



## ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การหาความคงทนและเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมพื้นบ้านไทย  
(A Study on Endurance and Injured Cells of *Staphylococcus aureus* in Thai Traditional Style Ice Cream)

โดย

นางสาวชฎากานต์ มะลิวัลย์  
นางสาวณัฐนิช กิตติกิจนภากาศ

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 26.3.39 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ  
(อภพร เปี๊ยะวิวัฒน์)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....  
ศ.ดร.ระติพร หาเรือนกิจ  
(หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร)  
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 30 เดือน 26 พ.ศ. 39

.....  
8127 21 ส.ค. 2541  
2038  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรณีใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหาความคงทนและเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมพื้นบ้านไทย

A study on Endurance and Injured Cells of *Staphylococcus aureus* in Thai Traditional Style Ice Cream



T096916

นางสาวชญาภานต์ มะลิวัลย์

นางสาวณัฐนิช กิตติก้องนางค์

พ.ศ.  
๒๕๖๓  
๒๕๖๓

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 96916

วัน,เดือน,ปี..... 5 JUN 2023

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ. 2539

ชญากานต์ มะลิวัลย์ และ ณัฐนิช กิตติก้องนางค์. 2539. : การทดสอบความคงทนและเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมพื้นบ้านไทย (A Study on Endurance and Injured Cells of *Staphylococcus aureus* in Thai Traditional Style Ice Cream). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์, 47 หน้า.

ในกระบวนการแช่แข็งและเก็บรักษาไอศกรีมนั้น มักจะมีแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดเหลืออยู่และอยู่ในสภาพที่มีความบกพร่องทางกายภาพ ซึ่งเรียกว่า เซลล์บาดเจ็บ (Injured cells) ในการทดลองได้ใช้วิธีการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ตามมาตรฐาน คือ การใช้ TSB (Trypticase soy broth) ที่เติมเกลือให้ได้ปริมาณ 10% และ TSB ที่มีเกลืออยู่ 0.5% เมื่อเปรียบเทียบกันจะพบว่าเชื้อจะเจริญใน TSB ที่มีเกลือ 10% น้อยกว่าใน TSB ที่มีเกลืออยู่ 0.5% เมื่อนำผลการทดลองไปหาความแตกต่างทางสถิติ ผลปรากฏว่า การตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ใน TSB ที่มีเกลือ 0.5% นั้นมีมากกว่าใน TSB ที่มีเกลือ 10% อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และจากการแช่แข็งไอศกรีมหลังการผลิตเป็นระยะเวลาต่าง ๆ แล้ว ยังพบว่ามีเซลล์บาดเจ็บอยู่ ดังนั้นถ้าใช้ TSB เติมเกลือให้ได้ปริมาณ 10% ตามวิธีการมาตรฐาน อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบเซลล์บาดเจ็บดังกล่าว ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้ เพราะฉะนั้นวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อในไอศกรีมกะทิสดแช่แข็งควรใช้ TSB ที่มีเกลืออยู่ 0.5%

ชญากานต์ มะลิวัลย์

ณัฐนิช กิตติก้องนางค์

ลายมือชื่อนักศึกษา

Ans

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

26-3-39

วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. วรณา ตั้งเจริญชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ความเข้าใจในการผลิตไอศกรีม ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์วิพัทธ์ อารีกุล และอาจารย์วัล สนิธิเพิ่มพูน กรรมการสอบที่ได้กรุณาให้ความกระจ่าง ตลอดจนข้อชี้แนะเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการปฏิบัติงาน รวมทั้งเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ให้การกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจ ทำให้ประสบความสำเร็จในครั้งนี้ได้

ชญากานต์ มะลิวัลย์  
ณัฐนิช กิตติก้อนางค์  
มีนาคม 2539

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ .....	ค
กิตติกรรมประกาศ .....	ง
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ช
<b>บทที่</b>	
1. บทนำ .....	1
2. วารสารปริทัศน์ .....	2
2.1 เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
2.2 ผลของการแช่แข็งต่อจุลินทรีย์ .....	11
2.3 ลักษณะของเซลล์บาดเจ็บบ .....	17
2.4 วิธีการตรวจสอบและการนับจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บบ .....	19
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง .....	26
3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง .....	26
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	26
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจทางจุลชีววิทยา .....	27
3.4 วิธีการผลิตไฮสกริม .....	27
3.5 วิธีการทดลอง .....	27
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	29
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	38
เอกสารอ้างอิง .....	39
ภาคผนวก .....	41
ประวัติผู้เขียน .....	47

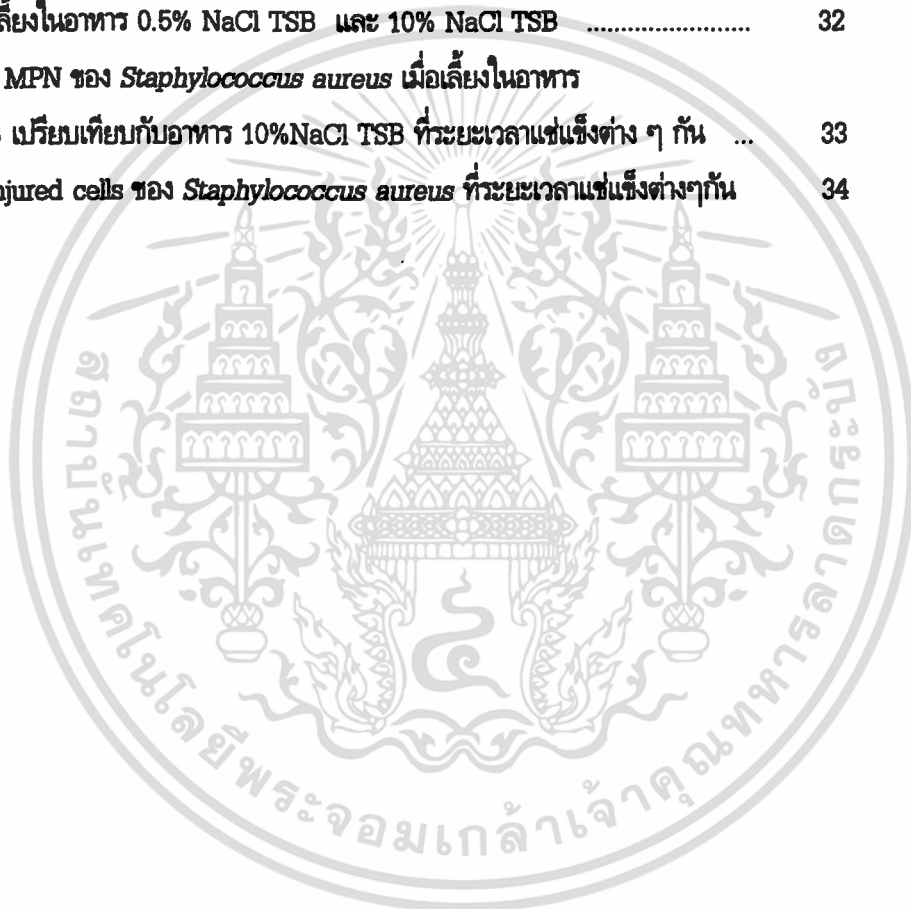
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะของ <i>Staphylococcus aureus</i> หรือกลุ่มของ <i>Staphylococcus</i> .....	3
2.2 แสดงลักษณะของเซลล์บาดเจ็บบที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปอาหารโดยวิธีต่าง ๆ .....	17
2.3 ตำแหน่งที่ถูกทำลายในเซลล์บาดเจ็บบเนื่องจากการบวนการแปรรูป .....	18
2.4 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการบวนการแปรรูปและถนอมอาหาร .....	19
2.5 แสดงสารประกอบจำเพาะบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็งและเหลว .....	24
2.6 ผลของอาหารแข็งจำเพาะในการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บบ .....	24
4.1 แสดงผลการตรวจเชื้อ <i>S. aureus</i> ในไอศกรีมกะทิสดหลังการผลิต .....	29
4.2 แสดงค่า MPN ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่เลี้ยงใน 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB เมื่อผ่านการแช่แข็งที่ระยะเวลาต่าง ๆ .....	30
4.3 แสดงค่า MPN เฉลี่ย ของเชื้อ <i>S. aureus</i> เมื่อเลี้ยงในอาหาร 0.5% NaCl TSB โดยเปรียบเทียบกับ 10% NaCl TSB ที่ระยะเวลาแช่แข็งต่าง ๆ กัน .....	31
4.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอาหาร 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB .....	31
4.5 แสดง % Injured cells ของเชื้อ <i>S. Aureus</i> เมื่อแช่แข็งไอศกรีมกะทิสดเป็นเวลาต่างๆ ...	31
4.6 แสดงขั้นตอนในการรักษาเซลล์บาดเจ็บบด้วยอาหารเหลว ในกรณีของการวิเคราะห์ จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บบ .....	36
ผนวกที่ 1 .....	43
ผนวกที่ 2 .....	44

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย .....	7
2.2 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย .....	7
2.3 แสดงผลของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ .....	15
2.4 แสดงผลของ sub lethal treatment ต่อเซลล์จุลินทรีย์ .....	20
4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า MPN ของ <i>Staphylococcus aureus</i> กับจำนวนวันที่แช่แข็งเมื่อเลี้ยงในอาหาร 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB .....	32
4.2 แผนภูมิแสดงค่า MPN ของ <i>Staphylococcus aureus</i> เมื่อเลี้ยงในอาหาร 0.5%NaCl TSB เปรียบเทียบกับอาหาร 10%NaCl TSB ที่ระยะเวลาแช่แข็งต่าง ๆ กัน ...	33
4.3 กราฟแสดง % injured cells ของ <i>Staphylococcus aureus</i> ที่ระยะเวลาแช่แข็งต่างๆกัน	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

ไอศกรีมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการให้ความร้อน การทำให้เย็น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในขั้นตอนของการแช่แข็งและการเก็บรักษา ซึ่งมักจะมีแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดเหลืออยู่ แต่อยู่ในสภาพที่มีความบกพร่องทางกายภาพ เนื่องจากผลของสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงซึ่งเซลล์แต่ละเซลล์กระทบ ดังนั้นก่อนที่จะเราจะทำการตรวจนับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร เราจำเป็นจะต้องทำความเข้าใจก่อนว่า จุลินทรีย์ที่พบหลงเหลืออยู่ภายหลังกระบวนการแปรรูปอาหารต่าง ๆ มักอยู่ในลักษณะของเซลล์ที่บาดเจ็บ ดังนั้นเพื่อที่จะได้ผลของการตรวจนับจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นที่ยอมรับ จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงการตรวจจุลินทรีย์ที่ได้รับบาดเจ็บเป็นประการแรก

โดยปกติแล้วเรามักนึกกันว่าวิธีการที่ใช้ตรวจนับจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บนั้นสามารถใช้วิธีการเดียวกันกับวิธีการที่ใช้ตรวจนับเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตาม ต่อมาจึงทราบว่าวิธีการดังกล่าวไม่สามารถใช้ตรวจนับได้ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของเซลล์เหล่านั้นเปลี่ยนแปลงไปนั่นเอง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาอย่างจริงจังจนกระทั่งได้ข้อสรุปว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์บาดเจ็บในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพที่เหมาะสมจะทำให้เซลล์เหล่านั้นสามารถรักษาตัวเองได้ จนกระทั่งสามารถส่งผลกระทบหรือเป็นอันตรายกับผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความรู้ทางพื้นฐานของผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการแช่แข็งที่มีต่อเซลล์ ทั้งนี้เพื่อสามารถเลือกใช้วิธีการในการตรวจนับเซลล์บาดเจ็บที่เหมาะสมได้ต่อไป

ในการตรวจสอบและตรวจนับจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของอาหารหรือจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคนั้น มักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกว่า selective medium ซึ่งมีสาร selective agents ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น แต่สารเหล่านี้กลับมีผลต่อการยับยั้งความสามารถในการรักษาตัวเองของแบคทีเรียที่ได้รับบาดเจ็บ ดังนั้นจึงต้องเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการรักษาตัวเองของเซลล์ที่บาดเจ็บต่อไป โดยในการทดลองมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. ศึกษาการทำเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมพื้นบ้านไทย
2. เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมพื้นบ้านไทยขณะแช่แข็ง

## บทที่ 2

### การสารปริทัศน์

#### 2.1 เชื้อ *Staphylococcus aureus*

##### 2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

อยู่ใน Family Micrococcaceae สกุล Staphylococcus รูปร่างเซลล์กลม พบอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ และเนื่องจากการแบ่งตัวมากกว่าหนึ่งระนาบทำให้พบอยู่เป็นกลุ่ม ๆ คล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ไม่มีการปักตัวติดสีแกรมบวก ให้โคโลนีสีเหลือง เป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph เมแทบอลิซึม มีทั้งแบบ respiration และ fermentation catalase เป็นบวก อาจสร้างคาโรติโนอยด์ ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน อาจใช้คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด โดยเฉพาะในสภาพที่มีอากาศ ซึ่งจะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สภายใต้สภาพที่ไม่มีอากาศ เมื่อใช้กลูโคสจะไดกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ไม่มีอากาศ จะไดกรดแอซิติกเป็นส่วนใหญ่ และ CO<sub>2</sub> ปริมาณเล็กน้อย

มีการสร้างเอนไซม์และสารพิษขับออกข้างนอกเซลล์ (enterotoxin) ที่ทนความร้อน บางสายพันธุ์ อาจก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ซึ่งเป็นผลจากการสร้างเอนเทอโรทอกซินได้ ไม่สร้างอินโดล ต้องการกรดอะมิโนและวิตามินและต้องการไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เมื่อเจริญในที่ที่มีอากาศ เป็นพวก facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ 34-40 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เจริญได้ 6.5-46 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสม 7.0-7.5 พีเอชที่เจริญได้ 4.2-9.3 ส่วนใหญ่เจริญได้ในที่มีเกลือ NaCl 15 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ ถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะอย่างเช่น B-lactam, tetracycline, novobiocin และ chloramphenicol แต่ต้านทานต่อ polymyxin และ polyene ส่วนใหญ่พบตามผิวหนัง ผิวต่อมและตามเยื่อของสัตว์เลือดอุ่น สำหรับลักษณะบางอย่างที่น่าสนใจนั้นจะแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

##### 2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

###### 2.1.2.1 ภาวะการแข่งขัน

มีแบคทีเรียหลายชนิดด้วยกันที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* เมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือแหล่งอาหารเดียวกัน อย่างเช่น *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, และ *Streptococcus diacetylactis* โดยจะมีการแย่งสารอาหารที่จำเป็น (Troller and Frazier 1963B; Landolo et al. 1965) ส่วนแบคทีเรียแลคติกนั้นจะสร้างกรดเพื่อยับยั้ง Staphylococci (Kao และ Frazier 1966) หรือผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย (Dahiya และ Speck 1968) จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อย่างเช่น *Proteus*

ไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.1** แสดงลักษณะของ *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup> หรือ กลุ่มของ *Staphylococcus*<sup>2</sup>

Characteristic	Reaction <sup>3</sup>
<b>Gram reaction:</b>	
Positive	+
Negative	-
<b>Size:</b>	
<1 $\mu$	+
1-1.5 $\mu$	-
>1.5 $\mu$	-
<b>Colony appearance:</b>	
Smooth, convex, entire edge	+
Nodular irregular edge	-
Granular surface, entire edge	-
White pigment	-
Yellow pigment	-
Orange (gold)	+(±)
<b>Appearances in broth:</b>	
Fine Deposit	+
Granular deposit	-
Mucoid deposit	-
<b>Metabolic products:</b>	
Coagulase	+
Phosphatase	+
Catalase	+
Acetoin	+
Oxidase	-
<b>Growth:</b>	
Presence of no added NaCl	+
Presence of 10% NaCl	+
Presence of 15% NaCl	+
At 10°C	±
At 45°C	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่มีการตีพิมพ์ หักเงิน อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของ *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup> หรือ กลุ่มของ *Staphylococcus*<sup>2</sup>

Characteristic	Reaction <sup>3</sup>
Media containing ammonium phosphate as sole nitrogen source	-
Media containing glucose as sole carbon source	-
Anaerobic fermentation (acid produced):	
Glucose	+
Mannitol	+
Oxidative action on sugars (acid produced):	
Glucose	+
Mannitol	+
Lactose	+
Sucros	+
Maltose	+
Mannose	+
Glycerol	+
Galactose	±(+)
Salicin	-(±)
Arabinose	-
Celobiose	-
Dulcitol	-
Dextrin	-
Inositol	-
Raffinose	-
Rhamnose	-
Xylos	-
Nitrogen cycle:	
Ammonia from ptone	+
Ammonia from Arginine	+
Nitrates reduced to nitrites	-
Nitrates reduced beyond nitrites	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ใ้แก่ใคร่ได้ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของ *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup> หรือ กลุ่มของ *Staphylococcus*<sup>2</sup>

Characteristic	Reaction <sup>3</sup>
Sodium hippurate	+
Esculin	-
Lard	+
Butter	+
Tween 20	+
Tween 40	+
Tween 60	+
Tween 80	±
Starch	-
Gelatin	+
Urea	+
Litmus milk:	
Acid	+
Acid and coagulation	±
Digestion	-
Litmus dicolorized	±
Methylene blue reduced	+
Clearing of casein	+
Clearing of egg yolk (lipase)	+
Methy red (pH 4.3-4.6, average 4.4)	+
Voges-proskauer	+
Indole	-
H <sub>2</sub> S produced	±

<sup>1</sup>From Buchanan and Gibbon (1974)

<sup>2</sup>From Shaw et al. (1951) and Baird-Parker (1963, 1965)

<sup>3</sup> + = greater than 80% positive; - = less than 20% positive; ± between 20 and 80% positive; ( ) different reaction from strains studied by different in investigators

ที่มา : Stanier และ Ingraham (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter (Aerobacter) aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter*, จะสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้ง Staphylococci (Troller และ Frazier 1963B) อย่างไรก็ตามได้มีการสังเกตว่า แบคทีเรียแลคติกจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ในช่วงแรกของการบ่ม และมีการกระตุ้นเล็กน้อยที่ระดับอุณหภูมิสูง แต่จะมีการยับยั้งการเติบโตที่ระดับอุณหภูมิต่ำเท่านั้น ซึ่งได้ได้มีการทดสอบการตายของ Staphylococci ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ กันและพบว่าจะมีการตายเกิดขึ้นในช่วงหลังของการบ่มโดยเกิดจากการที่สร้างขึ้นมา ยิ่งไปกว่านั้นในอาหารดิบที่มีแบคทีเรียประจำถิ่น (bacterial flora) ปนกันอยู่หลายชนิดนั้น Staphylococci จัดเป็นคู่แข่งที่เลวและมักจะถูกยับยั้งโดยสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ สร้างขึ้นเสมอ

#### 2.1.2.2 จำนวนเริ่มต้น

ปริมาณการปนเปื้อนของ *S. aureus* เริ่มต้นในอาหารเป็นจำนวนมากนั้น ส่งผลให้ *S. aureus* มีโอกาสในการอยู่รอดสูงโดยสามารถเพิ่มจำนวนได้จนถึงระดับที่เป็นจุลินทรีย์เจ้าถิ่นและผลิตเอนโทโรทอกซินในที่สุด

#### 2.1.2.3 ช่วงของการเจริญเติบโต

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ระยะ lag phase ของ *S. aureus* จะใช้เวลาสั้น (Lando et al. 1964) แต่ถ้าในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะใช้เวลาหลายวัน (Anglotti et al. 1961A)

ก่อนหน้าการผลิตเอนโทโรทอกซินนั้น Staphylococci มักจะผ่านช่วง lag phase และมีการเจริญเติบโตในระยะเอกซ์โปเนนเชียล Mclean et al. (1968), Markus และ Silverman (1968), และ Morse et al. (1969) ได้สังเกตว่า *S. aureus* จะมีการผลิตเอนโทโรทอกซินชนิด B ในช่วงหลังของการเติบโตในระยะเอกซ์โปเนนเชียล (log phase) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

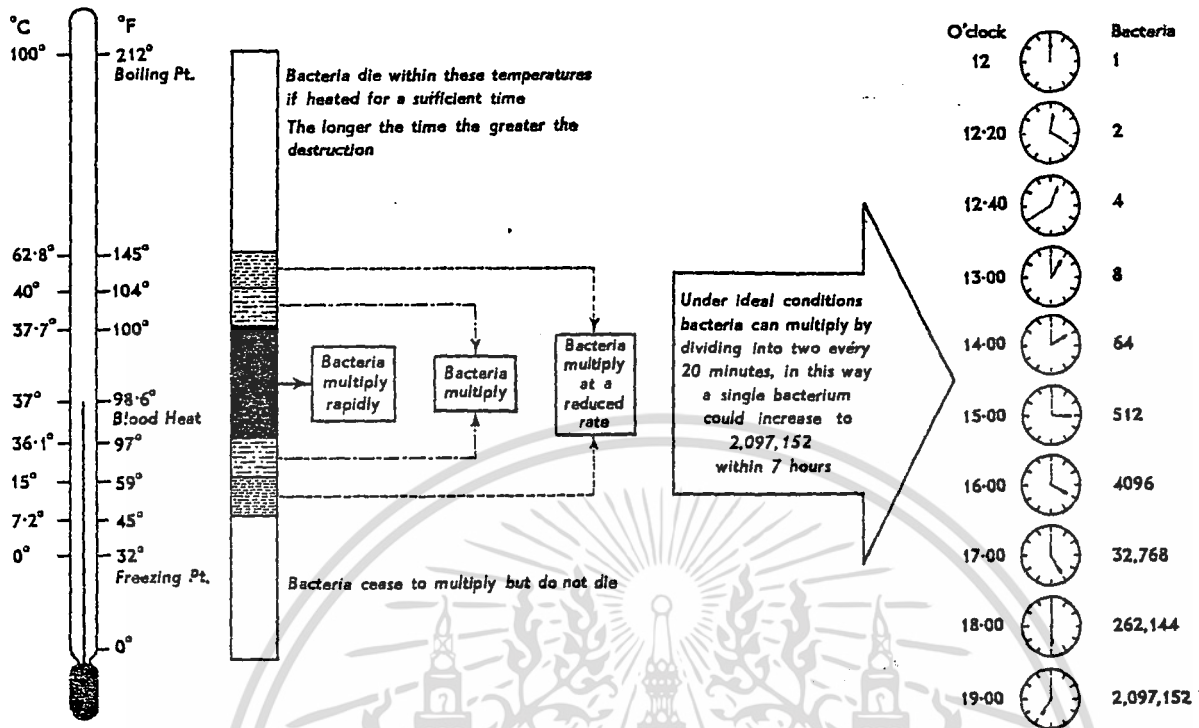
#### 2.1.2.4 อาหารที่จำเป็น

*S. aureus* นั้นต้องการอาหารบางอย่างที่อุดมสมบูรณ์ สารอนินทรีย์ที่ต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ กลีโคไลน ไทอามีน กรดนิโคตินิก รวมไปถึงกรดอะมิโนทั้ง 11 ชนิด (ไกลซีน เกลูตามีน ลิวซีน ทรีโอนีน ฟีนีลอลานีน ไทโรซีน เมไทโอนีน โพรลีน ฮิสทีดีน และ ฮีสติดีน) (Mah et al. 1967)

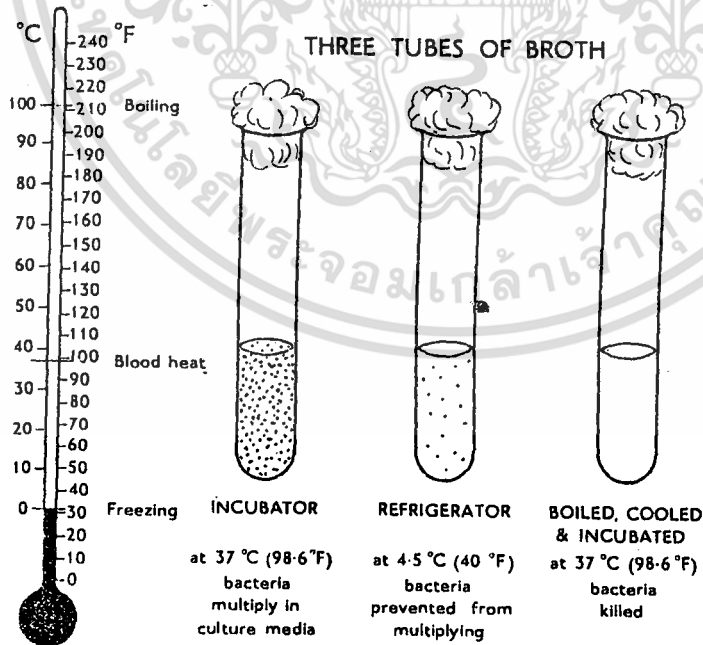
#### 2.1.2.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนโทโรทอกซินของ *S. aureus* นั้นมีค่าประมาณ 98°F (37°C) ที่ระดับอุณหภูมินี้ Lando et al. (1964) กล่าวว่าจะมีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนคือ 19 นาทีในอาหารที่มี NaCl อยู่ 0.5% ซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อนี้มีการเพิ่มจำนวนสูงสุดที่อุณหภูมิการบ่ม 98.6°F (37°C) โดยเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 59.9°F (15.5°C) 80.6°F (27°C) และ 113°F (45°C) สำหรับผลของอุณหภูมิที่มีต่อเซลล์แบคทีเรียนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.1 และ 2.2

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 แสดงผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย  
ที่มา : Adrian (1992)



ภาพที่ 2.2 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ที่มา : Adrian (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.2.6 Water Activity

*S. aureus* สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับ water activity ( $a_w$ ) ที่ต่ำกว่าหรือในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าแบคทีเรียทั่วไป ในสภาวะการใช้ภาคนั้นได้มีรายงานว่าอยู่ได้ที่ระดับ  $a_w$  0.999 ถึง 0.89 Scott (1953) รายงานว่าการเติบโตในสภาวะไร้อากาศจะสร้างเซลล์ได้จำนวนน้อยและอาจไม่ได้เกิดจากค่า  $a_w$  ที่ลดต่ำกว่า 0.90 เมื่อค่า  $a_w$  ลดต่ำกว่าระดับ 0.999 อาจเป็นสาเหตุให้การเจริญลดลงทั้งในแง่ของอัตราการเจริญและการผลิตเซลล์ Genigeorgis และ Sadler (1966C) รายงานว่า *S. aureus* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารเหลวที่ปราศจากเกลือและเป็นไปอย่างช้า ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl มากกว่า 6% Parfentjev และ Catelli (1964) รายงานว่า *S. aureus* จะเจริญใน ทริฟโตส ฟอสเฟต บรอก ที่อิมมัลชันด้วย NaCl ได้ Nunheimer และ Fabian (1940) พบว่า *S. aureus* จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในซูโครสเข้มข้น 50 ถึง 60% และกลูโคสเข้มข้น 35 ถึง 45% และมีการถกเถียงเกี่ยวกับระดับความเข้มข้นสูงสุดของเกลือที่ยอมให้เชื้อเจริญเติบโตได้ซึ่งสามารถอธิบายว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กัน (อย่างเช่น สารอาหาร pH และอุณหภูมิ เป็นต้น) ทั้งยังรวมถึงความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบด้วย

### 2.1.2.7 ค่าออกซิเดชัน - รีดักชัน

แม้ว่า *S. aureus* จะเป็นพวก facultative แต่ที่สภาวะการใช้ภาคนั้นจะมีอัตราและปริมาณการเจริญเติบโตรวมถึงการผลิตแอนโทโรทอกซินมากกว่าในสภาวะไร้อากาศ (Genigeorgis et al. 1969, 1971; Barber และ Deibel 1972)

### 2.1.2.8 พีเอช

พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. aureus* จะมีค่าประมาณ 7 (Landolo et al. 1964) สำหรับระดับพีเอชสูงสุดหรือต่ำสุดที่ยอมให้เจริญได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมหลายปัจจัยด้วยกัน อย่างเช่น ชนิดของอาหาร ชนิดของกรด การแข่งขัน ค่ารีดักชัน - ออกซิเดชัน และค่า water activity

### 2.1.2.9 ความชื้นสัมพัทธ์

ค่าความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อการอยู่รอดของ *S. aureus* โดย McDade และ Hall (1963A) พบว่าเชื้อ *S. aureus* จะสามารถรอดชีวิตได้เป็นส่วนใหญ่ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 95 ถึง 98% และมีการเพิ่มจำนวนในช่วงนี้ ซึ่งบางทีอาจเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่เหลือ ยิ่งไปกว่านั้นถ้าความชื้นสัมพัทธ์มีค่ามากเกินไปในช่วงนี้เชื่อว่าจะมีการตายเพิ่มขึ้นตามระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้น

### 2.1.3.10 ความร้อน

ปัจจัยนี้มีความสัมพันธ์กับเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกับปัจจัยอื่น ๆ *S. aureus* สามารถทนต่อความร้อนมากกว่าในระดับเฉลี่ยทั่วไป สิ่งนี้เป็นสาเหตุให้สามารถแบ่งเซลล์ได้มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3.11 สารเคมี

สารเคมีที่มีผลต่อ *S. aureus* มีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ สารปฏิชีวนะ ไนเตรทและไนไตรท์ รวมถึงยาฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น ซึ่งในที่นี้จะขอไม่กล่าวถึง

### 2.1.3 การแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ในการตรวจสอบอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococci* นั้นมีเหตุผลที่สำคัญคือ

- 1) เพื่อยืนยันว่า *Staphylococci* อาจจะเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ
- 2) เพื่อตัดสินว่า อาหารนั้น ๆ จะมีโอกาสเป็นแหล่งอาหารที่ทำให้เกิดพิษหรือไม่
- 3) เพื่อพิจารณาว่ามีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในอาหารภายหลังการแปรรูปหรือไม่

วิธีการที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่นำมาตรวจสอบ โดยเฉพาะถ้าอาหารนั้น ๆ ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือเกิดการปนเปื้อนขึ้นภายหลังการแปรรูป อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่อาหารนั้นเกิดการปนเปื้อนก่อนหน้าการแปรรูป จะมีผลทำให้เชื้อ *Staphylococci* อาจเกิดการบาดเจ็บได้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป และต้องการวิธีการที่แตกต่างออกไปในการจำแนก

ในการแยกเชื้อ *Staphylococci* ที่ให้ผลทดสอบเอนไซม์โคแอกกูเลสเป็นบวกนั้น จัดเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึง เนื่องจากโดยส่วนใหญ่เชื้อเหล่านี้มักจะเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของอาหาร ถึงแม้ว่าในบางครั้งเชื้อ *Staphylococci* ที่ให้ผลทดสอบเอนไซม์โคแอกกูเลสเป็นลบจะเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารบ้างก็ตาม

*Staphylococci* ที่เกิดการบาดเจ็บเนื่องจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมซึ่งอาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแปรรูปนั้น จะมีการเจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่อนับเพลทโดยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะอย่างเช่น Baird-Parker agar จากนั้นไป ในการตรวจสอบ *Staphylococci* ที่บาดเจ็บนั้นอาจมีความจำเป็นต้องปมเชื้อเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเสริม (enrichment media) อย่างเช่น Trypticase soy broth (TSB) ก่อนหน้าที่จะเทเชื้อเหล่านี้ไปบนอาหารจำเพาะ โดยวิธีการทั่วไปที่ได้รับการแนะนำในการแยกเชื้อ *Staphylococci* ที่บาดเจ็บ ได้แก่ การถ่ายอาหารเนื้อเดียวที่มีความเจือจาง 1:10 จำนวน 50 มิลลิลิตร ลงอาหาร TSB และปมที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารจำเพาะ

สามารถแยกเชื้อ *Staphylococci* ที่ให้ผลทดสอบโคแอกกูเลสเป็นบวกได้จากอาหารที่ไม่น่าจะจะมีเชื้อ *Staphylococci* ที่บาดเจ็บอยู่โดยวิธีการนับเพลทที่ระดับความเจือจางของอาหารต่าง ๆ กัน บนอาหารจำเพาะ Baird-Parker agar เป็นจำนวน 3 เพลท (0.4 0.3 และ 0.3 มิลลิลิตร) เมื่อเชื้อแทรกซึมไปทั่วเพลทแล้ว จะกลับเพลทและปมที่อุณหภูมิ 35 ถึง 37 °C เป็นเวลา 45 ถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งแต่ละเพลทจะมีโคโลนี 20 ถึง 200 โคโลนี และเลือกนับโคโลนีที่แสดงลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* ในกรณีที่มีโคโลนีแปลกปลอมเกิดขึ้นในขณะทดลอง ก็จะนับโคโลนีและบันทึกแยกกัน หลังจากนั้นจะเลือกโคโลนีอย่างน้อย 1 โคโลนีมาทดสอบ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์โคแอกูเลสและการทำงานของเอนไซม์ TNase บนพลททั้ง 3 พลท โดยรายงานผลเป็นจำนวน  
ของเชื้อ "*S. aureus*" ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์ที่นำมาตรวจสอบ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 ผลของการแช่แข็งต่อจุลินทรีย์

จากการศึกษาของ Marth (1973) พบว่า ขั้นตอนของการแช่แข็งจุลินทรีย์ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1. ช่วงแช่เย็นเซลล์ของจุลินทรีย์จนอุณหภูมิลดถึง 0 องศาเซลเซียส
2. ช่วงแช่เย็นต่อไปจนเกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นภายนอกเซลล์ และอาจมีการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้น

ภายในเซลล์ด้วย

3. การเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีอยู่ภายนอกและภายในเซลล์จุลินทรีย์
4. ช่วงของการเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ในสภาพแช่แข็ง
5. ช่วงของการละลายของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ตามปกติแล้ว การแช่แข็งจะมีผลต่อการลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่อยู่ในอาหาร ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของการทำลาย (lethal) และผลการทำลายบางส่วน (sublethal effect)

ในที่นี้จะกล่าวถึงผลของการแช่แข็งที่มีต่อจุลินทรีย์ โดยสามารถแบ่งออกเป็นผลของการเป็นน้ำแข็ง และผลของการละลายน้ำแข็ง

### 2.2.1 ผลของการแช่แข็ง

การแช่แข็งไม่เพียงแต่ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่มีผลทำให้จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเกิดการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วอีกด้วย เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำจะทำให้ค่า water activity ( $a_w$ ) ของน้ำแข็งลดต่ำลงก่อนที่อาหารจะแข็งตัวพร้อม ๆ กับอุณหภูมิที่ลดลง น้ำที่แข็งตัวจะมีค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.823 ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  และเท่ากับ 0.62 ที่อุณหภูมิ  $-50^{\circ}\text{C}$  (Scott, 1962) ดังนั้นทั้งยีสต์และราจะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแช่แข็งที่มีค่า  $a_w$  และระดับอุณหภูมิต่ำกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่า ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ทดลองการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดที่อุณหภูมิ  $-18^{\circ}\text{C}$  ถึง  $-34^{\circ}\text{C}$  และที่อุณหภูมิประมาณ  $-12^{\circ}\text{C}$  (Elliot และ Michener, 1965)

ในการแช่แข็งเซลล์แบคทีเรียอาจมีผลทำให้แบคทีเรียบางพวกเกิดการบาดเจ็บอย่างถาวร นอกนั้นจะสามารถซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายได้ เมื่อมีการนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมภายหลังจากการละลายแล้ว ส่วนแบคทีเรียบางพวกจะยังคงเป็นปกติ ในการแช่แข็งคาดว่าแบคทีเรียจะเกิดการตายและลดจำนวนลงสืบถึงหนึ่งร้อยเท่าของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น นอกจากนี้เซลล์บาดเจ็บอย่างรุนแรงและไม่รุนแรง (lethally and nonlethally injured cells) ของแบคทีเรียแช่แข็งจะแสดงลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนจากเซลล์ที่ยังไม่แช่แข็ง ข้อมูลต่อไปนี้จะใช้เป็นพื้นฐานในการแยกแยะเซลล์ที่ตายจากที่ยังรอดชีวิต และเซลล์ที่บาดเจ็บอย่างรุนแรงกับเซลล์บาดเจ็บไม่รุนแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.1.1 สูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวน

การไม่ประสบความสำเร็จของเซลล์แบคทีเรียในการสร้างโคโลนีบนอาหารวันนั้น จะใช้เป็นหลักในการวัดระดับของการบาดเจ็บ ไม่ว่าจะเป็นการล้มเหลวที่จะเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบหน้าที่หรือโครงสร้างเดี่ยวที่สำคัญ หรือผลกระทบจากโครงสร้างหรือหน้าที่ต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปก็ตาม ซึ่งจะใช้ในการตัดสินใจ และบางสมมุติฐานจะได้กล่าวถึงในภายหลัง

### 2.2.1.2 การรั่วของส่วนประกอบของเซลล์

หลังการแช่แข็งและการละลาย เซลล์แบคทีเรียจะสูญเสียส่วนประกอบโมเลกุลใหญ่และเล็ก อย่างเช่น โปรตีน กรดอะมิโน RNA DNA และเอ็นไซม์ในตัวกลางแขวนลอย การที่เซลล์จะตายหรืออยู่รอดนั้น เกี่ยวพันกับชนิดของสิ่งที่รั่วซึมมากกว่าปริมาณ

### 2.2.1.3 ความ (รู้สึก) ไว

มีการเพิ่มความไวต่อสาร surfactants และสารประกอบอื่น ๆ เช่น เกลือน้ำดี โลโซไซม์ เป็นต้น

### 2.2.1.4 ความต้องการสารอาหาร

มีความต้องการสารอาหารเพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์ที่ถูกทำลายไม่สามารถสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ทั้งหมด

### 2.2.1.5 การขยายของ lag phase

แบคทีเรียที่รอดตายจากการแช่แข็งนั้น สามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เหล่านี้มักจะมีการขยายช่วง lag phase ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากความต้องการเวลาในการซ่อมแซมความเสียหาย

### 2.2.1.6 การฉายรังสี

แบคทีเรียจะมีความไวต่อการทำลายของรังสีอุลตราไวโอเล็ตเพิ่มขึ้น เมื่อมีการแผ่กระจายรังสีในสภาวะแช่แข็ง ในทางตรงกันข้าม ความไวของเซลล์แบคทีเรียต่อรังสีกำลังสูงจะลดลงเมื่อเซลล์นั้นได้รับรังสีในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งรายละเอียดปลีกย่อยเกี่ยวกับเซลล์บาดเจ็บจะได้กล่าวถึงในหัวข้อต่อไป

ธรรมชาติของการบาดเจ็บเนื่องจากการแช่แข็งนั้นยังไม่เป็นที่รู้จักแน่ชัด เมื่อพิจารณาหน้าที่ของเซลล์และความเสถียรของยีนส์ จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในโครงสร้างของเซลล์ส่วนที่หยาบและละเอียด (Ray และ Speck, 1973) Mazur (1966) ได้กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวเคมีที่เกิดขึ้นในเซลล์และสิ่งแวดล้อมระหว่างการแช่แข็งและการละลาย

ในระหว่างการแช่แข็งอุณหภูมิของสารแขวนลอยแบคทีเรียจะลดต่ำกว่า  $0^{\circ}\text{C}$  ตัวกลางภายนอกจะเกิดการเย็นยิ่งยวด (supercooled) หลังจากนั้นจึงเริ่มสร้างผลึกน้ำแข็ง น้ำในเซลล์จะยังคงเกิดซูเปอร์คูลจนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ  $-10^{\circ}\text{C}$  ถึง  $-15^{\circ}\text{C}$  แต่ถ้าระดับอุณหภูมิสูงกว่านี้การเป็นน้ำแข็งจะเกิดในสิ่งแวดล้อมเท่านั้น เพื่อที่จะรักษาสมดุลระหว่างภายในและภายนอกของความดันไอน้ำ น้ำจะเริ่มเคลื่อนออกจากเซลล์และแข็งตัวที่ภายนอกเซลล์ (การระเหยน้ำออกจากเซลล์) และน้ำภายในเซลล์จะแข็งตัวในที่สุด ถ้าอัตราของการแช่เย็นต่ำหรือความสามารถในการซึมผ่านของเซลล์นั้นสูง เซลล์จะแข็งตัวโดยการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นที่ภายนอกเซลล์ การแช่แข็งอย่างรวดเร็วจะสร้างผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กภายในเซลล์ โดยผลึกน้ำแข็งเหล่านี้จะไม่เสถียร และมีแนวโน้มว่าจะขยายใหญ่เพิ่มขึ้น เมื่อได้เวลาของการตกผลึก เซลล์แบคทีเรียจะแข็งตัวโดยการสร้างน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ หรือโดยการระเหยน้ำออกจากเซลล์ การแช่แข็งจะเคลื่อนย้ายน้ำจากทั้งภายในและภายนอกสิ่งแวดล้อม ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในและภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น ผลึกน้ำแข็งจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตกผลึกอีกครั้ง สามารถที่จะทำให้ลายเซลล์เมมเบรนได้ สารอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้นสูง จะถูกสร้างขึ้นโดยการแช่แข็งและมีผลกระทบต่อชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรนโดยจะทำให้เกิดการรั่วได้ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์โมเลกุลใหญ่รวมทั้ง RNA DNA และโปรตีน ทำให้เกิดการเสียหาย ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงบางอย่างนี้อาจไม่สามารถกลับคืนได้

เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการค้นพบซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยทั้งเดี่ยวหรือหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกันซึ่งมีผลทำลายเซลล์แบคทีเรียแช่แข็ง ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ อุณหภูมิที่ลดลง การสร้างผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ การสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์ และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ เป็นต้น และยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า การบาดเจ็บนั้นเกิดขึ้นจากปัจจัยเดี่ยวดั้งเดิมหรือการรวมกันของหลาย ๆ ปัจจัย (Mazur, 1966) แต่เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีหลักฐานจากการทดลองซึ่งชี้ให้เห็นว่าการบาดเจ็บจากการแช่แข็งมีสาเหตุใหญ่มาจากการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ การเคลื่อนที่จากสารละลายความเข้มข้นต่ำไปยังสารละลายความเข้มข้นสูงกว่า (Ray และ Speck, 1973)

ได้มีการเสนอว่า การแช่แข็งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เมมเบรน ซึ่งต่อมากจะเกิดการแยกกันของพันธะไรโบโซมในเซลล์เมมเบรน เซลล์แช่แข็งจะสูญเสียเปปไทด์ที่มีความว่องไว (biologically active peptides) ซึ่งจะกลายเป็นสาเหตุของเมตาบอลิกและการบาดเจ็บอย่างรุนแรง (lethal injury) ได้ ในที่สุด (Ray และ Speck, 1973) ลักษณะเฉพาะของเซลล์แบคทีเรียและสภาวะแวดล้อมก่อนหน้าและระหว่างการแช่แข็งรวมทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์และสปีชีส์อาจมีผลต่อการบาดเจ็บ แบคทีเรียแกรมบวกดูเหมือนว่าจะมีความต้านทานมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่การแช่แข็งแทบจะไม่มีผลกระทบต่อสปอร์เลย ในการศึกษาเปรียบเทียบการเติบโตของเซลล์ที่ระดับเสถียรและเอ็กซ์โพรเนเรียล (stationary

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and exponential phase) พบว่าที่ระดับเอ็กซ์โปเนนเชียลแบคทีเรียจะมีความไวต่อผลการทำลายเนื่องจากการแช่แข็งมากกว่า (Jones และ Fabian, 1952) นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในช่วง logarithmic จะถูกทำลายด้วยอุณหภูมิของการแช่แข็งได้ง่ายกว่าแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในช่วงอื่นของการเจริญเติบโต (วราวุฒิ, 2538) ความหลากหลายของสภาวะการเติบโตก่อนหน้าการแช่แข็ง อย่างเช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระดับอุณหภูมิที่ใช้ปัม สภาวะการใช้อากาศ (aerobiosis) จะมีผลกระทบต่ออัตราการสนองของแบคทีเรียที่บาดเจ็บเนื่องจากการแช่แข็ง โดยปัจจัยหลักซึ่งมีผลกระทบต่ออัตราการบาดเจ็บ ได้แก่ การรวมอยู่ในตัวกลางแขวนลอยของโซเดียมคลอไรด์และเกลือชนิดอื่น ๆ ระดับพีเอชที่ต่ำ และจำนวนออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง เป็นต้น ทั้งนี้อุณหภูมิและอัตราการแช่แข็งจะเป็นตัวกำหนดว่าน้ำเซลล์จะแข็งตัวภายในหรือภายนอกเซลล์ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อระดับของการถูกทำลายจากการแช่แข็งได้ ทั้งอัตราการแช่แข็งที่เร็วและช้าล้วนแต่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ได้ทั้งสิ้น โดย วราวุฒิ (2538) กล่าวว่า การแช่แข็งในอัตราที่เร็วจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในระดับที่ต่ำกว่าเมื่อใช้การแช่แข็งในอัตราที่ช้ากว่า ทั้งนี้เนื่องจากการแช่แข็งในอัตราที่เร็วจะทำให้จุลินทรีย์ผ่านช่วงอุณหภูมิวิกฤต ซึ่งมีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ถ้ามีการแช่แข็งในอัตราที่เหมาะสมก็จะทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตรอดได้เป็นจำนวนมาก

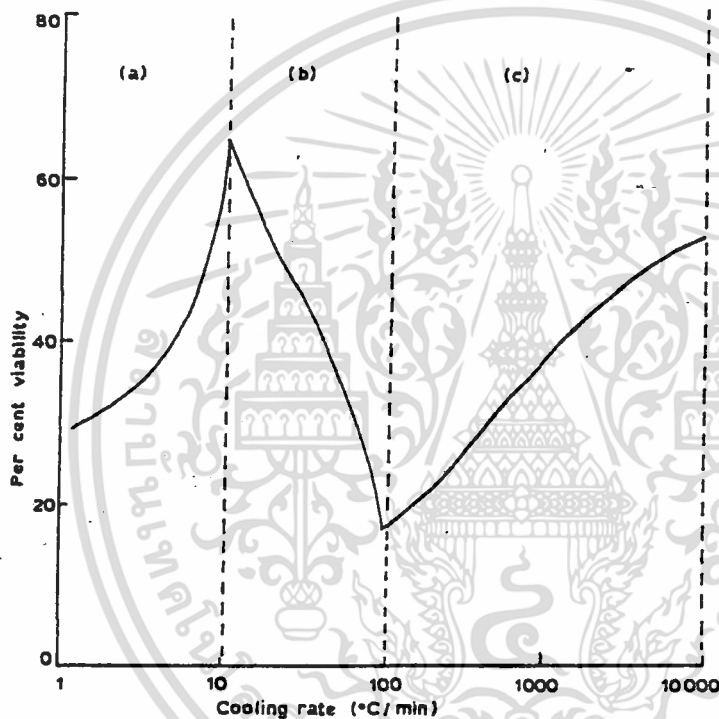
อย่างไรก็ตาม Farrell และ Rose (1967) ได้แสดงว่าอัตราการแช่แข็งที่เพิ่มขึ้นจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ด้วย (ดังภาพที่ 2.3 เส้นโค้ง a) โดยการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตนี้ อาจมีสาเหตุมาจากช่วงเวลาเวลาที่จุลินทรีย์ซึ่งมีความไวได้รับอันตรายจากตัวถูกละลายความเข้มข้นสูงในน้ำส่วนที่ยังไม่แข็งตัวลดน้อยลง และเมื่อการแช่แข็งมีความเร็วเพิ่มขึ้นต่อไป จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจะเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ซึ่งมีผลทำลายเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ (ดังเส้นโค้ง b) และเมื่ออัตราการแช่แข็งเพิ่มมากที่สุด ตัวอย่างเช่น ในกรณีของการใช้ไนโตรเจนเหลว การสร้างผลึกน้ำแข็งจะลดน้อยลงและถูกแทนที่ด้วยก้อนน้ำแข็ง (vitrification) (เส้นโค้ง c) โดยปกติ เมื่ออาหารถูกแช่แข็งในทางการค้านั้นแบคทีเรียที่รอดชีวิตจะอยู่ในช่วงของเส้นโค้ง a อย่างไรก็ตาม มีสารบางชนิด อย่างเช่น กลูโคส milk solids ไขมัน และโซเดียมกลูตาเมต ซึ่งเป็นที่รู้จักว่าสามารถช่วยป้องกันและพัฒนาความอยู่รอดของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งกลไกการป้องกันนั้นจะไม่กล่าวถึงในที่นี้

## 2.2.2 ผลของการเก็บรักษา

การตายของเซลล์แบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากปัจจัย 2 ประการ ปัจจัยแรก ได้แก่ การตกผลึกใหม่ (recrystallization) ของผลึกน้ำแข็งภายในขนาดเล็กที่ไม่เสถียร ซึ่งถูกสร้างขึ้นมากในระหว่างการแช่แข็งแบบเร็ว (rapid freezing) (เวลาแช่แข็งสั้น) อีกปัจจัยคือ การปล่อยไว้ในสารละลายความเข้มข้นสูงและในสารละลายของเซลล์ส่วนที่ยังไม่แข็งตัวเป็นระยะเวลานาน (Ray และ Speck, 1973) พฤติกรรมของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งจะแปรเปลี่ยนตามอายุของเซลล์ สารย่อยสลาย (monstuum) ของจุลินทรีย์ รวมถึงระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา จุลินทรีย์จะมีการตายเพิ่มขึ้นอีกในระหว่างการเก็บรักษา แต่อัตราการตายนั้นจะช้ากว่าในระหว่างการแช่แข็งมาก นอก

จากนี้พบว่าในระหว่างการเก็บรักษา ความชันของเส้นกราฟที่รอดชีวิตก่อนข้างจะราบเรียบ (Georgala และ Hurst, 1963) การลดต่ำและขึ้น ๆ ลง ๆ (fluctuates) ของอุณหภูมิ จะเป็นผลดีสำหรับการรอดชีวิตของ จุลินทรีย์ (Weiser, 1951; Georgala และ Hurst, 1963; Woodburn และ Strong, 1960; Haines, 1938)

ส่วนประกอบของอาหาร เช่น ไซโครส ซูโครส น้ำเชื่อมข้าวโพด ปลา กลิเซอรอล และเนื้อสกัด จะช่วย เพิ่มความสามารถในการอยู่รอดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียพวกที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ขณะที่มีการงาน ว่าในสภาวะความเป็นกรดจะมีผลลดจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลง (Georgala และ Hurst, 1963) และการเก็บ รักษาในออกซิเจนจะมีผลทำลายจุลินทรีย์มากกว่าเก็บในไนโตรเจน



ภาพที่ 2.3 แสดงผลของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

ที่มา : Farrell และ Rose (1967)

### 2.2.3 ผลของการละลาย

การละลายเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการแช่แข็งซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ การแช่แข็งและการละลายซ้ำจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียได้ และเป็นที่ยอมรับว่า การละลายอย่างรวดเร็วจะทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตได้เป็นจำนวนมาก ยิ่งไปกว่านั้น การละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็วจะช่วยลดจำนวนเกล็ดน้ำแข็งที่ตกผลึกใหม่ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการละลายน้ำแข็งได้มาก อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะการทดลอง การละลายอย่างช้า ๆ อาจมีส่วนสำคัญช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ได้ เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการเปิดเผยถึงผลการละลายต่อ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนจุลินทรีย์ในดินเชื่อว่า ขณะที่อุณหภูมิศูนย์กลางของดินเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึง  $-1^{\circ}\text{C}$  นั้นที่พื้นผิวส่วนนอกจะมีอุณหภูมิ  $10^{\circ}$  ถึง  $15^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 6 ถึง 24 ชั่วโมง ดังนั้นในช่วงเวลานี้จุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนที่พื้นผิวส่วนนอกก่อน (Roberts, 1974b) อย่างไรก็ตามการทำให้ดินอย่างรวดเร็วจึงมีผลในการทำลายแบคทีเรียบางชนิด (วรารุณี, 2538)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3 ลักษณะของเซลล์บาดเจ็บ

โดยทั่วไปเซลล์บาดเจ็บจะมีลักษณะต่าง ๆ ซึ่งแตกต่างไปจากเซลล์ปกติ (ดังตารางที่ 2.2) กล่าวคือ เซลล์บาดเจ็บจะสูญเสียคุณสมบัติในการต้านทานและมีความไวต่อสารเคมีต่าง ๆ มากขึ้น นอกจากนี้ยังสูญเสียส่วนประกอบของโมเลกุลเล็ก ๆ จำนวนมากให้แก่สิ่งแวดล้อม โดยการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เชื่อว่าทำให้เซลล์เสียความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ไป และยิ่งไปกว่านั้นเซลล์เหล่านี้จะสูญเสียคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนด้วย อย่างไรก็ตาม หลังจากได้รับการซ่อมแซมในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแล้วก็จะสามารถเพิ่มจำนวนได้อีกครั้งหนึ่ง โดยเซลล์บาดเจ็บจะมีช่วงระยะเวลาการพักตัว (lag period) ที่ยาวนานเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีผลในการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ต่าง ๆ ของส่วนประกอบของโมเลกุลใหญ่ (ดังตารางที่ 2.3)

ในระหว่างนี้จะเกิดการทำลายโครงสร้างส่วนผิวหน้า (lipopolysaccharides, LPS, ในแบคทีเรียแกรมลบและกรดไทโอโคอิด ในแบคทีเรียแกรมบวก) ขึ้น และมีรายงานว่าได้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นส่วนมากเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปที่ต่างกัน การทำลายโครงสร้างทั้ง 2 ส่วนนี้ ส่งผลให้จุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการซึมผ่านและมีความไวต่อสารประกอบต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดความล้มเหลวได้เมื่อต้องการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะของเซลล์บาดเจ็บที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปอาหารโดยวิธีต่าง ๆ

#### Characteristics

1. Increased sensitivity to :
  - a. Surface - active compounds
  - b. Salt and toxic chemicals
  - c. antibiotics
  - d. dyes
  - e. Acid and low pH
2. Loss of cellular materials
3. Longer lag phase
4. Inability to multiply (until repair)
5. Ability to repair injury in suitable environment

ที่มา : Ray (1979) 96916  
ไม่อาจรณิใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตารางที่ 2.3 ตำแหน่งที่ถูกทำลายในเซลล์แบคทีเรียเนื่องจากกระบวนการแปรรูป

#### Site

1. Surface structure
  - a. Outer membrane in gram - negative
  - b. Teichoic acid in gram - positive
2. Cytoplasmic membrane
3. Ribosomes
4. DNA
5. Certain enzymes

ที่มา : Ray (1979)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 วิธีการตรวจสอบและการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บ

### 2.4.1 ข้อเสนอทั่วไป

ระหว่างกระบวนการแปรรูป เก็บรักษา การขนส่งและการจัดการนั้น อาหารจะต้องผ่านขั้นตอนการแปรรูปทางกายภาพและทางเคมีหลาย ๆ วิธีด้วยกัน (ดังตารางที่ 2.4) โดยวิธีการเหล่านี้มีจุดมุ่งหมายหลักทางจุลชีววิทยาเพื่อเป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ปนเปื้อนอยู่ในส่วนประกอบต่างๆและในผลิตภัณฑ์ ทั้งยังเป็นการช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์สำเร็จ (finished products) ที่ได้

### ตารางที่ 2.4 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปและถนอมอาหาร

#### Physical

1. Low temperature: refrigeration, freezing
2. Heat (below sterilization) : pasteurization
3. Drying (low moisture): air drying, freeze drying
4. High solids: sugar, salt
5. Radiation

#### Chemical

1. Acids: inorganic, organic
2. Preservatives
3. Sanitizers (equipment)

ที่มา : Ray (1979)

ในส่วนของเซลล์ที่พบหลงเหลืออยู่ภายหลังกระบวนการแปรรูปนั้น ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และ รา จุลินทรีย์เหล่านี้จะคงอยู่ในสภาวะที่อ่อนแอหรือบาดเจ็บ จำนวนจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บจะมากน้อยเพียงใด นั้นขึ้นอยู่กับวิธีการแปรรูป สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารและปัจจัยอื่น ๆ โดยได้แก่ จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีสายพันธุ์ต่าง ๆ พวกที่ทำให้เกิดโรค พวกที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย รวมไปถึงยีสต์และราต่าง ๆ ซึ่งเป็นที่รู้จักว่าจะเกิดการบาดเจ็บจากกระบวนการที่รุนแรงได้ นอกจากนี้ เซลล์บาดเจ็บเหล่านี้ยังสามารถซ่อมแซมหรือฟื้นฟูตนเองได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นเราจึงควรศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารรวมทั้งผลกระทบจากกระบวนการแปรรูปอาหารด้วย เพื่อที่จะสามารถเลือกใช้วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อประโยชน์ด้านการค้า

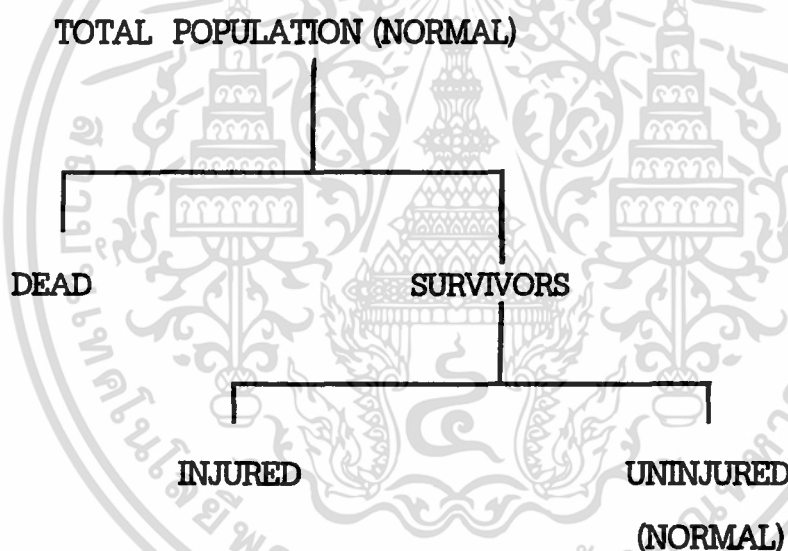
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไป อย่างไรก็ตาม วิธีการทั่วไปที่ใช้สำหรับตรวจนับจำนวนและแยกกลุ่มหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์จากอาหารนั้นไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบเซลล์บาดเจ็บได้ เนื่องจากวิธีเหล่านี้ได้ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ตรวจสอบเซลล์ปกติ นั่นคือตรวจได้เฉพาะเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บและยังอยู่รอดเท่านั้น ซึ่งไม่ได้หมายถึงเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด (ดังภาพที่ 2.4) ดังนั้นวิธีการเหล่านี้ยังไม่เพียงพอสำหรับการชี้ให้เห็นถึงคุณภาพทางด้านการสุขาภิบาลอาหาร รวมไปถึงการรับประกันความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ สิ่งที่ต้องตระหนักถึง ได้แก่

ก) เซลล์บาดเจ็บและเซลล์ปกติมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างไร และ ข) ทำไมเซลล์บาดเจ็บจึงไม่ถูกตรวจพบโดยอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ

การเรียนรู้ในสิ่งเหล่านี้จะชักนำไปสู่การตัดสินลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์บาดเจ็บโดยไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงกระบวนการแปรรูปและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์



ภาพที่ 2.4 แสดงผลของ sublethal treatment ต่อเซลล์จุลินทรีย์

ที่มา : Ray (1979)

#### 2.4.2 การรักษาและตรวจนับเซลล์บาดเจ็บ

โดยทั่วไป สารจำเพาะที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบและนับจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีหรือแยกจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคในอาหารนั้น จะมีผลยับยั้งการซ่อมแซมหรือฟื้นฟูของแบคทีเรียที่บาดเจ็บ ดังนั้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องรักษาเซลล์บาดเจ็บก่อนหน้าขั้นตอนของการนับจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะโดยวิธีการทั่วไป อย่างไรก็ตามวิธีการที่ช่วยส่งเสริมการรักษาเซลล์มากที่สุด มักจะมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งชั้นน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการแยก Staphylococci ที่มีอยู่ในอาหารชนิดต่าง ๆ นั้น จะเห็นว่าไม่มีวิธีการใดเฉพาะที่จะเป็นประโยชน์ได้ในทุกกรณี ดังนั้นจึงได้มีผู้พยายามหาวิธีการแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ ในที่สุดจึงได้พบว่าการรวมกันของอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective media) และ อาหารเลี้ยงเชื้อเสริม (enrichment media) นั้น จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ staphylococci ในขณะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ประจำถิ่นอื่น ๆ ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะเจริญได้ดีกว่า staphylococci ปัญหาหนึ่งที่พบในการแยกเซลล์ขนาดเล็กของ staphylococci คือ selective media ที่ใช้ในการนับปริมาณของ *S. aureus* โดยทั่วไปนั้นให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ (Gray et al., 1974; Collins Thompson et al., 1974) โดยเฉพาะในกรณีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10% ซึ่งเป็นส่วนประกอบตามปกติที่ใช้สำหรับยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ปนเปื้อนมากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

เมื่อหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานเกี่ยวกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ซึ่งพบว่า บางชนิดได้ถูกใช้อย่างเป็นทางการและแพร่หลาย (Bryam, 1976b) แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงเนื่องจากในปัจจุบันมีวิธีการที่น่าสนใจกว่านั้น

วิธีการจำแนกโดยหลอดทดลอง 3 หลอด นั้นจะใช้ trypticase soy broth กับโซเดียมคลอไรด์ 10% ซึ่งได้รับการยอมรับกันทั่วไปว่าเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการแยกเชื้อ staphylococci กลุ่มที่ให้ผลการทดสอบ coagulase เป็นบวกจำนวนมากออกจากอาหารชนิดต่าง ๆ (Insalata, 1973) แต่ได้มีการโต้ตอบวิธีการเหล่านี้ตามที่ทางราชการได้บันทึกไว้ โดยกล่าวแยกเหตุผล 2 ประการคือ

(1) ระยะเวลาที่ต้องการสำหรับการตรวจวิเคราะห์ และ (2) เซลล์ขนาดเล็กของ *S. aureus* ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10% ได้ จากการฟังเสียงนี้เอง Baer et al. (1975) ได้มีรายงานถึงการยอมรับวิธีการนับเพลทโดยตรงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird - Parker สำหรับวัตถุประสงค์ทั่วไป

ในกรณีที่ไม่พิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ขนาดเล็กเป็นสำคัญ หลักการของการตรวจนับจุลินทรีย์ที่ขนาดเล็ก สามารถกล่าวได้เป็นข้อ ๆ ดังนี้

1. เซลล์ที่ขนาดเล็กจะถูกรักษาให้หายได้อย่างรวดเร็ว ถ้าเซลล์ที่ขนาดเล็กนั้นไปปนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการรักษา (Repair medium) ที่เหมาะสม ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม

2. เมื่อกระบวนการรักษาเซลล์ที่ขนาดเล็กเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เซลล์ที่ได้รับการรักษาแล้วจะพร้อมที่จะเพิ่มจำนวนขึ้นได้ตามปกติ

3. เซลล์ที่ได้รับการรักษาแล้วจะสามารถเจริญบน Selective medium ซึ่งใช้ในการตรวจนับเซลล์ในสภาพปกติได้

4. สภาพที่ใช้ในการรักษาเซลล์ขนาดเล็กนั้น จะต้องไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งกัน (Competting organism) ของเซลล์ที่ขนาดเล็ก

นอกจากนี้แล้ว ระยะเวลาที่จำเป็นต่อการรักษาเซลล์ที่ขนาดเล็กนี้ จะต้องขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ คือ ชนิดของผลิตภัณฑ์อาหาร จำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และระดับหรือความรุนแรงของกระบวนการแปรรูปที่ใช้ที่มีผลต่อจุลินทรีย์นั้น เป็นต้น

ไม่อนุญาตให้นำเอกสารนี้ไปใช้เพื่อการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่เอกสารนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอสงวนลิขสิทธิ์ในเอกสารฉบับนี้  
สงวนลิขสิทธิ์ในเอกสารฉบับนี้

มีการนำวิธีการต่าง ๆ รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดมาใช้เพื่อตรวจนับ staphylococci ในอาหาร ได้แก่ วิธีการนับเพลทโดยใช้ Baird - Parker's Agar (BP) (Egg Yolk - Tellurite - Glycine-Pyruvate Agar) ซึ่งได้รับการแนะนำให้ใช้ในการระบุปริมาณเมื่อเซลล์มีจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 100 cells /g ของอาหารที่ตรวจ และในกรณีที่คาดว่าจะมีเซลล์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 cells/g นั้นวิธีที่ได้มีการแนะนำก็คือเทคนิค 3-tube most probable number (MPN) ใน Trypticase Soy Broth + 10% NaCl (TSBS) (U.S. Department of health, Education and Welfare และ the Food and Drug Administration, 1972) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่น ๆ ซึ่งได้รับความนิยมน้อยกว่าได้แก่ การนับเพลทของ Tellurite - Polymixin - Egg Yolk Agar (TPEY), Vogel Johnson's Agar (VG) (Thatcher and Clark, 1968) เป็นต้น

selective media เกือบทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจนับ staphylococci นั้นค่อนข้างจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกรณีเซลล์บาดเจ็บ เนื่องจากความเข้มข้นของไฮเดียมคลอไรด์ที่มากนั่นเอง ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของ staphylococci ที่บาดเจ็บ (DeWaart et al., 1968) อาหารวุ้น TPEY และ VJ จะประกอบด้วย tellurite เป็นจำนวนมาก ซึ่งได้มีรายงานว่าจะไปมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* ได้ (Chou and Marth, 1969; Marshall et al., 1965) Baer et al. (1971) หลังจากที่มีการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 เพลทซึ่งใช้สำหรับการจำแนกเชื้อ *S. aureus* จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ส่วนมากจะไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไข่แดง (egg yolk) นั้นโดยทั่วไปจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ staphylococci ได้น้อยกว่า แต่จะมีประสิทธิภาพลดลงในการจำกัดการเจริญของสปีชีส์อื่น ๆ

วิธีการที่ได้รับการยอมรับกันทั่วไปในปัจจุบันนั้น อาจจะเพียงพอต่อการนับจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ปกติในอาหารที่ผ่านการแปรรูป แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในการนับปริมาณเซลล์บาดเจ็บหรือเซลล์ที่ถูกรักษาแล้ว ซึ่งเมื่อได้รับการซ่อมแซมแล้วส่วนที่ถูกทำลายนั้นจะกลับมีความต้านทานต่อ selective compound ได้อีกครั้ง เซลล์สามารถที่จะซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายได้ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันนี้ สิ่งนี้เป็นการยากให้เห็นถึงส่วนประกอบที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีแต่กลับไม่ประสบความสำเร็จในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์บาดเจ็บ โดยทั่วไป อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะถูกจำแนกเป็น selective media (ทั้งอาหารวุ้นและอาหารเหลว) ซึ่งแตกต่างจาก non selective media ในด้านของสารประกอบเคมีจำเพาะที่มากกว่า สารประกอบเหล่านี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติที่มีการคัดเลือกพิเศษยอมให้จุลินทรีย์บางสายพันธุ์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ เซลล์ของสปีชีส์เหล่านี้จะมีความต้านทานต่อความเข้มข้นของสารประกอบในระดับที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของจุลินทรีย์ โดยสามารถแบ่งสารประกอบออกเป็น 5 กลุ่มคร่าว ๆ (ดังตารางที่ 2.5) คุณสมบัติในการต้านทานต่อสารประกอบเหล่านี้ของจุลินทรีย์ถือเป็นเรื่องสำคัญ เพราะเหตุว่าสารเคมีเหล่านี้ไม่สามารถที่จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้ กล่าวคือ สารประกอบเหล่านี้ จะช่วยป้องกันเซลล์และช่วยต้านทานแต่ในที่นี้จะไม่รวมถึงจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความไว โครงสร้างส่วนผิวหน้า (LPS ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และกรดโทโอโคอิกในแบคทีเรียแกรมบวก) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม ทั้งสองส่วนนี้ช่วยควบคุมความสามารถในการซึมผ่านของจุลินทรีย์ในเซลล์ปกติ (Costerton และ Ingram, 1974; Mossel และ Corry, 1977) อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์บาดเจ็บแล้วเยื่อซึมผ่านเหล่านี้จะอ่อนแอลง ซึ่งเกิดจากการกระบวนการแปรรูปที่มีผลทำลายโครงสร้างส่วนผิวหน้าและเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม ดังนั้นเซลล์บาดเจ็บจึงไม่สามารถป้องกันเซลล์จากการเข้าสู่เซลล์ของสารเคมีจำเพาะได้ และเซลล์จะมีความไวเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่สามารถซ่อมแซมตนเองในสิ่งแวดล้อมจำเพาะได้ เซลล์บาดเจ็บจึงไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน และไม่สามารถตรวจพบได้ทั้งในอาหารวุ้นจำเพาะ (selective agar) หรืออาหารเหลว (Hill, 1967; Maxcy, 1970; Stersky และ Hedrick, 1972; Roth และคณะ, 1973; Gabis และ Silliker, 1974; Klein และ Wu, 1974; Stiles และ Clark, 1974; Mossel และ Corry, 1977)

อย่างไรก็ตาม เซลล์บาดเจ็บยังสามารถซ่อมแซมและเพิ่มจำนวนได้ใน nonselective media ลักษณะเช่นนี้ นั่นคือ เซลล์บาดเจ็บสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน nonselective media แต่ไม่เพิ่มจำนวนใน selective media ซึ่งสิ่งนี้จะใช้เพื่อตัดสินเปอร์เซ็นต์ของเซลล์บาดเจ็บและเซลล์ปกติ ท่ามกลางเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ การศึกษานี้จะชี้ให้เห็นถึงจำนวนของเซลล์บาดเจ็บซึ่งแปรเปลี่ยนไปตามกระบวนการแปรรูป รวมทั้งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และ selective medium ที่ใช้ จากข้อมูลในตารางที่ 2.6 ได้แสดงถึงประชากรที่รอดชีวิตประมาณ 56 ถึง 95% ซึ่งเป็นเซลล์บาดเจ็บและไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อใช้วิธีการตรวจนับในอาหารวุ้นจำเพาะสำหรับสายพันธุ์ต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมดจะสร้างโคโลนีบนอาหารวุ้นไม่จำเพาะ (nonselective agar) ได้ เพื่อเป็นการคาดคะเนจำนวนของเซลล์บาดเจ็บที่ไม่สามารถตรวจพบได้โดยอาหารเหลวจำเพาะต่าง ๆ ซึ่งมีกรอกแบบการทดลองให้ต่างกันเล็กน้อย หลังจากผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วเซลล์ที่รอดชีวิตจะถูกนับจำนวนโดยวิธีการนับเพลทบนอาหารวุ้นไม่จำเพาะ สารละลายเซลล์จะถูกปล่อยทิ้งไว้ในอาหารเหลวจำเพาะเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการเจือจางที่จำเป็นแล้ว เซลล์จะถูกนับอีกครั้งในอาหารไม่จำเพาะชนิดเดียวกัน ปริมาณที่นับได้ก่อนหน้าและภายหลังการปล่อยทิ้งไว้ในอาหารเหลวจำเพาะจะแตกต่างกันและใช้เป็นตัวกำหนดจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ ผลที่ได้จะชี้ให้เห็นว่า หลังจากการปล่อยทิ้งไว้เพียง 5 นาทีในอาหารเหลวจำเพาะ เซลล์ที่รอดชีวิตจำนวน 25 ถึง 85% จะไม่สามารถถูกตรวจพบได้ต่อมาในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ (nonselective media) และยังมีข้อเสนอแนะว่าการปล่อยเซลล์ทิ้งไว้ในสิ่งแวดล้อมจำเพาะ เซลล์บาดเจ็บจะสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนไปในสิ่งแวดล้อมไม่จำเพาะ สิ่งนี้อาจเป็นสาเหตุสู่การตายของเซลล์

การบาดเจ็บเนื่องจาก sublethal treatment นั้นสามารถหายได้เมื่อได้รับการซ่อมแซมในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอย่างเช่นในอาหารวุ้นหรืออาหารเหลวไม่จำเพาะ (nonselective agar or broth medium)

**ตารางที่ 2.5** แสดงสารประกอบจำเพาะบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็งและเหลว

Surface active compounds

Bile salts, deoxycholate, laury sulfate, teepol

Salt and toxic chemicals

NaCl, LiCl, bismuth, selenite, iodine, azide, tellurite

Antibiotics

Cycloserine, polymyxin

Dye

Brilliant green, eosine

Acid

Tartaric acid, acetic acid

ที่มา : Ray (1979)

**ตารางที่ 2.6** ผลของอาหารแข็งจำเพาะในการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียที่บดเจ็บ

Organism	Treatment <sup>a</sup>	Selective media <sup>b</sup> (s)	%Undetected
<i>Escherichia coli</i>	Freezing	VRBA	90
	Heating	VRBA	56
	Acid treatment	VRBA	83
<i>Salmonella sp.</i>	Freezing	XLDA	90
	Freez-drying	XLDA	95
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Freezing	TCBS	80
	Refrigeration	TCBS	67
<i>Staphylococcus aureus</i>	Freezing	MSA	67
	Heating	MSA	59
<i>Streptococcus fecalis</i>	Freezing	KFA	88
	Heating	KFA	95

ที่มา : Ray (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.3 ข้อควรคำนึงในการตรวจนับเซลล์บาดเจ็บ

หลักสำคัญซึ่งควรพิจารณาเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเซลล์บาดเจ็บ สามารถสรุปได้ดังนี้

- เซลล์บาดเจ็บจะกลายเป็นเซลล์ที่มีความไวต่อสารประกอบจำเพาะ ( selective compounds ) ต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วขณะหนึ่ง
  - ความไวนี้จะมีการขยายออกไป อันเป็นผลเนื่องมาจากการทำลายเยื่อซีมผ่านในโครงสร้างส่วนผิวหน้า และ เยื่อหุ้มไซโตพลาสติคของเซลล์
  - การบาดเจ็บสามารถรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะที่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเติม เมื่อเซลล์ได้รับการซ่อมแซมแล้วจะมีความต้านทานต่อสารจำเพาะและสามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้
  - เซลล์บาดเจ็บจะไม่มีการซ่อมแซมหรือเพิ่มจำนวนเมื่อเลี้ยงในสารประกอบจำเพาะ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้มีความเข้มข้นสูงจนเกินไป หรือเซลล์นั้นถูกกระทบอย่างรุนแรงในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารจำเพาะที่มีต่อแบคทีเรียที่บาดเจ็บโดยตรง
  - สามารถตรวจนับจำนวนหรือแยกเซลล์บาดเจ็บได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ( selective media) ถ้าทิ้งไว้ให้ได้รับการรักษาในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก่อนจะปล่อยทิ้งไว้ใน selective environment
  - ในส่วนของประชากรที่อยู่รอดซึ่งประกอบด้วยเซลล์ปกติและเซลล์บาดเจ็บนั้น เซลล์บาดเจ็บจะมีความแตกต่างในส่วนของท่าน้ำที่ถูกทำลายเท่า ๆ กับระดับของการทำลาย ณ ตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องการเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกันสำหรับการซ่อมแซม ภายใต้สภาวะเดียวกัน เซลล์ปกติอาจจะมีการเพิ่มจำนวนเป็นระยะเวลานานก่อนหน้าเซลล์บาดเจ็บ โดยสามารถเพิ่มจำนวนที่นับได้ ในสภาวะการซ่อมแซมนั้นควรจะมีการเพิ่มจำนวน (ที่นับได้) โดยวิธี selective enumeration ซึ่งเป็นเพียงแต่การซ่อมแซมเซลล์เท่านั้นไม่ได้รวมถึงการเพิ่มจำนวน
  - ในระหว่างการรักษาเซลล์บาดเจ็บ อาจเกิดปัญหาเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่ออาหารที่ใช้ในการรักษาเป็นอาหารเหลว เพราะถ้าจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บนั้นสามารถเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการรักษา จะส่งผลทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ดังกล่าวภายหลังจากการตรวจนับมีค่าสูงกว่าปกติได้

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

###### 3.1.1 เครื่องมือในการทำไอศกรีม

1. เครื่องปั่นไอศกรีม
2. กาละมัง
3. ที่พตี
4. ผ้าขาวบาง
5. ถ้วยไอศกรีม

###### 3.1.2 ส่วนผสมไอศกรีม

1. มะพร้าวชูดขาว 1 กก.
2. น้ำ 5 ถ้วย
3. น้ำตาลทราย 1 1/2 ถ้วย

##### 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. slant PCA หลอดละ 3 ml
2. NaCl 0.85 % ขวดละ 225 ml
3. NaCl 0.85 % หลอดละ 9 ml
4. Trypticase soy broth (0.5% NaCl TSB) หลอดละ 10 ml
5. Trypticase soy broth (0.5% NaCl TSB) หลอดละ 9 ml
6. 10 % NaCl Trypticase soy broth (10% NaCl TSB) หลอดละ 9 ml
7. Mannitol salt egg yolk agar
8. Plate count agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจทางจุลชีววิทยา

1. Petri dish
2. Pipette ขนาด 1 ml
3. Micropipette
4. ลูกยาง
5. อ่างล้าง pipette
6. ตะเกียง alcohol
6. Loop
7. Autoclave
8. ตู้ปมเชื้อ (Incubator)
9. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminarflow)

### 3.4 วิธีการผลิตไอศกรีม

1. นำมะพร้าวมาคั้นจนได้น้ำกะทิประมาณ 15 ถ้วยตวง
2. นำมากรองแล้วต้มให้เดือดจึงเติมน้ำตาลทรายจนละลายได้ที่
3. นำไปทำให้เย็นอย่างรวดเร็วแล้วกรองอีกครั้ง
4. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น
5. บรรจุใส่ภาชนะแล้วเก็บในตู้แช่

### 3.5 วิธีการทดลอง

#### 3.5.1 การเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* เพื่อนำมาใส่ในไอศกรีม

1. ใช้ลูป (loop) ลงไฟทิ้งไว้สักครู่เขี่ยเชื้อ *S. aureus* แล้วนำมา streak ลงบนผิว slant PCA โดย streak ให้ได้พื้นที่เต็มมากที่สุด
2. นำไปปมที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.
3. ใส่ 0.85% NaCl ลงไป 1 ml แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ขึ้นให้หลุดออก
4. ใช้ Micropipette ตูดมา 0.1 ml ใส่ใน 0.5% NaCl TSB 10 ml
5. นำไปปมที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. จะได้เชื้อที่มีปริมาณ  $10^8$  cell/1ml แล้วจึงเจือจางให้เหลือ  $10^5$  cell/1ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำ Micropipette ดูดมา 0.2 ml ใส่ในถ้วยซึ่งมีไอศกรีมอยู่ 25 กรัม พอดี
7. นำไปเก็บในตู้แช่แข็ง เพื่อทำการทดลองต่อไป

### 3.5.2 การหาความคงทนและเซลล์ขาดเจ็บของเชื้อ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิสด

1. นำไอศกรีม 25 กรัม ใส่ใน 0.85% NaCl 225 ml ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ความเจือจาง 1:10
2. เจือจางให้เป็น 1:100 และ 1:1000 ด้วย 0.85% NaCl 9 ml
3. ดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางมาใส่ในหลอด 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB ระดับความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 ml
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.
5. นำมา streak ลงบน MS-EY agar โดยในแต่ละจานเพาะเชื้อจะแบ่งออกเป็น 3 ช่อง ซึ่งทำให้ streak ได้ระดับความเจือจางละ 1 จานพอดี
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.
7. ตรวจสอบโดยดูลักษณะโคโลนีเฉพาะที่มีสีเหลืองมีตะกอนขาวห่อรอบ ๆ โคโลนี นำโคโลนีที่สงสัยว่ามีเชื้อ *S. aureus* ไปทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase
8. รายงานผลจำนวนช่องที่ให้ผล coagulase positive *S. aureus* ในแต่ละระดับความเจือจาง เทียบกับตาราง MPN
9. ทำการทดลองหาเชื้อ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิสดที่ผลิตในวันเริ่มต้น หลังจากแช่แข็งผ่านไป 2 วัน, 4 วัน, 6 วัน และ 8 วัน

### 3.5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ของ *S. aureus*

1. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อขนาดเล็กหลอดละ 0.3 ml
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* เพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดที่มี BHI broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.
3. ดูด rabbit plasma ปริมาตร 0.3 ml ลงในหลอดเพาะเชื้อ BHI broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 4-6 ชม.
4. อ่านผล โดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องมาจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไอศกรีมกะทิสดหลังการผลิต

หลังจากการผลิตไอศกรีมกะทิสดแล้ว จะนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นการตรวจว่าพบหรือไม่และถ้าพบจะมีปริมาณเท่าใด ดังผลที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการตรวจเชื้อ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิสดหลังการผลิต

ชุดที่	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนช่องที่เกิดมลภาวะที่ระดับความเจือจาง			MPN
		1:10	1:100	1:1000	
1,2	0.5% NaCl TSB	+++	++-	---	95
	10% NaCl TSB	+++	---	---	25
3,4	0.5% NaCl TSB	---	---	---	0
	10% NaCl TSB	---	---	---	0

#### หมายเหตุ

1. การทดลองนี้จะแบ่งเป็น 4 ชุด โดยที่ ชุดที่ 1 และ 2 จะทดลองพร้อมกัน ชุดที่ 3 และ 4 จะทดลองพร้อมกัน ดังนั้นผลการทดลองของไอศกรีมหลังผลิตเสร็จของชุดที่ 1 และ 2 , 3 และ 4 จึงเป็นผลการทดลองเดียวกัน ส่วนไอศกรีมกะทิสดที่ใส่เชื้อ *S. aureus* จะทดลองแต่ละชุดโดยใส่เชื้อ *S. aureus* ต่างชุดกัน

2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยหาค่า MPN นี้ เป็นการคาดคะเนจำนวนมากที่สุดของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจจะมีได้ในตัวอย่างอาหารโดยใช้หลักการทางสถิติ

จากผลการตรวจวิเคราะห์นี้ทำให้ได้ทราบว่า ไอศกรีมที่ผลิตได้ในชุด ที่ 1 และ 2 นั้นปรากฏว่ายังมีเชื้อ *S. aureus* หลงเหลืออยู่บ้างซึ่งอาจมีผลต่อการทดลองในขั้นตอนต่อไปได้ (ขั้นตอนการหาความคงทนและเซลล์ขาดชีพของ *S. aureus* )และถ้าพิจารณาในแง่ของสุขลักษณะในการผลิตแล้วจะเห็นว่ายังไม่ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ กล่าวคือยังมีเชื้อจุลินทรีย์หลงเหลือแม้จะเป็นปริมาณที่น้อยก็ตาม ดังนั้นเราควรคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นสำคัญ ซึ่งควรจะต้องมีการพัฒนาขั้นตอนต่อไป

จากผลการตรวจสอบในไอศกรีมชุดที่ 3 และ 4 นั้น ไม่ปรากฏว่าพบเชื้อดังกล่าว ซึ่งแสดงว่าขั้นตอนในการผลิตมีการสุขาภิบาลที่ดีและมีประสิทธิภาพกว่าการผลิตในครั้งที่ 1 และ 2

#### 4.2 การหาความคงทนและเสถียรภาพของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ขั้นตอนนี้จะนำไอศกรีมที่ผลิตได้มาทดลองตามวิธีการที่ได้กล่าวถึงแล้วในบทที่ 3 ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองและการคำนวณจะแสดงไว้ดังตารางที่ 4.2, 4.3, 4.4 และ 4.5

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า MPN ของเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงใน 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB เมื่อผ่านการแช่แข็งที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จำนวนวันที่แช่แข็ง	ระดับความเจือจาง	จำนวนช่องที่เกิดผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อ							
		0.5% NaCl TSB				10% NaCl TSB			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0 (เริ่มต้น)	1:10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1:100	+++	+++	+++	+++	++-	+++	+++	+++
	1:1000	+++	+++	+++	+++	+--	+--	---	---
		>1100	>1100	>1100	>1100	160	1100	240	240
2	1:10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1:100	+++	+++	+++	+++	+++	++-	++-	+++
	1:1000	+++	+++	+++	+++	---	---	---	+--
		>1100	>1100	>1100	>1100	240	93	93	460
4	1:10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1:100	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	+++
	1:1000	+++	+++	+++	+--	---	+--	+--	---
		>1100	>1100	>1100	460	23	460	460	240
6	1:10	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
	1:100	+++	+++	+++	++	+++	++-	+++	+++
	1:1000	+++	+++	+++	+--	---	---	+--	---
		>1100	>1100	>1100	1100	240	93	460	240
8	1:10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1:100	+++	+++	+++	+++	+++	+--	+++	+++
	1:1000	+++	+++	+++	+--	+--	+--	---	---
		>1100	>1100	>1100	1100	460	75	240	240

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** ตารางแสดงค่า MPN เฉลี่ย ของเชื้อ *S. aureus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร 0.5% NaCl TSB โดยเปรียบเทียบกับ 10% NaCl TSB ที่ระยะเวลาแช่แข็งต่าง ๆ กัน

จำนวนวันที่แช่แข็ง	MPN เฉลี่ย ในอาหาร	
	0.5% NaCl TSB	10% NaCl TSB
0 (เริ่มต้น)	>1100	432.5
2	>1100	221.5
4	>1100	295.75
6	>1100	258.25
8	>1100	253.75

**ตารางที่ 4.4** การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอาหาร 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB

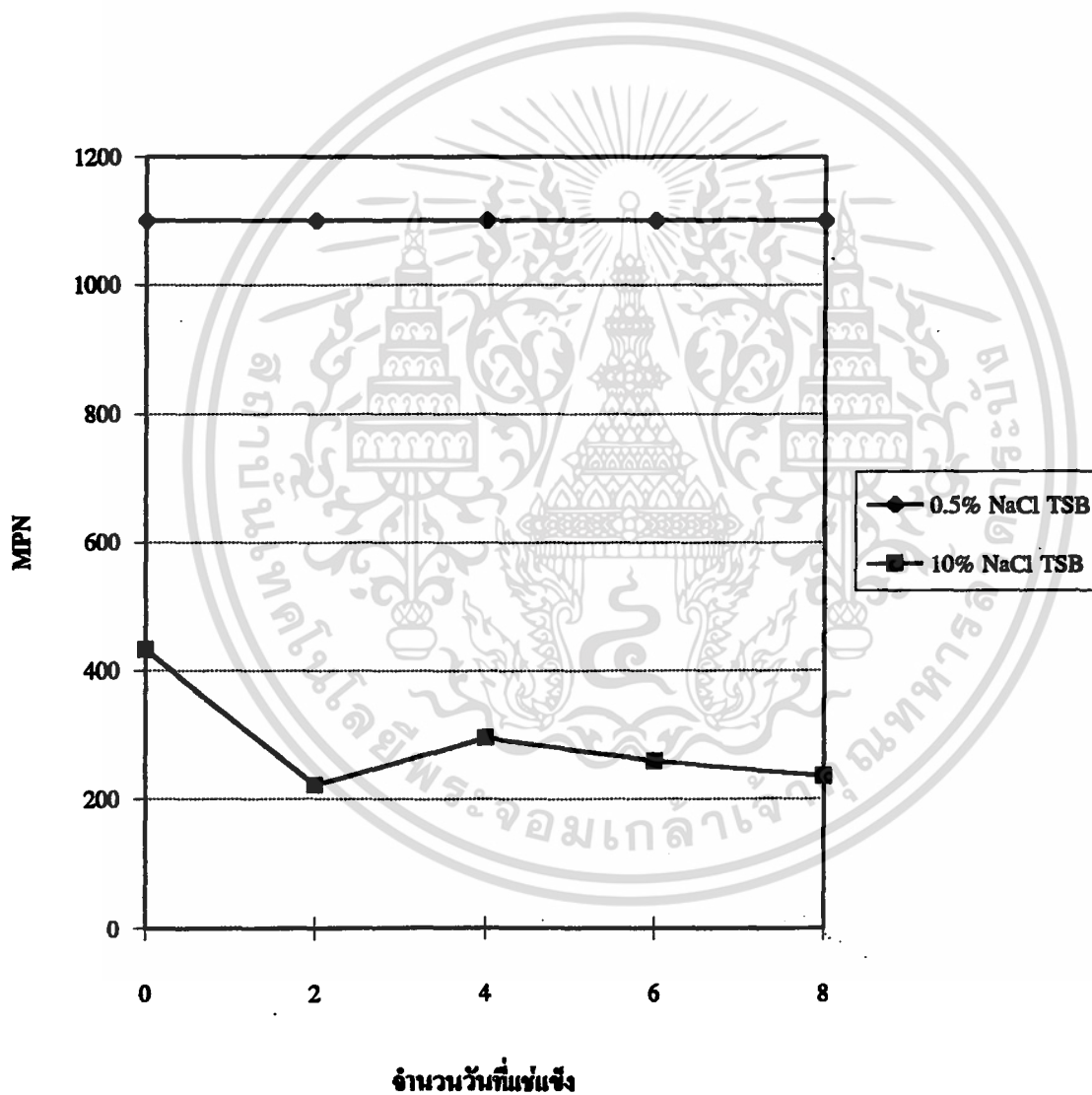
Variable	Mean	d.f	Standard Deviation	Standard Error	t Value	t table
0.5% NaCl TSB	1100.0000					
10% NaCl TSB	292.3500	4	82.653	36.964	21.85**	4.604

จากตารางพบว่า  $t_{\text{value}} > t_{\text{table}}$  แสดงว่า ระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

**ตารางที่ 4.5** แสดง % Injured cells ของเชื้อ *S. aureus* เมื่อแช่แข็งโศกกริมกะทิสต์เป็นเวลาที่ต่าง ๆ

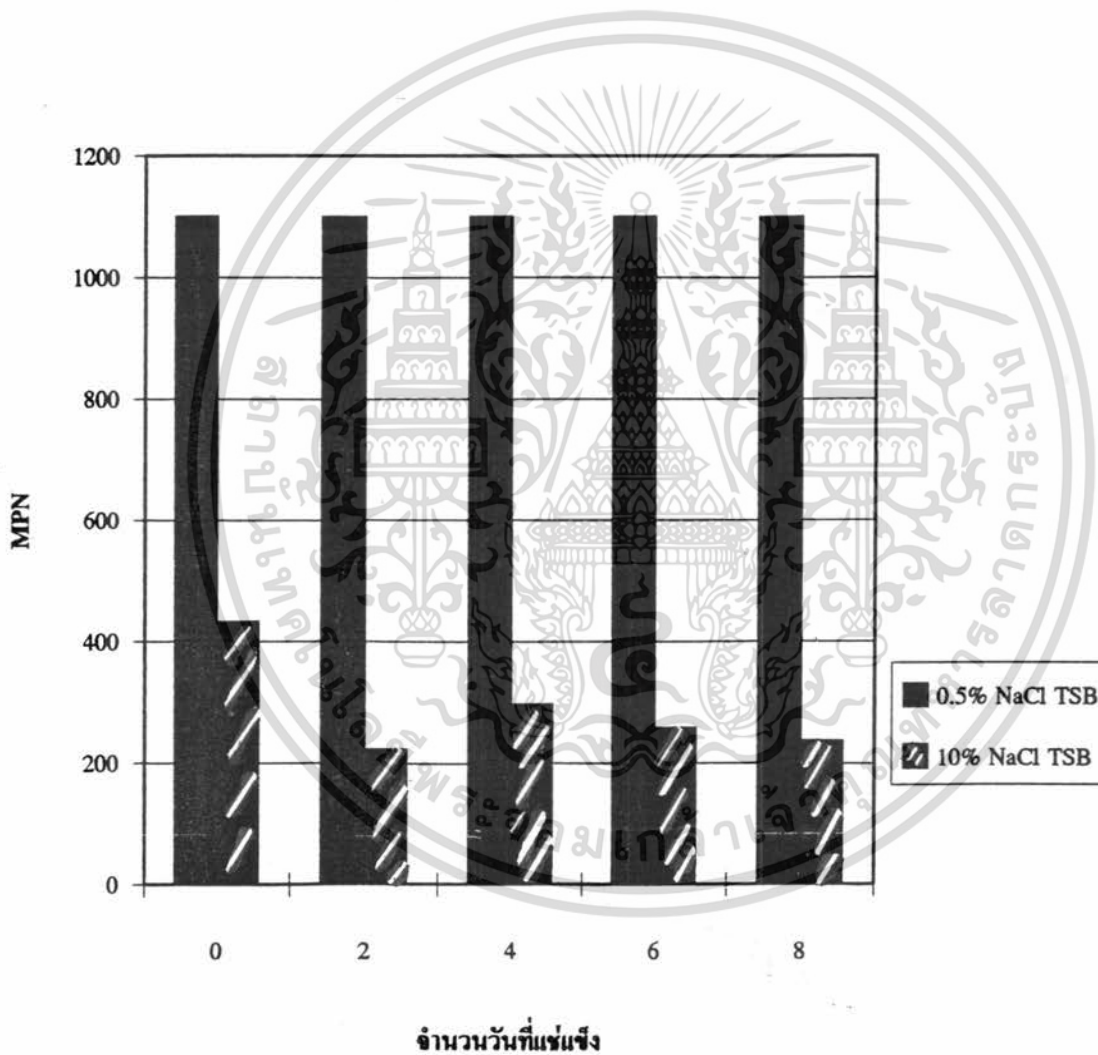
จำนวนวันที่แช่แข็ง	% Injured cells
0 (เริ่มต้น)	> 60.68
2	> 79.86
4	> 73.11
6	> 76.52
8	> 76.93

**ภาพที่ 4.1** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า MPN ของ *Staphylococcus aureus* กับจำนวนวันที่แช่แข็งเมื่อเลี้ยงในอาหาร 0.5% NaCl TSB และ 10% NaCl TSB

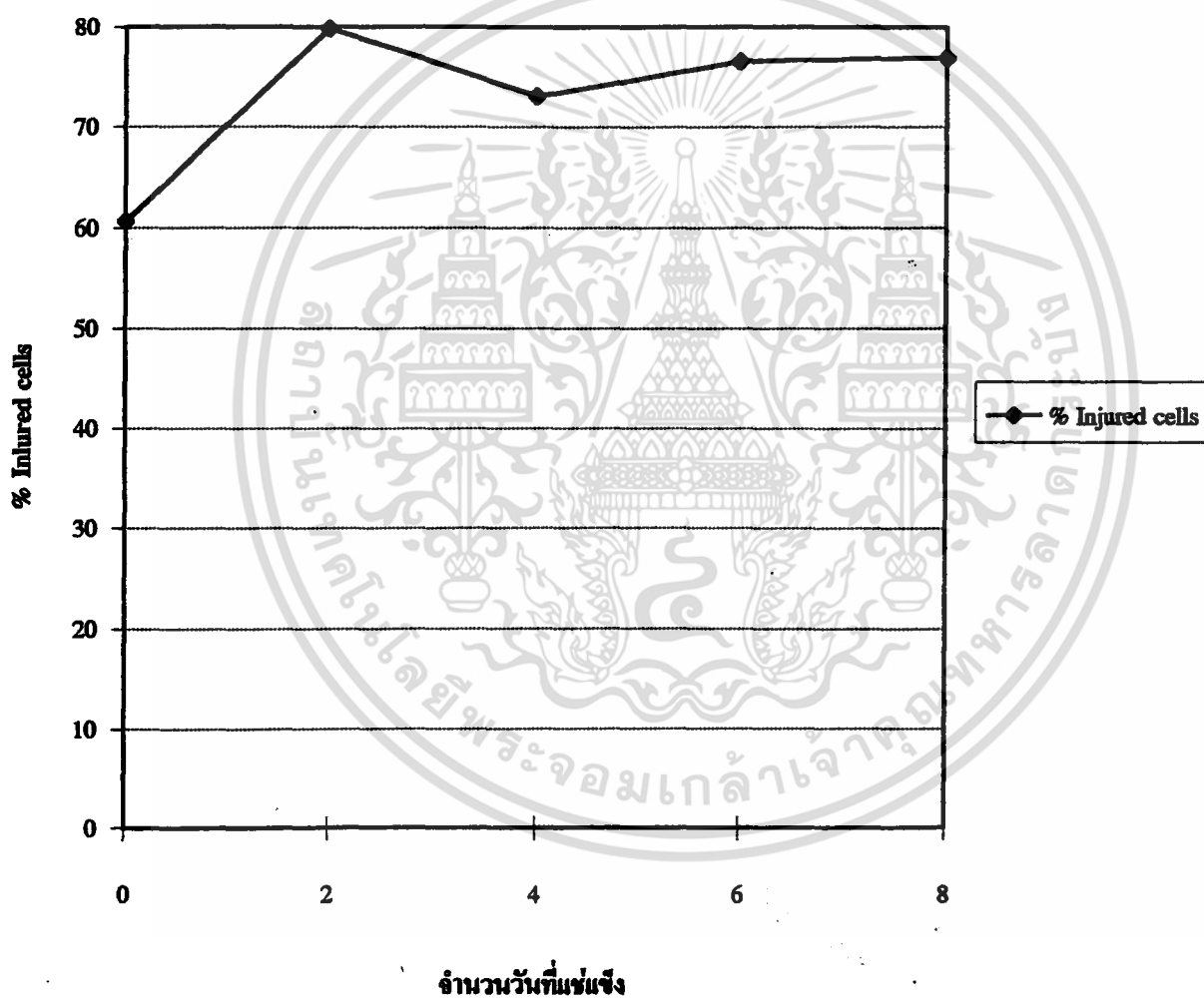


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงค่า MPN ของ *Staphylococcus aureus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร 0.5% NaCl TSB เปรียบเทียบกับอาหาร 10% NaCl TSB ที่ระยะเวลาแช่แข็งต่าง ๆ กัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดง %Injured cells ของ *Staphylococcus aureus* ที่ระยะเวลาแช่แข็งต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 0.5% NaCl TSB และ TSB +10% NaCl นั้น ผลปรากฏว่าค่า MPN ที่ได้จาก TSB ที่มีเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีจำนวนน้อยกว่าที่มีอยู่ 0.5% และเมื่อนำผลที่ได้มาทดสอบทางสถิติพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้ มีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ดังตารางที่ 4.4) และเมื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์บาดเจ็บ (%injured cells) ผลดังตารางที่ 4.5 จะพบว่า % เซลล์บาดเจ็บ ที่ได้ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการแช่แข็ง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากผลของการแช่แข็งที่มีต่อการบาดเจ็บของจุลินทรีย์

อย่างไรก็ตาม ในการตรวจนับเซลล์บาดเจ็บของจุลินทรีย์ เนื่องจากอุณหภูมิต่ำ จำเป็นจะต้องพิจารณาถึงสิ่งต่าง ๆ ได้แก่ มาตรฐานของอาหารแต่ละชนิด วิธีการที่เพียงพอในการตรวจนับความเป็นโรคของเซลล์บาดเจ็บ และการสรุปจำนวนของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตในอาหารแช่แข็ง

ในส่วนของการประเมินแรกเมื่อพิจารณาตามมาตรฐานไอศกรีมแล้ว ปรากฏว่า ไอศกรีมที่ผลิตเองนี้ได้มาตรฐานและมีความสะอาดเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค คือตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* รวมไปถึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นั้นย่อมแสดงว่าจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งนั้นมีน้อยมากหรือไม่เลย และเมื่อพิจารณาถึงวิธีการที่ใช้ในการตรวจนับนั้น จะเห็นว่าแม้การทดลองนี้จะมีการใช้วิธีการตามมาตรฐานคือ ใช้ TSB + 10% NaCl ก็ตามแต่ปัญหาหนึ่งที่พบนั่นคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเกลือสิบเปอร์เซ็นต์นั้น จะให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจาก เซลล์บาดเจ็บของ *S. aureus* นั้น อาจไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือสิบเปอร์เซ็นต์ได้ แม้ว่าเกลือที่เติมนี้จะมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่นก็ตาม

ช่วงระยะเวลาการบ่มใน TSB ซึ่งถือว่าเป็นช่วงของการเสริมอาหารแก่เซลล์บาดเจ็บนั้น จัดว่าเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงเช่นกัน เนื่องจากเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อที่จะได้ระบุปริมาณ *S. aureus* ที่ยังคงมีชีวิตรอดแต่บาดเจ็บเนื่องจากการแช่แข็งรวมถึงส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ได้ ยิ่งไปกว่านั้น TSB + 10% NaCl จะถูกใช้กับวิธีการ MPN เพื่อแยก *S. aureus* จากอาหารต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์ที่บาดเจ็บด้วย ช่วงระยะเวลาของการเสริมอาหารก่อนหน้า เป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อที่จะสามารถบ่งชี้ปริมาณของเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตแต่ยังคงบาดเจ็บเนื่องจากกระบวนการแปรรูปอาหารและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ ด้วยวิธีการ MPN ใน TSB + 10% NaCl อย่างไรก็ตามผลเบื้องต้นจะชี้ให้เห็นว่าการใช้ช่วงระยะเวลาการเสริมอาหารนั้นไม่ได้มีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์บาดเจ็บไปพลอตกราฟ จะเห็นแนวโน้มได้ชัดเจนยิ่งขึ้น (ดังภาพที่ 4.3)

ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการรักษาเซลล์บาดเจ็บโดยอาหารเหลว (liquid-repair method) โดยนำตัวอย่างอาหารผสมกับ Trypticase soy broth (TSB) หรือ nonselective broth อื่น ๆ ในอัตราส่วน 1:10 และบ่มไว้เพื่อสะดวกต่อการรักษา ซึ่งรายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการนี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.6

#### ตารางที่ 4.6 แสดงขั้นตอนในการรักษาเซลล์บาดเจ็บด้วยอาหารเหลว ในกรณีของการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บ

1. Sample are blend in a nonselective broth.
2. Incubated in the broth at optimum repair conditioning
3. Then transferred to selective environment for their selective growth.
4. Advantage: a) for isolation  
b) for MPN- enumeration  
c) for plating
5. Disadvantages: May not be effective for regulatory purposes especially when enumeration is done by plating.

ที่มา : Ray (1979)

ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะเป็วิธีที่มีประสิทธิภาพเมื่อใช้แยกแบคทีเรียพวกที่ก่อให้เกิดโรค รวมถึง ใช้นับจำนวนแบคทีเรียที่เป็นดัชนีหรือพวกที่ก่อให้เกิดโรคได้โดยใช้เทคนิค MPN ก็ตาม แต่วิธีการนี้ยังคงมีปัญหา กล่าวคือไม่สามารถใช้กับการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการความเที่ยงตรงได้ เนื่องจากอาหารชนิดนี้ไม่เพียงแต่ช่วยรักษาเซลล์บาดเจ็บเท่านั้น แต่ยังมีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ปกติที่นับได้โดยเฉพาะเมื่อใช้ระยะเวลาการปรวมที่ยาวนานและอุณหภูมิค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงไม่เหมาะกับการนับเพลทซึ่งต้องการความแม่นยำสูง

เมื่อการรักษาถูกดำเนินต่อไปในอาหารเหลว การดูและการทดลองนั้น ควรจะมีการพิจารณาเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างการฟื้นฟูและการเพิ่มจำนวน เพราะเมื่อไม่สามารถตรวจสอบการเพิ่มจำนวนได้ การคาดคะเนอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดได้สูงซึ่งการรักษาด้วยวิธีนี้จะไม่มีผลต่อเทคนิค MPN อย่างไรก็ตาม วิธีการ MPN ซึ่งใช้ในการทดลองนี้จะเป็นการประมาณจำนวนเซลล์อย่างคร่าว ๆ และให้ผลแปรเปลี่ยนได้หลากหลายด้วยกัน (ดังตารางที่ 4.2) และผลที่ได้นี้จะชี้ให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์บาดเจ็บในอาหาร TSB ที่มีเกลือ 10% การทนต่อเกลือและสารจำเพาะอื่น ๆ จะค่อย ๆ ลดน้อยลง (ดังภาพที่ 4.2) เซลล์จะเกิดการตายไปบ้างเป็นส่วนใหญ่ ส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตนั้นจะมีการขยายช่วง lag phase ก่อนหน้าที่เจริญต่อไปช่วง log phase โดยเป็นการชะลอการเจริญเติบโต ของ *S. aureus* ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากความเข้มข้นของเกลือในอาหารชนิดนี้ วิธีการ MPN จะมีการใช้เมื่อมี *S. Aureus* จำนวนน้อยในผลิตภัณฑ์ (USDHEW/FDA, 1972) ยิ่งไปกว่านั้น วิธีนี้ MPN นี้ยังต้องการระยะเวลาบ่งพอสสมควร (ต้องการประมาณ 48 ถึง 96 ชั่วโมง) และค่อนข้างจะสิ้นเปลือง (ในด้านการจัดจำหน่ายและแรงงานที่ใช้) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นอาหารเหลวจึงอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างการรักษาเซลล์บาดเจ็บได้ง่าย ประกอบกับวิธีการนับจำนวนจากเพลทโดยตรงจะให้ผลแน่นอนเป็นที่น่าพอใจกว่าการนับโดยวิธี MPN ในกรณีที่ใช้นับจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีวิธีที่น่าสนใจได้แก่ วิธีการรักษาเซลล์ขาดเชื้อด้วยอาหารแข็ง (solid- repair method)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อแนะนำ

จากการทดสอบทางสถิติพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (TSB + 10% NaCl และ TSB + 0.5 % NaCl) นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหลังซึ่งเป็นวิธีการตามมาตรฐานที่ได้มีการแนะนำให้ใช้ จะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้มากกว่าและปริมาณเซลล์ขาดเจ็บนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแปรตามระยะเวลาของการแช่แข็ง

ภายใต้สภาวะต่าง ๆ การควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ทั้งในส่วนประกอบและในตัวผลิตภัณฑ์ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพิจารณาคุณภาพทางด้านจุลชีวภาพ รวมถึงการรับประกันความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค ในขั้นตอนของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์รวมถึงการขนส่งจะต้องผ่านการกระบวนกรต่าง ๆ อีก ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ไม่ได้มีผลต่อการทำลายเซลล์จุลินทรีย์จนถึงแก่ความตาย หากเป็นเพียงทำให้จุลินทรีย์ได้รับการขาดเจ็บเท่านั้น สำหรับวิธีการประเมินจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ นั้น ตัวอย่างอาหารที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์ จะต้องผ่านขั้นตอนในการรักษาเซลล์ขาดเจ็บเสียก่อน อย่างเช่น การรักษาในอาหารเหลว หรืออาหารแข็ง เป็นต้น ซึ่งควรมีการนำวิธีการเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมและเป็นประโยชน์สูงสุดต่อการควบคุมคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันทโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 202น.
- วรารุณี ครุสง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.
- อดิสร เสวตวิวัฒน์. 2538. คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.
- Baer, E.F., Gilden, M.M. and Franklin. M.K. 1971. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and other species by staphylococcal isolation media. Bacteriol. Proc.1971:16.
- Chou, C.C. and Marth, E.H. 1969. A comparison of direct plating and enrichment methods for detection and enumeration of coagulase-positive staphylococci in frozen feeds of animal origin. J. Milk Food Tech. Nol. 32:398.
- Collins- Thompson, D. L., A. Hurst, and B. Aris. 1974. Comparison of selective media for the enumeration of sublethally heated food - poisoning strains of *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol, 20:1072-1075.
- Costerton, J. W. and J.M. Ingram, 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. Bacteriol. Rev.38:87-110.
- DeWaart. J., Mossel, D.D.A., Tin Broeke. And Van de Moosdijk. A. 1968. Enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods with special reference to egg-yolk reaction and mannitol-negative mutants. J. Appl. Bacteriol. 31: 276.
- Elliot , P.R., and Michener, D.H. (1965), Agric. Res. Serv., U.S. Dep. Agric., Tech. Bull. 1320,55.
- Farrell, J. And Rose, A. 1967. Temperature effects on microorganisms. Annual Rev. Of Microb. 21: 101-120.
- Food an Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. (BAM) 1992. 7<sup>th</sup> ed., AOAC International.
- Gabis, D.A., and J. H. Silliker. 1974. ICMFS method studies. IV. The influence of selective enrichment media and incubation temperatures on the detection of *Salmonella* in dried foods and feeds. Can. J. Microbiol. 20:1509-1511.
- Georgala , D.L., and Hurst, A. (1963). J. Appl. Bacteriol.26,346.
- Gray, R.J.H., M.A. Gaske, and Z.J. Ordal.1974. Enumeration of thermally stressed *Staphylococcus aureus* MF31. J. Food Sci.39:844-846.

- Haines , R.B.(1938). Proc. R. Soc. London , Ser.B 124, 451.
- Hill, M.N. 1967. Action of bile salts on bacterial cell walls. Nature (London) 214: 1152-1154.
- Jones, A.H., and Fabian. F.W. (1952), Mich. Agric. Exp. Stn., Tech. Bull.229.
- Klein, D. A., and S. Wu. 1974. Stress: a factor to be considered in herotrophic microorganisms enumeration from agenatic environments. Appl. Microbiol. 27:429-431.
- Marth, E. H. 1973. Behavior of food microorganism during freeze preservation. In Low- temperature preservation of foods and living matter. Ed. By O.R. Fennema, W.D. Powrie and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Maxcy, R. B. 1970. Non- lethal injury and limitations of recovery of colifrom organisms on selective media. J. Milk Food Technol. 38:445-448.
- Mazur , P. (1966). In "Cryobiology" (H.T. Merymen, ed.), p.214. Academic Press, New York.
- Ray , B., and Speck, M.L. (1973). Crit. Rev. Environ. Control 4, 161.
- Roth, L. A., M., E. Stiles, and L. F.L. Clegg. 1973. Reliability of selective media for enumeration and estimation of Escherichia coli. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6:235-238.
- Mossel, D. A. A., and J. E. L. Corry. 1977. Detection and enumeration of sublethally injured pathogenic and endex bacteria in foods and water processed for safety. Alimenta- Sonder Ausgabe,pp. 19-34
- Ray, B. 1979. Methods to Detect Stressed Microorganisms<sup>1</sup>. J. Of Food Protection,42:340-345.
- Roberts, T.A. (1974b) "Meat Freezing - Why and How?" Symp. No.3,pp. 21.1-21.7. Meat Res. Inst., Langford, U.K.
- Scott , W.J. (1962). Proc. Low Temp. Microbial Symp., 1961p. 89.
- Stanier, R.Y., E.A. A delberg and L.L. Ingraham. 1976. The Microbiology World (4 ed). Prentice-Hall, Inc. 502-526.
- Stersky, A.K., and T. I. Hedrick. 1972. Inhibition of growth of airborne coliforms and other bacteria on selective media. J. Milk Food Technol. 35:156-162.
- U.S. Dept. Of Health, Education & Welfare and Food & Drug Administration. 1972. " Bacterial Analytical Manual."
- Weiser , H.H. (1951). Quick Frozen Foods 13,50.
- Woodburn , M.J., and strong, D.H. (1960) . Appl. Microbiol. 8,109.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Mannitol Salt Agar

Beef Extract	1.0 g	Polypeptone	10.0 g
Sodium chloride	75.0 g	Mannitol	10.0 g
Phenol red	0.025 g	Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 liter	Final pH	7.4 ± 0.2

ผสมองค์ประกอบอาหารทั้งหมด นำไปต้มจนละลาย (เดือด) แล้วต้มต่ออีกประมาณ 1 นาที ถ่ายใส่ขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ในการตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยทั่วไปแล้วมักมีการเติม egg yolk ลงไปใน Mannitol Salt Agar ประมาณ 3% ซึ่งการเตรียมทำได้โดยการล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไว้ใน alcohol เป็นเวลานานกว่า 30 นาที ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยวิธี aseptic technique นำไข่แดงที่แยกได้ใส่ลงใน Mannitol Salt Agar ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

Plate Count Agar (Standard Method)

Tryptone	5.0 g	Yeast extract	2.5 g
Dextrose	1.0 g	Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 liter	Final pH	7.0 ± 0.2

การเตรียม Slant PCA ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายใส่หลอดทดลองที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด หลอดละ 3 ml นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำออกมาเอียงให้ผิวหน้าเอียงเป็นระนาบเดียวกัน

Trypticase (Tryptic) Soy Broth

Trypticase peptone	17.0 g	Phytone peptone	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g	Dipotassium phosphate	2.5 g
Glucose	2.5 g	Distilled water	1.0 liter
Final pH	7.3 ± 0.2		

อุ่นละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วถ่ายอาหารปริมาตร 9 และ 10 ml ลงในหลอดทดลองที่มีจุกหรือฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 ค่า MPN ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อใช้ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

หลอดที่ให้ผลบวก				หลอดที่ให้ผลบวก				หลอดที่ให้ผลบวก				หลอดที่ให้ผลบวก			
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
MPN				MPN				MPN				MPN			
0	0	0	< 3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	16	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ที่มา : BAM (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

## ตารางผนวกที่ 2 ตารางค่า t

d.f.	ค่า $\alpha$	
	0.050	0.010
1	12.706	63.657
2	4.303	9.925
3	3.182	5.841
4	2.776	4.604
5	2.571	4.032
6	2.447	3.707
7	2.365	3.499
8	2.306	3.355
9	2.262	3.250
10	2.228	3.169
11	2.201	3.106
12	2.179	3.055
13	2.160	3.012
14	2.145	2.977
15	2.131	2.947
16	2.120	2.921
17	2.110	2.898
18	2.101	2.878
19	2.093	2.861
20	2.086	2.845

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

d.f.	ค่า $\alpha$	
	0.050	0.010
21	2.080	2.831
22	2.074	2.819
23	2.069	2.807
24	2.064	2.797
25	2.060	2.787
26	2.056	2.779
27	2.052	2.771
28	2.048	2.763
29	2.045	2.756
30	2.042	2.750
35	2.030	2.724
40	2.021	2.704
45	2.014	2.690
50	2.008	2.678
55	2.004	2.669
60	2.000	2.660
70	1.994	2.648
80	1.989	2.638
90	1.986	2.631
100	1.982	2.625
120	1.980	2.617
$\infty$	1.9600	2.5768

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

## วิธีการคำนวณ % Injured cells

$$\text{จากสูตร \% Injured cells} = \left[ 1 - \frac{\text{จำนวนเชื้อที่เจริญบน selective medium}}{\text{จำนวนเชื้อที่เจริญบน Non-selective medium}} \right] \times 100$$

เมื่อ Non-selective medium = 0.5% NaCl TSB

Selective medium = 10% NaCl TSB

ในการคำนวณ % Injured cells จะใช้ค่า MPN เฉลี่ยมาคำนวณ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ค่า MPN เฉลี่ยใน 0.5% NaCl TSB นั้นจะมีค่า >1100 ดังนั้นการคำนวณจึงใช้ค่า 1100 ในการคำนวณ และ % Injured cells จะมากกว่าค่าที่คำนวณได้

## การคำนวณ % Injured cells

เริ่มต้น	% Injured cells	= $\left[ 1 - \frac{432.5}{1100} \right] \times 100$
		> 60.68 %
แช่แข็ง 2 วัน	% Injured cells	= $\left[ 1 - \frac{221.5}{1100} \right] \times 100$
		> 79.86 %
แช่แข็ง 4 วัน	% Injured cells	= $\left[ 1 - \frac{295.75}{1100} \right] \times 100$
		> 73.11 %
แช่แข็ง 6 วัน	% Injured cells	= $\left[ 1 - \frac{258.25}{1100} \right] \times 100$
		> 76.52 %
แช่แข็ง 8 วัน	% Injured cells	= $\left[ 1 - \frac{253.75}{1100} \right] \times 100$
		> 76.93 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ประวัติผู้เขียน

นางสาวชฎากานต์ มะลิวัลย์ เกิดวันที่ 27 กรกฎาคม 2517 จังหวัดระยอง สำเร็จการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) ในปี พ.ศ. 2539 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสามเสนวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2535

นางสาวณัฐนิช กิตติก้อนางค์ เกิดวันที่ 27 เมษายน 2517 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) ในปี พ.ศ. 2539 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสตรีวิทยา 2 กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2535



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้