอุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส ต่อสปอร์ของ *B.*

Cereus

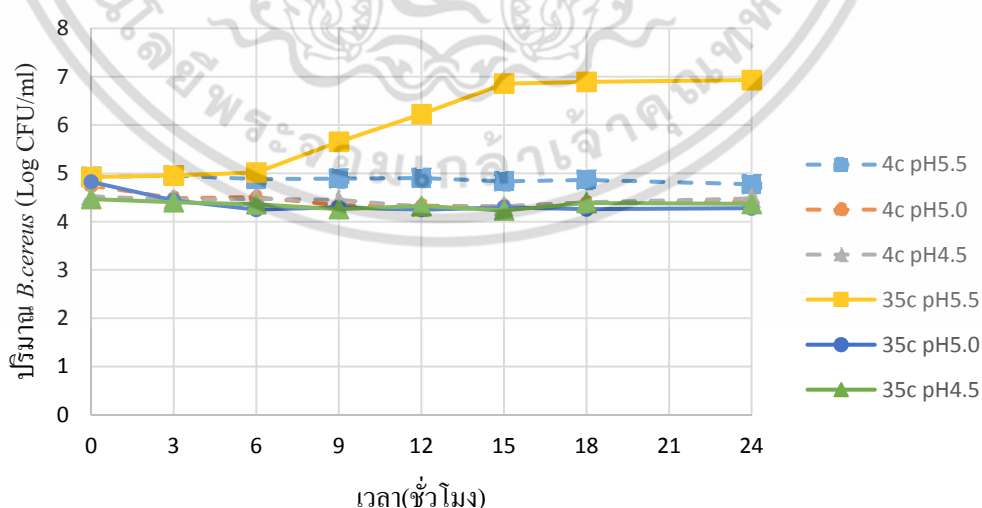
ทำการทดลองโดยใส่เชื้อเริ่มต้นที่เป็นสปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5, 5.0 และ 5.5 โดยคำนวณให้มีปริมาณเริ่มต้นประมาณ 4 Log CFU/ml และนำไปเลี้ยงที่

อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส และ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น

| เวลา(ชั่วโมง) | ปริมาณเฉลี่ยของ <i>B. cereus</i> (Log CFU/ml) | | | | | |
|---------------|---|------|------|------|------|------|
| | 4°C | | | 35°C | | |
| | 5.5 | 5.0 | 4.5 | 5.5 | 5.0 | 4.5 |
| 0 | 4.93 | 4.75 | 4.53 | 4.92 | 4.82 | 4.47 |
| 3 | 4.95 | 4.49 | 4.45 | 4.95 | 4.44 | 4.40 |
| 6 | 4.88 | 4.51 | 4.47 | 5.02 | 4.25 | 4.36 |
| 9 | 4.89 | 4.34 | 4.45 | 5.65 | 4.30 | 4.26 |
| 12 | 4.91 | 4.33 | 4.31 | 6.22 | 4.24 | 4.32 |
| 15 | 4.83 | 4.32 | 4.32 | 6.85 | 4.29 | 4.23 |
| 18 | 4.87 | 4.40 | 4.40 | 6.89 | 4.26 | 4.39 |
| 24 | 4.77 | 4.42 | 4.48 | 6.93 | 4.28 | 4.37 |

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 4.5 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ใน TSB เมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 4 Log

CFU/ml ที่ค่า pH 4.5, 5.0, 5.5 และอุณหภูมิ 4, 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.4) พบว่าที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียสในทุก ระดับ pH มีปริมาณเชื้อที่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 ใกล้เคียงกันคือประมาณ 4 Log CFU/ml และที่ อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส pH 4.5 และ 5.0 สามารถควบคุมปริมาณเชื้อให้อยู่ในช่วง 4 Log CFU/ml ได้ถึง 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน แต่ที่ pH 5.5 เชื้อจะเพิ่มปริมาณมากกว่า 4 Log CFU/ml ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป และเมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะมีจำนวนเชื้อประมาณ 6 Log CFU/ml

4.2.2 ผลของ pH 4.5, 5.0 และ 5.5 และอุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ของ *B.*

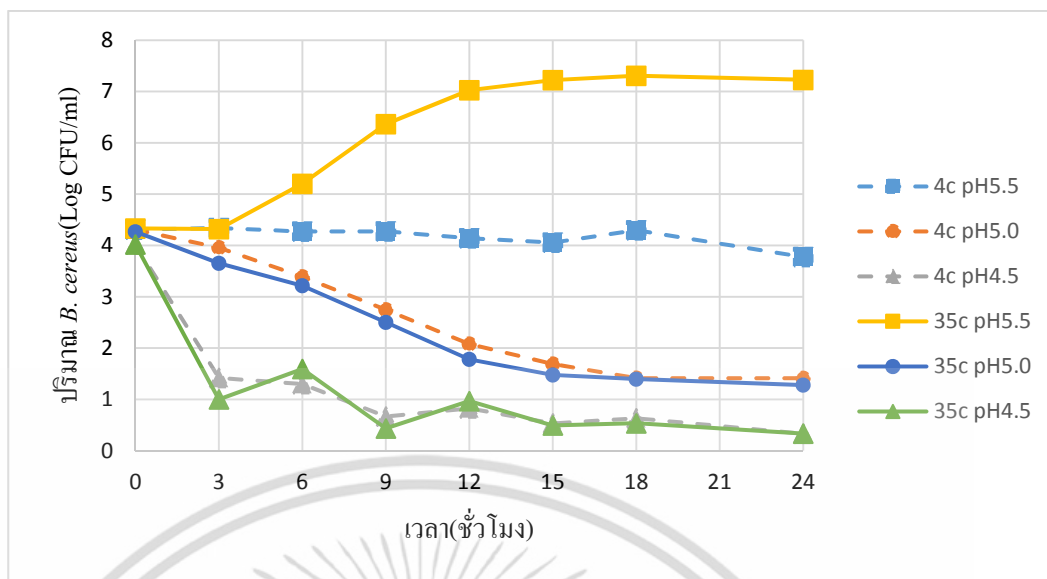
Cereus

ทำการทดลองโดยใส่เชื้อเริ่มต้นในรูปเซลล์ประมาณ 4 Log CFU/ml ในรูปเซลล์ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ทำการปรับพีเอชเท่ากับ 5.5, 5.0 และ 4.5 และนำไปทดลองเลี้ยงและเก็บ ตัวอย่างในสภาวะเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.2.1

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น

| เวลา(ชั่วโมง) | ปริมาณเฉลี่ยของ <i>B. cereus</i> (Log CFU/ml) | | | | | |
|---------------|---|------|------|------|------|------|
| | 4°C | | | 35°C | | |
| | 5.5 | 5.0 | 4.5 | 5.5 | 5.0 | 4.5 |
| 0 | 4.31 | 4.31 | 4.02 | 4.33 | 4.27 | 4.02 |
| 3 | 4.34 | 3.96 | 1.42 | 4.32 | 3.65 | 1.00 |
| 6 | 4.27 | 3.39 | 1.30 | 5.20 | 3.21 | 1.59 |
| 9 | 4.27 | 2.75 | 0.67 | 6.37 | 2.50 | 0.43 |
| 12 | 4.14 | 2.08 | 0.83 | 7.03 | 1.78 | 0.97 |
| 15 | 4.06 | 1.69 | 0.53 | 7.22 | 1.48 | 0.49 |
| 18 | 4.30 | 1.41 | 0.63 | 7.31 | 1.39 | 0.53 |
| 24 | 3.78 | 1.41 | 0.33 | 7.23 | 1.28 | 0.33 |

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณเชื้อใน TSB เมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้นที่ค่า pH 4.5, 5.0, 5.5 และอุณหภูมิ 4, 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.5) พบว่าที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อได้มีการลดจำนวนลง โดยปริมาณเชื้อที่ 24 ชั่วโมงจะอยู่ในช่วง 0, 1 และ 3 Log CFU/ml ที่ระดับ pH 4.5, 5.0 และ 5.5 ตามลำดับ โดยที่ pH 4.5 เชื้อจะลดลงจนถึงช่วง 1 Log CFU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เป็นต้นไป และที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ระดับ pH 4.5 และ 5.0 พบการลดจำนวนของปริมาณเชื้อเช่นเดียวกัน โดยปริมาณเชื้อที่ 24 ชั่วโมงจะใกล้เคียงที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส คืออยู่ในช่วง 0 และ 1 Log CFU/ml ตามลำดับ แต่ที่ระดับ pH 5.5 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจะเพิ่มจำนวนจนถึงช่วง 7 Log CFU/ml และเชื้อเพิ่มจำนวนมากกว่า 4 Log CFU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ ANOVA พบว่าทั้งปัจจัย pH และอุณหภูมิ ต่างมีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ทั้งในชุดการทดลองที่ใช้สปอร์ และเซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น โดยอุณหภูมิ 4 ± 2 และ 35 ± 2 องศาเซลเซียสส่งผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อของทั้งสองชุดการทดลอง ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียสพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เป็นอย่างดีในทุกๆ ระดับ pH ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อจะไม่เพิ่มจำนวนไปจากปริมาณเริ่มต้น และอาจจะลดลงได้หากมีปัจจัยอื่นเสริมเช่น pH ที่ระดับต่ำๆ และที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส จะไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ เว้นแต่จะได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่น

ในชุดการทดลองที่ใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น พบว่าที่ระดับ pH 4.5 และ 5.0 ปริมาณเชื้อไม่มี

ความแตกต่างกัน แต่แตกต่างกันที่ระดับ pH 5.5 ในชุดการทดลองที่ใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้นพบว่า ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานในเพื่อนักศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นเป็นประโยชน์ในการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุกระดับ pH มีปริมาณเชื้อแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด และหากพิจารณาที่ระดับ pH เดียวกันทั้งสอง ชุดการทดลอง พบว่าที่ระดับ pH 4.5 และ 5.0 มีจำนวนเชื้อใกล้เคียงกันในทั้งสองอุณหภูมิ แต่ที่ pH ระดับ 5.5 จำนวนเชื้อของสองอุณหภูมิแตกต่างกันมาก จึงกล่าวได้ว่า ที่ระดับ pH 5.0 ลงไปจะมีผล ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้

สอดคล้องกันกับการศึกษาอิทธิพลของ pH และอุณหภูมิต่อการเจริญของ *B. cereus* ในแคโร ทบด โดยที่ pH 5.0 จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ถึง 60 วันในทุกช่วงอุณหภูมิของการทดลอง (5-16 องศาเซลเซียส) แต่ที่ pH 5.5 จะพบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เท่านั้น (Valeroa *et al*, 2003) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อข้าวหุง สุก (cooked rice medium) ซึ่งพบว่าที่ระดับ pH ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5.0 เชื้อ *B. cereus* จะไม่สามารถ เจริญเติบโตได้ (วิศาล อังกูรรัต, 2547) อย่างไรก็ตาม pH จะมีอิทธิพลต่อเซลล์มากกว่าสปอร์ เนื่องจากค่า pH จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์และการขนส่งสารอาหาร เข้าสู่เซลล์ (วิศาล อังกูรรัต, 2547) โดยที่ระดับ pH ต่ำกว่า 5.0 จะสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ในชุด การทดลองที่ใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น แต่จะเพียงยับยั้งเชื้อไม่ให้เพิ่มจำนวนในชุดการทดลองที่ใช้ สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น นอกจากนี้อุณหภูมียังเป็นอีกปัจจัยที่สามารถชะลอการเจริญของเชื้อได้ โดย อุณหภูมิต่ำจะมีผลกระทบต่อเซลล์โดยจะไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ ยับยั้งการสัง กราะห์ DNA, RNA และโปรตีน และทำให้โครงสร้างไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวขึ้นและเสีย ความสามารถในการรับ-ส่งสารอาหารที่จำเป็นเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตช้าลง (Bisht, 2011)

จากผลการทดลองจึงเห็นได้ว่า ทั้งปัจจัยอุณหภูมิและ pH มีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณ เชื้อได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับข้อแนะนำในการผลิตซูชิของประเทศออสเตรเลีย ที่แนะนำให้ เก็บซูชิที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ทั้งวัตถุดิบและการวางจำหน่ายหน้าร้าน รวมไปถึงการ ปรับค่า pH ให้ต่ำกว่า 4.6 เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (NSW Food Authority, 2007) เช่นเดียวกับ Association of Food and Drug Officials (AFDO, 2004) ที่แนะนำให้เก็บซูชิที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศา เซลเซียส และปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.6 หรือต่ำกว่าเช่นกัน แต่มีข้อแนะนำเพิ่มเติมว่า pH เป้าหมาย ของข้าวซูชิควรจะอยู่ที่ 4.1 เพื่อให้มั่นใจว่า pH สุดท้ายจะไม่เกิน 4.6 ไปอย่างแน่นอน อย่างไรก็ตาม การปรับค่า pH จะมีผลกระทบต่อรสชาติของซูชิโดยตรง ซึ่งถ้าหากผู้ประกอบการทำการปรับค่า pH โดยหวังผลในการยับยั้งเชื้อเพียงอย่างเดียวอาจส่งผลกระทบต่อความพึงพอใจของผู้บริโภคได้

จากผลการทดลอง จึงพิจารณาได้ว่า ที่ระดับ pH 5.0 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและลด จำนวนเชื้อ *B. cereus* ทั้งในสภาวะอุณหภูมิต่ำ (4 ± 2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (35 ± 2 องศา

เซลล์เซียส) จึงอาจนำมาพิจารณาในการประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อในข้าวซูชิ เนื่องจากค่า pH ไม่ต่ำมาก และยังคงประสิทธิภาพแม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงทำการทดลองที่ pH 5.0 ต่อการเจริญของเชื้อในข้าวต่อไป

4.3 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *B. cereus* ในรูปของเซลล์และสปอร์ในตัวอย่างข้าวซูชิ

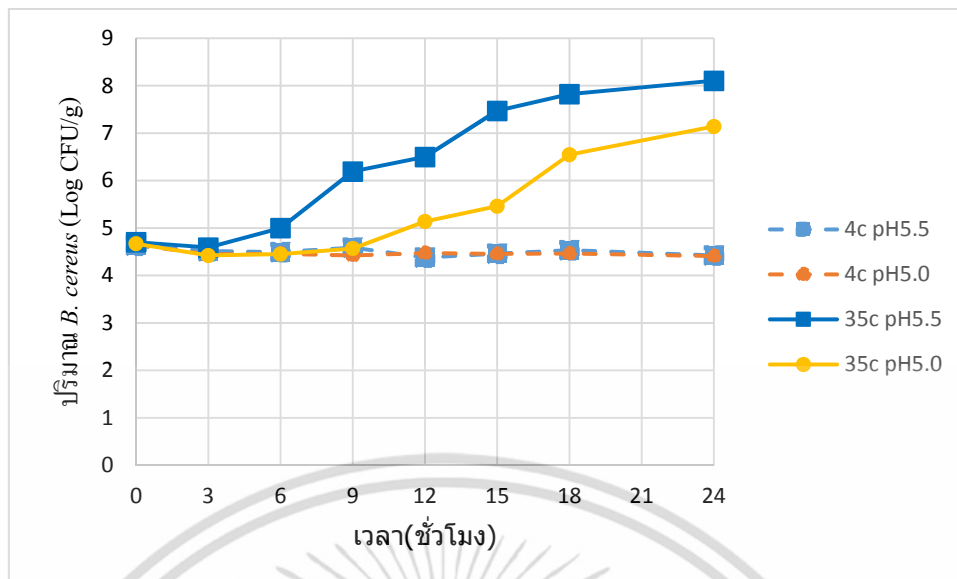
4.3.1 ผลของ pH 5.0 และ 5.5 และอุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส ต่อสปอร์ของ *B. cereus*

ทำการทดลองโดยใส่สปอร์เชื้อที่มีความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเท่ากับ 4 Log CFU/g ในตัวอย่างข้าวที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 และ 5.5 ทำการบ่มตัวอย่างที่ 4 และ 35 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ *B. cereus* ในตัวอย่างข้าว เมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> (CFU/g) | | | |
|----------------|--------------------------------------|------|------|------|
| | 4°C | | 35°C | |
| | 5.5 | 5.0 | 5.5 | 5.0 |
| 0 | 4.63 | 4.64 | 4.70 | 4.67 |
| 3 | 4.51 | 4.45 | 4.59 | 4.42 |
| 6 | 4.49 | 4.46 | 5.00 | 4.45 |
| 9 | 4.59 | 4.42 | 6.19 | 4.57 |
| 12 | 4.38 | 4.47 | 6.50 | 5.14 |
| 15 | 4.46 | 4.46 | 7.47 | 5.46 |
| 18 | 4.54 | 4.46 | 7.82 | 6.55 |
| 24 | 4.42 | 4.41 | 8.10 | 7.14 |

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณเชื้อในตัวอย่างข้าวเมื่อใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้นที่ค่า pH 5.0, 5.5 และ อุณหภูมิ 4, 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.6) พบว่าที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียสสามารถควบคุมปริมาณเชื้อให้ไม่เพิ่มจำนวนได้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อของทั้งสองระดับ pH ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อได้ โดยเชื้อเพิ่มจำนวนจนเกิน 4 Log CFU/g ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และ 12 และปริมาณเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมง มีปริมาณ 8.10 และ 7.14 Log CFU/g ที่ระดับ pH 5.5 และ 5 ตามลำดับ และปริมาณเชื้อของในระดับ pH 5.0 จะน้อยกว่าปริมาณเชื้อในระดับ pH 5.5 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

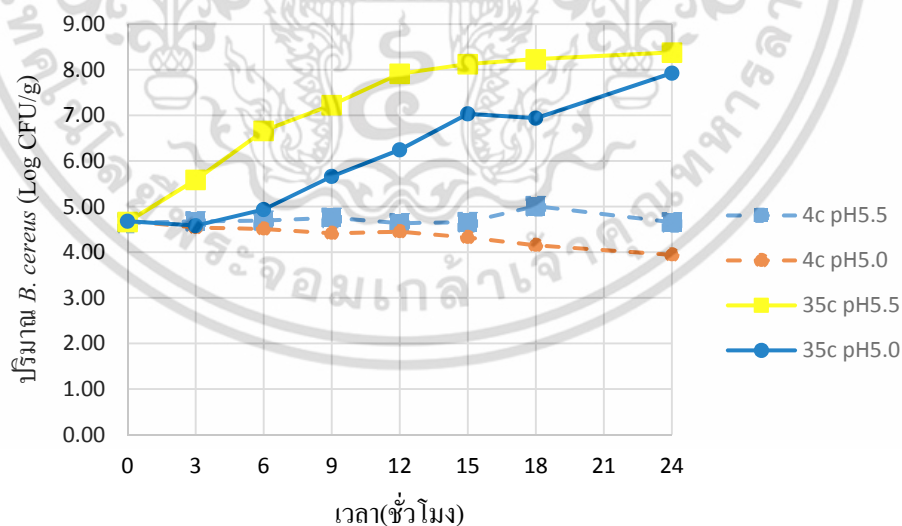
4.2.2 ผลของ pH 5.0 และ 5.5 และอุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ของ *B. Cereus*

ทำการทดลองโดยใส่เซลล์เชื้อที่มีความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเท่ากับ 4 Log CFU/g ในตัวอย่างข้าวที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 และ 5.5 และนำไปทดลองเลี้ยงและเก็บตัวอย่างในสภาวะเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.2.1

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ *B. cereus* ในตัวอย่างข้าว เมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้น

| เวลา(ชั่วโมง) | ปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> (CFU/g) | | | |
|---------------|--------------------------------------|------|------|------|
| | 4°C | | 35°C | |
| | 5.5 | 5.0 | 5.5 | 5.0 |
| 0 | 4.65 | 4.69 | 4.67 | 4.68 |
| 3 | 4.68 | 4.54 | 5.59 | 4.58 |
| 6 | 4.69 | 4.51 | 6.66 | 4.94 |
| 9 | 4.76 | 4.42 | 7.23 | 5.66 |
| 12 | 4.64 | 4.45 | 7.91 | 6.25 |
| 15 | 4.66 | 4.33 | 8.13 | 7.03 |
| 18 | 5.01 | 4.15 | 8.23 | 6.94 |
| 24 | 4.66 | 3.94 | 8.38 | 7.93 |

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 4.8 ปริมาณเชื้อในตัวอย่างข้าวเมื่อใช้เซลล์เป็นเชื้อเริ่มต้นที่ค่า pH 5.0, 5.5 และอุณหภูมิ 4, 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.7) พบว่าโดยรวมออกมาคล้ายคลึงกันโดยใน อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียสสามารถควบคุมปริมาณเชื้อให้ไม่เพิ่มจำนวนได้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อของทั้งสองระดับ pH ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่ที่ อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อจะเกิน 4 Log CFU/g ไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และ 9 และ ปริมาณเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 8.38 และ 7.93 Log CFU/g ที่ระดับ pH 5.5 และ 5.0 ตามลำดับ โดยปริมาณเชื้อของระดับ pH 5.0 จะน้อยกว่าปริมาณเชื้อในระดับ pH 5.5 อย่างแตกต่างกันที่ระดับ นัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$)

วิศาล อังกูรรัต (2547) ได้ศึกษาผลของเทคโนโลยี Hurdle ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ใน ผลิตภัณฑ์ข้าวหุงสุก พบว่าที่ pH ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5.0 เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่ง สอดคล้องกับผลการทดลองในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของการศึกษานี้ แต่ขัดแย้งกับผลการ ทดลองในตัวอย่างข้าวซึ่งพบว่าที่ pH 5.0 เชื้อไม่เพียงแต่รอดชีวิต แต่ยังสามารถเจริญเติบโตจนถึง ระดับที่อาจจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาของ วิศาล อังกูรรัต (2547) ได้ ทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 ของข้าวหุงสุกในน้ำกลั่น (cooked rice medium) แทนที่จะ เป็นข้าวหุงสุกธรรมดาเช่นในการทดลองนี้ โดยอ้างอิงข้อมูลจากผลการทดลองว่า Cooked Rice Medium มีการเจริญเติบโตคล้ายกันกับข้าวหุงสุกธรรมดาและความสะดวกในการดำเนินการ ทดลองจึงใช้ Cooked Rice Medium เป็นตัวแทนของข้าวหุงสุกในการทดลองนั้น ซึ่งความแตกต่าง ของตัวอย่างในจุดนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองในตัวอย่างข้าวของการทดลองนี้ ขัดแย้ง กันกับผลการทดลองใน Cooked Rice Medium

โดยทั่วไปแล้วสภาวะ pH ที่เป็นกรดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ แต่มีปัจจัย บางประการที่ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดสูงๆได้ เช่น อาหารบางชนิด สามารถเอื้อให้แบคทีเรียสามารถเหลือรอดได้ในสภาวะกรด และเมื่อแบคทีเรียเจริญอยู่บนผิวหน้า อาหารนั้นๆ จะสามารถเหลือรอดและเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดอันตรายได้ เช่น โดยปกติ เชื้อ *Salmonella Typhimurium* จะถูกยับยั้งที่ pH 4.0 (Tiganitas *et al.*, 2009) แต่กลับสามารถอยู่รอด ได้ที่ pH 3.27 เมื่อให้เชื้อเจริญบนเนื้อบด (Scott and Small, 1998) หรือในกรณีของเชื้อ *B. cereus* ที่ สามารถเหลือรอดได้ที่ระดับ pH 3.6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่นม (Gastric Media-Milk) โดยมีปริมาณ มากกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปกติ (Gastric Media-J) ที่ pH 4.0 (Clavel *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า ชนิดของอาหารมีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารนั้นๆ และมี อิทธิพลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์อย่าง pH อีกด้วย

ซึ่งจากผลกระทบของอาหารที่เชื้อเจริญจึงทำให้เชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างข้าวมีความทนทานต่อ pH มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดังนั้น หากต้องการควบคุมปริมาณเชื้อในข้าวซูชิไม่ให้เกิดการเจริญเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงอาจจะต้องพิจารณาในการปรับ pH ข้าวให้ต่ำลง โดยมีแนวทางปฏิบัติสำหรับการเตรียม และจัดวางซูชิของออสเตรเลียได้แนะนำให้ปรับ pH ของข้าวซูชิให้ต่ำกว่า 4.6 เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (NSW, 2007)

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ที่ pH 5.0 จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างที่คาดหวัง แต่เมื่อเทียบกับตัวอย่างข้าวที่ pH 5.5 พบว่า pH 5.0 สามารถชะลอการเจริญของเชื้อได้เล็กน้อย ทั้งในรูปเซลล์และสปอร์ ดังนั้น หากสามารถกำหนดเวลาในการจัดเตรียมและจำหน่ายซูชิให้สั้นลง และสามารถลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นในข้าวซูชิให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้โดยใช้หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice - GMP) เข้ามาประยุกต์ใช้ จะทำให้ซูชิที่ผลิตนั้น มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้เช่นกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจปริมาณเชื้อ *B. cereus*, pH และ a_w ในตัวอย่างซูชิหน้าไข่กุ้ง และข้าวซูชิจากร้านร้านค้าย่านลาดกระบังจำนวน 5 ร้าน โดยสำรวจร้านละ 3 ครั้ง พบ *B. cereus* ในตัวอย่างซูชิคิดเป็นร้อยละ 80 และในตัวอย่างข้าวซูชิพบร้อยละ 53 โดยเมื่อเทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารปรุงสุกทั่วไปที่กำหนดโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งประกาศเกณฑ์ดังกล่าวในปีพ.ศ. 2553 โดยจากตัวอย่างที่พบเชื้อทั้งหมด พบว่าเกินเกณฑ์ร้อยละ 50 ในตัวอย่างซูชิ และร้อยละ 37.5 ในตัวอย่างข้าวซูชิ และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจะพบว่าการปนเปื้อนในซูชิมากกว่าข้าวซูชิถึงร้อยละ 60 แต่หากพิจารณาข้อมูลจากกราฟแล้วจะพบว่าแนวโน้มของเชื้อในตัวอย่างทั้งสองประเภทจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

ค่า pH ของตัวอย่างถือว่าเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ โดยในตัวอย่างซูชิอยู่ในช่วง 4.91 - 5.80 และในตัวอย่างข้าวซูชิจะอยู่ในช่วง 4.50 - 5.30 จึงทำให้มีความเสี่ยงที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนจนเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้และในส่วน of ค่า a_w จะอยู่ในช่วง 0.97 - 0.99 ทั้งในตัวอย่างซูชิและข้าวซูชิ ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียทั่วไปรวมถึงเชื้อก่อโรคสามารถเจริญได้เป็นอย่างดี จากข้อมูลการสำรวจทำให้พบว่าซูชิตามร้านทั่วไปอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ จึงทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและจำหน่าย โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว(TSB) ที่ปรับ pH เท่ากับ 4.5, 5.0 และ 5.5 ที่อุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียสและปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตรทั้งในรูปแบบเซลล์และสปอร์เพื่อดูว่าสภาวะใดสามารถควบคุมปริมาณเชื้อได้ดีที่สุด

ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถควบคุมปริมาณเชื้อให้ไม่เกิน 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตรได้ในทุกระดับ pH ทั้งในรูปแบบเซลล์และสปอร์ แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสที่ระดับ pH 5.5 ไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อได้ในเซลล์และสปอร์ โดยเมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะมีปริมาณเชื้อถึง 6-7 Log CFU/ml และที่ระดับ pH 4.5, 5.0 สามารถควบคุมปริมาณเชื้อให้ไม่เพิ่มจำนวนได้เมื่อใส่เชื้อเริ่มต้นในรูปแบบสปอร์ และเมื่อใส่เชื้อเริ่มต้นในรูปแบบเซลล์พบว่าเชื้อจะลดจำนวนลงจนปริมาณต่ำกว่า 2 Log CFU/ml จึงอาจกล่าวได้ว่าที่ระดับ pH 4.5 และ 5.0 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากค่า pH จะส่งผลกระทบต่อรสชาติโดยตรง โดยผู้บริโภคอาจไม่ยอมรับได้หากค่า pH ต่ำเกินไป จึงทำการทดลองในตัวอย่างข้าวที่ระดับ pH 5.0 และ 5.5 ที่อุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถควบคุมปริมาณเชื้อไม่ให้เพิ่มจำนวนได้ทั้งในสองระดับ pH แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยมีปริมาณเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมงอยู่ที่ 7-8 Log CFU/g ซึ่งสาเหตุมาจากตัวอย่างอาหาร(ข้าวสุก)อยู่ในรูปของแข็งจึงทำให้เชื้อไม่ได้รับผลกระทบจากค่า pH ได้อย่างเต็มที่และส่งผลทำให้ผลการทดลองไม่สอดคล้องกันกับผลการทดลองในอาหารเหลว

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองจึงสรุปว่า ผู้ประกอบการควรที่จะปรับค่า pH ให้ต่ำกว่า 4.5 ตามที่คำแนะนำของข้อปฏิบัติในการผลิตซูชิกำหนด (NSW Food Authority, 2007) รวมไปถึงการใช้มาตรการอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การลดอุณหภูมิของซูชิที่วางจำหน่ายโดยใช้ถาดน้ำแข็งรองข้างใต้ถาดซูชิ การลดอุณหภูมิของวัตถุดิบในกล่องโฟม การลดระยะเวลาวางจำหน่ายซูชิโดยผลิตซูชิต่อรอบให้น้อยลง เพื่อให้ซูชิจำหน่ายหมดเร็วขึ้น รวมไปถึงการประยุกต์ใช้หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice - GMP) เช่น การหาวัสดุมาปิดคลุมซูชิเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนข้ามจากสิ่งแวดล้อม การให้ผู้ผลิตสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันเช่น หมวก ถุงมือ หน้ากาก เพื่อลดการปนเปื้อนข้ามจากผู้ปฏิบัติงาน และทำให้ซูชิที่ผลิตขึ้น มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้นได้

บรรณานุกรม

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารฉบับที่ 2. สืบค้นออนไลน์ที่ <http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguide1.pdf> (ตรวจสอบวันที่ 29 พฤษภาคม 2559). กระทรวงสาธารณสุข.
- จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์, ปรีชา จึงสมานกุล และ อติสร เสวตวิวัฒน์. 2536. พัฒนาการวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหาร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 35 : 253-262.
- ทิพาพร อยู่วิทยา. 2551. อาหารที่ปรับสภาพให้เป็นกรด. 65-85. หลักการผลิตและฆ่าเชื้ออาหารในภาชนะปิดสนิทด้วยความร้อน. สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ.
- ไทยรัฐออนไลน์. 2556. อีโคไลน์ซูชิ โดยไทยรัฐและสถาบันอาหารโดยโครงการอาหารปลอดภัย. สืบค้นออนไลน์ที่ <http://www.thairath.co.th/content/350936> (ตรวจสอบวันที่ 28 เมษายน 2558). ไทยรัฐออนไลน์.
- วราวุฒิ ครูส่ง. 2551. การบริหารจัดการจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ.
- วิศาล อังกูร์รัต. 2547. การศึกษาผลของเทคโนโลยี Hurdle ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* โดยการใช้การปรับค่าความเป็นกรดค่า ปริมาณน้ำอิสระ และสภาวะบรรยากาศ ในผลิตภัณฑ์ข้าวหุงสุก. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร. ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สุดสายชล หอมทอง, จิราพร ตันวุฒิบัณฑิต, ณัฐชนาภัทร ดังก้อง, อำไพ บุตรงาม และบุญทริกา นิลโนรี. 2554. การแพร่กระจายของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ในซูชิ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16 (1) : 69-76
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2559. ข้อมูลเกี่ยวกับข้าว. สืบค้นออนไลน์ที่ http://www.thairiceexporters.or.th/rice_profile.htm (ตรวจสอบวันที่ 5 พฤศจิกายน 2559). สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. กรุงเทพฯ.
- ศูนย์วิทยบริการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2548. สถาบันอาหารพบเชื้อโรค 2 ชนิดในข้าวปั้น(ซูชิ). สืบค้นออนไลน์ที่ <http://elib.fda.moph.go.th/library/default.asp?page2=subdetail&id=299> (ตรวจสอบวันที่ 28 เมษายน 2558). สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข.
- Association of Food and Drug Officials (AFDO). 2004. Guidance for Processing Sushi in Retail Operations [Online]. Available at <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/FS/FS11700.pdf> (verified 18 April 2016). Association of Food and Drug Officials. Pennsylvania.

- Ashkenazi, M. and Jeanne J. 2003. Food Culture in Japan. Greenwood Publishing Group, Westport, Connecticut.
- Balm, M. N. D., Jureen R., Teo C., Yeoh A. E. J., Lin R. T. P. and Dancer S. J. 2012. Hot and steamy: outbreak of *Bacillus cereus* in Singapore associated with construction work and laundry practices. Journal of Hospital Infection. 4: 224-230.
- Bisht, S. C. 2011. Effect of low temperature on bacterial growth[Online]. Available at <http://www.biotecharticles.com/Biology-Article/Effect-of-Low-Temperature-on-Bacterial-Growth-721.html> (verified 20 November 2016). Biotech Article.com.
- Bryan, F.L., Bartleson C.A. and Christopherson N. 1981. Hazard analysis, in reference to *Bacillus cereus* of boiled and fried rice in Cantonese style restaurants. Journal of Food Protection; 44: 500-512.
- Centre for Food Safety. 2015. Microbiological quality of Shshi and Sashimi in Hong Kong. [Online]. Available at http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/programme_rafs_fm_01_23_Report_e.pdf (verified 19 November 2016). Food and Environmental Hygiene Department. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. Hong Kong.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1994. *Bacillus cereus* Food Poisoning Associated with Fried Rice at Two Child Day Care Centers [Online]. Available at <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm4310.pdf> (verified 18 April 2016). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Atlanta, Georgia.
- Christine L. Little, Barnes J. and Mitchell R. T. 2002. Microbiological quality of take-away cooked rice and chicken sandwiches: effectiveness of food hygiene training of the management. Communicable Disease and Public Health. 5: 289-298.
- Decagon Devices. 2016. Aqualab Water Activity Meter - Operator's Manual [Online]. Available at http://manuals.decagon.com/Manuals/13484_AquaLab%20Series%20Four_Web.pdf (verified 18 April 2016). Decagon Devices. Pullman. Washington.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2005. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs[Online]. Available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2005.175/pdf>(verified 20 November 2016). The EFSA Journal. 175:1-48.
- Feng, C.H. 2012. The Tale of Sushi: History and Regulations. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 11: 205-220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Food and Drug Administration (FDA). 2012. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Second Edition [Online]. Available at <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf> (verified 18 April 2016). Food and Drug Administration (FDA). Silver Spring.
- Food Safety Authority of Ireland. 2003. 4th Quarter National Microbiological Survey 2003 (NS4):Microbiological quality/safety of pre-prepared rice[Online]. Available at https://www.fsai.ie/uploadedfiles/preprepared_rice.pdf (verified 18 April 2016). Food Safety Authority of Ireland
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2001. Guidelines for the microbiological examination of ready - to - eat foods [Online]. Available at <http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/Guidelines%20for%20Micro%20exam.pdf> (verified 18 April 2016). Food Standards Australia New Zealand
- Granum P.E. 1997. Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM press. Washington DC.
- Gilbert R.J., Stringer M.F. and Peace T.C. 1974. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *Journal of Hygiene*. 73 : 433-444.
- Guthrie, D. 2016. Learn everything you ever wanted to know about all the different Types of Sushi[Online]. Available at <http://www.allaboutsushiguide.com/types-of-sushi.html> (verified 18 April 2016). www.allaboutsushiguide.com.
- Harmon S.M. and Kautter D.A. 1991. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *Journal of Food Protection*; 54 : 372-374.
- Health Protection Agency. 2009. Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods[Online]. Available at https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf (verified 13 July 2016). Health Protection Agency. London.
- Jaquette, C.B. and Beuchat L.R. 1998. Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *Journal of Food Protection*. 61: 1629-1635.
- Jenson, I. and C.J. Moir. 1997. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. Sydney. Australian Institute of Food Science and Technology: 379-406

- Johnson KM. 1984. *Bacillus cereus* foodborne illness-An update. Journal of Food Protection. 47: 145-153.
- Little, C.L., J. Barnes and Mitchell R.T. 2002. Microbiological quality of take-away cooked rice and chicken sandwiches: effectiveness of food hygiene training of the management. Communicable Disease and Public Health. 2002(5) : 289-298.
- Marrku, R., Kiutamo T., Niskanen A. and Salminen K. 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food-poisoning in Finland associated with boiled rice . The Journal of Hygiene., 76: 319-327.
- Ministry for Primary Industry. 2015. *Bacillus cereus*[Online]. Available at http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Bacillus_Cereus-Spore_Forming.pdf (verified 8 October 2016). Ministry for Primary Industries. New Zealand.
- Muscolino, D., Giarratana F., Beninati C., Tornambene A., Panebianco A. and Ziino G. 2014. Hygienic-Sanitary Evaluation of Sushi and Sashimi Sold in Messina and Catania, Italy. Italian Journal of Food Safety.
- Nichols, G.L., C.L. Little , V. Mithani and J. Louvois 1999. The microbiological quality of cooked rice from restaurants and take-away premises in the United Kingdom. Journal of Food Protection. 62: 877-882.
- Notermans, S. and Batt C.A. 1998. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. 84: 51S-61S.
- NSW Food Authority. 2007. Food Safety Guidelines for the Preparation and Display of Sushi[Online]. Available at http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_documents/industry_pdf/sushi-guidelines-eng.pdf (verified 18 April 2016). NSW Food Authority. Silverwater NSW. Australia.
- NSW Food Authority. 2008. Report on food handling practices and microbiological quality of sushi in Australia[Online]. Available at http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/scienceandtechnical/report_quality_sushi_australia.pdf (verified 20 December 2016). NSW Food Authority. Silverwater NSW. Australia.
- Organization to Promote Japanese Restaurants Abroad (JRO). 2015. Japanese foods market trend findings 2015 in Thailand [Online]. Available at <http://jronet.org.e.rl.hp.transer.com/topics/2015/thailand-data/> (verified 16 May 2016). Organization to Promote Japanese Restaurants Abroad.

- Penna, T.C.V. and Moraes D.A. 2002. The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. 65 : 415-418.
- Pielaat, A., Fricker M., Nauta M.J. and Leusden F.M.V. 2005. Biodiversity in *Bacillus cereus* [Online]. Available at <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/7253/1/250912004.pdf> (verified 8 October 2016). National Institute for Public Health and the Environment. Netherland.
- Raevuori, M., Kiutamo T., Niskanen A. and Salminen K. 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food -poisoning in Finland associated with boiled rice. *The Journal of Hygiene*. 76:319-327
- Rob L., Hudson A. and Cressey P.. 2004. Risk Profile: *Bacillus* spp. in Rice. Silverwater NSW. Australia.
- Setlow, P., Johnson E.A. 1997. Spores and their significance. 30-65. In: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (eds). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Shelef L.A. and Liang P. 1982. Antibacterial effects of butylated hydroanisole (BHA) against *Bacillus* spp. *Journal of Food Science*. 47: 796-799.
- Tiganitas, A., N. Zeaki, A. S. Gounadaki, E. H. Drosinos and P. N. Skandamis. 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a(w) stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *International journal of food microbiology*. 2009(134):104-112.
- Ultee, A., Slump R.A., Steging G., Smid E.J. 2000. Antimicrobial activity of cavacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*. 63: 620-624.
- Valeroa, M., P.S. Fernandez and M.C. Salmeron. 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *International Journal of Food Microbiology*. 82: 71-79.
- Victoria's hub for health services and business. 2012. Microbiological surveillance of ready to eat Sushi rolls [Online]. Available at <https://www2.health.vic.gov.au/Api/downloadmedia/%7BB220699A-F862-4521-B9ED-18D9E8DFCB3C%7D> (verified 19 November 2016). Department of Health and Human Services. State Government of Victoria. Australia.
- Wong T.L. 1997. Report on fermented bean curd. ESR Client Report FW96/54. Institute of Environmental Science and Research .Christchurch.

Yasukawa, A., Okada Y., Miyamoto S., Yoshimura A., Fukushima T., Tanemura M., Yamamoto H., Kawamura S. and Ito K. 1979. Two Outbreaks of Food Poisoning Probably Due to *Bacillus cereus* in Osaka City. *Food Hygiene and Safety Science*. 20:186-191



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1 PREYA(Phenol Red Egg Yolk Agar with Kanamycin)

1.1. Base Medium

| | | | |
|--------------|---------|---------|------|
| Beef extract | 1 g | Peptone | 10 g |
| Mannitol | 10 g | NaCl | 10 g |
| Phenol red | 0.025 g | Agar | 15 g |
| น้ำกลั่น | 900 ml | | |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปให้ความร้อน พร้อมกับการกวนเป็นระยะๆจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเดือด ทิ้งไว้ 1 นาทีเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

1.2. Kanamycin solution

ละลาย Kanamycin (Meji) ขนาด 1 กรัมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปกรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส

1.3. Saline solution 0.85 %

| | | | |
|------|-------|----------|---------|
| NaCl | 8.5 g | น้ำกลั่น | 1000 ml |
|------|-------|----------|---------|

ละลาย NaCl ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

1.4. Egg yolk emulsion ,50%

ล้างไข่ไก่ให้สะอาดแล้วแช่ไว้ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นให้ทำการตอก และแยกไข่แดงด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและเก็บไว้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ ทำการตวงไข่แดงมาผสม กับ Saline solution 0.85 % ในปริมาตรที่เท่าๆกัน เก็บสารละลายที่ได้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส

1.5. Complete medium

นำ Base medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อุ่นใน water bath จนกระทั่งเหลืออุณหภูมิ ประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงผสม Egg yolk emulsion ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 3 (Egg yolk emulsion 27 มิลลิลิตรต่อ Base medium 900 มิลลิลิตร) จากนั้นจึงเติม Kanamycin solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Kanamycin solution 221 ไมโครลิตรต่อต่อ Base

medium 900 มิลลิลิตร และ Egg yolk emulsion 27 มิลลิลิตร) แล้วเทลงจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ หากยังไม่ใช้ในทันทีให้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส

ก.2 Tryptic Soy Broth

| | | | |
|-----------------------------|-------|-------------------------------|---------|
| Pancreatic digest of casein | 17 g | Enzymatic digest of soya bean | 3 g |
| NaCl | 5 g | K_2HPO_4 | 2.5 g |
| Glucose | 2.5 g | น้ำกลั่น | 1000 ml |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.3 Tryptic Soy Agar

| | | | |
|-----------------------------|---------|-------------------------------|------|
| Pancreatic digest of casein | 15 g | Enzymatic digest of soya bean | 5 g |
| NaCl | 5 g | Agar | 15 g |
| น้ำกลั่น | 1000 ml | | |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มให้เดือดพร้อมกับกวนเป็นระยะเพื่อให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.4 Nutrient Agar

| | | | |
|--------------|------|----------|---------|
| Beef extract | 3 g | Prptone | 5 g |
| Agar | 15 g | น้ำกลั่น | 1000 ml |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาทีพร้อมกับกวนเป็นระยะเพื่อให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.5 Plate Count Agar

| | | | |
|---------------|---------|-----------------------------|------|
| Yeast extract | 2.5 g | Pancreatic digest of casein | 5 g |
| Glucose | 1 g | Agar | 15 g |
| น้ำกลั่น | 1000 ml | | |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาทีพร้อมกับกวนเป็นระยะเพื่อให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.6 Butterfield's Phosphate-Buffer

| | | | |
|--------------------------|------|----------|---------|
| KH_2PO_4 | 34 g | น้ำกลั่น | 1000 ml |
|--------------------------|------|----------|---------|

ทำการเตรียมสารละลายเข้มข้นโดยการละลาย KH_2PO_4 ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายนี้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส

เตรียมสารละลายเจือจาง Butterfield's Phosphate-Buffer โคนการตรวจสารละลายเข้มข้น ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทำการดูคแบ่งลงภาชนะตามปริมาตรที่ใช้งานแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.7 Malachite green solution

| | | | |
|-----------------|------|----------|--------|
| Malachite green | 10 g | น้ำกลั่น | 100 ml |
|-----------------|------|----------|--------|

ก.8 Safranin O solution

| | | | |
|------------|--------|----------|-------|
| Safranin O | 0.25 g | น้ำกลั่น | 20 ml |
|------------|--------|----------|-------|

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายสปอร์และเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1 การเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

1.1 เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar slant (NA slant) ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 เติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอด NA slant ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อชะเชื้อที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปของสารละลายเชื้อ แล้วถ่ายสารละลายเชื้อลงในหลอดปราศจากเชื้อ



ภาพที่ ข.1 สารละลายเชื้อ(หลอดขวา) ที่ชะออกจาก NA slant (หลอดซ้าย)

1.3 นำสารละลายเชื้อไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำเย็นอย่างรวดเร็ว (heat shock)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.2 การนำสารละลายเชื้อไปให้ความร้อนด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

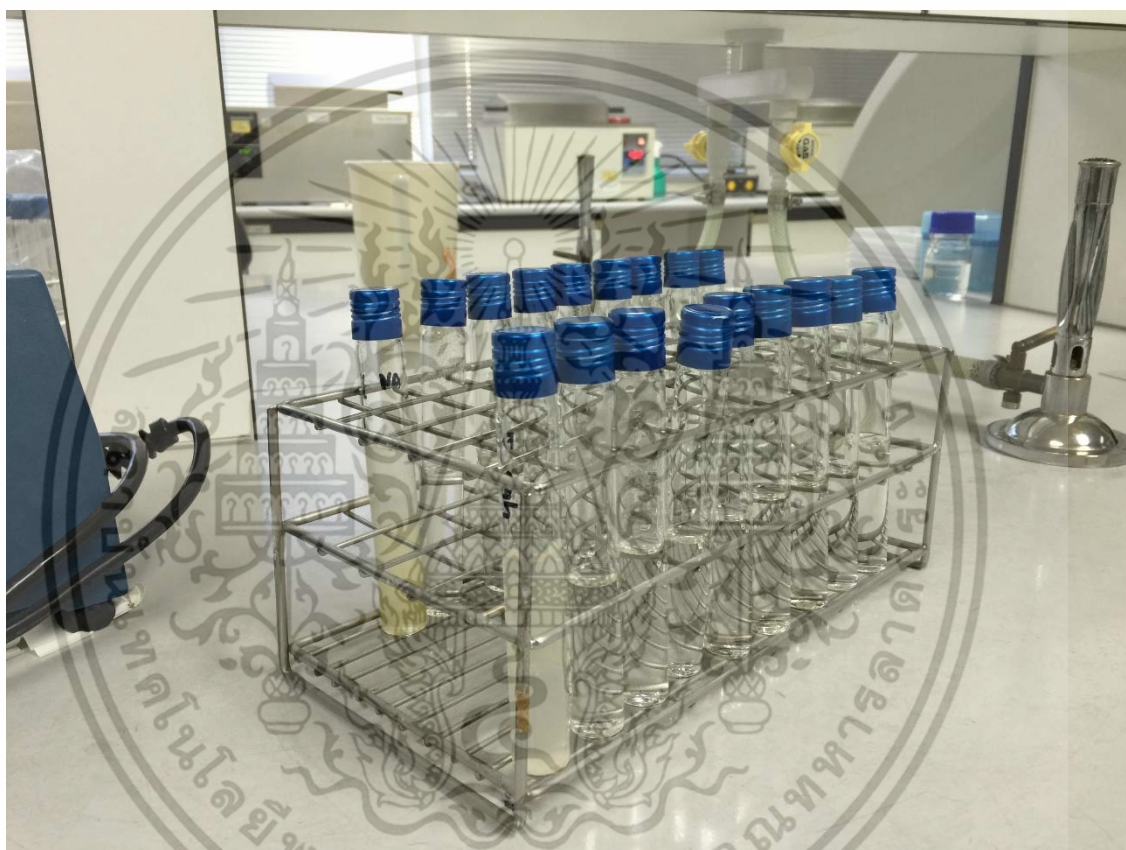
1.4 นำสารละลายสปอร์ที่ได้มาข้อมด้วย Malachite green และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อยืนยันการเกิดสปอร์



ภาพที่ ข.3 สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ทำการหาความเข้มข้นของเชื้อในสารละลายสปอร์ โดยดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตรเพื่อทำการเจือจางเชื้อลง 10 เท่า (10^{-1}) ให้ทำการเจือจางเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆ (serial dilution) จนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-8} แล้วให้ดูดสารละลายเชื้อที่ทำการเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อและทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนโคโลนี และคำนวณกลับไปเป็นความเข้มข้นของเชื้อต่อไป



ภาพที่ ข.4 การทำ serial dilution เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อในสารละลายสปอร์

ข.2 การเตรียมเซลล์ของเชื้อ *B. cereus*

2.1 เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2 นำสารละลายเชื้อใน TSB ไปย้อมแกรมเพื่อยืนยันการเกิดเซลล์ของเชื้อ

2.3 ทำการหาความเข้มข้นของเชื้อ โดยใช้วิธีใน ภาคผนวก ข. ข้อ 1.5 ทุกประการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.1 การทดสอบยืนยันเชื้อ *B. cereus*

1.1 นำเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากตัวอย่าง และลงบนผิวหนังอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep Blood Agar เพื่อดูปฏิกิริยา hemolytic โดยเชื้อ *B. cereus* จะผลิตเอนไซม์ hemolysin ออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนเกิดเป็นโซนใส (clear zone) รอบๆ โคลนิจของเชื้อ



ภาพที่ ค.1 โซนใสของเชื้อ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep Blood Agar (หมายเลข 2/5 และ 4/5)

1.2 นำเชื้อที่ให้โซนใสไปทำการตรวจยืนยันสายพันธุ์ที่ ฝ่ายจุลชีววิทยา สำนักมาตรฐานและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 รายการการทดสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus*

| Dilution ที่ | NA | Gram stain | NO ₃ | Motility | VP | Glucose (AnO ₂) | Hemolyse | Rhizoid growth | Tyrosine | Toxin crystal | Growth 43°C | <i>B. cereus</i> (/ หรือ x) |
|--------------|----|------------|-----------------|----------|----|-----------------------------|----------|----------------|----------|---------------|-------------|-----------------------------|
| B01 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B02 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B03 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B04 | + | + | - | + | - | + | ++ | - | + | - | + | x |
| B05 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B06 | + | + | - | + | - | + | ++ | - | + | - | + | x |
| B07 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B08 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B09 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |
| B10 | + | + | + | + | + | + | ++ | - | + | - | + | / |

NA หมายถึง การเจริญของเชื้อบน Nutrient Agar

NO₃ หมายถึง nitrate reductase test

VP หมายถึง Voges-Proskauer test

+/- หมายถึง positive reaction, negative reaction

++ หมายถึง strongly hemolysis

/, x หมายถึง *Bacillus cereus* positive, *Bacillus cereus* negative

ประวัติผู้เขียน

| | |
|------------------------------|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นายศักดิ์ศิลป์ อภิรักษ์นันทน์ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 6 ธันวาคม 2527 ที่กรุงเทพฯ |
| ที่อยู่ | 10/126 หมู่ 8 ตำบลสำโรงเหนือ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ 10270 โทร 089-996-3065 |
| ประวัติการศึกษา | 2550 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ประสบการณ์ทำงานและผลงานวิจัย | |
| พ.ศ. 2550-2559 | เจ้าหน้าที่ทดสอบทางจุลชีววิทยา ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |
| พ.ศ. 2559 | นำเสนอ ปสเตอร์เรื่อง Surveillance of <i>Bacillus cereus</i> in Onigiri, Tobiko Sushi and Sushi rice in Ladkrabang area ในงาน Food Innovation Asia Conference 2016 ครั้งที่ 18 วันที่ 16-18 มิถุนายน 2559 ณ ไบเทค บางนา |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้