ประสิทธิภาพไอระเหยน้ำส้มสายชูหมัก เอทานอล และสารร่วมต่อการลดลงของ *Klebsiella pneumoniae* ในพักชี

EFFICACY VAPOR OF VINEGAR, ETHANOL AND COMBINED ON REDUCTION OF *Klebsiella pneumoniae* ON CORIANDER (*Coriandrum sativum* Linn.)

ฐิติพันท์ ชยาวัชรกุล

THITINUN CHAYAWATCHARAKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AI-M-054-163

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ประสิทธิภาพไอกรดน้ำส้มสายชูหมัก เอทานอล และสารร่วมต่อการลดลงของ *Klebsiella pneumoniae* ในผักชี

EFFICACY VAPOR OF VINEGAR, ETHANOL AND COMBINED ON REDUCTION OF *Klebsiella pneumoniae* ON CORIANDER (*Coriandrum sativum* Linn.)

ฐิตินันท์ ชยาวัชรกุล

THITINUN CHAYAWATCHARAKUL

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....123756
วัน, เดือน, ปี.....28 พ.ย. 2555

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AI-M-054-163

EFFICACY VAPOR OF VINEGAR, ETHANOL AND COMBINED ON REDUCTION OF *Klebsiella pneumoniae* ON CORIANDER (*Coriandrum sativum* Linn.)

THITINUN CHAYAWATCHARAKUL

A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2012

KMITL-2012-AI-M-054-163

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพไอกรดน้ำส้มสายชูหมัก เอทานอล และสารร่วมต่อการลดลงของ *Klebsiella pneumoniae* ในผักชี Efficacy vapor of fermented vinegar, ethanol and combined on reduction of *Klebsiella pneumoniae* on coriander (*Coriandrum sativum* Linn.)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฐิตินันท์ ชยาวัชรกุล
รหัสประจำตัว	51608061
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

ผลการสำรวจการปนเปื้อนของ Faecal coliform บนผักชีในเขตมีนบุรีและลาดกระบัง จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ปริมาณ 3.00-6.02 log CFU/g (คิดเป็น 43.4-84.0% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด) การศึกษาผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion วิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลายในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypticase Soy Broth (TSB) และวิธีการรมไออิ่มตัวในจานเพาะเชื้อด้วยน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% เอทานอล 95% และสารร่วมทั้งสองชนิด ที่อุณหภูมิห้อง (30±1°C) สำหรับการรมไออิ่มตัวของสารร่วมนั้นถูกแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ (1) การรมสารร่วมแบบพร้อมกัน (2) การรมไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมักตามด้วยไออิ่มตัวของเอทานอล และ (3) การรมไออิ่มตัวของเอทานอลตามด้วยไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก การศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกตั้งแต่ 2% (v/v) ให้ผลยับยั้งสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นกรดที่เพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่เนื่องจากเอทานอลเป็นสารที่ระเหยได้เร็วและง่าย จึงไม่ปรากฏโซนยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ขณะที่ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธีสัมผัสโดยตรงใน TSB (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 log CFU/ml) เป็นเวลา 10 นาที พบว่า น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2.4% (v/v) (pH 3.59) ขึ้นไป และเอทานอลความเข้มข้น 18% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* สมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับผลการรมไออิ่มตัวในจานเพาะเชื้อ ระยะเวลารมไอ 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่ายิ่งสัมผัสไออิ่มตัวของสารนานเท่าใดประสิทธิภาพการยับยั้งจะเพิ่มสูงขึ้น โดยเมื่อใช้ไออิ่มตัว

น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% และไออิ่มตัวเอทานอล เป็นเวลา 50 และ 15 นาที ตามลำดับ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์ ในการรมไออิ่มตัวสารร่วมนั้น พบว่า สารทั้ง 2 มีอิทธิพลร่วมต่อการอยู่รอดของเชื้อ *K. pneumoniae* โดยการรมไออิ่มตัวของสารร่วมโดยการใช้ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก 40 นาที ร่วมกับการใช้ไออิ่มตัวเอทานอล 10 นาที ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ และลำดับในการรมก่อนหลังไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาและลักษณะปรากฏโดยวิธีไม่ปรับและปรับความชื้นสัมพัทธ์ ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ปริมาณเซลล์ระดับทั่วไป (4 log CFU/g) และระดับสูง (6 log CFU/g) พบว่า การรมไอในผักชีที่ถ่ายเชื้อในระดับทั่วไปจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้สูงกว่าในผักชีที่ถ่ายเชื้อระดับสูง โดยที่ความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อการยับยั้ง ความชื้นสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยทำให้ลักษณะทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวของสารดีขึ้น ขณะเดียวกันก็ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลงด้วย ไออิ่มตัวเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ดีกว่าไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัว พบว่า ไออิ่มตัวเอทานอลส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพที่รุนแรงกว่า และการรมไออิ่มตัวของสารร่วมนั้นให้ผลเช่นเดียวกับการรมด้วยไออิ่มตัวเอทานอลเพียงชนิดเดียว ศึกษาลักษณะทางกายของผักชีที่ผ่านการรมไอแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C ในวันที่ 0 3 5 7 วัน ตามลำดับพบว่ามีเพียงผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักที่สามารถเก็บรักษาได้ใกล้เคียงกับผักชีที่ไม่ผ่านการรมไอซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงโครงสร้างของใบผักชีที่มีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า พื้นผิวของผักชีรวมทั้งปากใบมีผลต่อการยึดติดของเชื้อ *K. pneumoniae* บนผักชี

Thesis	Efficacy vapor of fermented vinegar, ethanol and combined on reduction of *Klebsiella pneumoniae* on coriander (*Coriandrum sativum* Linn.)
Student	Ms. Thitinun Chayawatcharakul
Student ID.	51608061
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2012
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

A total of 30 coriander samples from Minburi and Ladkrabang districts were determined for faecal coliform contamination. Among those contaminants, the amount of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) was found at 3.00-6.02 log CFU/g (equivalent to 43.4-84.0% of Aerobic bacteria count). Reductions of *K. pneumoniae* by fermented vinegar and ethanol were further studied *in vitro* for their concentration and inhibition time before vaporization study on inoculated coriander. Agar Overlay Disc Diffusion, direct contact in Trypticase Soy Broth (TSB) and vaporization on inoculated *K. pneumoniae* on agar plate were investigated. Vaporization was applied by using commercial fermented vinegar containing 10% acetic acid (FV), 95% ethanol and their combined at room temperature ($30\pm1^{\circ}C$). The three methods for combined saturated vapors were studied consisting of (1) simultaneous treatment of both vapors of FV and ethanol, (2) vaporization of FV before ethanol, and (3) vaporization of ethanol before FV. Results from Agar Overlay Disc Diffusion indicated that at least 2% (v/v) acetic acid of FV caused significant inhibition effect on *K. pneumoniae* ($p<0.05$). Due to the rapid evaporation property of ethanol, no inhibition zone was detected. In case of direct contact in TSB with 6 log CFU/ml initial number of *K. pneumoniae* for 10 min indicated that at least 2.4% (v/v) acetic acid of FV and 18% ethanol provided complete inhibition, significantly effect at $p<0.05$. The result of vaporization on agar plate of inoculated *K. pneumoniae* at 1, 2, 3 and 4 h showed that when contact time of vaporization was prolonged, the strong inhibition of *K. pneumoniae* was obtained. The vaporizing time for complete inhibition of *K. pneumoniae* by FV and ethanol were 50 and 15 min, respectively. While in case of subsequent vaporizing method, 40 min of FV and 10 min of ethanol

also showed complete inhibition. No significant effect ($p>0.05$) between sequence of FV and ethanol in process was noticed. The effect of vaporizing process with both substances was further applied on inoculated *K. pneumoniae* on coriander. Two levels of *K. pneumoniae* consisting of normal at 4 log CFU/g and high at 6 log CFU/g were taken. Additionally, the study was comparison of vaporizing time and appearance of coriander after treatment was conducted between two conditions, increase and non-increase of relative humidity (RH) during treatment. Results indicated that amount of *K. pneumoniae* directly related to the efficiency of vaporization. Strong effect of vaporization was noticed at normal level of inoculated *K. pneumoniae* on coriander. The increase of RH caused to maintain the appearance of vaporized coriander. Moreover, weak negative impact on inoculated *K. pneumoniae* was observed. By visual observation, saturated ethanol vapor caused more severe appearance of coriander than FV vapor. Additionally, saturated combined vaporization provided the same result as saturated ethanol vaporization. The vaporized coriander samples without inoculation of *K. pneumoniae* were stored at 10°C for 7 days and conducted the sensorial test by scoring during 0, 3, 5, and 7 days. Only FV vaporized coriander sample could maintain its property nearby with control sample, without vaporization treatment. In study of structure of coriander leave on microbial infection, the leave was observed by Scanning Electron Microscope (SEM). It was found that surface and stomata of the coriander leave was support the adhesion of microorganism such as *K. pneumoniae* in this study.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือ ออกแบบกล่องรมไอ และให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหา ตลอดจนให้ความรู้และประการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ดร.ประมวล ศรีกาหลง กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ รวมถึง ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกที่ช่วยตรวจทาน

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการและทุนการวิจัยนี้

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับ บิดา มารดา และพี่สาวที่คอยเป็นกำลังใจ นางศรีประจันทร์ วงค์ใหญ่ เพื่อนที่ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ รวมถึงเพื่อนๆ ที่คอยกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้า

ฐิตินันท์ ชยาวัชรกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ผักชี.....4

2.2 แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae*.....8

2.3 น้ำส้มสายชู.....15

2.4 เอทานอล.....17

2.5 การรมไอ.....18

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....22

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....22

3.2 อุปกรณ์การทดลอง.....22

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....22

3.4 สารเคมี.....23

3.5 เชื้อจุลินทรีย์.....23

3.6 วิธีการทดลอง.....24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....31

4.1 ผลการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชี (Blackground flora).....31

4.2 การศึกษาและเปรียบเทียบผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลและผลของไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับห้องปฏิบัติการ.....32

4.3 ศึกษาและเปรียบเทียบถึงระยะเวลาและลักษณะปรากฏของการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วม โดยวิธีไม่ปรับและปรับความชื้นต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี.....44

4.4 โครงสร้างผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวกรดน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C 59

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....64

5.1 สรุปผลการทดลอง.....64

5.2 ข้อเสนอแนะ.....66

เอกสารอ้างอิง.....67

ภาคผนวก.....76

ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย.....76

ข การทดสอบและการตรวจวิเคราะห์.....82

ค ตาราง MPN และเกณฑ์ประเมินคุณภาพทางกายภาพของผักชี.....85

ง ผลการสำรวจแบคทีเรียและการทดสอบในผักชี.....87

จ กราฟสรุปผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในหลอดทดลอง.....92

ประวัติผู้วิจัย.....93

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 คุณค่าทางโภชนาการอาหารของผักชีในส่วนของใบสด 10 กรัม.....5

4.1 ชนิดแบคทีเรียที่พบมากเป็น 3 อันดับแรกในการสำรวจผักชีในเขตมีนบุรีและ ลาดกระบัง จำนวน 30 ตัวอย่าง.....32

4.2 ค่าเฉลี่ยขนาดโซนยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำส้มสายชูหมักที่มีกรดอะซิติกในระดับ ความเข้มข้นกรดอะซิติต่างๆ.....34

4.3 ค่า pH จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สัมผัสโดยตรงกับสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0-3.0 % (v/v) เป็นเวลา 10 นาทีในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) 36

4.4 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การรอดและการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สัมผัสโดยตรงกับสารละลายเอทานอลความเข้มข้นตั้งแต่ 10-20% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C).....38

4.5 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 77%.....39

4.6 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในการรมไอ อิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 37%.....40

4.7 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยสารร่วมแบบพร้อมกันระหว่างไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) และไออิ่มตัวน้ำสมสายชูหมัก ความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 64%.....41

4.8 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ที่รมด้วยไออิ่มตัว สารร่วมแบบลำดับ ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) 43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อระดับทั่วไปและระดับสูงที่สัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10 % (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 77%).....45

4.10 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อระดับทั่วไปและระดับสูงที่สัมผัสไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 37%).....46

4.11 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไปที่สัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 10% (v/v) และไออิ่มตัวเอทานอล 95% ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์.....47

4.12 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับสูงที่สัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 10 % (v/v) และไออิ่มตัวเอทานอล 95% ในระยะเวลาต่างๆณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์.....48

4.13 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10 % (v/v) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ (83%).....50

4.14 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่รมไออิ่มตัวเอทานอล 95 % (v/v) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ (83%).....51

4.15 ลักษณะปรากฏของผักชีหลังการสัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอล และไออิ่มตัวของสารร่วมในระยะเวลารวมต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์.....53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.16 สรุปลักษณะปรากฏของผักชีหลังการสัมผัสไออิ่มน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมในระยะเวลารวมต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์.....58

4.17 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ10°C.....63

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 ลักษณะของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* : (ก) โคโลนี *K. pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey*; (ข) แคปซูล *K. pneumoniae***; (ค) รูปร่างเซลล์ *K. pneumoniae* ที่ถ่ายด้วย SEM.....9

4.1 ขนาดโซนยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHAด้วยน้ำส้มสายชูหมัก ที่ระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกต่างๆ (% v/v) เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion.....33

4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งด้วยไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์; (ก) คือ การถ่ายเชื้อระดับทั่วไป; (ข) คือ การถ่ายเชื้อระดับสูง.....53

4.3 ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรม (ก)ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก ความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) (ความชื้น77%); (ข)ไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) (ความชื้น 37%) ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้น.....55

4.4 ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรม (ก)ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก ความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v); (ข) ไออิ่มตัวของเอทานอล 95% (v/v) (ค) ไออิ่มตัวของสารร่วมอย่างละ 0.5 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้น (83%) 57

4.5 โครงสร้างของใบผักชีและการเกาะติดของเชื้อ *K. pneumoniae* ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM): (ก) ปากใบและร่องใบ; (ข) การเกาะติดของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่โครงสร้างใบ; (ค) เซลล์ของ *K. pneumoniae* ที่เกาะอยู่บริเวณปากใบ.....59

4.6 ลักษณะปรากฏของผักชี (ก) ผักชีที่ไม่ผ่านการรมไอ; (ข) ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมง; (ค) ผ่านการรมไออิ่มตัวเอทานอล 1 ชั่วโมง; (ง) การรมไออิ่มตัวของสารร่วมอย่างละ 0.5 ชั่วโมง ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 0 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ.....62

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบในตระกูล Enterobacteriaceae สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ น้ำ ดิน ระบบหายใจ ทางเดินอาหารและอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงในผัก ผลไม้ (O'Connor-Shaw และคณะ, 1995) แม้ว่า *Klebsiella* จะไม่จัดว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคอย่างชัดเจนแต่ก็เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่แฝงตัวและสามารถก่อโรคได้ (Sabota และคณะ, 1998; Rennie และคณะ, 1990) หากมีปัจจัยสนับสนุน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น คนชรา ผู้ป่วยที่รับการผ่าตัด หรือ ผู้ที่มีโรคประจำตัว เช่น โรคเบาหวาน โรคพิษสุราเรื้อรัง เป็นต้น (Boglione และคณะ, 2008; Umeh และ Berkowitz, 2009) เป็นสาเหตุสำคัญให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบหายใจและทางเดินอาหาร เชื้อดังกล่าวยังเป็นปัญหาในการรักษามาก เนื่องจากมีความดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม ทำให้รักษาไม่หายถึงขั้นเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดลักษณะการดื้อยาไปสู่แบคทีเรียอื่นๆที่มีความใกล้เคียงกันได้อีกด้วย (พรพิมล พฤกษ์ประเสริฐ และคณะ, 2549)

โดยทั่วไปเกือบ 50% (Wright และคณะ, 1976) ของผักพบ *Klebsiella* ประมาณ 10^3 CFU/g โดยมีรายงาน *K. pneumoniae* ในผักสดหลายชนิด (Wright และคณะ, 1976 ; Soriano และคณะ, 2000 ; Soriano และคณะ, 2001) รวมถึงผักชีด้วยเช่นกัน (Rajvanshi, 2010) ผักชีเป็นผักที่นิยมรับประทานสดจึงเป็นแหล่งของการรับแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกาย ขั้นตอนการเพาะปลูกผักชีที่มีการรดน้ำและปุ๋ยคอกเป็นเส้นทางสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนดังกล่าว อุตสาหกรรมผักสดนิยมใช้คลอรีนช่วงความเข้มข้น 50-200 mg/l ในการล้างเพื่อลดจุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว แต่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อก่อโรคในผักใบได้ (Beuchat และ Golden, 1998) และนอกจากนี้การใช้สารประกอบคลอรีนอาจมีสารตกค้างซึ่งก่อมะเร็ง (Richardson และคณะ, 2000) เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ และจากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนผักชี พบ *K. pneumoniae* ในผักชีจำนวน 28 จาก 30 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ง) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเน้นการศึกษาการลด *K. pneumoniae* ในผักชี ประกอบกับผักชีเป็นผักใบที่มีอายุสั้นเหี่ยวเฉาเร็ว การล้างและแช่ผักชีตามปกติอาจยังไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงควรศึกษาการนำสารที่ปลอดภัยมาใช้และวิธีการที่เหมาะสมในการลดหรือกำจัดเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี

น้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลต่างก็เป็นสารปลอดภัย สามารถใช้ในอาหารและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญได้ ปัจจุบันการศึกษาทดลองและนำมาประยุกต์ใช้เกี่ยวกับการรมไอใน

อุตสาหกรรมผลไม้นั้นได้รับความสนใจมากขึ้น แต่ส่วนมากจะมุ่งเน้นที่การกำจัดเชื้อราที่ทำให้เสื่อมเสียและการยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวเป็นหลัก โดยยังไม่มีผู้ใดศึกษาเกี่ยวกับการรมไอเพื่อลดเชื้อ *K. pneumoniae* มาก่อน ประกอบกับวิธีการรมไออาจจะทำให้ผักชีไม่บอบช้ำ ดังนั้นการนำสารทั้งสองชนิดมารมไอผักชีเพื่อลดเชื้อ *K. pneumoniae* คาดหวังว่าน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการลดเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีในอุตสาหกรรมต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 สำรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชี

1.2.2 การศึกษาและเปรียบเทียบผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลและผลของไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.2.3 ศึกษาและเปรียบเทียบระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มน้ำส้มสายชูหมัก ไอเอทานอลและสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี

1.2.4 ศึกษาโครงสร้างผักชีที่มีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวกรดน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เริ่มจากการสำรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มของผักชีในท้องตลาดจำนวน 30 ต.ย. ในเขตมีนบุรีและลาดกระบัง ช่วงเดือนธ.ค. 53-ม.ค.54 เพื่อทราบถึงชนิดและความชุกของเชื้อในกลุ่มดังกล่าวที่พบทั่วไปในผักชี โดยแยกเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ได้เพื่อนำมาใช้ตลอดงานวิจัย ในการทดลองได้ใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% และเอทานอล 95% เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นทั้งในสภาวะของเหลวช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆในหลอดทดลองและสภาวะไอในจานเพาะเชื้อ โดยการศึกษาในสภาวะไอนั้นอาศัยปั๊ม (pump) ในการพาไอเข้ากล่องทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง (30-32°C) จนอิ่มตัว วางจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *K. pneumoniae* แบ่งเป็นการรมไอของสารเดี่ยวได้แก่ไอน้ำส้มสายชูหมักและไอเอทานอล และการรมไอของสารร่วม สำหรับการรมไอสารร่วม แบ่งออกเป็นสามวิธีได้แก่ (1) ไอน้ำส้มสายชูหมักตามด้วยไอเอทานอล (2) ไอเอทานอลตามด้วยไอน้ำส้มสายชูหมัก และ(3) ไอน้ำส้มสายชูหมักพร้อมกับไอเอทานอล โดยเปรียบเทียบผลการยับยั้งและลักษณะทางกายภาพของผักชีระหว่างการรมที่ไม่ได้ปรับความชื้นกับการรมที่มีการปรับความชื้นเพื่อพิจารณาความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผักชี จากนั้นศึกษาผลของโครงสร้างผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ

K. pneumoniae และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (การเน่าเสีย สี กลิ่น ความสดและลักษณะโดยรวม) ของผักชีภายหลังผ่านการรมไอที่เหมาะสมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 0 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ปนเปื้อนบนผักชี ในระดับอุตสาหกรรมทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมถึงการนำไอน้ำส้มสายชูหมัก ไอเอทานอลและไอสารร่วมไปประยุกต์ใช้ในการลดแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชนิดอื่นๆในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักชี

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

ผักชีเป็นผักที่อยู่ในตระกูล Unbelliferae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Coriandrum sativum* Linn. มีชื่อพื้นบ้านว่า ผักชีไทย ผักชีลี ผักชีลา ผักหอม ผักชีไร่ ผักหอมน้อย และผักชี แตกต่างกันไปตามพื้นที่ปลูก มีชื่อภาษาอังกฤษว่า คอร์เรียนเดอร์ (Coriander) ไชนีสพาสย์เลย์ (Chinese Parsley) (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2547) ชื่อของผักชีมีที่มาจากภาษากรีกว่า "Koris" หมายถึงแมลงและเป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่า "Cilantro" มีต้นกำเนิดจากแถบเมดิเตอร์เรเนียนและตะวันออกกลาง หลายประเทศในเอเชียรู้จักเป็นเวลานับพันปีมาแล้ว (Chaudhry และ Tariq, 2006) และมีการนำไปประกอบอาหารอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น จีน เม็กซิโก อเมริกาใต้ อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ผักชีมีลำต้นตั้งตรง ภายในกลวง กิ่งก้านเล็กไม่มีขน ลำต้นสูงประมาณ 8-15 นิ้ว ลำต้นสีเขียวแต่ถ้าแก่จัดจะออกสีเขียวอมน้ำตาล รากแก้วสั้น แต่รากฝอยจะมีมาก ใบมีสีเขียวสด เรียงคล้ายขนนก แต่อยู่ในรูปทรงพัดโดยใบที่โคนต้นนั้นจะมีขนาดใหญ่กว่าที่ปลายต้น เพราะส่วนมากที่ปลายต้นใบจะเป็นเส้นฝอย ออกเป็นช่อ ตรงส่วนยอดของต้น ดอกนั้นมีขนาดเล็ก มีอยู่ 5 กลีบสีขาวหรือชมพูอ่อน ๆ ติดผลในฤดูหนาว ลักษณะของผลเป็นรูปทรงกลมโตประมาณ 3-5 มิลลิเมตร สีน้ำตาล ตรงปลายผลแยกออกเป็น 2 แฉก ตามผิวจะมีเส้นคลื่นอยู่ 10 เส้นใบ (ภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552)

ผักชีสามารถปลูกได้ในดินแทบทุกชนิดที่มีความชื้นพอสมควรโดยเฉพาะดินร่วน ปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ ราชบุรี นครปฐม และเขตปริมณฑล สามารถปลูกได้ตลอดปีแต่ช่วงที่เหมาะสมที่สุด คือ ฤดูหนาว พันธุ์ที่ปลูกกันแพร่หลายในประเทศไทย มี 2 ชนิดคือ พันธุ์พื้นเมือง มีลักษณะใบบาง ต้นเล็ก เมล็ดเล็ก ออกดอกเร็ว อายุสั้น มีกลิ่นหอมมากจนฉุนและพันธุ์แอฟริกา มีลักษณะใบใหญ่หนา ต้นใหญ่ กลิ่นหอมเล็กน้อย อายุยาวนานกว่าพันธุ์พื้นเมือง (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2547) ผักชีมีอายุการเก็บรักษาสั้น เหี่ยวง่าย โดยทั่วไปการสูญเสียน้ำเพียง 5% จะทำให้ผลิตผลเหี่ยว คุณภาพลดลงและรสชาติเปลี่ยน (ภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552)

ผักชีมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวเนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ประกอบด้วย active phenolic acid compound ที่มี caffeic และ chloronic acid (Chaudhry และ Tariq, 2006) ซึ่งพบในทุกส่วนของต้นและพบมากที่สุดในเมล็ด (ลัดดาวัลย์ คำมะปะนา, 2551) ทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ใบและก้านใบนิยมบริโภคเป็นผักสดหรือเครื่องเคียง กลิ่นหอมของเมล็ด ราก ใบ และต้นใช้เป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหารได้หลายอย่าง ใช้ต้มเป็นน้ำซุป หรือหมักเนื้อสัตว์

ทำให้มีกลิ่นหอม ดับกลิ่นคาว และทำให้รสชาติดี (ภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552) นอกจากนี้ใบของผักชียังมีสรรพคุณเป็นสมุนไพร เช่น ช่วยย่อยอาหาร บำรุงกระเพาะ เจริญอาหาร ขับลมขับพิษ แก้หวัด ขับเหงื่อ ลดน้ำตาลในเลือด แก้โรคหัด พอกทาแก้ผื่นคัน แก้ไฟลามทุ่ง แก้ตับอักเสบ ลดการปวดบวมข้อ ต้มดื่มแก้ไอ แก้หวัด อาหารเป็นพิษ แก้สะอึก กระตุ้นการทำงานของเลือด พลาสมา และกล้ามเนื้อ มีสารต้านมะเร็ง เป็นต้น (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2547) สำหรับคุณค่าทางโภชนาการของผักชี แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการอาหารของผักชีในส่วนของใบสด 10 กรัม

โภชนาการ	ปริมาณ/ใบสดของผักชี 10 กรัม
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	37.0
โปรตีน (กรัม)	2.6
ไขมัน (กรัม)	0.1
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	7.3
แคลเซียม (กรัม)	113.0
ฟอสฟอรัส (กรัม)	80.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	4.5
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.11
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.15
ไนอาซีน (มิลลิกรัม)	1.3
วิตามินซี (มิลลิกรัม)	58.0
เบต้า-แคโรทีน (RE)	149.26
ใยอาหาร (กรัม)	3.0

ดัดแปลงจาก ภัทราวดี ศรีปัญญา (2552)

2.1.2 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผักชี

ผักชีมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเริ่มต้นค่อนข้างสูงทั้งตอนที่เป็นเมล็ดพันธุ์และเมื่อเจริญเป็นต้นสมบูรณ์แล้ว เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกแบบสัมผัสดินประกอบกับมีลักษณะใบที่หงิกงอไม่เรียบแบนซึ่งเป็นสภาพที่เพิ่มการเกาะติดของจุลินทรีย์ได้ง่าย (ภัทราวดี ศรีปัญญา และ บุษกร ทองใบ, 2553)

ในต่างประเทศมีความกังวลเพิ่มขึ้นเรื่องความปลอดภัยของการบริโภคผักชี มีรายงานการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. บนตัวอย่างผักชี 1.6% (Food and Drug Administration, 1999), *Escherichia coli* O157:H7 19.5-20% (Beuchat, 1996), *Yesinia* spp. และ

Listeria monocytogenes (Kamat และคณะ, 2003) นอกจากเชื้อก่อโรคที่สำคัญแล้วยังพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^6–10^8 CFU/g เชื้อรา 10^3–10^4 CFU/g aerobic mesophilic bacterial count เฉลี่ย 7.0 ± 0.12 log CFU/g และโคลิฟอร์ม (Kamat และคณะ, 2003) ซึ่งโคลิฟอร์มที่พบในผักชี ได้แก่ *K. pneumoniae* และ *Citrobacter koseri* (Shahid และคณะ, 2009) รวมถึงแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae 6 log CFU/g (Wang และคณะ, 2004)

สำหรับประเทศไทยผักชีที่ปลูกในประเทศไทย พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 7.6 log CFU/g ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มมีค่ามากกว่า 1,100 MPN/g (รัชพล พรรษา และ สราวุธ มณี, 2549) และ 5.74 log CFU/g (ภัทราวดี ศรีปัญญา และ บุษกร ทองใบ, 2553)

2.1.3 การลดเชื้อจุลินทรีย์บนผักชี

ภัทราวดี ศรีปัญญา และ บุษกร ทองใบ (2553) รายงานว่าการล้างผักชีด้วยน้ำกลั่นช่วยลดปริมาณแบคทีเรียที่ผิวภายนอกเพียงบางส่วนเท่านั้น โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจาก 7.17 log CFU/g ลดไปได้ 0.31 log CFU/g และโคลิฟอร์มลดจาก 5.47 log CFU/g ลงไปได้ 0.98 log CFU/g สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีการแนะนำให้ใช้ในการล้างผัก ได้แก่ สารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยจะมีประสิทธิภาพในการทำลาย *E. coli* และ *Salmonella* spp. มากขึ้นเมื่อมีปรับสภาวะกรด-ด่าง ของน้ำล้างให้เท่ากับ 4 (วราภา มหากาญจนกุล และคณะ, 2544) หรือ สารเคมีที่ไม่ใช่กลุ่มคลอรีน ได้แก่ ส่วนผสมของเปอร์ออกซีแอซีติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อผักทางการค้า นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริกและกรดแลคติก รวมถึงการใช้โอโซนและรังสี (สุดสายชล ทองหอม และ นันทวัน กรัตพงศ์, 2552)

ในอุตสาหกรรมส่งออกผักนิยมใช้คลอรีนช่วงความเข้มข้น 50-200 mg/l ในการล้างเพื่อลดจุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว โดยผักชีที่จะส่งออกไปขายต่างประเทศจะผ่านขั้นตอนการแช่ล้างน้ำที่ผสมคลอรีนเนื่องจากมีต้นทุนต่ำเพื่อช่วยฆ่าเชื้อโรคเพิ่มอีกขั้นตอนหลังการล้างดินที่ราก เช่น น้ำ 250 ลิตร สามารถใส่ผักชีได้ไม่เกิน 40 กิโลกรัม แช่ตามอัตราส่วนและเวลาที่กำหนด นำผักชีขึ้นใส่ในตะกร้า ลงในถังสะบัดพร้อมทั้งตะกร้าเพื่อสะบัดน้ำก่อนนำไปจัดเก็บในห้องเย็น จากนั้นผักชีจะถูกลำเลียงลงสายพาน เพื่อให้พนักงานคัดคุณภาพ ตัดแต่ง ชั่งน้ำหนักและบรรจุใส่ถุงแล้วบรรจุลงกล่อง จัดเก็บในห้องเพื่อรอการขนส่ง ในการขนส่งจะทำการใส่เจลไอซ์ (gel ice) และปิดฝาลังเพื่อรักษาอุณหภูมิ (พีเค สยาม, มปป.) แต่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหารได้ (Beuchat และคณะ, 1998) เช่นเดียวกับรายงานของ Kamat และคณะ (2003) ที่กล่าวว่าการแช่ผักชีด้วยคลอรีน 250 ppm นาน 10 นาที ไม่สามารถยับยั้งโคลิฟอร์มหรือฟีคอลโคลิฟอร์มได้เช่นกัน นอกจากนี้การใช้สารประกอบคลอรีนดังกล่าวอาจมีสารตกค้าง เช่น Trihalomethanes และ chloramines ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งและอาจส่งผลต่อสุขภาพผู้บริโภคได้

(Richardson และคณะ, 2000) อีกทั้งเกิดการกัดกร่อน (Ölmez และ Kretzschmar, 2009) และส่งผลต่อโครงสร้างความสมบูรณ์ของใบผักซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียในที่สุด (Kamat และคณะ, 2003)

วราภา มหากาญจนกุล และคณะ (2544) รายงานการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรท์ 50 ppm สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm และสารผสมเปอร์ออกซีแอซีติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 80 ppm ในการลดปริมาณเซลล์ *E. coli* ในผักชี พบว่า สารละลายโซเดียมคลอไรท์ และสารผสมเปอร์ออกซีแอซีติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แต่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดทำให้สีผักชีคล้ำเนื่องจากใบมีขนาดเล็กและบาง โดยที่กลิ่นผักไม่เปลี่ยน ลักษณะใบผักที่หงิกงอของผักชีทำให้สารฆ่าเชื้อเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ยากกว่าปกติ แต่ตามข้อกำหนดด้านความปลอดภัยในอาหารของ Regulation (EU) No. 378:2002 ไม่อนุญาตให้ใช้โอโซนคลอรีนไดออกไซด์ เปอร์ออกซีแอซีติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกระบวนการผลิตอาหาร (Ölmez และ Kretzschmar, 2009)

ภัทราวดี ศรีปัญญา และ บุษกร ทองใบ (2553) ศึกษาผลของสารสกัดข่าร่วมกับกรดอะซิติกต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักชี พบว่า ผักชีมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและโคลิฟอร์มปนเปื้อนเริ่มต้น 7.17 และ 5.74 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อล้างผักชีด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม, T1) และสารสกัดข่า (15 mg/ml) ร่วมกับกรดอะซิติก (0.5 % v/v) (T2) เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ 0.31 และ 1.04 log CFU/g ตามลำดับ และลดปริมาณโคลิฟอร์มได้ 0.98 และ 2.20 log CFU/g ตามลำดับ ปริมาณจุลินทรีย์บนผักชีที่ทดสอบในระหว่างการเก็บรักษา ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7°C (ความชื้นสัมพัทธ์ 84%) เป็นเวลา 12 วัน พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง 6.86 - 9.46 log CFU/g (T1) และ 6.13 - 8.44 log cfu/g (T2) และมีปริมาณโคลิฟอร์ม 4.76 - 7.47 log CFU/g (T1) และ 3.54 - 6.50 log CFU/g (T2) แต่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผักชี (ใบและลำต้นมีสีเหลืองและคล้ำ) ในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโคลิฟอร์มมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยในวันที่ 8 เป็น 5.22 log CFU/g และวันที่ 12 เป็น 7.47 log CFU/g โดยอธิบายว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดและโคลิฟอร์มหลังการล้างสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการเก็บรักษาแต่เป็นการเพิ่มปริมาณอย่างช้าๆ เนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียได้รับบาดเจ็บและการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ให้ช้าลง จึงสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น

ข้อดีของการใช้กรดอินทรีย์คือ ใช้ง่าย ไม่เป็นพิษ แต่ข้อเสียคือ ต้องใช้ระยะเวลาสัมผัสกับเชื้อ (contact time) นาน โดยทั่วไปประมาณ 5-15 นาที (สำหรับการล้างหรือแช่) อาจส่งผลกับคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางด้านประสาทสัมผัส และหากใช้ในปริมาณมาก ยังเกิดผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเสีย ทำให้ค่า BOD และ COD ในน้ำสูงจึงไม่เหมาะสมกับการใช้ในโรงงาน (Ölmez และ Kretzschmar, 2009) แต่เหมาะสมกับการใช้ในระดับครัวเรือนมากกว่า

นอกจากการใช้สารต่างๆเพื่อใช้ฆ่าจุลินทรีย์ในผักชีแล้ว ยังมีรายงานการฉายรังสีแกมมาในปริมาณที่ปลอดภัยของใบผักชี พบว่ารังสี 1 kGy สามารถกำจัด *Listeria* spp. และ *Yersinia* spp. ให้หมดไปได้และลดโคลิฟอร์มลงจาก > 1100 MPN/g เหลือเพียง 43 CFU/g โดยยังคงรักษาคุณภาพของใบผักชี (การเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองและการเน่าเสีย) ได้มากกว่า 2 สัปดาห์ หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8-10°C และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณของส่วนประกอบที่สำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่น นอกจากนี้ยังไม่พบเชื้อหลังการเก็บรักษาอีกด้วย (Kamat และคณะ, 2003)

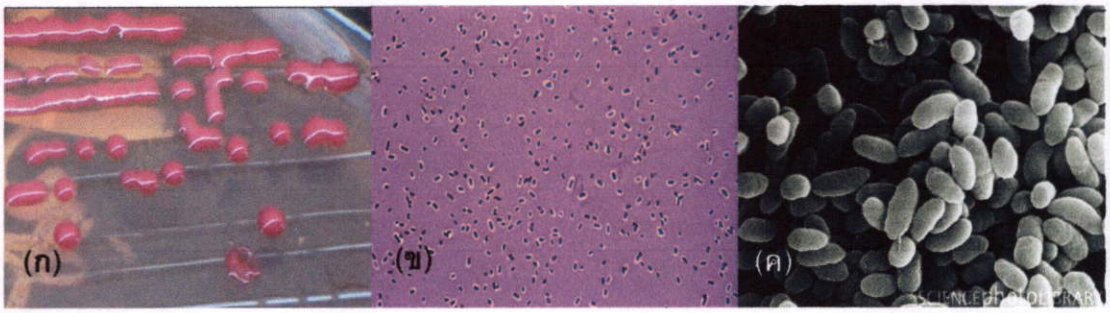
2.2 แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

เชื้อ *Klebsiella* ตั้งชื่อตามนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันชื่อ Edwin Klebs เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae อยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม และจัดเป็นฟีคอลโคลิฟอร์ม เช่นเดียวกับ *E. coli* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.8 x 1.2-2.4 μm รูปร่างเป็นรูปท่อน มีแคปซูลเป็นโพลีแซกคาไรด์หนา ไม่มีแฟลกเจลล่าในการเคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีใหญ่ เยิ้มและเหนียว สามารถหมักน้ำตาลแลกโตส (O'Connor-Shaw และคณะ, 1995) ให้โคโลนีลักษณะเป็นเมือก ขนาด 4-6 mm สีชมพูและเกิดการตกตะกอนเกลือน้ำดีรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (De la Maza, 2004) ปัจจุบันเชื้อ *Klebsiella* มี 7 สปีชีส์ (Umeh และ Berkowitz, 2009) ได้แก่ *K. pneumoniae, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis, K. oxytoca, K. planticola, K. terrigena* และ *K. ornithinolytica* โดย *K. pneumoniae* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุด ภาพที่ 1.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *K. pneumoniae*

เชื้อ *Klebsiella* เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 37°C เป็นแบคทีเรียที่มีกระบวนการเผาผลาญทั้งเพื่อการหายใจและการหมัก กลูโคสจะถูกหมักไปพร้อมกับกรดและแก๊สที่ผลิตได้ เชื้อ *Klebsiella* หลายสายพันธุ์ (30%) สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะไม่มีออกซิเจนได้ (De la Maza, 2004) สามารถสร้างแก๊สใน Lauryl tryptose broth ที่อุณหภูมิ 44.5°C (thermotolerant coliform) ในเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลบวกต่อการทดสอบฟีคอลคอลิฟอร์มเช่นเดียวกับ *E. coli* แต่เมื่อทดสอบทางชีวเคมีจะให้ผล IMVIC เป็น - - + +/ Catalase +/ Oxidase – (De la Maza, 2004) เจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำ pH 3.6 สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะไม่มีออกซิเจนได้ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 10°C ในเวลา 14 วัน บน nutrient agar และไม่สามารถหมักน้ำตาล D-melizitose ภายในเวลา 7 วัน (O'Connor-Shaw และคณะ, 1995) ทั้งนี้ Fuentes และคณะ (1985) รายงานอัตราการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* (Genaration time) ในน้ำส้มเข้มข้นที่อุณหภูมิ 4 25 และ 34°C เป็น 1.84 0.48 และ 0.39 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่ Regue และคณะ (2004) รายงานอัตราการเจริญของ *K. pneumoniae* ที่พบในหนู

ว่าอยู่ในช่วง 38-40 นาที ไม่แตกต่างกันมากในสายพันธุ์ที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 37°C



ภาพที่ 1.1 ลักษณะของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* : (ก) โคโลนี *K. pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey*; (ข) แคปซูล *K. pneumoniae***; (ค) รูปร่างเซลล์*K. pneumoniae* ที่ถ่ายด้วย SEM***

ที่มา : * http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Klebsiella_pneumoniae_mucoid.jpg;

** http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/result.html;

*** http://www.sciencephoto.com/media/12329/enlarge

MacConkey-inositol-carbinicillin (MCIC) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกนำมาใช้โดยทั่วไปสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Klebsiella* spp. โดยจะให้ลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey (MC) แต่มีความจำเพาะกว่า คือให้โคโลนีที่เป็นผลบวกเทียม (false-positive) ต่ำ ซึ่งแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆในตระกูล Enterobacteriaceae ที่อยู่ในลำไส้ ได้แก่ *Enterobacter sakazakii, Citrobacter freundii, Y. enterocolitica, En. cloacae, Shi. dysenteriae, Sal.* Enteritidis, *E. coli, Serratia marcescens* ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีส่วนประกอบของน้ำตาล Inositol และยาปฏิชีวนะ Carbinicillin เพิ่มเติมจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC สายพันธุ์ส่วนมาก (11 สายพันธุ์) ของ *Klebsiella* ยกเว้น *K. pneumoniae* CMCC 46105 สามารถหมักน้ำตาลนี้ได้ (Gao และคณะ, 2010) เกิดเป็นโคโลนีสีแดง ขนาด 2-4 mm บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCIC สายพันธุ์ *E. coli* มีเพียง 0-1% ที่สามารถหมักน้ำตาล inositol ได้ นอกจากนี้ *En. agglomerans, En. cloacae, Sal.* Typhimurium, *Proteus vulgaris* ซึ่งอาจมีโอกาสพบได้ในผักชีก็ไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนี้ได้ (Tomas และคณะ, 1986) ในการตรวจเชื้อ *K. pneumoniae* จึงมีการใช้น้ำตาล inositol นี้ในการคัดแยกถึง 95% เชื้อ *E. coli* ส่วนมากไวต่อ Carbinicillin ทำให้เกิดเป็นโคโลนีจางบนอาหาร MCIC (Gao และคณะ, 2010) หากใช้ Carbinicillin ร่วมกับ MC ในปริมาณ 50 μg/ml จะทำให้การฟื้นตัวของเชื้อ *Klebsiella* spp. เป็น 92±3% แต่หากใส่มากเกินไปการฟื้นตัวจะต่ำลง (100 μg/ml) จะทำให้การฟื้นตัวของเชื้อ *Klebsiella* spp. เหลือเพียง 75±5%) แต่

Carbinicillin ใน MCIC จะมีศักยภาพลดลงหลังการเก็บรักษา (Tomas และคณะ, 1986) และนอกจากนี้เชื้อ *Klebsiella* spp.สามารถเจริญบน Violet Red Bile Glocose Agar (VRBGA) ได้เช่นกันให้โคโลนีสีแดงเข้มหรือสีชมพู (Gao และคณะ, 2010)

Maroncle และคณะ (2006) พบว่าหลังจากเลี้ยง *K. pneumoniae* ที่ pH 7 (เพื่อให้เซลล์ไม่เกิดการปรับตัว) และปรับค่าความเป็นกรด pH 4 ด้วย HCl (เพื่อให้เซลล์เกิดการปรับตัว) เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อใน Luria Bertani medium (acid shock medium, pH 3) เป็นเวลา 60 นาที เซลล์ที่ไม่มีการปรับตัวรอดชีวิตน้อยกว่า 0.5% ส่วนเซลล์ที่มีการปรับตัวรอดได้ 8.2% แสดงว่าเชื้อ *K. pneumoniae* สามารถทนต่อสารอนินทรีย์ได้ และเมื่อเปลี่ยนจาก HCl มาเป็นสารละลายกรดที่ประกอบด้วย butyric acid, acetic acid และ propionic acid (pH 5.5) นำมาเลี้ยงต่อใน Luria Bertani medium (acid shock medium, pH 4.3) เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเซลล์ที่มีการปรับตัวรอดได้น้อยกว่า 50 %

2.2.2 การก่อโรค

เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบในช่องปาก หลอดลม ผิวหนังและลำไส้ (Umeh และ Berkowitz, 2009) เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) เป็นเชื้อก่อโรคที่หลบซ่อนตัวอยู่ (invasive pathogen) โคโลนีขนาดใหญ่ที่เกิดจากการสร้างแคปซูลโพลีแซกคาไรด์หรือเมือก (แอนติเจน K) ขนาดใหญ่ ทำให้เชื้อป้องกันตัวเองจากเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) ในร่างกายได้ (Umeh และ Berkowitz, 2009) เชื้อ *Klebsiella* spp. มีแอนติเจนที่ผิวที่ทำให้ก่อโรคได้ทั้ง 2 ชนิดคือ O แอนติเจนและ K แอนติเจน (Umeh และ Berkowitz, 2009) นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้มากเป็นอันดับสองรองจากเชื้อ *E. coli*

เชื้อ *Klebsiella* spp. ถูกจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญจากการติดเชื้อในโรงพยาบาลสำหรับผู้ที่อยู่ในโรงพยาบาลและผู้ป่วยที่เป็นโรครุนแรง (Gao และคณะ, 2009 ; Haryani และคณะ, 2007) โดยปี ค.ศ. 2004 องค์การอาหารและเกษตรของสหประชาชาติ (FAO) และองค์การการค้าโลก (WHO) จัดให้เชื้อ *K. pneumoniae* อยู่ในหมวด B เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดความเจ็บป่วยในเด็กทารกและพบในนมผงสูตรสำหรับเด็กทารก (รายงานการประชุม FAO/WHO, 2004; Gao และคณะ, 2009) ทำให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ หรือระบบทางเดินอาหาร ผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดบวมจากเชื้อนี้มักจะเป็นฝีในปอด มีเสมหะเหนียวบางครั้งมีเลือดปนออกมาโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะจะมีแผลติดเชื้อเป็นหนองฝี ในส่วนระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดอุจจาระร่วงโดยมักจะเกิดกับวัยกลางคนหรือวัยสูงอายุ ปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ที่สำคัญได้แก่ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันลดลง ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานและ ผู้ติดสุรา โรคเกี่ยวกับตับ ปอด หลอดลม การติดเชื้อจากการผ่าตัดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Boglione และคณะ, 2008; Umeh และ Berkowitz, 2009) มะเร็ง โรคหัวใจ และรูมาตอยด์ (Meatheral และคณะ, 2009)

ประเทศแคนนาดา ปี ค.ศ. 2000-2007 เกิดความชุกของการติดเชื้อ *K. pneumoniae* สูงโดยเกิดในอัตรา 7.1 ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี อัตราการตายของผู้ป่วย 20% และอัตราการตายของประชากร 1.3 ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี โดยผู้ป่วยมาจากกลุ่มที่ติดเชื้อจากโรงพยาบาล (nosocomial) 27% กลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ 43% และกลุ่มที่ติดเชื้อนอกโรงพยาบาล 30% ผู้ป่วยสูงอายุ เพศชาย และผู้ที่เป็นพิษสุราเรื้อรังมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือด (Meatheral และคณะ, 2009) ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่ามีอัตราการตายสูงถึง 50% และเกือบ 100% ในผู้ที่เป็นพิษสุราเรื้อรัง (Umeh และ Berkowitz, 2009) ส่วนโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อดังกล่าวพบมากในวัยกลางคนในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตะวันออกเฉียงเหนือ มีอัตราการตายสูง 30-40% และพบว่า K1 และ K2 เป็นซีโรไทป์ที่แพร่หลายที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศไต้หวัน (Boglione และคณะ, 2008)

แหล่งของการติดเชื้อในโรงพยาบาลมาจากสาเหตุหลัก คือ ระบบทางเดินอาหารและมือของผู้ที่อยู่ในโรงพยาบาล (Umeh และ Berkowitz, 2009) ถึงแม้ว่ากรดในกระเพาะจะเป็นสารชนิดแรกที่มีความสำคัญในการขัดขวางก็ตาม แต่เชื้อ *K. pneumoniae* ที่รอดชีวิตจะเคลื่อนไปลำไส้เล็กเผชิญกับ volatile fatty acid ค่าความเป็นกรด-ด่างที่แปรปรวนและมีการแข่งขันกับเชื้อ normal flora ในลำไส้ก็ตาม (Maroncle และคณะ, 2006)

2.2.3 การดื้อยา

เชื้อ *K. pneumoniae* หลายสายพันธุ์สร้างเอ็นไซม์ extended spectrum β-lactamases (ESBL) ได้ โดยสายพันธุ์ที่สร้าง ESBL เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (Umeh และ Berkowitz, 2009) ก่อให้เกิดการดื้อยา เป็นปัญหาสำคัญในการรักษา โดยมักดื้อต่อยาในกลุ่มที่เคยใช้รักษาได้ผล เช่น aminoglycoside (gentamicin, amikacin), cephalosporin รุ่นที่ 3 (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), penicillin (piperacillin), co-trimoxazole รวมทั้ง quinolone (ciprofloxacin) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถถ่ายทอดสมบัติการดื้อยาให้แก่เชื้ออื่นๆที่อยู่ในกลุ่ม enterobacteriaceae ด้วยกัน เช่น *E. coli* และ *Enterobacter* spp. ทำให้เป็นปัญหามากขึ้น (พรพิมล พฤกษ์ประเสริฐ และคณะ, 2549) การดื้อยาเป็นปัจจัยให้เชื้อเกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง ทั้งนี้เชื้อ *K. pneumoniae* ซีโรไทป์ K1 และ K2 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากที่สุด เนื่องจากสามารถแพร่กระจายในโฮสต์และเกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่า โดยการผลิตแคปซูลโพลีแซกคาไรด์ที่ไม่ชอบน้ำเป็นสาเหตุหลักของการต้านการจับกินเชื้อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งเชื่อว่าขึ้นอยู่กับยีนส์ magA ยีนส์นี้จะพบมากใน K1 ดังนั้น K1 จึงต้านทานการถูกจับกินได้มากกว่า K2 (Boglione และคณะ, 2008)

เจนจิรา เกิดผล และคณะ (2550) ศึกษาโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในผักสดที่วางขายในตลาดต่างๆ ในกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และ ฉะเชิงเทรา โดยทำการเพาะแยก

เชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae* spp. และ *Enterobacter* จากผัก 140 ตัวอย่าง ที่เก็บตัวอย่างระหว่างเดือน เมษายน-กันยายน พ.ศ. 2550 พบเชื้อในผัก 130 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ *E. coli* 64 สายพันธุ์ เชื้อ *K. pneumoniae* 99 สายพันธุ์ และเชื้อ *Enterobacter* spp. 37 สายพันธุ์ (45.7 70.7 และ 26.4% ตามลำดับ) พบว่าเชื้อ *E. coli* V 155 และเชื้อ *K. pneumoniae* V 149 ซึ่งแยกได้จากผัก 2 ตัวอย่างจากต่างแผงกันในตลาดเดียวกันสร้างเอนไซม์ ESBLs (1.43 % ของสิ่งส่งตรวจ)

แม้ว่าจากรายงานของ Shahid และคณะ (2009) ที่ศึกษาความชุกของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีความชุกถึง 52.6 % (20/38) ซึ่งมากที่สุดของแบคทีเรียที่แยกได้ แต่ไม่พบยีนส์ bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{ampC} ซึ่งเป็นยีนส์ดื้อยาที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก อย่างไรก็ตามพบว่า *K. pneumoniae* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการสร้าง ESBLs เพิ่มมากขึ้นประมาณ 20% (Boglione และคณะ, 2008) และดูเหมือนว่าเชื้อ *K. pneumoniae* จะมีความสำคัญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในแง่ของการดื้อยา ทำให้ยากต่อการรักษาในที่สุด

2.2.4 การปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae*

เชื้อ *K. pneumoniae* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ น้ำ ดิน ระบบหายใจ ทางเดินอาหาร และอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงในผัก ผลไม้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคและอาหารเน่าเสีย

เกือบ 50% ของผักโดยทั่วไปจะพบเชื้อ *K. pneumoniae* ประมาณ 10^3 CFU/g มีรายงานว่าพบ *Klebsiella* spp. ในผักสดหลายชนิด (Wright และคณะ, 1976 ; Soriano และคณะ, 2000 ; Soriano และคณะ, 2001) ทั้งนี้ผักชีด้วยเช่นกัน (Rajvanshi, 2010) ต่อมา Falomir และคณะ (2010) พบเชื้อ *K. pneumoniae* ในตัวอย่างผักกาดหอม (iceberg) 2/8 ตัวอย่าง ผักกาดหอม (romaine) 1/10 ตัวอย่าง มะเขือเทศ (ทั้งลูก) 1/10 ตัวอย่าง มะเขือเทศ (ปอกเปลือก) 1/10 ตัวอย่าง แครอท 2/10 ตัวอย่าง จากผักที่ขายปลีกในประเทศสเปน และ Soriana และคณะ (2000) พบเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักกาดหอม 8.3% สาเหตุเนื่องจากเชื้อ *Klebsiella* spp. มีความสามารถเมทาบอไลท์โพลีแอลกอฮอล์ เช่น inositol และ pinitol เพื่อนำ phytic acid ที่เป็นส่วนประกอบของเมล็ดและธัญพืชมาเป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสเฟสมาใช้ในการเจริญและตรึงไนโตรเจน (O'Connor-Shaw และคณะ, 1995) ในอุจจาระโคนมสามารถพบเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ถึง 80% (Munoz และคณะ, 2006) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อมีโอกาสปนเปื้อนมากับปุ๋ยคอกที่ใช้ปลูกผักได้สูง

นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *K. pneumoniae* ในอาหารหลายชนิด เช่น ผักที่ใช้ทำสลัด (Wright และคณะ, 1976; Soriano และคณะ, 2000; Soriano และคณะ, 2001; Rajvanshi, 2010) มอซซาเรลล่าชีส (Massa และคณะ, 1992) อาหารทะเล (Singh และ Kulshreshtha, 1992) และอาหารทั่วๆไป (Haryani และคณะ, 2007) เป็นต้น อีกทั้งมีรายงานความเป็นพิษเนื่องจากการผลิตเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ปนเปื้อนในแฮมเบอร์เกอร์ (Sabota และคณะ,

1998) และไก่งวง (Rennie และคณะ, 1990) จนทำให้เกิดอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบ ท้องเสียอย่างรุนแรงและอาการอื่น ๆ หลังจากบริโภคอาหารดังกล่าวมาแล้ว

ในแง่บวกเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคที่มีปะปนอยู่ในเทมเป้พบว่ามีบทบาทในการสร้างวิตามินบี 12 ในเทมเป้ (Adam และ Moss, 2000)

2.2.5 การปนเปื้อนในผัก

ปริมาณ Aerobic mesophile ที่ยอมรับได้ทั่วไปในผักคือ 5 log CFU/g (Soriana และคณะ, 2000) แบคทีเรียแกรมลบที่เป็นเชื้อ microflora หลักที่พบในผักส่วนใหญ่ เนื่องจาก pH ของผักหลายชนิดอยู่ในช่วงที่แบคทีเรียก่อโรคสามารถเจริญเติบโตได้ (Beuchat, 2002) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน ได้แก่ คุณภาพน้ำ การใช้ปุ๋ยคอก การเลี้ยงสัตว์ในบริเวณแปลงเพาะปลูกหรือบริเวณบรรจุ และสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานตั้งแต่ขั้นตอนการปลูก การบรรจุ การผลิต การขนส่ง การกระจายสินค้า (Pinto และคณะ, 2006) การเสียหายทางกายภาพ เช่น รูรั่วหรือรอยช้ำ จะสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเก็บรักษานอกตู้เย็น (Harris และคณะ, 2003) การปนเปื้อนของเชื้อฉวยโอกาสในผักถูกพิจารณาให้เป็นกังวลเกี่ยวกับเรื่องความปลอดภัยในอาหาร เนื่องจากมีความเสี่ยงต่อสุขภาพผู้บริโภคในรายที่เป็นโรคเบาหวานและภูมิคุ้มกันบกพร่องและการต้านยาของแบคทีเรีย (Falomir และคณะ, 2010)

Johnston และคณะ (2005) ศึกษาเส้นทางการปนเปื้อนในผักจากแหล่งปลูกถึงหลังการเก็บรักษาใน Cilantro และ Parsley พบว่าระดับโคลิฟอร์มรวมเพิ่มสูงขึ้นระหว่างขั้นตอนการบรรจุ พบว่าใน Cilantro มีปริมาณเพิ่มขึ้น 1.4 log หลังจากการเก็บเกี่ยวจนถึงการบรรจุ โดยเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในขั้นตอนการล้าง (rinse step) เมื่อเทียบจากขั้นตอนการเก็บเกี่ยว (1.8 ± 1.2 log CFU/g) ส่วน pasley เพิ่มจาก 2.3 ± 1.1 log CFU/g เป็น 2 เท่าในขั้นตอนเดียวกัน และชี้ว่า สายพานลำเลียงที่ใช้ในโรงบรรจุ ทำจากวัสดุได้หลายชนิด เช่น ลักษณะแบบผิวพรมซึ่งยากต่อการทำความสะอาดและเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค

Wright และคณะ (1976) รายงานการศึกษาเชื้อ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas aeruginosa* จากสลัดผักที่เสริฟให้ผู้ป่วยในโรงพยาบาล ซึ่งประกอบด้วย มะเขือเทศ หัวไชเท้า คื่นช่าย แครอท เอ็นไดฟ (endive) แตงกวา และผักสลัด พบว่า กลุ่ม *Enterobacteriaceae* หลักที่พบคือ เชื้อ *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., และ *Serratia* spp. โดย *En. agglomerans* พบมากที่สุดถึง 85% ของตัวอย่างในปริมาณ 10^2-10^6 CFU/g รองลงมาคือเชื้อ *En. clocae* 48% ของตัวอย่าง และเชื้อ *Klebsiella* spp. 46 % ของตัวอย่าง เชื้อ *P. aeruginosa* พบ 44% ในปริมาณต่ำ 10^1-10^3 CFU/g ขณะที่เชื้อ *E. coli*, *Citrobacter* spp. และ *Proteus* spp.พบน้อยกว่า 4% ของตัวอย่าง

Robertson และคณะ (2002) วิเคราะห์แบคทีเรียในถั่วงอกจากเมล็ดถั่ว 4 ชนิด ได้แก่ alfalfa, mung bean, radish และถั่วผสม (green peas, adzuki beans, lentils และ chick peas) พบว่ามี

โคลิฟอร์มทนความร้อนประมาณ 25% จากตัวอย่างทั้งหมด 300 ตัวอย่าง ในปริมาณที่หลากหลาย (ระหว่าง 0.2 x 10^2 ถึง 1.4 x 10^7 CFU/g) โคลิฟอร์มทนความร้อนส่วนมากเป็นเชื้อ *Enterobacter* spp. *(En. cloacae, En. sakazakii)* และเชื้อ *Klebsiella* (*K. pneumoniae* spp. *pneumon*iae) พบเชื้อ *E. coli* 8 ใน 62 ของโคลิฟอร์มทนร้อนที่มาจากถั่ว mung bean การแช่ถั่วงอกพบโคลิฟอร์มทนความร้อน 40% ของตัวอย่างน้ำแช่ ในปริมาณที่หลากหลายตั้งแต่ 2 CFU /100 ml ถึง 6.0 x CFU/100 ml

Rajvanshi (2010) รายงานปริมาณแบคทีเรียรวมในผักชี แครอทและแตงกวา พบว่าผักชีมีปริมาณแบคทีเรียรวมมากที่สุดคือ 1.38 x 10^4 CFU/ml หลังการล้างด้วยน้ำประปาและแบคทีเรียรวมลดลงเหลือประมาณ 0.834 x 10^4 CFU/ml (37.6%) หลังการล้างด้วยน้ำประปาอุ่น 40°C เมื่อนำมาวิเคราะห์แยกแบคทีเรียพบว่าในผักชีมีเชื้อ *Bacillus* spp. มากที่สุดคือ 13 ไอโซเลทและเชื้อ *Klebsiella* 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 44 ไอโซเลท

Mpuchane และ Gashe (1996) รายงานการพบเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *Enterobacter* spp. จากใบกระเจี๊ยบ (okra) และสมุนไพร African spider herb ที่ใช้ในการบริโภค โดยใบกระเจี๊ยบมีขั้นตอนการล้างและผึ่งแดด 2-3 วันและสมุนไพร African spider herb มีขั้นตอนเฉพาะการล้างจากนั้นนำมาต้มเป็นเวลา 20-30 นาที ปั้นเป็นก้อนกลมแล้วผึ่งแดด 2-3 วัน พบเชื้อ *Enterobacter* spp. และฟีคอลโคลิฟอร์มในทุกตัวอย่าง โดยฟีคอลโคลิฟอร์มมีค่า MPN 10^1-10^4/g และ 10^2-10^5/g ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *E. coli* 67% และ 71% ของตัวอย่างตามลำดับ มีค่า MPN > 10^3/g เป็น 27% และ 31% ของตัวอย่างตามลำดับ ส่วนกรณีของเชื้อ *K. pneumoniae* subsp. pneumoniae 33% และ 59% ของตัวอย่างตามลำดับ ในปริมาณ 10^1-10^5 CFU/g ซึ่งการพบเชื้อ *K. pneumoniae* subspp. pneumoniae ในปริมาณที่มากเช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* แสดงถึงความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค

จนถึงปัจจุบันนี้องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (USFDA) ยังไม่ได้ออกมาตรฐานในการตรวจแยกและนับจำนวนเชื้อ *Klebsiella* ในอาหาร (Gao และคณะ, 2009)

2.2.6 การลดการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae*

เมล็ดของผักชีมีน้ำมันหอมระเหยที่อาจมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ (Chaudhry และ Tariq, 2006) เชื้อดังกล่าวไม่สามารถหลุดออกจากผิวของผักได้ง่ายด้วยการล้างน้ำประปา (O'Connor-Shaw และคณะ, 1995) ลักษณะผิวของใบผักที่ขรุขระมีร่องและรูเปิดตามธรรมชาติ ทำให้เชื้อเข้าไปเกาะได้ง่ายและถูกชะล้างได้ยากกว่าในผิวเซลล์ผัก-ผลไม้ที่เรียบ (Harris และคณะ, 2003) มีน้ำยาล้างผักทางการค้าและสารฆ่าเชื้อบางชนิดถูกเสนอให้ใช้ล้างผัก ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ของสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดของสาร ความเข้มข้นที่ใช้ ระยะเวลาสัมผัส (contact time) และอุณหภูมิของสาร (วราภา มหากาญจนกุล และคณะ, 2544)

เชื้อ *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* และ *Enterobacter* spp. เป็นโคลิฟอร์มที่มักพบในข้าวสาร (Piernas และ Guiraud, 1997) ซึ่ง Lee และคณะ (2007) ได้นำมาศึกษาการใช้สารฆ่าเชื้อและสารทำความสะอาดเพื่อลดโคลิฟอร์มในข้าวสาร พบว่า การใช้ hydrogen peroxide 24,000 ppm คลอรีน 250 ppm, quaternary ammonium compound 180 ppm, ethanol 95% 350,000 ppm และ calcium oxide 2,000 ppm แช่ข้าวสารนาน 5 นาที สามารถกำจัดโคลิฟอร์มที่มี 3.10 ± 0.23 log CFU/g ได้ เอกชัย สร้อยน้ำและคณะ (2550) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Klebsiella* spp. ที่แยกได้จากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จากสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ พลู บัวบก เปลือกมังคุด กระเจี๊ยบแดง ฝรั่ง ดาวเรือง และหญ้าลูกใต้ พบว่าพลูและกระเจี๊ยบแดง ที่ความเข้มข้น 1% ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella* spp. โดยพลูทำให้เชื้อ *Klebsiella* spp. ลดลง 46.4×10^5 CFU/ml ส่วนกระเจี๊ยบแดงทำให้ *Klebsiella* spp. ลดลง 36×10^5 CFU/ml อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้อบเชยและ Cumin ก็สามารถออกฤทธิ์ต้าน *K. pneumoniae* ได้ดี (Agaoglu และคณะ, 2007)

แต่สำหรับการลดการปนเปื้อนเชื้อ *Klebsiella* spp.ในผักนั้นยังไม่พบการรายงาน

2.3 น้ำส้มสายชู

2.3.1 ลักษณะทั่วไป

น้ำส้มสายชูมีลักษณะเป็นของเหลวใสให้กลิ่นรสเปรี้ยว เป็นกรดที่เหมาะสมในการรักษาคุณภาพอาหารยิ่งกว่ากรดชนิดใดๆ จัดเป็นสารประเภท General Recognized as Safe (GRAS) เพราะไม่มีพิษต่อร่างกาย นิยมใช้ทั่วไปในครัวเรือน มีองค์ประกอบสำคัญทางเคมีเป็นกรดอะซิติก หรือกรดน้ำส้มซึ่งเป็นกรดอ่อน มีโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับกรดอะซิติก (CH_3COOH)

น้ำส้มสายชูทั่วไปจะมีกรดอะซิติกประมาณ 4.2-6% การแบ่งชนิดของน้ำส้มสายชูอาศัยความแตกต่างของกรรมวิธีผลิต มีทั้งเป็นผลิตผลที่ได้จากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ทางเคมี ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ. 2543 ระบุน้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ น้ำส้มสายชูหมัก น้ำส้มสายชูกลั่น และน้ำส้มสายชูเทียม โดยการควบคุมคุณภาพของน้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นนั้นระบุว่าต้องมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัม ต่อ 100 ml ที่ 27°C (เครือข่ายจัดการองค์ความรู้, 2550)

2.3.2 น้ำส้มสายชูหมัก

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลมาหมักกับส่าเหล้าแล้วหมักต่อกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ การหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหล่านี้ให้เป็นแอลกอฮอล์โดยอาศัยยีสต์ที่มีตามธรรมชาติ จากนั้นจะอาศัยแบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria) ตามธรรมชาติ หรือการเติมแบคทีเรียอะซิติก โดยแบคทีเรียที่สำคัญคือเชื้อ Acetobacter spp.

โดยเฉพาะเชื้อ *Acetobacter aceti* ที่สามารถผลิตกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมักได้สูง เพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกหรือที่เรียกว่ากรดน้ำส้ม น้ำส้มสายชูหมักจะมีสีเหลืองอ่อนตามธรรมชาติ มีกลิ่นหอมและรสชาติดี มีรสหวานของน้ำตาลที่ตกค้างมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก วัตถุดิบที่นำมาทำ เช่น แอปเปิ้ล ข้าว ข้าวโพดอ่อน กล้วยสุก เศษเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมะม่วง มะม่วง น้ำมะพร้าว น้ำหางนม หัวหอมสายพันธุ์ญี่ปุ่น อ้อย เป็นต้น ให้ความแตกต่างในด้านกลิ่นรส และความเข้มข้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ น้ำส้มสายชูหมักจะใส ไม่มีตะกอน ยกเว้นตะกอนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ น้ำส้มสายชูหมักทั่วไปจะมีกรดอะซิติกประมาณ 5-10% แต่ปัจจุบันกำลังมีการพัฒนาให้อยู่ในระดับ 10-12% (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2553)

น้ำส้มสายชูหมักยังคงส่วนประกอบของเกลือแร่ วิตามิน ไฟเบอร์ เอ็นไซม์และสารอินทรีย์อื่นๆไว้ นอกจากนี้ยังให้กลิ่นหอมที่เฉพาะตัวของวัตถุดิบที่ใช้หมักอีกด้วย (Boatwright, n.d.) pH ของน้ำส้มสายชูหมักขึ้นอยู่กับปริมาณไฮโดรเจนไอออนในสารละลาย โดยถ้า pH ลดลง 1 หน่วยจะมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น 10 เท่า น้ำส้มสายชูกลั่นโดยทั่วไปที่จำหน่ายทางการค้าที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 5% จะมี pH ประมาณ 2.4 มีความหนาแน่นประมาณ 1.01 g/ml จุดเยือกแข็งประมาณ -2°C จุดเดือดประมาณ 100.6°C หากมีกรดอะซิติกสูงขึ้นจุดเดือดก็จะสูงขึ้น (กรดอะซิติกบริสุทธิ์มีจุดเดือด 118.1°C (Boatwright, n.d.))

2.3.3 ผลของน้ำส้มสายชูต่อการการยับยั้งแบคทีเรียในผัก

วชิราภรณ์ เทียมพันธ์ (2545) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชูที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 2 และ 4% (v/v) ต่อการทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *E. coli* บนผักกาดหอม พบว่าสารละลายของน้ำส้มสายชูที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1% (v/v) สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดได้มากกว่า 2 log ที่เวลา 15 และ 30 นาที และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2 และ 4% (v/v) พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ประมาณ 3 log ในเวลา 15-30 นาที แต่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูสูงขึ้นประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *E. coli* ก็เพิ่มขึ้นด้วย ความเข้มข้นที่ 2% (v/v) ให้ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ดี แต่ทำให้สีและความสดของผักกาดหอมเปลี่ยนแปลงไป น้ำส้มสายชูที่ความเข้มข้นเพียง 1% แช่ผักเป็นเวลา 15 นาที ทำให้ขอบใบของผักกาดหอมเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อทิ้งไว้นานขึ้นจะเห็นรอยสีน้ำตาลชัดขึ้น

สุดสายชล ทองหอม และ นันทวัน กรัตพงศ์ (2552) รายงานผลของน้ำส้มสายชูความเข้มข้น 2% และ 5% กรดซิตริกความเข้มข้น 2% และ 5% และโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1% และ 2% ต่อการลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium บนใบสะระแหน่ พบว่าความเข้มข้น 2% (pH 2.83) สามารถลดเชื้อ *S.* Typhimurium จาก 2.30-3.44 log CFU/g ลงได้ 1.39 log CFU/g ที่เวลาเริ่มต้น (0 นาที) 1.67 log CFU/g ที่เวลา 15 นาที และ 2.53 ที่เวลา 30 นาทีและที่ความเข้มข้น 5% (pH 2.73)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สามารถลดจาก 4.83 log CFU/g ลงได้ 1.7 log CFU/g ที่เวลาเริ่มต้น (0 นาที) และลดลงมากที่สุด 4.16 log CFU/g ที่เวลา 15 และ 30 นาที โดยที่เวลา 30 นาทีจะทำให้สะระแหน่เกิดสีน้ำตาลเล็กน้อย อย่างไรก็ตามน้ำส้มสายชูความเข้มข้น 2% รวมถึงโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1% และ 2% สามารถลดเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่ากรดซิตริกมีประสิทธิภาพค่อนข้างดีกว่าน้ำส้มสายชูและโซเดียมไบคาร์บอเนต ตามลำดับ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรงกว่าและเสถียรมากกว่า

2.4 เอทานอล

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง จัดเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพปานกลาง คือ ไม่สามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรีย แต่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ เช่น เชื้อวัณโรค และไวรัสได้ เอทานอลพบได้ทั่วไปในพืชและมีความเข้มข้นสูงขึ้นในเนื้อเยื่อเมื่อมีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน พืชทนระดับเอทานอลได้สูงโดยเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และช่วยชะลอการเหี่ยวของเนื้อเยื่อ (Corcuff และคณะ, 1996) การจุ่มผลเบอร์รี่ในเอทานอลพบว่าทำให้เกิดการตกค้างต่ำ จึงไม่ส่งผลต่อลักษณะปรากฏและรสชาติ (Lichter และคณะ, 2003)

2.4.1 ผลของเอทานอลต่อการยับยั้งแบคทีเรียในผักและผลไม้

เอทานอลถูกใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทั่วไป เอทานอลที่มีความเข้มข้น 70-95% มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์สูงสุด (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538)

Beuchat (1997) ศึกษาการใช้เอทานอลฆ่าเชื้อ *Salmonella* spp. ในเมล็ดถั่วงอก โดยทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ *Salmonella* spp. 5 ซีโรวาร์ ที่ปนเปื้อนในเมล็ดถั่วงอกโดยศึกษากับแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอทานอล โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.3 x 10^7 CFU/ml พบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1% และเอทานอล 70-80%สามารถฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของเมล็ดได้ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Salmonella* spp. ที่อยู่ชั้นผิวภายในได้ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์หรือโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ที่มี available chlorine 1,800 และ 2,000 mg/ml และเอทานอล 80% ทำให้เชื้อ *Salmonella* spp. ลดลงได้มากกว่า 1,000 เท่าหลังจากแช่ 10 นาที เหมาะสมกับการใช้เป็นทางเลือกในการฆ่าเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ แต่ยังไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Salmonella* spp.ที่อยู่ชั้นผิวภายในให้หมดได้ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6% ก็ให้ผลได้ดีเช่นกันแต่ยากเรื่องการจัดการเนื่องจากทำให้ผู้ปฏิบัติการเกิดการระคายเคืองผิวหนัง

Pinto และคณะ (2006) ศึกษาผลของการจุ่มเอทานอลต่อเชื้อ *E. coli* ในผลองุ่นไร้เมล็ด Crimson พบว่า ผลของระยะเวลาในการจุ่มเอทานอลต่อเชื้อ *E. coli* โดยจุ่มนาน 1 3 และ 10 นาที พบว่าเชื้อลดลงประมาณ 1.30 log CFU/g ขณะที่ตัวควบคุมที่จุ่มน้ำ ทำให้เชื้อลดลงเพียง 0.47 log CFU/g สำหรับผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อเชื้อ *E. coli* พบว่า การจุ่มเอทานอลความ

123756

เข้มข้น 50% เป็นเวลา 3 นาที ทำให้เชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในผลองุ่นที่มีประมาณ 10^4 CFU/g ลดลง 2 log CFU/g อย่างไรก็ตาม การทดลองมีความแปรปรวนสูงมากทั้งภายในและระหว่างกลุ่มทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางกายวิภาคขององุ่นแต่ละกิ่งอนึ่ง จากผลการทดลองคณะผู้วิจัยได้แนะนำว่า การใช้เอทานอลที่ถูกให้ความร้อน การเติมสารเช่นซอร์เบท การรมไอเอทานอลระหว่างการเก็บรักษา หรือการใช้หลายเทคนิคเข้าร่วมอาจจะทำให้การกำจัดเชื้อ *E. coli* มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.5 การรมไอ

การรมควัน คือ การปล่อยให้สารเคมีในสถานะของก๊าซหรือไอระเหย แพร่กระจายและครอบคลุมศัตรูพืช ที่ต้องการกำจัด ส่วนการกลายเป็นไอ คือการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นก๊าซ โดยโมเลกุลเคลื่อนที่หลุดออกจากผิวของเหลว ซึ่งความดันไอจะไม่ขึ้นกับขนาดของภาชนะ แต่จะขึ้นอยู่กับแรงระหว่างโมเลกุลในของเหลว (ภัทราพรรณ จรูณรัตนสกุล, 2553) ดังนั้นการรมไอจึงเป็นการใช้ไอระเหยในสถานะก๊าซของสารเคมีแพร่กระจายครอบคลุมศัตรูเป้าหมาย รูปของก๊าซมีโมเลกุลที่เล็กกว่ารูปของเหลวจึงสามารถที่จะเข้าไปทำลายจุลินทรีย์จุลินทรีย์ได้ดีกว่า (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549) กิจกรรมของสารฆ่าเชื้อโรคในสถานะไอโดยทั่วไปนำเสนอความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ (Robert, 1968)

Tzortzakis (2010) รายงานผลการรมไอเอทานอลสัมบูรณ์ (100% v/v) น้ำส้มสายชู และน้ำมันออริกาโน ยับยั้งการพัฒนาของเชื้อรา anthracnose rot ที่ทำให้มะเขือเทศเน่า การรมเริ่มจากการทำให้อิ่มตัวในภาชนะ ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บภาชนะที่อุณหภูมิ 12°C โดยมีความชื้นสัมพัทธ์ 95% ตลอดการสัมผัสไอ พบว่า ให้ผลลดการงอกของสปอร์ไม่แตกต่างกันทางสถิติในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar แต่ในมะเขือเทศที่ใส่เชื้อถูกยับยั้งเมื่อรมด้วยเอทานอลสัมบูรณ์หรือน้ำมันออริกาโน

Burt และคณะ (2007) รายงานการยับยั้งเชื้อ *Salmonella enterica* serotype Enteritidis บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและชิ้นไก่ดิบขนาด 10×10×5 mm โดยใช้ไอ Carvacrol (สมุนไพรชนิดหนึ่ง) ที่อุณหภูมิ 4 20 และ 37°C ซึ่งมีเชื้อประมาณ 5×10^3 CFU พบว่าเมื่อรมเป็นเวลา 3 ชั่วโมงขึ้นไป ที่อุณหภูมิ 37°C และใช้ Carvacrol ความเข้มข้นต่ำที่สุด 20% ในเอทานอลให้ผลการยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เป็นสารเคมีที่ใช้ในการรมผลิตภัณฑ์หลายชนิด สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์หลังเก็บเกี่ยว ในประเทศไทยนิยมใช้รมลำไยและลิ้นจี่เพื่อเพิ่มคุณภาพและช่วยควบคุมโรค แต่เนื่องจากผู้บริโภคบางคนมีอาการแพ้ จึงต้องมีการควบคุมไม่ให้มีตกค้างมากเกินไปหรือบางประเทศต้องตรวจไม่พบระดับความปลอดภัยในการใช้จึงต้องไม่เกิน 1% (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549)

Portner และ Hoffman (1986) รายงานการใช้ไอของกรดอะซิติกที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 20 40 60 และ 80% ณ อุณหภูมิ 25°C เพื่อฆ่าสปอร์ของ *B. subtilis* var.niger ที่กระดาษและผิวเครื่องแก้ว พบว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์สูง 80% ให้ผลการฆ่าสปอร์ได้ดีที่สุด แต่สปอร์ที่อยู่บนผิวที่ไม่สามารถซึมผ่านได้จะถูกทำลายได้ยากกว่า อาจเนื่องจากไอของสารเข้าไปไม่ถึงชั้นเซลล์ที่ทับซ้อนกันอยู่

อุดร อุณหวุฒิ และคณะ (2536) ได้ทำการอบไอน้ำบนมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ แรดและพิมเสนแดง เป็นเวลา 0 60 120 นาที ภายใต้สภาพอากาศอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์ 98% จากนั้นลดอุณหภูมิด้วยอากาศเย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า มะม่วงมีแนวโน้มแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสและโรคเน่าขั้วผลลดลง การสูญเสียน้ำหนักน้อยกว่ามะม่วงที่ไม่ได้อบไอน้ำ แต่การอบไอน้ำทำให้เกิดความเสียหายที่ไม่แสดงให้เห็นจนกว่ามะม่วงจะสุก คือ เกิดจุดสีขาวและทำให้เนื้อมะม่วงเป็นรูพรุน

การรมด้วยไอกรดอะซิติกเป็นวิธีที่นำเสนอให้ใช้เพื่อฆ่าเชื้อในบริเวณที่มีพื้นผิวกว้างของผลไม้ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในผัก (Tripathi และ Dubey, 2004) ส่วนหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในการควบคุมการแพร่ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* หลังการเก็บเกี่ยว (Sholberg และคณะ, 2004) มีรายงานการรมไอกรดอะซิติก 2 หรือ 4 mgl^{-1} เพื่อควบคุมการเน่าเสียของ แอปเปิ้ล องุ่น เชื้อรา กีวี ลูกแพร มะเขือเทศ จากเชื้อรา *B. cinerea* (Sholberg และคณะ, 2004)

2.5.1 การรมไอน้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชูหมักประกอบไปด้วยสารประกอบที่ระเหยได้หลายชนิด ส่วนประกอบหลักที่พบได้แก่ furfural, acetic acid, ethyl acetate, 3-hydroxy-2-butanone, 3-methyl-1-butanol, isopentyl acetate, benzaldehyde และ phenylethyl alcohol (Xiao และคณะ, 2011) ซึ่งมีมากกว่าและแตกต่างจากน้ำส้มสายชูกลั่น (Aurand และคณะ, 1966) การรมไอน้ำส้มสายชูหมักที่มีกรดอะซิติก 4-6% สามารถป้องกันการเน่าเสีย มีความปลอดภัยมากกว่าและยังคงประสิทธิภาพกว่ารมไอกรดอะซิติก (Sholberg และคณะ, 2004) โดยยังคงให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเน่าเสียเมื่อรม 20 ครั้งหรือมากกว่านั้น (Sholberg และคณะ, 2000)

จิราวรรณ ยี่สิบแสน (2552) รายงานการลดเชื้อ *S.* Enteridiidis บนผิวเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก โดยเปรียบเทียบวิธีการจุ่ม สเปรย์และรมไอ ณ อุณหภูมิห้อง พบว่า วิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักไม่ทำให้ลักษณะทางกายภาพของไข่เสียหายแต่จะใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนานที่สุด โดยการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 2% และ 10% ใช้เวลา 6 ชั่วโมงและ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ และไม่พบการปนเปื้อนหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (31±1°C)

ภัทราพรรณ จรูญรัตนสกุล (2553) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* บนผิวสตรอเบอร์รี่สดด้วยการสเปรย์และรมไอน้ำส้มสายชูหมัก พบว่า วิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10% เป็นเวลา 20 นาที ณ อุณหภูมิห้อง สามารถลดการเสื่อมเสียของ

สตรอเบอร์รี่สดจากเชื้อรา *B. cinerea* ได้ถึง 20% โดยที่จะเริ่มแสดงการเสื่อมเสียในวันที่ 9 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C วิธีสเปรย์จะเริ่มแสดงการเสื่อมเสียในวันที่ 7 ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มแสดงการเสื่อมเสียในวันที่ 5 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าว และผลการศึกษาด้านประสาทสัมผัส พบว่า น้ำส้มสายชูหมักกลิ่นสตรอเบอร์รี่ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10% จากสตรอเบอร์รี่สด 20% (w/v) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสตรอเบอร์รี่ที่ไม่ได้รมไอ ซึ่งให้ผลการยอมรับดีกว่าวิธีสเปรย์

ตวงพร โรจนวงศ์ และคณะ (2545) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการติดเชื้อและการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสบนมะละกอพันธุ์ฮาวายหลังการเก็บเกี่ยว โดยใช้ไอที่ได้จากน้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำแอปเปิ้ล น้ำส้มสายชูกลั่นและกรดน้ำส้ม ปริมาตร 5 ml พบว่า สามารถลดการเน่าเสียจาก 100% เป็น 3.4 6.9 และ 10% ตามลำดับ

2.5.2 การรมไอเอทานอล

Corcuff และคณะ (1996) รายงานการรมไอเอทานอลบนบล็อกโคลี่โดยใช้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 1 3 และ 5% (v/v) ในภาชนะบรรจุ 3 ลิตร มีความเข้มข้นของเอทานอลในบรรยากาศ 500 1,000 และ 2,500 ppm (± 10-15%) ในสภาวะป้องกันการรวมตัวของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และการขาดออกซิเจน ความชื้นสัมพัทธ์ใกล้เคียง 100% ปรับความสมดุลระหว่างเอทานอลในน้ำและอากาศ 3-5 ชั่วโมงหลังจากปิดภาชนะ ใช้เวลาในการรม 12 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 13°C เป็นเวลา 6 วัน โดยเปลี่ยนสารละลายเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน พบว่ามีเพียงเอทานอลที่มีความเข้มข้น 2,500 ppm ในบรรยากาศเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ คำนวณดัชนีความรุนแรงของเชื้อราจากการให้คะแนน โดยใช้รัศมีของโคโลนีเป็นเกณฑ์ นอกจากนี้ยังพบว่าทำให้ผักยังคงความเขียวได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์เนื่องจากมีเอทานอลในเนื้อเยื่อสูง

Suzuki และคณะ (2004) รายงานการเก็บรักษาบล็อคโคลี่ด้วยผงเอทานอล 0 3 6 และ 12 กรัม ที่อุณหภูมิ 20°C พบว่าผงเอทานอล 6 และ 12 กรัมทำให้บล็อคโคลี่มีกลิ่นที่ผิดปกติ ความอ่อนนิ่มและสีเขียวเข้มขึ้นในหลังการ แต่หากใช้เอทานอลในปริมาณ 3 กรัม กลับช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเนื่องจากจะระงับการสร้างเอทิลีนโดยไปยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดสของ 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid

กฤษฎา บุตรพลอย และ ดนัย บุณยเกียรติ (2545) รายงานการรมไอระเหยของเอทานอลบนส้มเขียวหวานที่ความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสามารถชะลอการเข้าไปทำลายของเชื้อรา *Penicillium* spp. ที่ทำให้เกิดโรคเน่าราสีเขียวได้นาน 4.25 วัน โดยไม่ทำให้เกิดบาดแผลที่ผิวซึ่งจะส่งผลต่อการเปลี่ยนสีของผิวส้ม และไม่ส่งผลต่อปริมาณวิตามินซีในส้ม

Lihandra (2007) รายงานผลการรมไอเอทานอล 70% - 100% นาน 30 วินาที ในผลพีช สามารถป้องกันเชื้อราได้ถึง 30 วันหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°C หรือที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งป้องกันได้ 2-3 วัน แต่ทำให้เกิดสีน้ำตาลอย่างรุนแรง ในทางตรงกันข้ามเมื่อรมที่ 20% สามารถป้องกันได้ 10 วันเมื่อเก็บรักษาที่ 4°C และ 2 วันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ทำให้เกิดสีน้ำตาล เมื่อเปรียบเทียบกับการจุ่มผลพีชด้วยเอทานอลความเข้มข้น 20 และ 100% ซึ่งให้ประสิทธิภาพไม่ดีเท่ากับการรมไอ แต่ไม่ทำให้เกิดสีน้ำตาลและเกิดการเน่าเสียหลังการเก็บรักษา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

Daifas และคณะ (2007) รายงานผลของไอเอทานอลต่อการควบคุมการเจริญและสร้างสารพิษของ *C. butulinum* ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่มีความชื้นสูง (crumpet) ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) โดยผลิตภัณฑ์บรรจุในถุงที่มีอัตราการแลกเปลี่ยนเอทานอล 0.21 $g/m^2/day$ โดยใช้ไอเอทานอล ที่มีชื่อทางการค้าว่า Ethicap 2 4 และ 6 กรัม กับถุงผ้าที่อิ่มตัวด้วย 2 4 และ 6 กรัมของเอทานอล 95% พบว่า Ethicap 4 และ 6 กรัม กับ ถุงผ้าที่อิ่มตัวด้วย 2 4 และ 6 กรัมของเอทานอล 95% สามารถควบคุมการเจริญและสร้างสารพิษของ *C. butulinum* ได้อย่างสมบูรณ์ คือ มากกว่า 21 วัน เปรียบเทียบกับตัวควบคุมซึ่งสามารถควบคุมได้ 5 วัน

Siddiqui และคณะ (2005) ศึกษาการรมไอเอทานอลบริสุทธิ์และไอกรดอะซิติก เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและการรมไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที พบว่าทุกวิธีมีผลต่อการลดการสร้างโคโลนีของเชื้อราและกำจัดเชื้อโคลิฟอร์มที่ผิวของผลฝรั่ง โดยการรมไอเอทานอลบริสุทธิ์ให้ผลดีที่สุดคือเป็นวิธีเดียวที่สามารถยืดอายุผลฝรั่ง เสียน้ำหนักน้อยกว่าและเนื้อแน่นกว่า

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

ผักชีทั้งต้น (รวมราก) จากตลาดในเขตมีนบุรีและลาดกระบัง เพื่อใช้ในการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และผักชีทั้งต้น (รวมราก) จากตลาดหัวตะเข้ (เขตลาดกระบัง) จ.กรุงเทพมหานคร เพื่อใช้ในการทดลองการรมไอ

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

		รุ่น	บริษัท	ประเทศ
3.2.1	หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	SS-245	Tomy	Germany
3.2.2	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Dragon 3002	Mettler Toledo	Switzerland
3.2.3	ตู้อบฆ่าเชื้อ	UL50	Memmert	Germany
3.2.4	ตู้บ่มเพาะเชื้อ	B30	Memmert	Germany
3.2.5	ตู้เขี่ยเชื้อ	BS24 9BP	Bio safety	UK
3.2.6	เครื่องเขย่าผสม	G-560 E	Scientific	U.S.A
3.2.7	เครื่องตีป่น	BA 7021	Seward	UK
3.2.8	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	CG841	Schott gerate	Germany
3.2.9	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	JSM-5410LV	JEOL	Japan
3.2.10	ชุดกล่องรมไอขนาดปริมาตร 0.015 m^3 และเครื่องปั๊ม			ไทย
3.2.11	ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	Certomat® H	Satorios	Germany
3.2.12	ไฮโกรมิเตอร์		SK Sato	Japan
3.2.13	กระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 mm		Whatman	England
3.2.14	เวอร์เนียร์แคลลิปเปอร์			
3.2.15	ไมโครปิเปต		Gilson	France
3.2.16	เครื่องแก้ว			

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัท	ประเทศ
3.3.1 Tryptic Soy Agar (TSA)	Himedia	India
3.3.2 Tryptic Soy Broth (TSB)	Himedia	India
3.3.3 Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST)	Merck	Germany
3.3.4 Brillient Green Bile (BGB)	Merck	Germany
3.3.5 EC broth	Merck	Germany
3.3.6 MacConkey Agar (MCA)	Himedia	India
3.3.7 Mueller Hinton Agar (MHA)	Himedia	India
3.3.8 Peptone	Merck	Germany
3.3.9 ชุดทดสอบสำเร็จรูป rapid ID 32 E	BioMerieux	France

3.4 สารเคมี

	บริษัท	ประเทศ
3.4.1 น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโพด (Corn Vinegar) เข้มข้น 10%	My Garden	ไทย
3.4.2 แอลกอฮอล์ 70% และ 90%	Sigma	Malaysia
3.4.3 ชุดทดสอบสำเร็จรูป rapid ID 32 E สำหรับกลุ่ม Enterobacteriaceae	BioMerieux	France
3.4.4 *Klebsiella* Selective Supplement (Carbinicillin)	Fluka	Switzerland
3.4.5 Myo-inositol	Fluka	Switzerland

3.5 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากตัวอย่างผักชี ที่ตรวจยืนยันด้วย rapid ID 32 E (BioMerieux) โดยหยดสารละลายเชื้อลงบนชุดทดสอบ ผสมเชื้อให้เข้ากันกับสารในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลตามคู่มือการใช้แล้วทำผลที่ได้ป้อนในโปรแกรมสำเร็จ apiweb (BioMerieux)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชี (Background flora)

สุ่มเก็บตัวอย่างผักชีเขตมีนบุรีและลาดกระบัง รวม 30 ตัวอย่าง เก็บโดยใช้ถุงพลาสติกที่สะอาดและปราศจากเชื้อ และควบคุมสภาวะการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการทดลองด้วยกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง และดำเนินการตรวจสอบภายหลังจากเก็บตัวอย่างภายในเวลา 6 ชั่วโมง ดังนี้

3.6.1.1 เตรียมตัวอย่างโดยล้างผักชีด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อกำจัดดินและสิ่งแปลกปลอมออกในเบื้องต้น ผึ่งให้แห้งในถาดที่วางในตู้เขี่ยเชื้อ ตัดผักชีออกเป็นท่อนๆโดยใช้ทั้งใบ ลำต้นและราก สุ่มมาชั่งน้ำหนัก 25 g เติมสารละลายเปปโตน 0.1% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 225 ml ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางสิบเท่า (ten fold dilution) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 ml ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน 0.1% 9 ml

3.6.1.2 ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มโคลิฟอร์มและฟีคอลโคลิฟอร์มเบื้องต้นด้วยวิธี Presumptive coliform และ Presumptive faecal coliform ตามลำดับ ตามวิธีการของ USDA (2008) (ภาคผนวก ข)

3.6. 1.3 นำเชื้อ dilution สุดท้ายจากการทดสอบข้อ 3.6.1.2 มา streak ลงบน MacConkey Agar (MCA) เพื่อดูลักษณะโคโลนีและการหมักน้ำตาลแลกโตส นำลักษณะโคโลนีที่พบมากที่สุดไปทดสอบทางชีวเคมี และยืนยันสปีชีส์ของเชื้อที่พบมากที่สุดในการสำรวจผักชีด้วยชุดทดสอบสำเร็จ rapid ID 32 E โดยหยดสารละลายเชื้อลงบนชุดทดสอบ ผสมเชื้อให้เข้ากันกับสารในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลตามคู่มือการใช้แล้วทำผลที่ได้ป้อนในโปรแกรมสำเร็จ apiweb (BioMerieux)

3.6.1.4 ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในผักชี ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และปริมาณเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MCIC (ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC ที่เติม Inositol และ Carbinicillin ตามภาคผนวก ก) จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยวิธีตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.1

3.6.2 การเตรียมเซลล์ *K. pneumoniae*

3.6.2.1 เขี่ยเชื้อ *K. pneumoniae* บริสุทธิ์จากอาหาร TSA slant ลงในอาหาร TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาถ่ายเชื้อปริมาตร 1 ml ลง TSB 10 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ซ้ำอีกครั้ง จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้นของเซลล์เป็น 9 log CFU/ml ยืนยันความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้โดยการตรวจนับโคโลนีด้วยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เลือกนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่อยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี

3.6.2.2 เก็บรักษาเชื้อโดยใน TSA slant ที่อุณหภูมิ 2-5 °C เพื่อใช้เป็น stock culture ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA slant เดือนละหนึ่งครั้งระหว่างทดลอง ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีโดยทดสอบ IMVIC test และ MCA เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยใช้เชื้อ *K. pneumoniae* โคโลนีเดี่ยวที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

3.6.3 การศึกษาและเปรียบเทียบผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอล และผลของไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วม ต่อการการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับห้องปฏิบัติการ

3.6.3.1 ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

นำสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5% ตามลำดับ หาค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละความเข้มข้น นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2 มาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ให้อยู่ในระดับ 6 log CFU/ml หาความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *K. pneumoniae* ตามวิธีของ จิราวรรณ ยี่สิบแสน (2552) โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA 10 ml ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม 5 ml ที่มีการเติมสารละลายเชื้อ *K. pneumoniae* 20 µl ทำการ pour plate เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เขียนระบุตำแหน่งที่วางแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.00 mm ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ คีบแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ วางตรงตำแหน่งที่ระบุ หยดน้ำส้มสายชูหมักที่จะทดสอบแต่ละความเข้มข้น 0 1 2 3 4 5 และ 10% ปริมาตร 20 µl ลงบนกระดาษกรอง ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปบ่ม โดยหงายจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1 °C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียร์แคลลิปเปอร์วัดโซนยับยั้ง ซึ่งมีลักษณะใส (inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษกรองที่หยดน้ำส้มสายชูหมัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำช่วงความเข้มข้นระหว่างการเกิดและไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.6.3.2 ความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

เจือจางเอทานอลความเข้มข้น 95% ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 70 80 และ 90% ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.3.1

3.6.3.3 ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในหลอดทดลอง โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลาย

นำน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% มาเตรียมสารละลายน้ำส้มสายชูหมักในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม (ช่วงระหว่างการเกิดและไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อ) ที่ได้จากข้อ 3.6.3.1 ให้มีช่วงห่างของความเข้มข้นหลอดทดลองละ 0.1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยการคำนวณปริมาตรจากน้ำส้มสายชูหมักซึ่งมีกรด อะซิติก 10% ให้มีความเข้มข้นต่างๆและมีปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ml ต่อ 1 หลอดทดลอง นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2 มาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ให้อยู่ในระดับ 10^7 CFU/ml จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อ *K. pneumoniae* ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดแต่ละความเข้มข้น จะทำให้ได้เชื้อในหลอดทดลองอยู่ในระดับ 6 log CFU/ml (ดัดแปลงจาก Kudkeaew และ Krusong, 2007) (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก) บ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 และ 10 นาที ตามลำดับ ทำการตรวจนับเชื้อด้วยวิธี pour plate บนอาหาร TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.3.4 ความเข้มข้นของเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในหลอดทดลอง โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลาย

เตรียมสารละลายเอทานอลจากเอทานอลความเข้มข้น 95% ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม (ช่วงระหว่างการเกิดและไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อ) ซึ่งได้จากข้อ 3.6.3.2 โดยมีช่วงห่างความเข้มข้นหลอดทดลองละ 1% ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.3.3

3.6.3.5 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักต่อเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ TSA

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2 มาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ดูดสารละลายเชื้อปริมาตร 0.1 ml ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เกลี่ยเชื้อด้วยวิธี Spread plate ให้ได้เชื้อในจานเพาะเชื้อ 4 log CFU/plate นำไปวางในกล่องที่อิ่มตัว (ทราบจากความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดจนคงที่) ด้วยไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 10% รมเป็นเวลา 0 10 20 30 40 50 และ 60 นาที ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 5 เพลท เมื่อครบเวลาตามกำหนด นำจานเพาะเชื้อที่รมไอแล้วผึ่งให้แห้งในตู้ laminar flow 5 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ตรวจนับ

ปริมาณเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูในเวลาต่างๆ โดยนับโคโลนีในพื้นที่ 1 ตร.ซม.ของจานเพาะเชื้อ นับทั้งหมด 10 ตร.ซม. หาค่าเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตร.ซม.และคูณด้วยพื้นที่จานเพาะเชื้อทั้งหมด นำผลจาก 5 เพลทมาหาค่าเฉลี่ยต่อเพลท ได้ออกมาเป็นจำนวนโคโลนี หน่วย CFU/plate เปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ ที่ไม่ได้รมไออิ่มตัวน้ำส้ม สายชูหมักเป็นตัวอย่างควบคุม ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำระยะเวลาที่ทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติไปพิจารณาใช้ในการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักในผักชีต่อไป

3.6.3.6 ระยะเวลารมไออิ่มตัวเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ TSA

ทำการทดลองลักษณะเดียวกันกับข้อ 3.6.3.5 แต่นำจานเพาะเชื้อไปวางในกล่องที่อิ่มตัวด้วยไอเอทานอล 95% รมเป็นเวลา 0 5 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ

3.6.3.7 ระยะเวลาและลำดับการรมไออิ่มตัวสารร่วม (ไอน้ำส้มสายชูหมักและไอเอทานอล) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ TSA

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ (1) การรมไออิ่มตัวสารร่วมแบบพร้อมกัน (2) แบบไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักแล้วตามด้วยไออิ่มตัวเอทานอล และ (3) แบบไออิ่มตัวเอทานอลตามด้วยไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ โดยทำการทดลองลักษณะเดียวกันกับข้อ 3.6.3.5

การรมไออิ่มตัวสารร่วมแบบพร้อมกัน ทำโดยปล่อยไอจากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดซิติก 10% และไออิ่มตัวจากเอทานอล 95% เข้าไปในกล่องจนอิ่มตัว นำจานเพาะเชื้อไปวางรมไออิ่มตัวเป็นเวลา 0 5 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ

การรมไออิ่มตัวสารร่วมแบบตามลำดับ ทำโดยนำจานเพาะเชื้อไปวางรมไอในกล่องที่อิ่มตัวด้วยสารรมชนิดหนึ่งตามเวลาที่เหมาะสมของสารชนิดนั้นจากการทดลองก่อนหน้า เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำจานเพาะเชื้อไปรมต่อทันทีในกล่องที่อิ่มตัวด้วยไอของสารอีกชนิดหนึ่งของสารชนิดนั้นจากการทดลองก่อนหน้า

เปรียบเทียบระยะเวลาการรมไออิ่มตัวสารร่วมทั้ง 3 วิธีที่ให้ผลในการยับยั้งที่ดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการรมไอผักชีขั้นต่อไป

3.6.4 การสร้างการปนเปื้อนเซลล์ของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี (ดัดแปลงจาก ภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552)

คัดเลือกผักชีที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน ล้างผักชีด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 l ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง สะบัดน้ำเบา ๆ ผึ่งให้แห้งบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลา 30 นาที จุ่มแช่

ผักชีในถุงพลาสติกที่มีสารละลายเชื้อ *K. pneumoniae* โดยเตรียมสารละลายเชื้อ *K. pneumoniae* ให้เป็น 5 และ 7 log CFU/g เป็นเวลา 5 นาที สะบัดน้ำเบา ๆ จากนั้นผึ่งให้แห้งบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 10 นาทีหรือจนกว่าจะไม่เห็นหยดน้ำติดที่ผัก จะได้เชื้อ *K . pneumoniae* ติดที่ผัก 4 และ 6 log CFU/g ตามลำดับ เพื่อเป็นตัวแทนเชื้อระดับที่พบทั่วไปตามธรรมชาติและในระดับสูง ตามลำดับ

3.6.5 ศึกษาระยะเวลาและลักษณะปรากฏของการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วม โดยวิธีไม่ปรับและปรับความชื้นสัมพัทธ์ต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี

เนื่องจากการรมไออิ่มตัวโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์เช่นในการทดลองในจานเพาะเชื้อ TSA เป็นวิธีที่ไอของสารที่มีความเข้มข้นสูงสัมผัสโดยตรงกับผักชี ซึ่งอาจทำให้ลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงไป การทดสอบต่อไปจึงเพิ่มการทดลองการเจือจางไอของสารด้วยไอน้ำเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อลดการเปลี่ยนสภาพของผักชีและความชื้นลง โดยเปรียบเทียบผลของวิธีปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ต่อประสิทธิภาพการยับยั้ง และลักษณะปรากฏณ์ของผักชีควบคู่กัน โดยการศึกษาถูกแบ่งการปนเปื้อนของเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นสองระดับ คือปริมาณเชื้อที่พบทั่วไปตามธรรมชาติ (4 log CFU/ml) และในปริมาณสูง (6 log CFU/ml) โดยวิธีไม่ปรับและปรับความชื้น ทำการรมไอโดยใช้ผักชีทั้งต้น รวมรากประมาณ 40 กรัม ต่อกล่อง

3.6.5.1 ศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

3.6.5.1.1 ศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

เตรียมผักชี ตามข้อ 3.6.4 วางผักชีในกล่องที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำส้มสายชูหมัก ความเข้มข้น 10% โดยเพิ่มระยะเวลาขึ้นเป็น 1 2 3 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ laminar flow เป็นเวลา 5 นาที นำไปตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเชื้อเหลือรอดเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.1 โดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 ml ลงบน MCIC เกลี่ยเชื้อด้วย Spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณเชื้อ *K. pneumoniae* โดยนับเฉพาะโคโลนีที่เป็นลักษณะของเชื้อ *K. pneumoniae* จากอาหาร MCIC เปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่สร้างการปนเปื้อนแต่ไม่ได้รมไอเป็นตัวอย่างควบคุม เพื่อทราบถึงระยะเวลาที่ทำให้ *K. pneumoniae* ในผักชีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.6.5.1.2 ศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวเอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับข้อ 3.3.6.1 แต่รมไออิ่มตัวเอทานอล 95%

3.6.5.1.3 ศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับข้อ 3.3.6.1 แต่รมไออิ่มตัวสารทั้งสองชนิดโดยใช้วิธีการรมที่เหมาะสม (จากข้อ 3.6.3.7) โดยรมสารแต่ละชนิดในระยะเวลาที่เหมาะสมจากผลข้อ 3.6.5.1.1 และ 3.6.6.1.2

3.6.5.2 ศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์

ทำลักษณะเดียวกับข้อ 3.6.5.1 แต่มีการเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 l ไว้ที่ก้นกล่องรม วัด % ความชื้นสัมพัทธ์ด้วย hygrometer

3.6.5.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งและลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรมไออิ่มตัวไออิ่มตัว

โดยเปรียบเทียบผลของไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมในผักชีโดยวิธีไม่ปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* และลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรมไออิ่มตัวต่อความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้

3.6.6 ศึกษาโครงสร้างผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายหลังการเก็บรักษา

3.6.6.1 ศึกษาโครงสร้างของผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae*

ส่งตัวอย่างใบผักชีทั่วไปและผักชีที่จำลองการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ไปตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อศึกษาโครงสร้างของผักชีที่มีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) โดยศึกษาโครงสร้างของใบผักชีตามธรรมชาติที่มีผลต่อการเกาะติดของเชื้อ *K. pneumoniae* และการเกาะติดของเชื้อหลังการล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง

3.6.6.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายหลังการเก็บรักษา

3.6.6.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายหลังการเก็บรักษา

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของผักชี ได้แก่ การเน่าเสีย สี กลิ่น ความสดและลักษณะทั่วไป ในรูปคะแนน (ดัดแปลงจาก ภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552) หลังผ่านการรมไอที่อุณหภูมิห้อง บรรจุผักชีน้ำหนักประมาณ 30 กรัมในถุงพลาสติกโพลีโพพิลีนใส ขนาด 5×14 นิ้ว ไม่เจาะรูและเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 10°C ในวันที่ 0 3 5 7 ตามลำดับ ระดับคะแนนของกลิ่นแบ่งเป็นหลังรมทันทีและผ่านการล้างหลังรมเปรียบเทียบกับผักชีที่ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อแต่ไม่ผ่านการรมไอและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C เป็นตัวควบคุม ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.7 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ทำการออกแบบการทดลองแบบ Complete Ramdomized Design (CRD) ในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบ Ramdomized Completely Block Design (RCBD) ในการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลบนผักชี และแบบ Factorials in RCBD ในการทดสอบปัจจัยในการรมไออิ่มตัวของสารร่วมในระดับหลอดทดลองและในผักชี นำผลการทดสอบที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS Version 11.5 จากนั้นนำค่าเฉลี่ยมาทำการเปรียบเทียบ ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชี (Background flora)

จากการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชีทั้งต้น (ที่เอาดินออก) ในเขตมีนบุรีและลาดกระบัง ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2554 จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยทดสอบวิธี Presumptive coliform ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brillient Green Bile (BGB) และทดสอบวิธี Presumtive faecal coliform ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว EC broth ในระดับการเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} พบว่า จำนวนตัวอย่างผักชีที่มีโคลิฟอร์มเกิน 11,000 MPN/g มีจำนวน 22 ตัวอย่าง และในจำนวนนี้เป็นฟีคอลโคลีฟอร์มที่มีปริมาณมากกว่า 11,000 MPN/g ถึง 16 ตัวอย่าง

เมื่อนำลูปแตะเชื้อจาก dilution สุดท้าย BGB และ EC broth ไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar (MCA) จากนั้นนำโคโลนีลักษณะต่างๆที่พบไปทดสอบทางชีวเคมี โคลีฟอร์มที่ได้จากวิธี Presumptive coliform และ Presumtive faecal coliform เฉลี่ยพบว่าเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (93.3%) *Pseudomonas* spp. (43.3%) และ *Citrobacter freundii* (23.3%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แต่ *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบทั่วไปในผักและสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ แต่ไม่ใช่กลุ่มโคลิฟอร์มเนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลและสร้างแก๊ส (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ส่วนเชื้อ *Ci. freundii* เป็นโคลิฟอร์มที่พบไม่สูงมาก จากการทดสอบทั้ง 2 วิธีชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่พบมากที่สุดในผักชีคือ *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นฟีคอลโคลิฟอร์ม สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae* ดังกล่าวได้ผ่านยืนยันผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ rapid ID 32 E (BioMerieux, France) สำหรับกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีการจำแนกเชื้อโดยใช้โปรแกรมซอฟแวร์ประมวลผล ซึ่งระบุว่าเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ssp pneumoniae ที่ความเชื่อมั่น 96.7% (ภาคผนวก ง)

สำหรับการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผักชีโดยวิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) และ MCA นั้นพบว่า มีจุลินทรีย์ทั้งหมด 6.56-7.95 CFU/g เฉลี่ย 7.27 (±0.03) log CFU/g เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* 3.00-6.02 log CFU/g (คิดเป็น 43.4-84.0% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด) หรือเฉลี่ย 4.52 (±0.69) log CFU/g (คิดเป็น 62.2% ของแบคทีเรียทั้งหมด) (ภาคผนวก ง) สอดคล้องกับงานวิจัยของ รัชพล พรรษา และ สราวุธ มณี (2549) ที่พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผักชีเท่ากับ 7.6 log CFU/g และ ภัทราวดี ศรีปัญญา และ บุษกร ทองใบ (2553) ที่พบโคลิฟอร์ม 5.74 log CFU/g และสอดคล้องกับรายงานของ Wright และคณะ (1976); Soriano และคณะ (2000); Soriano และคณะ (2001) และ Rajvanshi (2010) ที่กล่าวว่า เกือบ 50% ของผักโดยทั่วไปจะพบเชื้อ *K. pneumoniae* ประมาณ 10^3 CFU/g

ตารางที่ 4.1 ชนิดแบคทีเรียที่พบมากเป็น 3 อันดับแรกในการสำรวจผักชีทั้งต้น เขตมีนบุรีและลาดกระบัง จำนวน 30 ตัวอย่าง

แบคทีเรีย	จำนวนตัวอย่างที่พบจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว		% ที่พบในตัวอย่าง (%)	การทดสอบยืนยัน
	BGB	EC		
Klebsiella pneumoniae	28/30	28/30	93.3	API rapid ID 32 E
Pseudomonas spp.	15/30	11/30	43.3	catalase/ oxidase test
Citrobacter freundii	8/30	6/30	23.3	API rapid ID 32 E

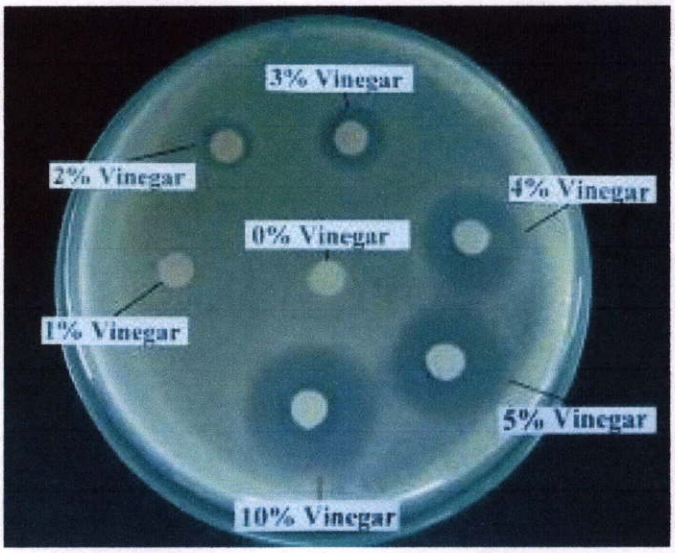
จากการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCIC พบว่าผักชีมีเชื้อ *K. pneumoniae* เฉลี่ย 4 log CFU/g เมื่อแยกส่วนต่างๆของผักชีออกเป็น ใบ ก้านและราก พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่พบในแต่ละส่วนมีปริมาณเฉลี่ย 4.28 4.80 และ 4.84 log CFU/g ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกัน การสำรวจนี้ได้ทำขึ้นในช่วงฤดูหนาวซึ่งจะพบปริมาณเชื้อต่ำกว่าฤดูฝน (Golberg และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่หรือล้างผักชีทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลงได้เพียงปริมาณหนึ่งเท่านั้น (ภาคผนวก ง)

4.2 การศึกษาและเปรียบเทียบผลของสารละลายน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอล และผลของไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับห้องปฏิบัติการ

4.2.1 ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

ในการศึกษานี้ ใช้หลักการแพร่โดยน้ำส้มสายชูหมัก (กรดอะซิติก) ที่เติมลงบนกระดาษกรอง ซึ่งวางไว้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มีปริมาณของสารละลายเชื้อเริ่มต้นเฉลี่ย 7.7 log CFU/ml ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้นกรดอะซิติก 7 ระดับ คือ 0 1 2 3 4 5 และ 10% (v/v) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) บ่งบอกถึงความสามารถของน้ำส้มสายชูหมักแต่ละระดับความเข้มข้นของกรดที่จะยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ผลการยับยั้งแสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่าน้ำส้มสายชูหมักที่มีความเข้มข้นกรดอะซิติกต่ำ 0 และ 1% (v/v) ไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* แต่เมื่อทดสอบด้วยน้ำส้มสายชูหมักที่มีความเข้มข้น

กรดอะซิติกตั้งแต่ 2 ถึง 5% (v/v) และ 10% (v/v) สามารถเกิดโซนยับยั้งที่มีความกว้างเพิ่มขึ้นตามลำดับจนถึงน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดสูงสุด โดยระดับความเข้มข้น 2 3 4 5 และ 10% (v/v) ทำให้เกิดโซนยับยั้งที่มีขนาดความกว้าง 9.33 11.68 14.23 17.61 และ 21.22 mm ตามลำดับ (ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางกระดาษกรอง 6.00 mm) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งผลการเกิดโซนยับยั้งระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกตั้งแต่ 2 ถึง 5% (v/v) และ 10% (v/v) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 4.1 ขนาดโซนยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ด้วยน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกต่างๆ (% v/v) เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งตามตารางที่ 4.2 พบว่าน้ำส้มสายชูหมักระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกที่สูงสุด 10% (v/v) หรือน้ำส้มสายชูหมักตั้งต้นให้โซนยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้สูงสุดคือ 21.22 mm

รายงานของ จิราวรรณ ยี่สิบแสน (2552) กล่าวว่าน้ำส้มสายชูหมักระดับความเข้มข้นกรดอะซิติก 5% (v/v) เกิดโซนยับยั้งเชื้อ *S.* enteritidis 17.71 mm ให้ผลใกล้เคียงกับโซนยับยั้งที่พบจากเชื้อ *K. pneumoniae* 17.61 mm (จากตารางที่ 4.2) Burt และคณะ (2007) กล่าวว่าขนาดของโซนยับยั้งในการทดลองขึ้นอยู่กับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในจานเพาะ ระยะเวลาการสัมผัสไอ อุณหภูมิและปริมาตรสารที่ใช้ในการรมไอ

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยขนาดโซนยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำส้มสายชูหมักในระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกต่างๆ

น้ำส้มสายชูหมัก ความเข้มข้นกรด (%)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ขนาดโซนยับยั้ง* (mm)
0	6.9	$6.00^{f} \pm 0.00$
1	4.0	$6.00^{f} \pm 0.00$
2	3.6	$9.33^{e} \pm 0.39$
3	3.4	$11.68^{d} \pm 0.24$
4	2.8	$14.23^{c} \pm 0.52$
5	2.7	$17.61^{b} \pm 0.38$
10	2.5	$21.22^{a} \pm 0.92$

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

เนื่องจากที่ความเข้มเข้มข้นกรดอะซิติก 1% ไม่เกิดโซนยับยั้ง แต่ 2% (v/v) ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธีนี้ ซึ่งเป็นวิธีศึกษาเบื้องต้น ประกอบกับที่ความเข้มเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 2 และ 3% (v/v) แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาถึงประสิทธิภาพการยับยั้งของน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้นกรดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติกจากน้ำส้มสายชูหมักอย่างละเอียดใน ช่วง 1-3% (v/v) ในหลอดทดลองเพื่อยืนยันความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ต่อไป

4.2.2 ความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

วิธีการทดสอบนี้ใช้หลักการแพร่โดยเอทานอลที่เติมลงบนกระดาษกรอง ซึ่งวางไว้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แต่เนื่องจากเอทานอลเป็นสารที่ระเหยได้เร็วและง่าย จึงไม่ปรากฏโซนยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในทุกระดับความเข้มข้นของเอลกอฮอล์ที่ทดสอบ วิธีนี้ไม่เหมาะสมต่อการหาความเข้มข้นของเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จึงควรทดสอบด้วยวิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลายในหลอดทดลองเท่านั้น

4.2.3 ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลาย

สารละลายเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ใช้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.26 log CFU/ml โดยถ่ายลงในสารละลายน้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้นกรดตั้งแต่ 1.0-3.0% (v/v) โดยเพิ่มความเข้มข้นละ 0.1% ซึ่งในระบบ *in vitro* นี้ทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* สัมผัสสารละลายน้ำส้มสายชูหมักโดยตรง (direct contact) เป็นเวลา 10 นาที พบว่าทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ โดยความเข้มข้นกรด 2% (v/v) สามารถยับยั้งเชื้อได้ *K. pneumoniae* ได้ 1 log cycle (การยับยั้ง 16.4%) และความเข้มข้นกรด 2.2% (v/v) ทำให้เชื้อลดลงอย่างฉับพลันเหลือ 2.86 log CFU/ml (การยับยั้ง 54.4%) และความเข้มข้นกรด 2.4% (v/v) ขึ้นไปให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Yu และ Saddler (1982) ที่รายงานว่ากรด อะซิติกจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* เมื่อมีความเข้มข้นกรดมากกว่า 1% (v/v) และสอดคล้องกับรายงานของสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และคณะ (2549) ที่รายงานว่าน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2.0% สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae ได้และจัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์มเช่นเดียวกับ *K. pneumoniae*

เมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มมากขึ้นทำให้ค่า pH ลดลงและมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *K. pneumoniae* ได้สูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ผลแสดงให้เห็นว่าค่า pH ที่ต่ำกว่า 3.59 ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์

กรดอะซิติกเป็นกรดอินทรีย์หรือกรดอ่อน ที่แตกตัวได้ไม่หมด ผลการทำลายเชื้อของกรดขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์กรดที่ไม่แตกตัว เมื่อความเข้มข้นกรดเพิ่มขึ้นจะมีปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวสูงขึ้น (Adams และ Hall, 1988) ซึ่งกรดอะซิติกที่ไม่แตกตัวนี้เป็นปัจจัยหลักในการทำลายเชื้อ *K. pneumoniae* เนื่องจากโมเลกุลของกรดที่ไม่แตกตัวจะสามารถละลายไขมัน (lipophilic Layer) ที่อยู่ในชั้นผนังเซลล์ แทรกซึมแล้วเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เข้าไปในเซลล์ได้ (Mills และคณะ, 2009 ; Roe และคณะ, 1998 ; Garbutt, 1997) ทำให้ค่ากรด-ด่างภายในเซลล์ลดลง ส่งผลต่อการเมทาบอลิซึม การทำงานของเอนไซม์ โปรตีน การสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดปกติ และเกิดแรงดันภายในเซลล์ ยิ่งภายนอกเซลล์มี pH ต่ำมากเท่าใด เซลล์ก็ยิ่งทำงานหนักในการใช้พลังงานขับไล่ประจุออกจากเซลล์ ถ้า pH ในเซลล์ลดลงถึงจุดๆหนึ่ง การเจริญช้าลง และถ้าเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมให้กลับสู่สภาพเดิมได้ จะทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545 ; Mills และคณะ, 2009 ; Roe และคณะ, 1998 ; Garbutt, 1997) ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นทำให้ปริมาณของกรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ความสามารถของกรดอะซิติกในการยับยั้งจุลินทรีย์จะแปรเปลี่ยนไปตามผลิตภัณฑ์อาหาร สิ่งแวดล้อมและชนิดของจุลินทรีย์ (ศิวาพร ศิวเวชช, 2535)

ตารางที่ 4.3 ค่า pH จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สัมผัสโดยตรงกับสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0-3.0% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C)

ความเข้มข้นกรดในน้ำส้มสายชูหมัก (%)	pH	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
0.0	7.25	$6.26^{a} \pm 0.02$	0.0
1.0	4.03	$6.22^{a} \pm 0.05$	0.7
1.1	3.96	$6.20^{a} \pm 0.04$	0.9
1.2	3.93	$6.18^{ab} \pm 0.04$	1.4
1.3	3.89	$6.14^{ab} \pm 0.09$	1.9
1.4	3.86	$6.10^{ab} \pm 0.10$	2.6
1.5	3.82	$6.07^{ab} \pm 0.09$	3.0
1.6	3.80	$6.02^{ab} \pm 0.16$	3.8
1.7	3.77	$6.01^{ab} \pm 0.17$	4.1
1.8	3.74	$5.94^{ab} \pm 0.22$	5.1
1.9	3.71	$5.84^{b} \pm 0.16$	6.8
2.0	3.69	$5.23^{c} \pm 0.43$	16.4
2.1	3.67	$4.58^{d} \pm 0.20$	26.9
2.2	3.64	$2.86^{e} \pm 0.02$	54.4
2.3	3.61	$0.33^{f} \pm 0.58$	94.7
2.4	3.59	ND^{f} **	100.0
2.5	3.57	ND^{f}	100.0
2.6	3.56	ND^{f}	100.0
2.7	3.54	ND^{f}	100.0
2.8	3.51	ND^{f}	100.0
2.9	3.50	ND^{f}	100.0
3.0	3.49	ND^{f}	100.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ND (not detected) หมายถึง ไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.4 ความเข้มข้นของเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลาย

ปริมาณเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ใช้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.24 log CFU/ml โดยถ่ายลงในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 10-20% (จากผลการทดลองเบื้องต้น) โดยเพิ่มความเข้มข้นละ 1% ซึ่งสัมผัสเซลล์โดยตรง (direct contact) เป็นเวลา 10 นาที พบว่าทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ โดย เอทานอล 10-11% สามารถยับยั้งได้ 1 log cycle (ประมาณ 16%) เอทานอล 16% ทำให้เชื้อลดลงเหลือ 3.11 log CFU/ml (การยับยั้ง 50.2%) เอทานอล 17% (v/v) ทำให้เชื้อลดลงอย่างฉับพลันเหลือ 0.20 log CFU/ml (การยับยั้ง 96.8%) และเอทานอล 18% (v/v) ขึ้นไปให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) ผลแสดงในตารางที่ 4.4 ต่างจากการทดลองของ Yu และ Saddler (1982) ที่สรุปว่าเอทานอลที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1 % (w/v) จะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* 45% หลังการเจริญ 24 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงในสารอาหารแม้ว่าจะมีน้ำตาลสูงก็ตาม

เอทานอลมีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเสียน้ำของเซลล์ (dehydration effect) ส่งผลต่อการรอดของจุลินทรีย์ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538) โดยทั่วไปเมื่อเซลล์แบคทีเรียแกรมลบสัมผัสกับเอทานอล เอทานอลจะซึมผ่านเข้าไปในชั้นไขมัน เกิดการตอบสนองที่ชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หากมีความเข้มข้นต่ำเซลล์จะสามารถปรับเปลี่ยนสัดส่วนระหว่างกรดไขมัน นอกจากนี้ยังมียีนส์สร้างปั๊ม (efflux pump) ทำให้ต้านทานต่อแอลกอฮอล์ได้ดี แต่หากเซลล์สัมผัสกับเอทานอลในปริมาณสูง เอทานอลจะสามารถเข้าไปในเซลล์ ตัวปั๊มต้องการใช้พลังงานในการขับสารพิษออกมากขึ้นและเกิดการทำลายส่วนประกอบต่างๆภายในเซลล์ที่เป็นโปรตีนตกตะกอนเสียสภาพ (Segura และคณะ, 2012) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเอทานอล 18% ส่งผลต่อเซลล์ *K. pneumoniae* อย่างรุนแรงจนสามารถทำลายเซลล์ลงได้สมบูรณ์ในที่สุด

ตารางที่ 4.4 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การรอดและการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สัมผัสโดยตรงกับสารละลายเอทานอลความเข้มข้นตั้งแต่ 10-20% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C)

ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ (%)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
0	$6.24^{a} \pm 0.17$	0.0
10	$5.28^{b} \pm 0.10$	15.4
11	$5.27^{b} \pm 0.10$	15.6
12	$5.15^{b} \pm 0.14$	17.4
13	$5.02^{b} \pm 0.13$	19.6
14	$4.72^{b} \pm 0.22$	24.3
15	$3.97^{c} \pm 0.86$	36.3
16	$3.11^{d} \pm 0.31$	50.2
17	$0.20^{e} \pm 0.35$	96.8
18	ND^{e}**	100.0
19	ND^{e}	100.0
20	ND^{e}	100.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

** ND (not detected) หมายถึง ไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.5 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ

ผลการศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักลงบนจานเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของเชื้อ *K. pneumoniae* เริ่มต้น 4.10 log CFU/ml ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 77% โดยใช้ระยะเวลาการรมไอ 0 10 20 30 40 50 และ 60 นาที ตามลำดับ พบว่า ยิ่งสัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักนานเท่าใดประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* จะเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยการรมไออิ่มตัวเป็นระยะเวลา 20 นาทีขึ้นไปจะเริ่มมีผลต่อการยับยั้งเชื้อเพิ่มมากขึ้น การรมไออิ่มตัวเป็นระยะเวลา 40 นาที ทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* ลดลงเหลือ 2.71 log CFU/ml (การยับยั้ง 34%) และการรมไออิ่มตัวเป็นระยะเวลา 50 นาที ขึ้นไปให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) ทั้งนี้ดังแสดงในตารางผลที่ 4.5

ไอของสารที่อิ่มตัวปริมาตรหนึ่ง ในบรรยากาศปิดซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ จะมีค่าความชื้นสัมพัทธ์คงที่ค่าหนึ่ง ณ อุณหภูมิคงที่ (Goffau และ Yang, 2009) และสารรมแต่ละชนิดให้ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องระบุความชื้นสัมพัทธ์และทำการควบคุมกล่องรมไออิ่มตัวให้มีความชื้นสัมพัทธ์คงที่ในสารแต่ละชนิดตลอดการทดลอง

ความชื้นสัมพัทธ์ (77%) ในกล่องรมที่มีไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักที่เปลี่ยนแปลงไปจากความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศทั่วไป (85-95%) อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ถูกยับยั้งได้นอกเหนือจากฤทธิในการยับยั้งของสาร

ตารางที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 77%

ระยะเวลารมไอ (นาที)	จำนวนเซลล์รอดชีวิต* (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
0	$4.10^{a} \pm 0.04$	0.0
10	$3.96^{a} \pm 0.11$	3.3
20	$3.70^{b} \pm 0.09$	9.6
30	$3.00^{c} \pm 0.15$	26.9
40	$2.71^{d} \pm 0.20$	34.0
50	ND^{e}**	100.0
60	ND^{e}	100.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT; ** ND (not detected) หมายถึง ไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.6 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ

ผลการศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวเอทานอลจากจานเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของเชื้อ *K. pneumoniae* เริ่มต้น 4.04 log CFU/ml ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 37% ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยใช้ระยะเวลาสัมผัสไอ 0 5 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ พบว่า ยิ่งสัมผัสไออิ่มตัวเอทานอลนานขึ้น ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* จะเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยการรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นระยะเวลา 10 นาที ทำให้เชื้อลดลงเหลือ 3.44 log CFU/ml (การยับยั้ง 11%) และการรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นระยะเวลา 15 นาทีขึ้นไป ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) ดังผลแสดงในตารางที่ 4.6

ความชื้นสัมพัทธ์ (37%) ในกล่องรมที่มีไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักที่เปลี่ยนแปลงไปจากความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศทั่วไป (85-95%) อย่างมาก อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ถูกยับยั้งได้ดีกว่าไออิ่มตัวน้ำส้มสายชู นอกเหนือจากฤทธิในการยับยั้งของสาร

ตารางที่ 4.6 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในการรมไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 37%

ระยะเวลารมไอ (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
0	$4.04^{a} \pm 0.02$	0.0
5	$3.87^{b} \pm 0.03$	4.3
10	$3.44^{c} \pm 0.15$	11.0
15	ND^{d}**	100.0
20	ND^{d}	100.0

* Mean±SD ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

** ND (not detected) หมายถึง ไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อสังเกตุโคโลนีที่พบในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 5 นาที พบว่ามีขนาดเล็กลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับจานเพาะเชื้อควบคุมที่ไม่ผ่านการรมไออิ่มตัวเอทานอล ส่วนสาเหตุนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ต้องทำการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

4.2.7 ระยะเวลาและลำดับการรมไออิ่มตัวของสารร่วม (ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอล) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อ

วิธีการรมไออิ่มตัวสารร่วมแบบพร้อมกันโดยปล่อยไอจากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% และไอจากเอทานอล 95% เข้าไปในกล่องจนอิ่มตัวจะมีความชื้นสัมพัทธ์ 64% ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) จานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *K. pneumoniae* เริ่มต้น 4.08 log CFU/ml ที่ผ่านการรมไอเป็นระยะเวลา 0 5 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า การรมไอิ่มตัวเป็นเวลา 5 นาที ไม่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ($p>0.05$) การสัมผัสไอิ่มตัวของสารร่วมเป็นเวลา 10 นาที เริ่มส่งผลต่อการยับยั้งทำให้เชื้อลดลงเหลือ 3.65 log CFU/ml (การยับยั้ง 10.6%) เมื่อรมไอิ่มตัวเป็นเวลา 15 นาที ขึ้นไปให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างรวดเร็วและ

สมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) เนื่องจากเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ดีกว่าน้ำส้มสายชูหมัก (จากการทดลองก่อนหน้า) ประกอบกับระยะเวลาที่ใช้ในการสัมผัสไออิ่มตัวของจานเพาะเชื้อค่อนข้างสั้น การรมไออิ่มตัวของสารร่วมวิธีนี้ให้ผลไม่แตกต่างกับการรมไออิ่มตัวเอทานอลเพียงอย่างเดียว จึงไม่ถูกพิจารณาในการนำไปประยุกต์ใช้กับการรมผักชีในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.7 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยสารร่วมแบบพร้อมกันระหว่างไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) และไออิ่มตัวน้ำสมสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 64%

ระยะเวลารมไอ (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
0	$4.08^{a} \pm 0.09$	0.0
5	$4.01^{a} \pm 0.12$	1.6
10	$3.65^{b} \pm 0.13$	10.6
15	ND^{c}**	100.0
20	ND^{c}	100.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT; ** ND (not detected) หมายถึง ไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การรมไออิ่มตัวของสารร่วม (ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอล) แบบตามลำดับถูกแบ่งออกเป็นสองวิธี คือ (1) การรมไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก (ความชื้นสัมพัทธ์ 77%) ตามด้วยไออิ่มตัวของเอทานอล (ความชื้นสัมพัทธ์ 37%) และ (2) การรมไออิ่มตัวของเอทานอลตามด้วยไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก โดยใช้ไอน้ำส้มสายชูหมัก 20 30 40 และ 50 นาที และไออิ่มตัวเอทานอล 5 10 และ15 นาที เมื่อนำจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Factorial in CRD (4×3) พบว่าไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักมีอิทธิพลร่วมต่อการอยู่รอดของเชื้อ *K. pneumoniae* และลำดับในการรมของสารร่วมดังกล่าวก่อนหลังไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) การรมสารร่วมระหว่างไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 30 นาทีร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอล 10 นาทีให้ผลในการยับยั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับการมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 40 นาทีร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอล 5 นาที (ให้ผลการยับยั้งเฉลี่ย คิดเป็น 36.4% และ 34.9% ตามลำดับ) และการรมไออิ่มตัวของสารร่วมโดยการใช้ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก 40 นาที ร่วมกับการใช้ไออิ่มตัวเอทานอล 10 นาที ให้ผลใน

การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* จากจำนวนเชื้อตั้งต้น 4.03 และ 4.04 log CFU/ml ได้อย่างสมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.8 เช่นเดียวกับการใช้ไออิ่มตัวของสารเพียงชนิดเดียว ซึ่งได้แก่ การใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 50 นาที และการใช้ไออิ่มตัวเอทานอล 15 นาที

การใช้ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก 40 นาที ร่วมกับการใช้ไออิ่มตัวเอทานอล 10 นาที สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์และมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้น้ำส้มสายชูหมักหรือเอทานอลในแง่ของการลดค่าใช้จ่าย เนื่องจากเอทานอลมีต้นทุนที่สูงกว่า ระเหยหมดไปง่ายกว่า และการสัมผัสไออิ่มตัวของสารชนิดเดียวเป็นระยะเวลานานอาจมีผลกระทบกับโครงสร้างผักชีได้ วิธีการรมไออิ่มตัวสารร่วมดังกล่าวจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อในการรมผักชีขั้นต่อไปได้

ตารางที่ 4.8 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ด้วยไออิ่มตัวสารร่วมแบบลำดับ ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (64%)

ระยะเวลารมไอ (นาที)		จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/ml)		การยับยั้งเฉลี่ย (%)
สาร V	สาร E	ลำดับ VE	ลำดับ EV	
0	0	$4.03^{A} \pm 0.03$	$4.04^{a} \pm 0.10$	0.0
20	5	$3.44^{B} \pm 0.12$	$3.53^{b} \pm 0.05$	13.6
	10	$3.31^{C} \pm 0.12$	$3.33^{c} \pm 0.05$	17.8
	15	ND^{F}	ND^{f}	100.0
30	5	$3.15^{D} \pm 0.08$	$3.21^{d} \pm 0.17$	21.3
	10	$2.52^{E} \pm 0.09$	$2.61^{e} \pm 0.10$	36.4
	15	ND^{F}	ND^{f}	100.0
40	5	$2.70^{E} \pm 0.09$	$2.55^{e} \pm 0.11$	34.9
	10	ND^{F}	ND^{f}	100.0
	15	ND^{F}	ND^{f}	100.0
50	5	ND^{F}	ND^{f}	100.0
	10	ND^{F}	ND^{f}	100.0
	15	ND^{F}	ND^{f}	100.0

V หมายถึง ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v)

E หมายถึง ไออิ่มตัวของเอทานอล 95%

VE หมายถึง การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักตามด้วยไออิ่มตัวเอทานอล (V→E)

EV หมายถึง การรมไออิ่มตัวเอทานอลตามด้วยไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก (E→V)

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

** ND (not detected) หมายถึง ไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3 ระยะเวลาและลักษณะปรากฏของการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วม โดยวิธีไม่ปรับและปรับความชื้นสัมพัทธ์ต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี

4.3.1 ศึกษาระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้น

4.3.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับทั่วไป (4.44 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ 19.7 42.8 47.2 และ 92.2% ตามลำดับ การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้ประมาณ 1 log CFU/g ที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเซลล์ได้ประมาณ 2 log CFU/g ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 4 ชั่วโมงทำให้เชื้อเหลือรอดเพียง 0.33 log CFU/ml (การยับยั้ง 92.2%) ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับสูง (6.17 log CFU/g) เมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อได้ 6.7 17 23.7 และ 27% ตามลำดับ การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 2 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเซลล์ได้ประมาณ 1 log CFU/g และการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 3 และ 4 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้ 23.7 และ 27% ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ผลแสดงในตารางที่ 4.9

จากการทดลองพบว่าเมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้มากขึ้น การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีที่ไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ บนผักชีที่มีเชื้อถ่ายอยู่ในระดับต่ำจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงกว่าการรมไอบนผักชีที่ถ่ายเชื้อระดับสูง โดยหากในผักชีมีเชื้อ *K. pneumoniae* ปนเปื้อนในระดับทั่วไปการรมด้วยไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักระยะเวลา 4 ชั่วโมง จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ถึง 92.2%

ตารางที่ 4.9 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อระดับทั่วไปและระดับสูงที่สัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10 % (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 77%)

ระยะเวลารมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก (ชั่วโมง)	การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป		การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับสูง	
	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)
0	$4.44^{a} \pm 0.22$	0.0	$6.17^{A} \pm 0.12$	0.0
1	$3.46^{b} \pm 0.33$	19.7	$5.81^{B} \pm 0.08$	6.7
2	$2.68^{c} \pm 0.12$	42.8	$5.08^{C} \pm 0.11$	17.0
3	$2.37^{c} \pm 0.25$	47.2	$4.62^{D} \pm 0.11$	23.7
4	$0.33^{d} \pm 0.58$	92.2	$4.56^{D} \pm 0.17$	27.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

4.3.1.2 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวเอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับทั่วไป (4.56 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อได้ 30.3 47.4 100 และ 100% ตามลำดับ การรมไออิ่มตัวเอทานอล 1 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 1 log CFU/g ขณะที่เวลา 2 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเซลล์ได้ประมาณ 2 log CFU/g และการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 3 และ 4 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (การยับยั้ง 100%) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4.10

ผักชีที่ปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับสูง (6.40 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อได้ 21 43.6 49.3 และ 53% ตามลำดับ การรมไออิ่มตัวเอทานอล 1 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่า 1 log CFU/g ที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเซลล์ได้ประมาณ 3 log CFU/g ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และการรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 4 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้ 53.0% ผลแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อระดับทั่วไปและระดับสูงที่สัมผัสไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 37%)

ระยะเวลารมไออิ่มตัวเอทานอล (ชั่วโมง)	การการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป		การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับสูง	
	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)
0	$4.56^{a} \pm 0.22$	0.0	$6.40^{A} \pm 0.36$	0.0
1	$3.15^{b} \pm 0.15$	30.3	$5.19^{B} \pm 0.09$	21.0
2	$2.47^{c} \pm 0.21$	47.4	$3.58^{C} \pm 0.38$	43.6
3	ND^{d}	100.0	$3.34^{C} \pm 0.11$	49.3
4	ND^{d}	100.0	$2.83^{D} \pm 0.26$	53.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

การรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลานาน ยิ่งส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* มากขึ้นการรมไออิ่มตัวเอทานอลโดยวิธีที่ไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์บนผักชีที่มีการถ่ายเชื้อในระดับทั่วไปให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงกว่าการรมไอบนผักชีที่มีเชื้อปนเปื้อนระดับสูงเช่นเดียวกับผลการรมไอน้ำส้มสายชูหมัก โดยหากในผักชีมีเชื้อ *K. pneumoniae* ปนเปื้อนในระดับทั่วไปการรมด้วยไออิ่มตัวเอทานอลระยะเวลา 3 ชั่วโมงจะสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (100%)

4.3.1.3 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวของสารร่วม (ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอล) ต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

เมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 0.5 1 และ1.5 ชั่วโมง ร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 0.5 1 และ1.5 ชั่วโมง บนผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับทั่วไป (4.38 log CFU/g) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์และใช้แผนการทดลองแบบ Factorial in RCBD (3×3) พบว่า การใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลอย่างละ 0.5 ชั่วโมง ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ 27.9% ขณะที่การใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลอย่างละ 1 ชั่วโมง

ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* 87% ส่วนการใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 0.5 ชั่วโมง ร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอล 1.5 ชั่วโมงและการใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1.5 ชั่วโมงร่วมกับไอ อิ่มตัวเอทานอล 1 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) โดยใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไปที่สัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 10% (v/v) ร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอล 95% ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (ความชื้นสัมพัทธ์ 64%)

ระยะเวลาสัมผัสไอ (ชั่วโมง)		จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต*	การยับยั้ง (%)
น้ำส้มสายชูหมัก	เอทานอล	(log CFU/g)	
0	0	$4.38^{a} \pm 0.22$	0.0
0.5	0.5	$3.16^{b} \pm 0.09$	27.9
	1	$2.00^{c} \pm 0.30$	54.3
	1.5	ND^{d}	100.0
1	0.5	$1.90^{c} \pm 0.17$	56.6
	1	$0.57^{d} \pm 0.98$	87.0
	1.5	ND^{d}	100.0
1.5	0.5	$1.80^{c} \pm 0.17$	58.9
	1	ND^{d}	100.0
	1.5	ND^{d}	100.0

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

เมื่อรมไอโดยวิธีวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์โดยใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 0.5 1 1.5 และ 2 ชั่วโมง ร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 0.5 1 1.5 และ 2 ชั่วโมง บนผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับสูง (6.24 log CFU/g) และใช้แผนการทดลองแบบ Factorial in RCBD (4×4) พบว่า การใช้ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลอย่างละ 0.5 ชั่วโมง ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ 28% เช่นเดียวกับในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป การใช้

ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลอย่างละ 2 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุดในการรมไออิ่มตัวสารร่วมให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* (81.9%) ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่มีการถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับสูงที่สัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 10 % (v/v) ร่วมกับไออิ่มตัวเอทานอล 95% ในระยะเวลาต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (ความชื้นสัมพัทธ์ 64%)

ระยะเวลารมไอ (ชั่วโมง)		จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)
น้ำส้มสายชูหมัก	เอทานอล		
0.0	0.0	$6.24^{a} \pm 0.24$	0.0
0.5	0.5	$4.49^{b} \pm 0.14$	28.0
	1.0	$3.42^{def} \pm 0.20$	45.2
	1.5	$2.98^{fg} \pm 0.11$	52.2
	2.0	$2.06^{hi} \pm 0.10$	67.0
1.0	0.5	$4.28^{bc} \pm 0.34$	31.4
	1.0	$3.21^{ef} \pm 0.03$	48.6
	1.5	$2.53^{gh} \pm 0.10$	59.5
	2.0	$1.83^{i} \pm 0.16$	70.7
1.5	0.5	$3.39^{cd} \pm 0.23$	45.7
	1.0	$2.96^{fg} \pm 0.13$	52.6
	1.5	$2.44^{gh} \pm 0.19$	60.9
	2.0	$1.70^{i} \pm 0.00$	72.8
2.0	0.5	$3.58^{de} \pm 0.14$	42.6
	1.0	$2.89^{fg} \pm 0.38$	53.7
	1.5	$2.23^{hi} \pm 0.21$	64.3
	2.0	$1.13^{j} \pm 0.98$	81.9

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

4.3.2 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์

4.3.2.1 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับทั่วไป (4.74 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อได้ 20.9 30.5 35.6 และ 47.3% ตามลำดับ การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อได้ประมาณ 1 log CFU/g ขณะที่เวลา 4 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเซลล์ได้ประมาณ 2 log CFU/g ดังผลแสดงในตารางที่ 4.13 ระยะเวลาสัมผัสไออิ่มตัวชั่วโมงที่ 1 ให้ผลในการยับยั้งที่ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์คือ 19.7 และ 20.9% ตามลำดับ (จากตารางที่ 4.9) แต่เมื่อระยะเวลาสัมผัสไออิ่มตัวเพิ่มขึ้น (2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ) ความแตกต่างของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (จาก 42.8 47.2 และ 92.2% ตามลำดับจากตารางที่ 4.9 เป็น 30.5 35.6 47.3 ตามลำดับ จากตารางที่ 4.13)

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับสูง (6.43 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อได้ 9.7 13.5 25.0 และ 25.5% ตามลำดับ การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 2 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อได้ประมาณ 1 log CFU/g ที่เวลา 3 และ 4 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเซลล์ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีเชื้อ *K. pneumoniae* เหลือรอด 4.98 และ 4.71 log CFU/g ตามลำดับ ดังผลแสดงในตารางที่ 4.13 โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อใกล้เคียงกับวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ จาก 6.7 17 23.7 และ 27% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) เป็น 7.9 13.5 25.0 และ 25.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13) ซึ่งแตกต่างจากผลของผักชีที่ปนเปื้อนเชื้อระดับต่ำ

การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีที่ปรับความชื้นสัมพัทธ์บนผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงกว่าการรมไอบนผักชีที่มีถ่ายเชื้อระดับสูงเช่นเดียวกับผลการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักด้วยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

นอกจากนี้ยังพบว่าความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศการรมไอมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง เนื่องจากเมื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักจากเดิม 77% เปลี่ยนเป็น 83% ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อลดลง สำหรับเหตุผลได้อธิบายเพิ่มเติมในหัวข้อ 4.3.2.4

ตารางที่ 4.13 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10 % (v/v) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ (ความชื้นสัมพัทธ์ 83%)

ระยะเวลารมไอ (ชั่วโมง)	การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป		การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับสูง	
	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)
0	$4.74^{a} \pm 0.06$	0.0	$6.43^{A} \pm 0.14$	0.0
1	$3.75^{b} \pm 0.13$	20.9	$5.82^{B} \pm 0.30$	7.9
2	$3.29^{c} \pm 0.16$	30.5	$5.58^{B} \pm 0.24$	13.5
3	$3.05^{d} \pm 0.09$	35.6	$4.98^{C} \pm 0.16$	25.0
4	$2.50^{e} \pm 0.17$	47.3	$4.71^{C} \pm 0.05$	25.5

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

4.3.2.2 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวเอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับความชื้น

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับทั่วไป (4.54 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อได้ 20.5 34.2 38.2 และ 48.2% ตามลำดับ โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ในสภาวะการทดสอบในผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไปมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (30.3 47.4 100 และ 100% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10) แต่ให้ผลการยับยั้งใกล้เคียงกับการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักในวิธีเดียวกัน (20.9 30.5 35.6 และ 47.3% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.13) ความชื้นอาจเป็นปัจจัยที่สำคัญในการอยู่รอดของเซลล์มากกว่าปัจจัยชนิดของไอสาร ณ สภาวะการทดลองนี้ ทั้งนี้ผลแสดงในตารางที่ 4.14

ผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับสูง (6.43 log CFU/g) พบว่า เมื่อรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อได้ 17.0 18.1 20.0 และ 21.6% ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังผลแสดงในตารางที่ 4.14 แสดงว่า การรมไออิ่มตัวเอทานอลโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ในสภาวะการทดสอบในผักชีที่ถ่ายเชื้อ

K. pneumoniae ระดับสูงนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (21 43.6 49.3 และ 53% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10)

การรมไออิ่มตัวเอทานอลโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์บนผักชีที่มีเชื้อปนเปื้อนระดับทั่วไปให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงกว่าการรมไอบนผักชีที่มีเชื้อปนเปื้อนระดับสูง เช่นเดียวกับ ผลการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักด้วยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ และพบว่าการปรับความชื้นในการรมไอเอทานอลจากเดิม 37% เปลี่ยนเป็น 83% ความชื้นที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อลดลง เช่นเดียวกับการรมไอน้ำส้มสายชูหมัก สำหรับเหตุผลได้อธิบายเพิ่มเติมในหัวข้อ 4.3.2.4

ตารางที่ 4.14 จำนวนเซลล์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีที่รมไออิ่มตัวเอทานอล 95 % (v/v) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ (83%)

ระยะเวลารมไอ (ชั่วโมง)	การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป		การถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับสูง	
	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/g)	การยับยั้ง (%)
0	$4.54^{a} \pm 0.34$	0.0	$6.46^{A} \pm 0.46$	0.0
1	$3.54^{b} \pm 0.33$	20.5	$5.36^{B} \pm 0.06$	17.0
2	$2.99^{bc} \pm 0.35$	34.2	$5.29^{B} \pm 0.19$	18.1
3	$2.90^{c} \pm 0.09$	38.2	$5.22^{B} \pm 0.34$	20.0
4	$2.37^{c} \pm 0.59$	48.2	$5.06^{B} \pm 0.12$	21.6

* Mean±SD; ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

4.3.2.3 ระยะเวลาการรมไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์

เมื่อรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% และไออิ่มตัวเอทานอล 95% อย่างละ 0.5 ชั่วโมงบนผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* พบว่า ในระดับการถ่ายเชื้อทั่วไปและระดับสูง คือ 4.38 (±0.02) และ 6.16 (±0.03) log CFU/g ตามลำดับ มีเชื้อเหลือรอด 3.50 (±0.11) และ 4.50 (±0.11) log CFU/g ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อคิดเป็น 20.2% และ

27.0% ตามลำดับ โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ในสภาวะทดลองในผักชีที่ถ่ายเชื้อ *K. pneumoniae* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อใกล้เคียงกับวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (27.9 และ 28% ตามลำดับ)

4.3.2.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอล และไออิ่มตัวสารร่วม ต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

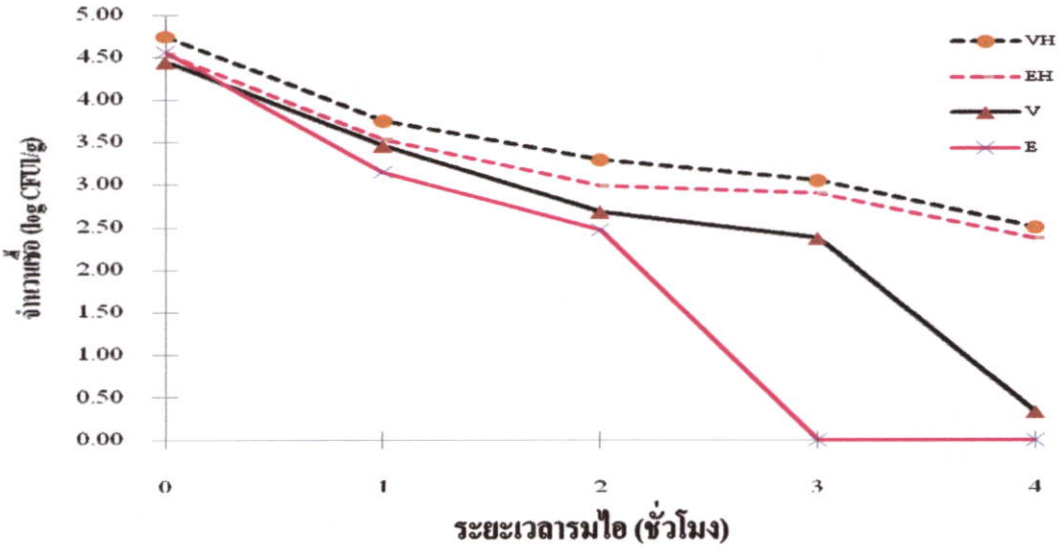
จากผลในข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการถ่ายเชื้อทั้งระดับทั่วไป คือ 4 log CFU/g และระดับสูง คือ 6 log CFU/g ให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทั้งสองชนิดพบว่าการรมไออิ่มตัวเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ดีกว่าไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและวิธีปรับเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในระหว่างการรมไออิ่มตัวของสารทั้งสองชนิดทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลง ดังสรุปใน ภาพที่ 4.2

แบคทีเรียแกรมลบโดยทั่วไปเจริญได้ดีในช่วงความชื้นสัมพัทธ์ 85-95% ความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการอยู่รอด การเจริญ รูปร่าง การสร้างสปอร์ การสร้างไบโอฟิล์มและการต้านยาปฏิชีวนะของเซลล์ (Goffau และ Yang, 2009)

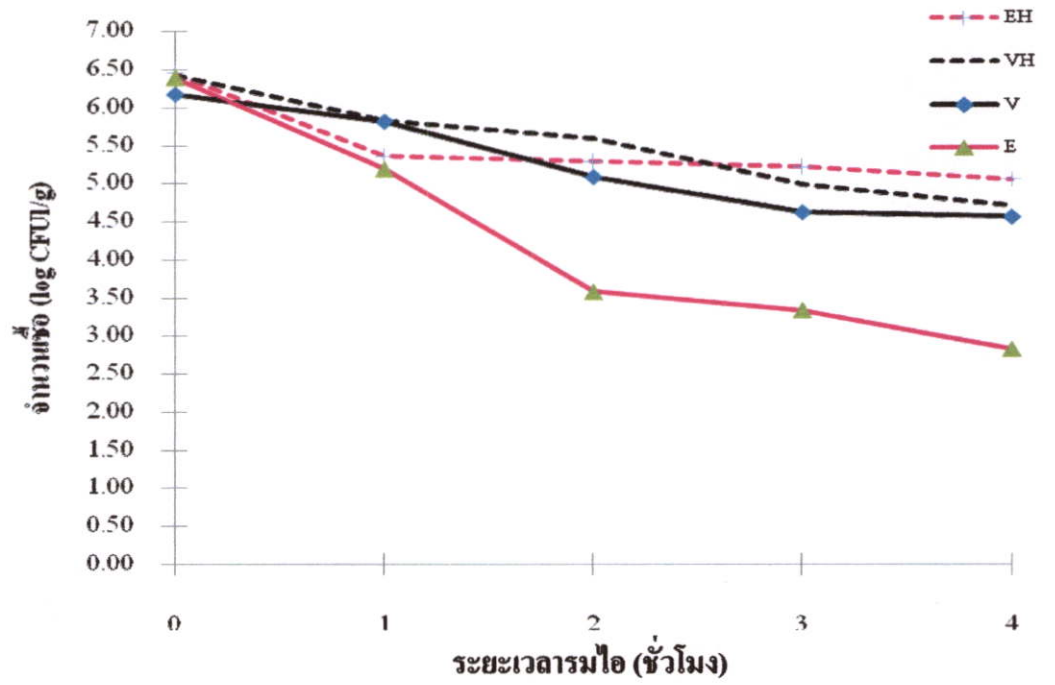
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในการรมไออิ่มตัวของสารทั้งสองชนิดที่ปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ พบว่า การรมไออิ่มตัวแบบปรับความชื้นสัมพัทธ์ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสารในสถานะไอถูกเจือจางด้วยไอน้ำที่เพิ่มขึ้นในบรรยากาศ ทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับความชื้นสัมพัทธ์ที่แบคทีเรียต้องการมากขึ้น จึงเป็นการสนับสนุนการเจริญของเซลล์ได้มากขึ้น

สาเหตุที่ไออิ่มตัวเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ดีกว่าไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก เนื่องจากเอทานอลเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่รุนแรงกว่าน้ำส้มสายชูหมักซึ่งเป็นกรดอ่อนประกอบกับไออิ่มตัวเอทานอลมีความชื้นสัมพัทธ์ 37% ต่ำกว่าไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ 77% ความชื้นที่เปลี่ยนไปมากกว่านี้แตกต่างจากความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมที่เซลล์ของเชื้อ *K. pneumoniae* จะเจริญได้จึงทำให้การปรับตัวอยู่รอดทำได้ยากกว่า

เมื่อเพิ่มน้ำซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์สูงเข้าไปทำให้ในระบบมีความชื้นสัมพัทธ์สูงขึ้นเป็น 83% เท่ากันในสารทั้งสองชนิด พบว่าการรมไออิ่มตัวเอทานอลโดยวิธีปรับความชื้นให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลงต่างจากวิธีไม่ปรับความชื้นอย่างมากขณะที่การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีปรับความชื้นทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงจากเดิมเล็กน้อย เนื่องจากความต่างของความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างวิธีปรับความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 83%) และไม่ปรับความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 37%) ทำให้ไออิ่มตัวเอทานอลถูกแทนที่ด้วยไอน้ำมากกว่าในไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักซึ่งเปลี่ยนจากความชื้นสัมพัทธ์ 77% เป็น 83%



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งด้วยไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอล และไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชีโดยวิธีปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์; (ก) คือ การถ่ายเชื้อระดับทั่วไป; (ข) คือ การถ่ายเชื้อระดับสูง; E คือ การรมไออิ่มตัวเอทานอลแบบไม่ปรับความชื้น; V คือ การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักแบบไม่ปรับความชื้น; EH คือ การรมไออิ่มตัวเอทานอลแบบปรับความชื้น; VH คือ การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักแบบปรับความชื้น

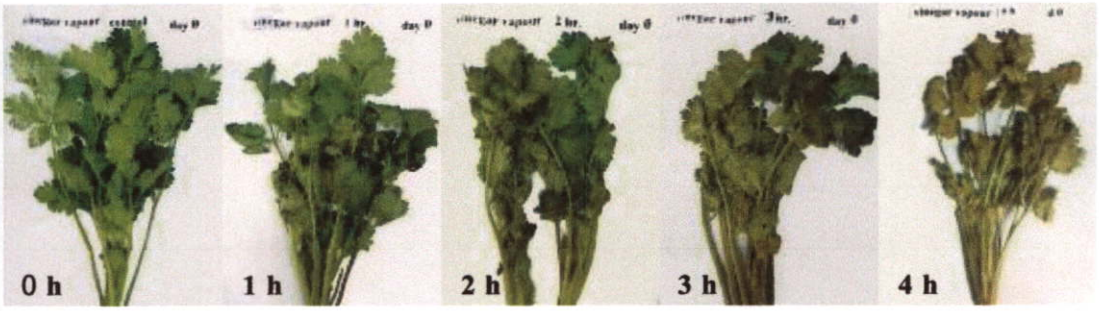
4.3.2.5 เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรมไออิ่มตัวโดยวิธีปรับและไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังผ่านการสัมผัสไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ 77% พบว่าสีเหลืองและความอ่อนนิ่มของผักชีเริ่มปรากฏให้เห็นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการสัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก และเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการสัมผัสไอ ดังภาพที่ 4.3 (ก) อาจเนื่องจากไอกรดไปมีผลกับคลอโรฟิลล์และโครงสร้างของผักชี

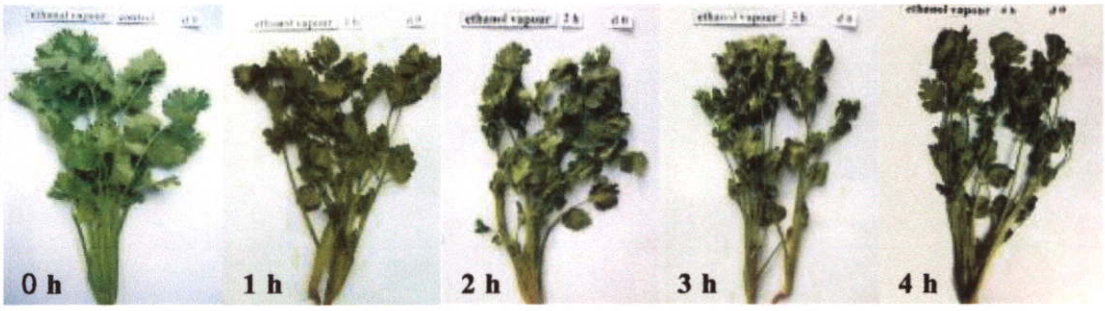
ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังผ่านการสัมผัสไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ 37% พบว่าความเขียวและความแห้งเหี่ยวของผักชีเริ่มปรากฏให้เห็นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการสัมผัสไออิ่มตัวเอทานอล และเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการสัมผัสไอ ดังภาพที่ 4.3 (ข) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suzuki และคณะ (2004) ที่รายงานการเกิดกลิ่นที่ผิดปกติ ความอ่อนนิ่ม และสีเขียวเข้มขึ้นในบล็อคโคลี่หลังการเก็บรักษาด้วยผงเอทานอล 6 กรัมและ 12 กรัม ที่อุณหภูมิ 20°C เอทานอลมีผลทำให้ประจุของโพแทสเซี่ยมผ่านได้มากขึ้น ทำให้ปากใบเปิด (Satler และ Thimann, 1980) สิ่งนี้อาจเป็นเหตุผลให้ผักชีที่ผ่านการรมไอเอทานอลมีลักษณะทางกายภาพของใบที่แห้งกรอบจากการสูญเสียน้ำทางใบ กลิ่นไม่พึงประสงค์ที่ปรากฏอาจเกิดจากเอทานอลและอะซิทอลดีไฮด์ (acetaldehyde) ที่สะสมระดับสูงในเนื้อเยื่อพืช (Suzuki และคณะ, 2004) สีเขียวที่เข้มขึ้นอาจเนื่องมาจากสารระเหยหรือประจุสารบางอย่างที่เกิดจากการระเหยของเอทานอลช่วยชะลอการสูญเสียคลอโรฟิลล์และอัตราการหายใจ (Corcuff และคณะ, 1996)

ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังผ่านการสัมผัสไออิ่มตัวของสารร่วม (ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก และไออิ่มตัวเอทานอล) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ พบว่า ลักษณะปรากฏเมื่อนำระยะเวลาที่ใช้ในการรมไอสารทั้งสองมารวมกัน มีลักษณะทางกายภาพเช่นเดียวกับการรมด้วยไออิ่มตัวเอทานอลเพียงชนิดเดียว และเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการสัมผัสไอ แสดงในตารางที่ 4.15 เนื่องจากไออิ่มตัวเอทานอลส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพที่รุนแรงกว่า

การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมโดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ส่งผลต่อลักษณะปรากฏในผักชีอย่างรุนแรงทั้งสี กลิ่นของสารที่ใช้รม ความอ่อนนิ่ม เหี่ยวเฉา ไม่เป็นที่พึงปรารถนา เนื่องจากความเข้มข้นของไอสารในบรรยากาศค่อนข้างสูงจึงส่งผลต่อโครงสร้างผักได้มาก นอกจากนี้ผักชีเป็นผักที่ต้องการความชื้นสูง แต่ไอของสารทั้งสองชนิดทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศลดลง ผักชีเกิดการสูญเสียความชื้น (dehydrate) จึงเหี่ยวเฉาง่าย การปรับปรุงเรื่องการเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในขณะรมไออิ่มตัว จึงเป็นสิ่งถูกนำมาพิจารณาเพื่อ ปรับปรุงความเสียหายที่เกิดขึ้น



(ก) ผักชีที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) (ความชื้นสัมพัทธ์77%)



(ข) ผักชีที่รมไออิ่มตัวของเอทานอล 95% (v/v) (ความชื้นสัมพัทธ์ 37%)

ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรม) ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง) ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้น

ตารางที่ 4.15 ลักษณะปรากฏของผักชีหลังการสัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอล และไออิ่มตัวของสารร่วมในระยะเวลารวมต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

ระยะเวลารมไอ (ชั่วโมง)	ไออิ่มตัว น้ำส้มสายชูหมัก	ไออิ่มตัว เอทานอล	ไออิ่มตัว สารร่วม
0	++++	++++	++++
1	+++	++	++
2	++	++	++
3	+	+	+
4	+	+	+

++++ คือ ผักไม่เหี่ยว ใบและก้านเขียวสด

+++ คือ ผักเหี่ยวเล็กน้อย สีของใบและก้านเริ่มเปลี่ยนบ้าง คิดเป็นประมาณ 20% ของทั้งหมด

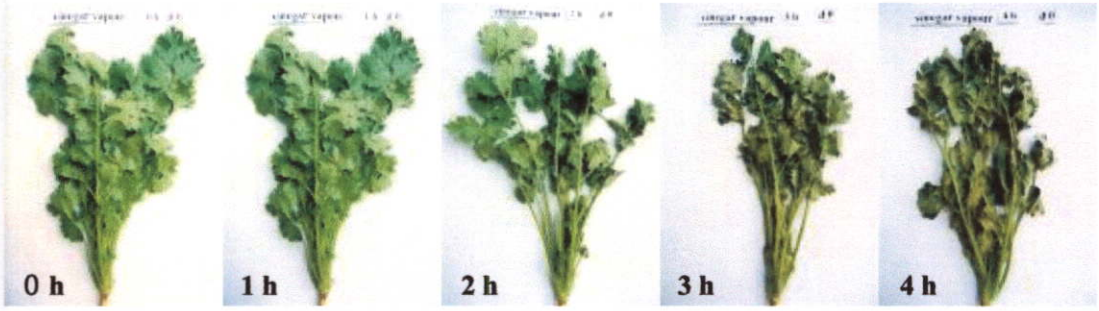
++ คือ ผักเหี่ยว สีของใบและก้านเปลี่ยนคิดเป็นประมาณ 60% ของทั้งหมด

+ คือ ผักเหี่ยว สีของใบและก้านเปลี่ยน คิดเป็นประมาณ 100% ของทั้งหมด

ลักษณะทางกายภาพผักชีหลังผ่านการสัมผัสไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศเพิ่มขึ้นจาก 77% เป็น 83% พบว่าสีเหลืองและความอ่อนนุ่มของผักชีเริ่มปรากฏให้เห็นช้าลงจากชั่วโมงที่ 1 เป็นชั่วโมงที่ 2 (บางส่วน) ของการสัมผัสไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก และเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 3 และ 4 ตามระยะเวลาการสัมผัสไอ ดังภาพที่ 4.4 (ก) แสดงว่าการรมไออิ่มตัวน้ำสายชูหมักเป็นเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรมต่อไปได้

ลักษณะทางกายภาพผักชีหลังผ่านการสัมผัสไออิ่มตัวเอทานอล 95% (v/v) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศเพิ่มขึ้นจาก 37% เป็น 83% พบว่าสีเขียวและความแห้งเหี่ยวของผักชียังคงเริ่มปรากฏให้เห็นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการสัมผัสไออิ่มตัวเอทานอล และเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการสัมผัสไอ ดังภาพที่ 4.4 (ข) แต่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการรมไออิ่มตัวเอทานอลที่ไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ ดังภาพ 4.3 (ข) แสดงว่าระยะเวลา 1 ชั่วโมง อาจยังไม่เหมาะสมต่อการรมไออิ่มตัวเอทานอลโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ในแง่ของลักษณะทางกายภาพดังนั้นจึงควรลดเวลาให้เหลือ 0.5 ชั่วโมงในการประยุกต์ใช้ต่อไป

ผลการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลต่อลักษณะปรากฏในผักชี ถูกนำ มาพิจารณาในขั้นตอนการรมไออิ่มตัวของสารร่วมทั้งสองชนิด ให้เป็นการรมไออิ่มตัวของสารอย่างละ 0.5 ชั่วโมงเพียงกรณีเดียว ดังภาพที่ 4.4 (ค)



(ก) ผักชีที่รมไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% (v/v) เป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

(ข) ผักชีที่รมไออิ่มตัวของเอทานอล 95% (v/v) เป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

(ค) การรมไออิ่มตัวของสารร่วมอย่างละ 0.5 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรม ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้น (83%)

สำหรับสรุปลักษณะทางกายภาพของผักชีหลังการรมไออิ่มตัวในสภาวะต่างๆที่ศึกษาแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 สรุปลักษณะปรากฏของผักชีหลังการสัมผัสไออิ่มน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมในระยะเวลารวมต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C) โดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์

ระยะเวลาสัมผัสไอ (ชั่วโมง)	สัมผัสไอน้ำส้มสายชูหมัก	สัมผัสไอไอเอทานอล	สัมผัสไอสารร่วม
0	++++	++++	++++
0.5	++++	+++	++++
1	++++	++	++++
2	+++	+	+
3	++	+	+
4	+	+	+

++++ คือ ผักไม่เหี่ยว ใบและก้านเขียวสด

+++ คือ ผักเหี่ยวเล็กน้อย สีของใบและก้านเริ่มเปลี่ยนบ้าง คิดเป็นประมาณ 20% ของทั้งหมด

++ คือ ผักเหี่ยว สีของใบและก้านเปลี่ยนคิดเป็นประมาณ 60% ของทั้งหมด

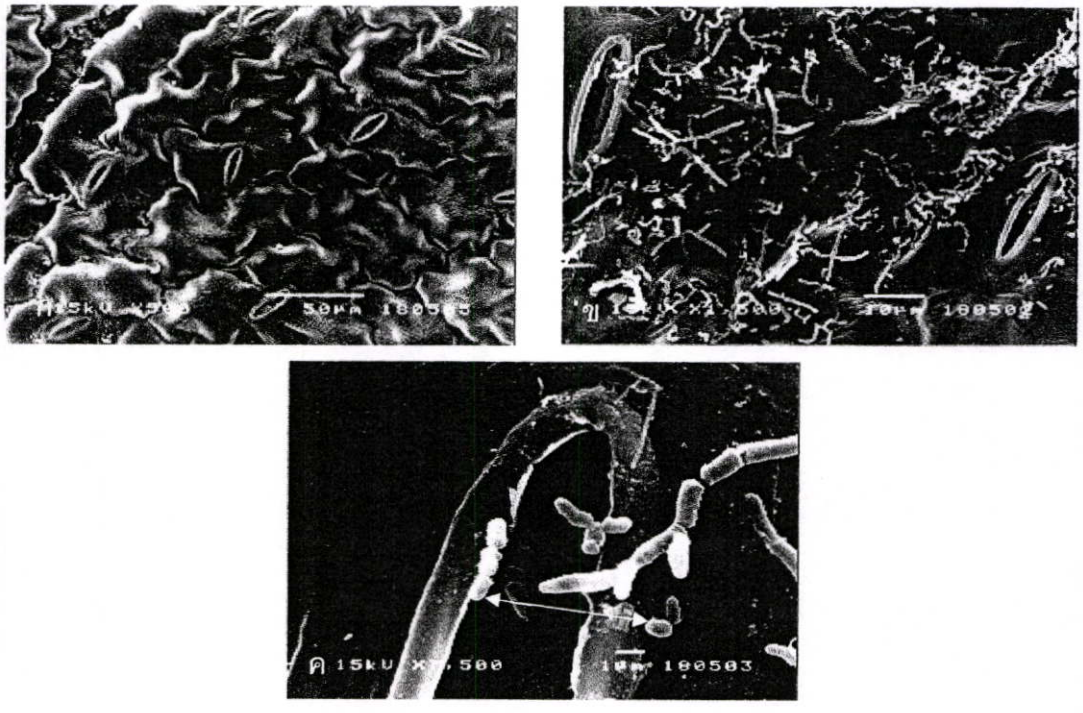
\+ คือ ผักเหี่ยว สีของใบและก้านเปลี่ยน คิดเป็นประมาณ 100% ของทั้งหมด

การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ ทำให้ความรุนแรงทางกายภาพที่ปรากฏกับผักชีลดลง การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมงให้ผลต่อลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุดของการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักผลการรมไออิ่มตัวเอทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมงข้างต้น ชี้ให้เห็นถึงลักษณะทางกายภาพที่ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป จึงได้ทำการลดระยะเวลาการรมเหลือ 0.5 ชั่วโมง ซึ่งจะส่งผลให้ยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลงโดยจากภาพที่ 4.2 ซึ่งพบว่าการยับยั้งในเชื้อที่ถ่ายลงในผักชีในระดับทั่วไปและระดับสูงจะลดเหลือประมาณ 9.4% และ 11.9% ตามลำดับ (เฉลี่ยจากแนวโน้มของกราฟ) และผลการรมไออิ่มตัวของสารร่วมอย่างละ 0.5 ชั่วโมงแสดงลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุดของการรมไออิ่มตัวของสารร่วม และในวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ของการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้มากกว่าการรมไออิ่มตัวเอทานอลเนื่องจากยังรักษาสภาพทางกายภาพไว้ได้ในชั่วโมงต้นๆของการรมไอและยับยั้งได้ 20.9% ในผักชีที่ปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป)

4.4 ผลของโครงสร้างผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวกรดน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอล และไออิ่มตัวของสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C

4.4.1 ผลของโครงสร้างของผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae*

ผลการศึกษาโครงสร้างของใบผักชีที่มีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ตามธรรมชาติผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า ใบผักชีมีปากใบและร่องอยู่ระหว่างปากใบเป็นจำนวนมาก แสดงในภาพที่ 4.5 (ก) ทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* มีพื้นที่ในการเกาะติดได้มาก เมื่อใช้กำลังขยายสูงขึ้น (1,500 เท่า) พบว่าผักชีมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและราหลากหลายชนิดเป็นจำนวนมาก หากมีปริมาณมากจะยากต่อการกำจัดให้หมดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเกาะติดของเชื้อไม่ได้มีมากบริเวณปากใบ แต่กลับพบมากบริเวณร่องหยักของใบรวมถึงเส้นใบแสดงในภาพที่ 4.5 (ข) ส่วนเซลล์ของ *K. pneumoniae* ที่เกาะอยู่บริเวณปากใบ แสดงในภาพที่ 4.5 (ค) ที่มีลูกศรชี้



ภาพที่ 4.5 โครงสร้างของใบผักชีและการเกาะติดของเชื้อ *K. pneumoniae* ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM): (ก) ปากใบและร่องใบ (กำลังขยาย 500 เท่า); (ข) การเกาะติดของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่โครงสร้างใบ (กำลังขยาย 1,500 เท่า); (ค) เซลล์ของ *K. pneumoniae* ที่เกาะอยู่บริเวณปากใบ

บริเวณที่เชื้อยึดเกาะกับผัก ได้แก่ บริเวณพื้นผิว ส่วนที่ยื่นออกมาจากชั้นผิว เช่น ขน (trichome) ปากใบ (stomata) และบริเวณขอบที่ถูกตัด เส้นทางการปนเปื้อนที่สำคัญคือปากใบ เนื่องจากสามารถป้องกันเชื้อก่อโรคให้หลุดออกจากการล้างหรือถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อ (Golberg และคณะ, 2011) Golberg และคณะ (2011) ได้รายงานการย้อมสารเรืองแสงเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่ถ่ายผ่าน SEM ในใบสมุนไพรต่างๆ 7 ชนิด พบว่า ใบ Parsley ซึ่งเป็นสมุนไพรในตระกูลเดียวกับผักชีพบว่ากลุ่มเชื้อดังกล่าวเกาะบริเวณผิวใบเกือบทั้งหมด ที่สามารถพบเชื้อภายในโครงสร้างชั้นในระดับต่ำมาก (1.9 ± 3.3% ของปริมาณเชื้อทั้งหมด) ต่างจากใบ Arugula และกระเพราที่จัดว่าพบเชื้อดังกล่าวภายในโครงสร้างในระดับสูง และปานกลาง ตามลำดับ แม้ว่าเชื้อ *S.* Typhimurium จะมีแฟลกเจลล่าซึ่งใช้ในการเคลื่อนที่ เนื่องมาจากโครงสร้างของใบ Parsley มีปากใบขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปากใบ Arugula (ตระกูลเดียวกับพวกผักสลัด) และกระเพรา นอกจากนี้ยังอธิบายว่าอาจเกี่ยวข้องกับการถูกยับยั้งการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย และ/หรือ การเคลื่อนที่เข้าหาหรือออกจากสารเคมี (chemotaxis) ต่อปากใบ จากข้อมูลนี้กล่าวได้ว่าใบผักชีมีปากใบขนาดเล็ก ประกอบกับ *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีแฟลกเจลล่าเกาะเชื้อจึงอยู่ที่บริเวณผิวใบเป็นส่วนใหญ่ ไม่สามารถเข้าไปยังชั้นผิวภายในของผักชีซึ่งมีปากใบขนาดเล็กได้

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวของสารร่วมโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของผักชี ได้แก่ การเน่าเสีย สี กลิ่นก่อนและหลังล้าง ความสดและลักษณะทั่วไป ในรูประดับคะแนน (ดัดแปลงจาก ภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552) หลังผ่านการรมไอที่อุณหภูมิห้อง บรรจุในถุงพลาสติกโพลีโพพิลีนใส ขนาด 5×14 นิ้ว ไม่เจาะรู และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C ในวันที่ 0 3 5 7 ตามลำดับ นำมาเปรียบเทียบกับผักชีที่ไม่ผ่านการรมไอและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C เป็นตัวอย่างควบคุม ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลแสดงดังภาพที่ 4.6 ตารางที่ 4.17

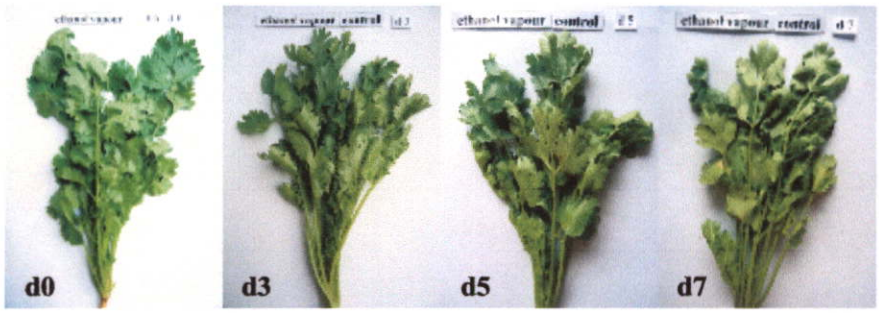
ตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการรมไอสารใดๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพตลอดการเก็บ 7 วัน ภาพที่ 4.6 (ก)

ผักชีที่รมอิ่มตัวไอน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมง มีระดับคะแนนการเน่าเสีย ความเต่ง สีและลักษณะทั่วไปเช่นเดียวกับชุดควบคุมในวันแรกของการรมไอ โดยความเต่ง (ความอ่อนนิ่มของก้านใบ) สี (เหลืองและน้ำตาล) และลักษณะทั่วไปมีความเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ไม่ทำให้เกิดการเน่าเสียตลอดการเก็บรักษา 7 วัน ภาพที่ 4.6 (ข) ส่วนกลิ่นของน้ำส้มสายชูหมักตกค้างในผักชีระดับปานกลางหลังรมทันที และลดลงเมื่อนำมาล้างในวันแรก

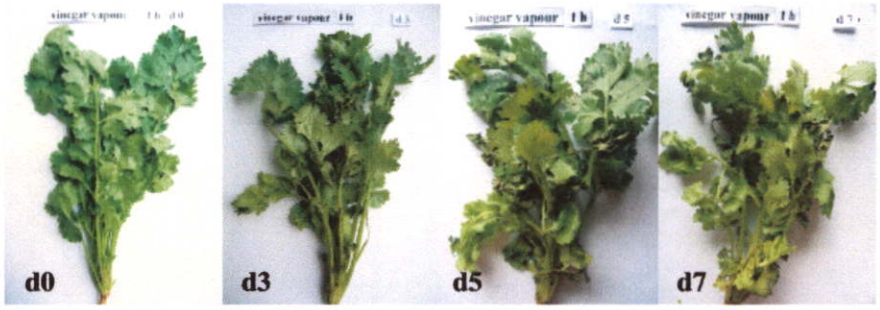
ของการรมไอ ลักษณะทั่วไปมีอายุการเก็บรักษา 7 วัน โดยวันที่ 5 ก้านใบที่อยู่ส่วนนอก (แก่กว่า) เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังตารางที่ 4.17

ผักชีที่รมไออิ่มตัวเอทานอล 0.5 ชั่วโมง มีระดับคะแนนความเต่ง สีและลักษณะทั่วไปต่างจากชุดควบคุมในวันแรกของการรมไอ โดยความเต่ง (ความแห้งเหี่ยว) สี (ความเขียว) และลักษณะทั่วไปของผักชีจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกของการรมไอ และค่อนข้างคงที่ตามระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ไม่ทำให้เกิดการเน่าเสียตลอดการเก็บรักษา 7 วัน ดังภาพที่ 4.6 (ค) ส่วนกลิ่นของเอทานอลนั้นตกค้างในผักชีระดับปานกลาง และลดลงเมื่อนำมาล้างในวันแรกของการรมไอ ลักษณะทั่วไปไม่สามารถเก็บรักษาได้เนื่องจากก้านใบกว่า 30% เหี่ยวทันทีหลังการรม และวันที่ 3 ของการเก็บรักษาผักเหี่ยวอย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.17)

ผักชีที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอลอย่างละ 0.5 ชั่วโมง มีระดับคะแนน ความเต่ง สีและลักษณะทั่วไปเช่นเดียวกับชุดควบคุมในวันแรกของการรมไอ ความเต่ง (ความแห้งเหี่ยว) สี (ความเขียว) และลักษณะทั่วไปมีความเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ไม่ทำให้เกิดการเน่าเสียตลอดการเก็บรักษา 7 วัน ดังภาพที่ 4.6 (ง) กลิ่นของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลตกค้างในผักชีระดับปานกลางหลังรมทันที และลดลงเมื่อนำมาล้างในวันแรกของการรมไอ (ตารางที่ 4.17)



(ก)



(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 4.6 ลักษณะปรากฏของผักชี (ก) ผักชีที่ไม่ผ่านการรมไอ; (ข) ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมง; (ค) ผ่านการรมไออิ่มตัวเอทานอล 0.5 ชั่วโมง; (ง) การรมไออิ่มตัวของสารร่วมอย่างละ 0.5 ชั่วโมง ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 0 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวชองสารร่วมที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 10°C

วิธีรม	คุณภาพ	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
		0	3	5	7
ตัวอย่างควบคุม (ไม่รม)	การเน่าเสีย	1	1	1	1
	ความแต่ง	1	1	1	1
	สี	1	1	1	1
	กลิ่นก่อนล้าง	1	-	-	-
	กลิ่นหลังล้าง	1	-	-	-
	ลักษณะทั่วไป	1	1	1	1
ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมง	การเน่าเสีย	1	1	1	1
	ความแต่ง	1	2	3	3
	สี	1	2	3	4
	กลิ่นก่อนล้าง	3	-	-	-
	กลิ่นหลังล้าง	2	-	-	-
	ลักษณะทั่วไป	1	3	3	3
ไออิ่มตัวเอทานอล 0.5 ชั่วโมง	การเน่าเสีย	1	1	1	1
	ความแต่ง	3	4	5	5
	สี	4	4	4	4
	กลิ่นก่อนล้าง	3	-	-	-
	กลิ่นหลังล้าง	1	-	-	-
	ลักษณะทั่วไป	3	4	5	5
ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก และไออิ่มตัวเอทานอล อย่างละ 0.5 ชั่วโมง	การเน่าเสีย	1	1	1	1
	ความแต่ง	1	3	4	5
	สี	1	4	5	5
	กลิ่นก่อนล้าง	3	-	-	-
	กลิ่นหลังล้าง	2	-	-	-
	ลักษณะทั่วไป	1	4	5	5

ระดับคะแนน และการอธิบายลักษณะคุณภาพทางกายภาพของผักชี (ภาคผนวก ค) โดยตัวอย่างผักชีได้ระดับคะแนนที่ 4 จะถือว่าตัวอย่างผักชีนี้หมดอายุการเก็บรักษาแล้ว

- หมายถึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ผลการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชีเขตมีนบุรีและลาดกระบัง จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า จำนวนตัวอย่างผักชีที่มีโคลิฟอร์มเกิน 11,000 MPN/g มีจำนวน 22 ตัวอย่างและเป็นฟีคอลโคลิฟอร์มที่มีปริมาณมากกว่า 11,000 MPN/g ถึง 16 ตัวอย่าง โดยผักชีมีจุลินทรีย์ทั้งหมด 7.27 (±0.03) log CFU/g เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* 3.00-6.02 log CFU/g (43.4-84.0% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด) หรือเฉลี่ย 4.52 (±0.69) log CFU/g

5.1.2 การศึกษาและเปรียบเทียบผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลและผลของไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอลและไออิ่มตัวสารร่วมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ และนำข้อมูลที่ได้ไปปรับใช้ในการลดเชื้อ *K. pneumoniae* บนผักชี

การศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion เมื่อทดสอบด้วยน้ำส้มสายชูหมักที่มีความเข้มข้นกรดอะซิติกตั้งแต่ 2 ถึง 5% (v/v) และ 10% (v/v) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นกรดอะซิติกตั้งแต่ 2% (v/v) ขึ้นไป เกิดโซนยับยั้งกว้างมากขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมกับการทดสอบในเอทานอล

เมื่อศึกษาด้วยวิธีสัมผัสโดยตรงกับสารละลายในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 log CFU/ml) พบว่า น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2.4% (v/v) (pH 3.59) ขึ้นไป และเอทานอลความเข้มข้น 18% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้สมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การศึกษาการรมไออิ่มตัวจากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% ไออิ่มตัวจากเอทานอล 95% และไออิ่มตัวของสารร่วม (น้ำส้มสายชูหมักและเอทานอล) ในจานเพาะเชื้อ ระดับเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml พบว่า ยิ่งสัมผัสไออิ่มตัวสารเป็นเวลานานขึ้นประสิทธิภาพการยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้น โดยสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

ไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักและไออิ่มตัวเอทานอล (ความชื้นสัมพัทธ์ 77% และ 37% ตามลำดับ) เมื่อใช้ระยะเวลารม 50 และ 15 นาที ตามลำดับขึ้นไปให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้สมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัณทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับการรมไออิ่มตัวสารร่วมนั้น การรมแบบพร้อมกัน (ความชื้นสัมพัทธ์ 64%) เป็นเวลา 15 นาที ขึ้นไปให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์แต่ไม่แตกต่างกับการรมไออิ่มตัวเอทานอลเพียงอย่างเดียว จึงไม่ถูกพิจารณาใน

การนำไปประยุกต์ใช้ในการรมผักชีขั้นตอนต่อไป การรมไอแบบลำดับ โดยใช้ไอน้ำส้มสายชูหมัก 20 30 40 และ 50 นาที และไออิ่มตัวเอทานอล 5 10 และ15 นาที พบว่าสารทั้ง 2 มีอิทธิพลร่วมต่อการอยู่รอดของเชื้อ *K. pneumoniae* แต่ลำดับในการรมของสารร่วมดังกล่าวก่อนหลังไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) และการใช้ไออิ่มตัวของน้ำส้มสายชูหมัก 40 นาที ร่วมกับการใช้ไออิ่มตัวเอทานอล 10 นาที ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในจานเพาะเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

5.1.3 ศึกษาและเปรียบเทียบระยะเวลาการรมไออิ่มตัวน้ำส้มน้ำส้มสายชูหมัก ไออิ่มตัวเอทานอล และไออิ่มตัวสารร่วม โดยวิธีไม่ปรับ/ปรับความชื้นสัมพัทธ์ต่อการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ในผักชี สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

ประสิทธิภาพในการยับยั้งของการรมไอผักชีที่ปนเปื้อนเชื้อในระดับทั่วไปมีสูงกว่าผักชีที่ถ่ายเชื้อระดับสูง ไออิ่มตัวเอทานอลยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก

การรมไอส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของผักชี ผักชีที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักให้สีเหลือง น้ำตาล ความอ่อนนิ่ม และกลิ่นตกค้าง ผักชีที่รมไออิ่มตัวเอทานอลให้สีเขียวเข้มขึ้นความแห้งเหี่ยว กรอบ และกลิ่นตกค้าง โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนเมื่อรมเป็นเวลานานๆและรมด้วยวิธีไม่ปรับความชื้นสัมพัทธ์

วิธีปรับเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในระหว่างการรมไอทำให้ลักษณะทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไออิ่มตัวดีขึ้น แต่ขณะเดียวกันก็ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ลดลงด้วย (โดยเฉพาะในผักชีที่ปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ระดับทั่วไป)

5.1.4 ผลของโครงสร้างผักชีต่อการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักชีที่ผ่านการรมไอภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C

ผักชีมีปากใบและร่องอยู่ระหว่างปากใบเป็นจำนวนมาก มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและราหลากหลายชนิด การเกาะติดของเชื้อพบมากบริเวณร่องหยักของใบรวมถึงเส้นใบ

ผักชีที่รมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมัก 1 ชั่วโมง ให้ผลต่อลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุด ลักษณะทั่วไปมีอายุการเก็บรักษา 7 วันโดยวันที่ 5 ผักชีเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผักชีที่รมอิ่มตัวไอเอทานอล 0.5 ชั่วโมง ก้านใบกว่า 30% เหี่ยวทันทีหลังการรม ไม่สามารถเก็บรักษาได้ และผักเหี่ยวอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา

ผักชีที่รมไออิ่มตัวสารร่วมอย่างละ 0.5 ชั่วโมง พบว่าความเต่ง สี และลักษณะทั่วไปของผักชีมีลักษณะทั่วไปเช่นเดียวกับผักชีทั่วไป แต่ไม่สามารถเก็บรักษาได้ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา

5.2 ข้อเสนอแนะ

การรมไออิ่มตัวน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีปรับความชื้นสัมพัทธ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงมีความเหมาะสมที่จะนำไประยุกต์ใช้ เนื่องจากยังรักษาสภาพทางกายภาพไว้โดยให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ แต่ยังไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน จึงควรมองหาสารชนิดอื่นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูง โดยไม่ทำลายลักษณะทางกายภาพและกลิ่นของผัก หรือปรับแต่งวิธีการรมไอสารให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา บุตรพลอย และ คนัย บุณยเกียรติ. 2545. ผลของเอทธานอลและอะซีตัลดีไฮด์ ต่อการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวและคุณภาพของผลส้มเขียวหวาน.วารสารเกษตร. 18 (2):110-118.

เครือข่ายจัดการองค์ความรู้. 2550. น้ำส้มสายชู. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. เข้าถึงได้จาก www.agro.cmu.ac.th/office/KMnetwork/?p=306 (24 สิงหาคม 2553).

จิราวรรณ ยี่สิบแสน. 2552. การลด *Salmonella* Enteritidis บนผิวเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวายของพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

เจนจิรา ผลเกิด เสาวนีย์ สุวรรณสินธุ์ สุประภาดา โฉมศิริ วรรณิศา ศรีตะปันย์ และธัชพรรณ เหมือนชู. 2550. สำรวจหาเชื้อใน Family Enterobacteriaceae ที่สร้าง Enzyme Extended-Spectrum β–Lactamase ที่ปนเปื้อนในผักที่วางขายในตลาดของประเทศไทย. ปริญญานิพนธ์ สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยรังสิต, กรุงเทพฯ.

ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2547. พืชผักผลไม้ไทยมีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยา ตอน "ผักชี"." บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร. 5 เมษายน 2547. เข้าถึงได้จาก http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio46-47/46-470027.htm (14 กรกฎาคม 2553).

ตวงพร โรจนวงศ์ โชคพิศิษฐ์ ชาญนันทพิพัฒน์ และวิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา. 2545. ผลของไอน้ำส้มสายชูต่อการลดการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวของมะละกอ. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

พรพิมล พฤกษ์ประเสริฐ, วนัสนันทน์ ธัญญพาณิชย์ และ ละม้าย แก้วจังหวัด. 2549. ความไวของเชื้อ multiresistant *K. pneumoniae* ต่อยาต้านจุลชีพ. สงขลานครินทร์เวชสาร. 3(24):148-151.

พีเค สยาม. มปป. ขั้นตอนการปลูกผักชีไทย. เข้าถึงได้จาก http://www.pk-siam.com/website/mart/vegets/pakcheethai/pakcheethai_arg.html (20 กุมภาพันธ์ 2554).

ภัทราพรรณ จรูณรัตนสกุล. 2553. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* บนผิวสตอเบอร์รี่สดด้วยน้ำส้มสายชูหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสุขาภิบาลอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ภัทราวดี ศรีปัญญา. 2552. ผลของสารสกัดข่า กันเกรา ร่วมกับกรดอะซิติกต่อจุลินทรีย์ก่อโรคบนผักชี.วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหารบัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.

ภัทราวดี ศรีปัญญา และบุษกร ทองใบ. 2553. ผลของสารสกัดข่าร่วมกับกรดอะซิติกต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักชี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41:1 (พิเศษ):576-580.

รัชพล พรรษา และสราวุธ มณี. 2549. การตรวจวัดการปนเปื้อนแบคทีเรียของผักสดบางชนิดจากตลาดสดจังหวัดมหาสารคาม. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.

ลัดดาวัลย์ คำมะปะนา. 2551. ผลของเอทธิฟอน และ 1- MCP ต่อการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในผักชีตัดแต่งพร้อมบริโภค. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วชิราภรณ์ เทียมพันธ์. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อเพื่อลดจำนวน *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium ปนเปื้อนบนผักกาดหอม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วราภา มหากาญจนกุล, ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และวชิราภรณ์ เทียมพันธ์. 2544. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในผักใบ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 5-7 กุมภาพันธ์ 2544.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง พนิต เพ็ชรน่วม และประภาส ปิ่นวิเศษ. 2553. เส้นทางวิจัยกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก:การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อทดแทนการนำเข้า...สู่การยอมรับของภาคเอกชนไทย. บทความเชิงทัศนวิสัย. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย 1 (1):14-21.

ศิวพร ศิวเวชช. 2535. วัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 347 หน้า.

สุดสายชล ทองหอม และนันทวัน กรัตพงศ์. 2552. ผลของน้ำส้มสายชู กรดซิตริกและโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อการลดลงของ *Salmonella* Typhimurium บนใบสะระแหน่. วารสารบูรพา. 14(1):18-25.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ. 454 หน้า.

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา วราวุฒิ ครูส่ง อดิศร เสวตวิวัฒน์ อัสนี วิจิตระกะ และสุเมธ ตันตระเธียร. 2549. การประชุมสัมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 8: นวัตกรรมทางอาหาร. 15-16 มิถุนายน 2549.

อุดร อุณหวุฒิ วลัยกร วรวิศิษฎ์ธำรง รัชฎา อินทรกำแหง มานะ พุ่มทอง และประเทือง ศรีสุข. 2536. คุณภาพมะม่วงน้ำดอกไม้ แรค และพิมเสนแดง หลังจากผ่านกระบวนการอบไอน้ำ. วารสารเกษตร. 11(1):15-19.

เอกชัย สร้อยน้ำ เกียรติศักดิ์ ตันเจริญ, ศุภชาติ ปานเนียม, สุวิมล พันธุ์ดี และณรงค์ จึงสมานญาติ. 2550. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเชื้อแบคทีเรียกรัมลบที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนม. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. 30 มกราคม 2550 - 2 กุมภาพันธ์ 2550.

Adams, M. R., and M. O. Moss. 2000. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry., UK.

Agaoglu, S., N. Dostbil, and S. Alemdar. 2007. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 51:53–57.

Aurand, L. W., J. A. Singleton, T. A. Bell, and J. L. Etchells. 1966. Volatile Components in the Vapors of Natural and Distilled Vinegar. Article first published online 25 Aug 2006. Journal of Food Science. 31(2):172–177.

Baron, E. J., L. R. Peterson, and S. M. Finegold, 1994. Purpose and Philosophy. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. St. Louis., Mosby.

Beuchat, L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated fresh produce. Journal of Food Protection. 59 : 204-216.

Beuchat, L.R. 1997. Comparison of chemical treatments to kill Salmonella on alfalfa seeds destine for spout production. Journal of Food Microbiology. 34:329-333.

Beuchat, L.R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. Journal of Microbes and infection. 4:413-423.

Beuchat, L.R., and D.A. Golden. 1998. Antimicrobials occurring naturally in foods. Journal of Food Technology. 43:134-142.

Boatwright, W. n.d. Properties of Vinegar. Available:http://www.apple-cider-vinegar-benefits.com/properties-of-vinegar.html. (accessed 9 October 2010).

Boglione, L., C. Spezia, F. Lipani, R. Balbiano, F.Canta, R. Marrone, M.D. Agostini, G. Calleri, and P. Caramello. 2008. *Klebsiella pneumoniae* meningitis in a 38-year-old Chinese traveller with impaired glucose tolerance: A new emerging syndrome? Travel Medicine and Infectious Disease. 6: 32–35.

Burt, S.A., M.J. Fledderman, H.P. Haagsman, F.V. Knapen, and E.J.A. Veldhuizen. 2007. Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapor. International Journal of Food Microbiology. 119:346–350.

Chaudhry, N.M.A., and P. Tariq. 2006. Bactericidal activity of black, bay leaf, aniseed and coriander Against Oral Isolates. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 19(3): 214-218.

Corcuff, R., E.H. J. Ad, E. Castaigne, and J. Makhlouf. 1996. Storage of broccoli florets in ethanol vapor enriched atmospheres. Postharvest Biology and Technology. 7:219-229.

Corcuff, R., J. Arul, F. Hamza, F. Castaigne, and J. Makhlouf. 1996. Storage of broccoli florets in ethanol vapor enriched atmospheres. Journal of Postharvest Biology and Technology. 7: 219-29.

Daifas, D. P., J. P. Smith, I. Tarte, B. Blanchfield, and J. W. Austin. 2007. Effect of ethanol vapor on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in a high moisture bakery produce. Journal of Food Safety. 20(2):111 – 125.

De la Maza, L.M. 2004. Introduction to Enterobacteriaceae. Color atlas of medical bacteriology. ASM Press.,Washington DC.

Falomir, M.P., D. Gozalbo, and H. Rico. 2010. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. Current Research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Microbial Biotechnology. 1175-1181.

Fuentes, F.A., T.C. Hazen, A.J. Lopez-Torres, and P. Rechani. 1985. Klebsiella pneumoniae in Orange Juice Concentrate. Journal of Applied and environmental Microbiology. 49 (6):1527-1529.

Food and Drug Administration. 1999. FDA Survey of Imported Fresh Produce. Available:http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/prodsurv.html. (accessed Date 15 July 2010).

Gao, H., Q.-L. Gao, X. Zhang, C. Guan, M.-H. Luo, H.-B. Zhang, P. Liu, H.-Y. Zhang, and J. Li. 2010. Improved medium for detection of Klebsiella in powered milk. Journal of Food Safety. 30:12-23.

Goffau, M.C.D., X. Yang, J.M.V. Dijl, and H.J.M. Harmsen. 2009. Bacterial pleomorphism and competition in a relative humidity gradient. Environmental Microbiology. 11:809-822.

Golberg, D., Y. Kroupitski, E. Belausov, R. Pinto, and S. Sela. 2011. *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. International Journal of Food Microbiology. 145:250–257.

Gurbutt, J.. 1997. Essential of Food Microbiology. Arnold, London. 54-78.

Harris, L.J., J.N. Farber, L.R. Beuchat, M.E. Parish, T.V. Suslow, E.H. Garrett, and F.F. Busta. 2003. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2 (Supplement):81-83.

Haryani, Y., A.S. Noorzaleha, A.B. Fatimah, B.A. Noorjahan, G.B. Patrick, A.T. Shamsinar, R.A.S. Laila, and R. Son. 2007. Incidence of *Klebsiella pneumonia* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD–PCR analysis. Journal of Food Control. 18:847–853.

Hoffman, R.K. 1968. Effect of Bacterial Cell Moisture on the Sporicidal Activity of β-Propiolactone Vapor. Applied Microbiology. 16:641-644.

Johnston, L.M., L. Jaykus, D. Moll, M.C. Martinez, J. Anciso, B. Mora and C.L. Moe. 2005. A Field Study of the Microbiological Quality of Fresh Produce. Journal of Food Protection. 68(9): 1840-1847.

Kamat, A., K. Pingulkar, B. Bhushan, A. Gholap, and P. Thomas. 2003. Potential application of low dose gamma irradiation to improve the microbiological safety of fresh coriander leaves. Journal of Food Control. 14:529–537.

Kudkeaw, N. and W. Krusong. 2007. Effect of acetic on *Salmonella* Anatum reduction *in vitro* and in fresh pork quality. Proceeding of the 9th Agro-Industrial Conference. Food Innovation Asia 2007, p307-NC.

Larson, E. L., and H. E. Morton, 1991. Alcohols. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 4th edition. Lea and Febiger, London. 191-203.

Lee, M.J., S.Y. Park, and S.D. Ha, 2007. Reduction of coliforms in rice treated with sanitizers and disinfectants. Journal of Food Control. 18:1093–1097.

Lichter, A., H.W. Zhou, M. Vaknin, , O. Dvir, Y. Zutchi, T. Kaplunov, and S. Lurie. 2003. Survival and responses of *Botrytis cinerea* after exposure to ethanol and heat. Journal of Phytopathol. 151:553–563.

Lihandra, E. M. 2007. Assessment of ethanol, honey, milk and essential oils as potential postharvest treatments of New Zealand grown fruit. A thesis submitted in (partial) fulfillment for the Degree of Master of Applied Science at the Auckland University of Technology, New Zealand.

Maroncle, N., C. Rich, and C. Forestier. 2006. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. Journal Research in Microbiology. 157:184–193.

Massa, S., F. Gardini, M. Sinigaglia, and M.E. Guerzoni. 1992. *Klebsiella pneumoniae* as a Spoilage Organism in Mozzarella Cheese. Journal of Dairy Science. 75(6):1411-1414.

Meatheral, B.L., D. Gregson, T. Ross, J.D.D. Pitout, and B.K. Laupland. 2009. Incidence, risk factors and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. The American Journal of Medicine. 122: 866-873.

Mills T.Y., N.R Sandoval and R.T. Gill. 2009. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology for Biofuel. Review 2(26):1-11.

Mpuchane, S.F., and B.A. Gashe. 1996. Presence of *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter species* in dried bush okra (Corchorus oliitorius) and African spider herb (Cleome gynandra). Journal of Food Control. 7(3):169-172.

Munoz, M.A., C. Ahlström, B.J. Rauch, and R.N. Zadoks. 2006. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. Journal of Dairy Science. 89(9):3425-3430.

O'Connor-Shaw, R.E., J.A. Guthrie, K.J. Dunlop, and R. Roberts. 1995. Coliforms in processed mango:Significance and control. International Journal of Food Microbiology. 25:51-61.

Ölmez, H., and U. Kretzschmar. 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. LWT - Food Science and Technology. 42: 686–693.

Piernas, V., and J. P. Guiraud. 1997. Microbial hazards related to rice sprouting. International Journal of Food Science and Technology. 32:33–39.

Pinto, R., A. Lichter, A. Danshin, and S. Sela. 2006. The effect of an ethanol dip of table grapes on populations of *Escherichia coli.* Journal of Postharvest Biology and Technology. 39: 308–313.

Portner, D., R. Hoffman. 1968. Sporicidal effect of peracetic acid vapor. Journal of Applied Microbiology. 16:1782–5.

Rajvanshi A. 2010. Bacterial Load on Street Vended Salads in Jaipur City, India. Internet Journal of Food Safety. 12:136-139.

Regué, M., B. Hita, N. Piqué, L. Izquierdo, S. Merino, S. Fresno, V. J. Benedí, and J.M. Tomás. 2004. A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. Journal of infect Immun. 72(1): 54–61.

Rennie, R.P., C.M. Anderson, B.G. Wensley, W.L. Albriton, and D. E. Mahony. 1990. *Klebsiella pneumoniae* Gastroenteritis Masked by *Clostridium perfringens*. Journal of Clinical Microbiology. 28 (2):216-219.

Richardson, S.D., A.D. Thruston, T.V. Caughran, P.H. Chen, T.W. Collette, K.M. Schenck, B.W. Lykins, C. Rav-Acha, and V. Glezer, 2000. Identification of new drinking water disinfection by products from ozone, chlorine dioxide, chloramine, and chlorine. Journal Water Air & Soil Pollution. 123:95-102.

Robertson, L.J., G.S. Johannessen, B.K. Gjerde, and S. Loncarevic. 2002. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. International Journal of Food Microbiology. 75:119–126.

Sabota, M.J., W.L. Hoppes, J.R.Z. Jr, H. DuPont, J. Mathewson, and G.W. Rutecki. 1998. A new variant of food poisoning: enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. The American Journal of Gastroenterology. 93(1):118-119.

Segura, A., L. Molina, S. Fillet, T. Krell, P. Bernal, J. Mun˜oz-Rojas and JL. Ramos. 2012. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. Review of Journal Environmental biotechnology. 23:415–421.

Shahid, M., A. Malik, M. Adil, N. Jahan, and R. Malik. 2009. Comparison of beta-lactamase genes in clinical and food bacterial isolates in India. Journal of Infection in Developing Countries. 3(8):593-598.

Sholberg, P.L., P. Haag, R. Hocking, and K. Bedford. 2000. The use of vinegar vapor to reduce post harvest decay of harvested fruit. Journal of Horticultural Science. 35:898-903.

Sholberg, P.L., T. Shephard, P. Randall, and L. Moyls. 2004. Use of measured concentrations of acetic acid vapor to control postharvest decay in d'Anjou pears. Journal of Postharvest Biology and Technology. 32:89-98.

Siddiqui, S., E. Kovacs, J. Beczner, R.K. Goyal, and F.C. Garg. 2005. Effect of ethanol, acetic acid and hot water vapors on the shelf-life of guava. Journal of Acta Alimentaria. 34 (1): [Abstract].

Singh, B.R., and S.B. Kulshreshtha. 1992. Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of *Klebsiella pneumoniae* from seafoods. International Journal of Food Microbiology. 16(4):349-352.

Soriano, J.M., H. Rico, J.C. Moltó, and J. Mañes. 2000. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. International Journal of Food Microbiology. 58:123–128.

Soriano, J.M., H. Rico, J.C. Moltó, and J. Mañes. 2001. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. Journal of Food Microbiology. 18:159-163.

Suzuki, Y., T. Uji, and H. Terai. 2004. Inhibition of senescence in broccoli florets with ethanol vapor from alcohol powder. Journal of Postharvest Biology and Technology. 31:177–182.

Tomas, J.M., B. Ciurana, and J.T. Jofre. 1986. New, Simple Medium for Selective, Differential Recovery of *Klebsiella* spp. Applied and Environmental Miccrobiology. 51:1361-1363.

Tripathi, P., and N. K. Dubey, 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Journal of Postharvest Biology and Technology. 32:235-245.

Tzortzakis, N.G. 2010. Ethanol, vinegar and Origanum vulgare oil vapor suppress the development of anthracnose rot in tomato fruit. International Journal of Food Microbiology. 142:14-18.

Umeh, O., and L.B. Berkowitz, 2009. Klebsiella Infections. Available: http://emedicine.medscape.com/arthicle/219907-overview. (accessed 9 Febuary 2011).

USDA. 2008. Most Probable Number Procedure and Tables. Microbiology Laboratory Guide book. Available: http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_Appendix_2_03.pdf (accessed 27 March 2011).

Wang, H., H. Feng, and Y. Luo. 2004. Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. Journal of Food Research International. 37(10): 949–956.

Wright, C., S.D. Kominos, and R.B. Yee. 1976. Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* recoveredfrom vegetable salads. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 31(3):453-454.

Yu, E.K., and J.N. Saddler, 1982. Enhanced Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 44(4): 777-784.

Xiao, Z., S. Dai, H. Yu , J. Zhu , H. Tian ,and Y. Gu. 2011. Discrimination of Chinese vinegars based on headspace solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry of volatile compounds and multivariate analysis. Journal of Food Science.76(8):1125-35.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Diluent (Merck, Germany)

Peptone	1.0 กรัม

ชั่ง Peptone 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 ml หรือขวดๆ ละ 225 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

2. Tryptic Soy Broth (TSB) (Himedia, India)

Casein enzymic hydrolysate	17.0 กรัม
Papaic digest of soyabean meal	3.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	2.5 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ชั่ง TSB 30 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH 7.3±0.2

3. Tryptic Soy Agar (TSA) (Himedia, India)

Pancreatic digest of casein	15.0 กรัม
Papaic digest of soyabean meal	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ชั่ง TSA 40 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH 7.3±0.1

4. Mueller Hinton Agar (MHA) (Himedia, India)

Beef, infusion form	300.0 กรัม
Casein acid hydrolysate	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Agar	17.0 กรัม

ชั่ง MHA 38 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2

5. MacConKey Agar w/0.15% Bile Salts, CV and NaCl (Himedia, India)

Pancreatic digest of gelatin	17.0 กรัม
Casein enzymic hydrolysate	1.5 กรัม
Peptic digest of animal tissue	1.5 กรัม
Lactose	10.0 กรัม
Bile salts	1.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Neutral red	0.03 กรัม
Crystal violet	0.001 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ชั่ง Sorbitol MacConKey Agar 51.5 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.1±0.2

6. MacConKey-Inositol-Carbinicillin Agar (MCIC) (ดัดแปลงจาก Gao และคณะ, 2010)

MacConkey	50.5 กรัม
Myo-inositol	10.0 กรัม
Carbinicillin	50.0 มิลลิกรัม

ชั่ง MacConKey 50.5 กรัม และ myo-inositol 10.0 กรัม ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 996 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50°C เติม carbinicillin ผงที่ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ml ให้ได้ความเข้มข้นของ carbinicillin เป็น 50.0 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1000 ml

7. Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST) (Merck, Germany)

Tryptose	20.0 กรัม
Lactose	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1 กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.75 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.75 กรัม

ชั่งอาหาร LST จำนวน 35.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 ปิเปตลงในหลอดทดสอบหลอดละ 10 ml ใส่หลอดดักก๊าซ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

8. Brilliant Green Broth (BGB) (Merck, Germany)

Peptone from meat	5.0 กรัม
Peptone from casein	5.0 กรัม
Meat extract	5.0 กรัม
Sodium chloride	3.0 กรัม
Di-sodium hydrogen phosphate	2.0 กรัม
Lactose	10.0 กรัม
Sucrose	10.0 กรัม

Brilliant green	0.0125 กรัม

ชั่งอาหาร BGB จำนวน 40.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.9±0.2 ปิเปตลงในหลอดทดสอบหลอดละ 10 ml ใส่หลอดดักก๊าซ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

9. EC broth (Merck, Germany)

Peptone from casein	20.0 กรัม
Lactose	5.0 กรัม
Bile salt mixture	1.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	4.0 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5 กรัม

ชั่งอาหาร EC จำนวน 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.9±0.2 ปิเปตลงในหลอดทดสอบหลอดละ 10 ml ใส่หลอดดักก๊าซ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

10. Simmon's citrate (Merck, Germany)

$MnSo_4$	0.2 กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0 กรัม
K_2PHO_4	1.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodium citrate	2.0 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
Agar	15. 0 กรัม

ชั่งอาหารจำนวน 24.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.9±0.2 ปิเปตลงในหลอดทดสอบ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเอียง (slant) ให้อาหารแข็งตัว

11. MR-VP broth

Buffer peptone	7.0 กรัม
Dextrose	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	5.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH 7.0±0.2 จากนั้นถ่ายใส่หลอดหลอดละ 5 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ให้มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกระดับต่างๆ (1.0-3.0%)

ปรับปริมาตร TSB และน้ำส้มสายชูหมักเป็น 9 ml ใน 1 หลอดทดลอง (เนื่องจากต้องเติมสารละลายเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ปริมาตร 1 ml ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนการจับเวลา เพื่อให้ปริมาตรสารละลายรวมเป็น 10 ml ใน 1 หลอดทดลอง) โดยคำนวณจากปริมาตรน้ำส้มสายชูหมักที่มีความเข้มข้นกรดอะซิติก 10% ที่ต้องใส่ในแต่ละหลอดทดลอง จากสูตร $C_1V_1=C_2V_2$ ยกตัวอย่าง เช่น ต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ให้มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1%

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(10\%)\ V_1 = (1\%)\ (10\ ml)$

$V_1 = 1\ ml$

ดังนั้นต้องเติมน้ำส้มสายชูหมักปริมาตร 1ml และTSB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและปรับ pH แล้วปริมาตร 8 ml ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารละลาย

1. Tryptone

ละลาย Tryptone 10 กรัมให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 ml ปิเปตลงในหลอดทดสอบ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Kovac's

ละลาย *p*-Dimethylaminobenzaldehyde 10 กรัมและ Isobutyl alcohol, 95% 150 ml ให้เข้ากัน จากนั้นค่อย ๆ เติม hydrochloric acid 50 ml คนให้เข้ากัน เก็บสารละลายในขวดสีชา

3. methyl red

ละลายสี methyl red 0.8 กรัม ใน 95% ethanol 300 ml แล้วจึงเติมน้ำกลั่น100 ml

4. α-naphthol solution

ละลาย α- Naphthol 10 กรัม ใน 95% ethanol 100 ml

4. 40% KOH

ละลาย Potassium hydroxide 20 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ml

ภาคผนวก ข

การทดสอบและการตรวจวิเคราะห์

การทดสอบ

1. IMVIC test (Baron และคณะ, 1994) ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ Indole production, Methyl red Test, Voges- Proskauer และ Citrate utilization

1.1 Indole test

เพาะเชื้อลงใน tryptone broth ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจ indole โดยหยดน้ำยา Kovac's ลงไป 1-2 หยด เขย่าเบา ๆ ผลบวกจะเกิดสีแดงเข้มอยู่ชั้นบนของอาหารเหลว แสดงว่าเชื้อสามารถผลิต tryptophanase ได้

1.2. Methyl red test (MR)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร MR-VP broth ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยด methyl red ลงไป 5-6 หยด เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก-เกิดสีแดง

ผลลบ-เกิดสีเหลืองหรือส้ม

1.3 Voges-Proskauer test (VP)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร MR-VP broth ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1.0 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 5% α-naphthol solution 0.6 ml และเติม 40% KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก-เกิดสีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ-เกิดสีเหลือง

1.4 Citrate Utilization

เพาะเชื้อโดยขีดเป็นเส้นตรงยาวบนผิวอาหาร บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลบวก-อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้

ผลลบ- อาหารมีสีเขียวดังเดิม

2. Catalase test (Baron และคณะ, 1994)

หยด 3% H_2O_2 ลงในสไลด์ จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วไปแตะโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบ นำมาแตะบน H_2O_2 ที่หยดไว้

ผลบวก-เกิดฟองก๊าซเนื่องจากเชื้อสร้างเอนไซม์ catalase ได้

ผลลบ-ไม่เกิดฟองก๊าซ

3. Oxidation test (Baron และคณะ, 1994)

หยด Kovac' s oxidase reagent (1% tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochroide ในน้ำกลั่น) ลงบนกระดาษกรอง ใช้แท่งแก้วเขี่ยเชื้อมาขีดลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ (ไม่ควรใช้ loop ที่ทำจากเหล็กและนิโครมเพราะจะทำให้เกิดผลบวกปลอมได้

ผลบวก-บริเวณที่ขีดเชื้อลงไปเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินภายใน 10 วินาที

ผลลบ-ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

การตรวจวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มด้วยวิธี presumptive coliform (USDA, 2008)

นำตัวอย่างที่เจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2} มาเจือจางต่อให้เป็น 10^{-3} โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.1ใช้ปิเปตขนาด 1 ml ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่ความเจือจางต่างๆ ลงในอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST) หลอดละ 1 ml ความเจือจางละ 3 หลอด (MPN-method) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง โดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซในหลอดอาหารแต่ละหลอด หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง และหากไม่มีหลอดใดไม่เกิดก๊าซให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงนำมาตรวจผลอีกครั้งหนึ่ง ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซในข้อที่ 5 ลงในอาหาร Brilliant Green Lactose Bile Broth จำนวน 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในแต่ละความเจือจางไปเทียบกับตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN ของโคลิฟอร์มต่อกรัมหรือ ml ของตัวอย่างอาหาร

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีคอลโคลิฟอร์มด้วยวิธี presumtive feacal coliform (USDA, 2008)

นำหลอดที่เกิดก๊าซในอาหารเหลว LST มาถ่ายเชื้อลงในอาหาร EC broth เพาะเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5°C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง และ 48±2 ชั่วโมง โดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซในหลอดอาหารแต่ละหลอด หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง และหากไม่มีหลอดใดไม่เกิดก๊าซให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงนำมาตรวจผลอีกครั้งหนึ่ง บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในแต่ละ

ความเจือจางไปเทียบกับตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN ของฟีคอลโคลิฟอร์มต่อกรัม หรือ ml ของตัวอย่างอาหาร

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมัก

คำนวณโดยใช้วิธีไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N ด้วยตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมัก 6 ml แล้วคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ กรด} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (N)} \times \text{ปริมาตรที่ไทเทรตได้} \times \text{มวลโมเลกุลกรด} \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง} \times 100}$$

ภาคผนวก ค

ตาราง MPN และเกณฑ์ประเมินคุณภาพทางกายภาพของผักชี

1. ตาราง MPN

ดัชนี MPN ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ของจำนวนหลอดทดสอบที่ให้ผลบวกใน 3 ระดับการเจือจางที่ 0.01, 0.001 และ0.0001 g (ml)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	MPN (/g หรือ /ml)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	MPN (/g หรือ /ml)
0-0-0	<30	2-2-0	210
0-0-1	30	2-2-1	280
0-1-0	30	2-2-2	350
0-1-1	61	2-3-0	290
0-2-0	62	2-3-1	360
0-3-0	94	3-0-0	230
1-0-0	36	3-0-1	380
1-0-1	72	3-0-2	640
1-0-2	110	3-1-0	430
1-1-0	74	3-1-1	750
1-1-1	110	3-1-2	1200
1-2-0	110	3-1-3	1600
1-2-1	150	3-2-0	930
1-3-0	160	3-2-1	1500
2-0-0	92	3-2-2	2100
2-0-1	140	3-2-3	2900
2-0-2	200	3-3-0	2400
2-1-0	150	3-3-1	4600
2-1-1	200	3-3-2	11000
2-1-2	270	3-3-3	>11000

2. เกณฑ์ประเมินคุณภาพทางกายภาพของผักชี

ผักชีในระหว่างการเก็บรักษามีการจัดระดับลักษณะที่เกิดขึ้นโดยดัดแปลงจาก ภัทราวดี ศรีปัญญา และ บุษกร ทองใบ (2553) ดังนี้

ระดับ	การเน่าเสีย	ความเต่งตึง	การเปลี่ยนสี	การเปลี่ยนกลิ่น	ลักษณะทั่วไป
1	ไม่ปรากฏ	เต่งตึงมาก	ต่ำกว่า 5%	ปกติ	เยี่ยม
2	น้อยมาก	เต่งตึงน้อยลง	5-15%	เล็กน้อย	ดี
3	เล็กน้อย	อ่อนนุ่มเล็กน้อย	15-30%	ปานกลาง	ปานกลาง
4	ปานกลาง	อ่อนนุ่มมาก	30-50%	แย่	แย่
5	รุนแรง	แห้งเหี่ยว	มากกว่า 50%	แย่มาก	แย่มาก

ผักที่ได้คะแนนระดับ 4 ถือว่าตัวอย่างผักชีนี้หมดอายุการเก็บรักษาแล้ว

การอธิบายลักษณะคุณภาพทางกายภาพของผักชี

1. การเน่าเปื่อย

การมองเห็น การทำลายของเนื้อเยื่อผักชีสาเหตุจากจุลินทรีย์ อาจจะเกิดขึ้นจากบริเวณฐานของลำต้น ซึ่งเกิดจากการตัดระหว่างการเก็บเกี่ยว และบนบริเวณใบ ส่วนของดอก และลำต้นที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากเครื่องจักรกลระหว่างการเก็บเกี่ยวด้วยมือ

2. สีของใบ

ใบที่เก็บเกี่ยวมาควรจะมีสีเขียวสด อย่างไรก็ตามการสูญเสียคลอโรฟิลล์ โดยทั่วไปเกิดขึ้นจากระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น ซึ่งทำให้เกิดใบเหลืองเพิ่มขึ้นและใบแก่ใช้เป็นตัวชี้วัดเบื้องต้น

3. ความเต่งตึง

ใบ ก้านใบ และลำต้น ควรจะสดและกรอบ ซึ่งทั้งช่อต้องตั้งตรง และไม่อ่อนปวกเปียก การสูญเสียน้ำเป็นสาเหตุให้ความเต่งตึงลดลง และส่งผลไปถึงความชื้นในการเก็บรักษา ลำต้น และก้านใบ เริ่มแรกเรียบลื่น และมีความสดมากอาจจะช่วยรักษาโครงสร้างให้แน่น แต่จะเหี่ยว และเกิดรอยย่นเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน

4. ลักษณะทั่วไป (General appearance)

สิ่งที่มองเห็น ความรู้สึกสัมผัสทั้งหมดของผักชี ซึ่งได้รับการยอมรับจากผู้ขายและผู้บริโภค

ภาคผนวก ง

ผลการสำรวจแบคทีเรียและการทดสอบในผักชี

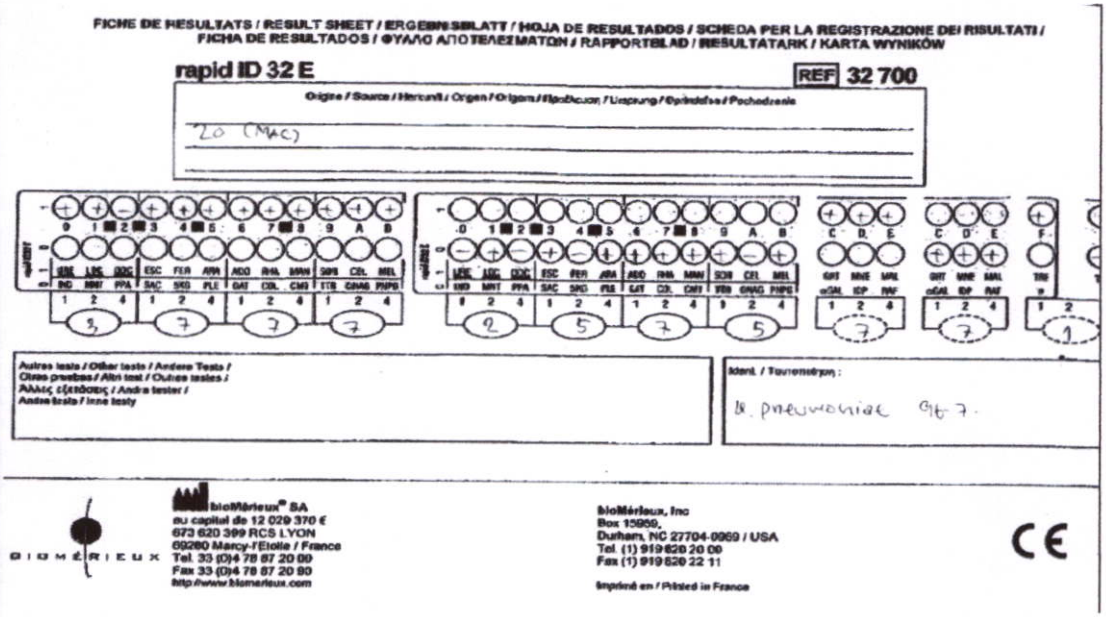
1. ผลการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในผักชี (Background flora)

ตามวิธี presumptive coliform และ presumtive feacal coliform ตามลำดับ ของ USDA (2008)

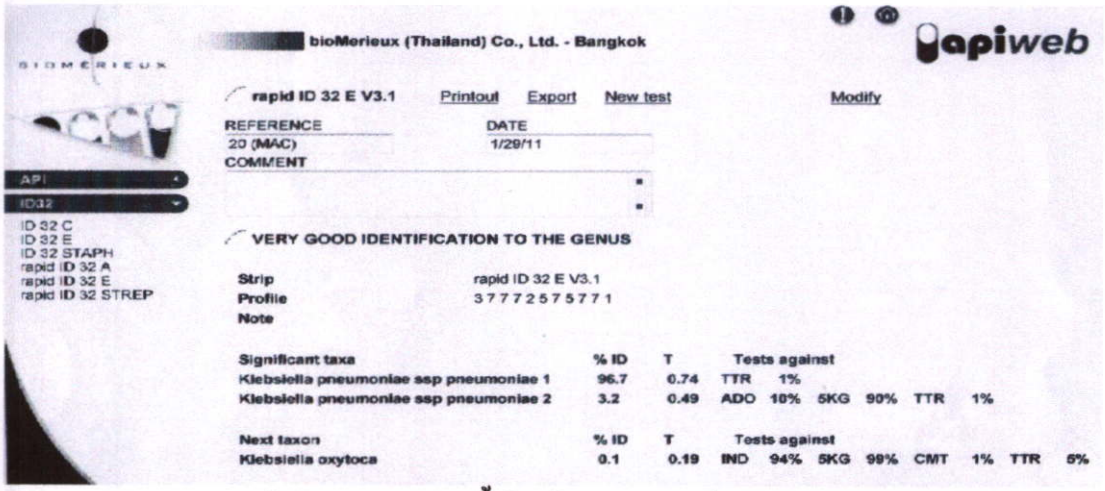
ตัวอย่างที่	BG			EC		
	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	MPN/g	แบคทีเรีย	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	MPN/g	แบคทีเรีย
1	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-3	>11,000	Kl, Ps
2	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-2	11,000	Ps, Ea
3	3-3-3	>11,000	Kl, Ci	2-2-1	280	Kl, Ci
4	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-3	>11,000	Kl, Ps, Ci
5	3-3-3	>11,000	Kl	3-2-2	2,100	Kl
6	3-3-1	4,600	Kl, Ps, B	3-0-0	230	Kl, Ps, Es
7	3-2-2	2,100	Kl	1-0-0	36	Kl, Ci
8	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-3	>11,000	Kl, Ps
9	3-3-3	>11,000	Ps, Ci	3-3-3	>11,000	Kl
10	3-3-3	>11,000	Kl	3-3-3	>11,000	Kl
11	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-3	>11,000	Kl, Ps
12	3-3-3	>11,000	Kl, Ci	3-3-3	>11,000	Kl
13	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-3	>11,000	Kl
14	3-3-3	>11,000	Kl, Ps	3-3-3	>11,000	Kl, Ps
15	3-3-1	4,600	Kl	3-2-1	1,500	Kl
16	3-3-3	>11,000	Kl	3-3-2	11,000	Kl
17	3-3-3	>11,000	Ps, Ci	3-3-3	>11,000	Kl, Ps, Ci
18	3-2-1	1,500	Kl, Ps, Ci, B	3-2-0	930	Kl, Ci, B
19	3-3-2	11,000	Kl	3-3-2	11,000	Kl

2. ผลการทดสอบยืนยันโดยชุดทดสอบ

2.1 ภาพชุดทดสอบ rapid ID 32 E สำหรับกลุ่ม Enterobacteriaceae (BioMerieux)



2.2 ภาพผลการทดสอบโดยชุดทดสอบ rapid ID 32 E สำหรับกลุ่ม Enterobacteriaceae (BioMerieux)



2.3 ภาพผลยืนยันการทดสอบเชื้อโดยโปรแกรมสำเร็จ apiweb (BioMerieux)

3. การสำรวจปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งหมด และ *K. pneumoniae* ในผักชี

ต.ย.	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)	*K. pneumoniae* (CFU/g)	*K. pneumoniae (%)*
1	7.17	6.02	84.0
2	7.30	5.27	72.1
3	6.86	4.85	70.7
4	6.67	3.81	57.2
5	7.52	4.48	59.5
6	7.17	4.26	59.3
7	7.42	4.48	60.4
8	7.27	5.85	80.4
9	7.27	4.38	60.2
10	7.75	4.48	57.8
11	7.95	4.20	52.9
12	7.37	3.57	48.5
13	7.11	4.34	61.0
14	7.08	3.81	53.8
15	6.91	3.00	43.4
16	7.55	5.34	70.8
17	7.57	5.49	72.6
18	7.07	4.43	62.7
19	7.23	4.87	67.4
20	7.39	5.15	69.8
21	7.52	4.70	62.5
22	6.96	4.11	59.1
23	7.39	4.71	63.7
24	7.71	5.18	67.1
25	6.99	4.12	59.0
26	7.40	3.46	46.8
27	7.37	5.08	68.9
28	6.56	3.80	57.9
29	7.39	4.06	55.0
30	7.07	4.36	61.7

4. การทดสอบแช่ผักชี

ต.ย.	aerobic mesophiles (cfu/g)				*K. pneumoniae* (cfu/g)			
	control*	5 นาที	10 นาที	15 นาที	control	5 นาที	10 นาที	15 นาที
1	6.67	6.04	6.00	6.06	3.81	3.54	3.48	3.30
2	7.52	7.06	7.06	7.01	4.48	4.17	4.14	4.13
3	7.17	7.10	7.06	6.96	4.26	4.12	4.08	3.98

* หมายถึง แช่ในน้ำประปาโดยไม่เปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่ และเป็นผักชีที่ไม่มีเศษดินติดที่ราก

5. การทดสอบการล้างผักชี

ต.ย.	aerobic mesophiles (cfu/g)				*K. pneumoniae* (cfu/g)			
	control*	การล้าง**			control*	การล้าง**		
		1 ครั้ง	2 ครั้ง	3 ครั้ง		1 ครั้ง	2 ครั้ง	3 ครั้ง
1	7.17	6.21	5.95	5.60	6.02	5.07	5.02	4.55
2	6.02	6.02	5.95	5.64	5.27	4.60	3.48	2.00
3	6.86	6.70	6.42	5.22	4.85	4.55	4.48	3.10

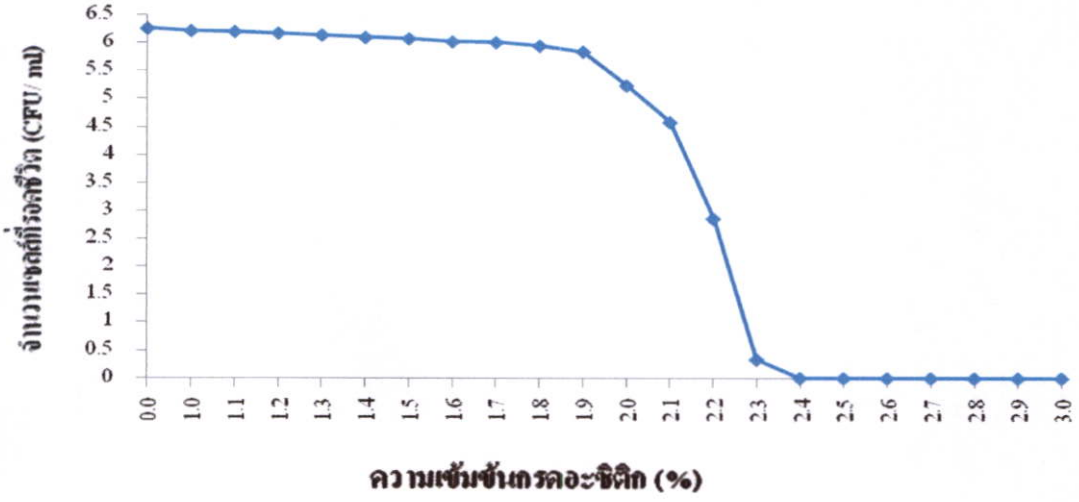
* หมายถึง ผักชีที่ไม่ได้ล้างด้วยน้ำประปา

** หมายถึง การล้างด้วยน้ำประปาแบบถูเบาๆเล็กน้อย โดยใช้ตัวอย่างผัก 200 กรัม ต่อน้ำประปา 5 ลิตร และเปลี่ยนน้ำทุกครั้ง

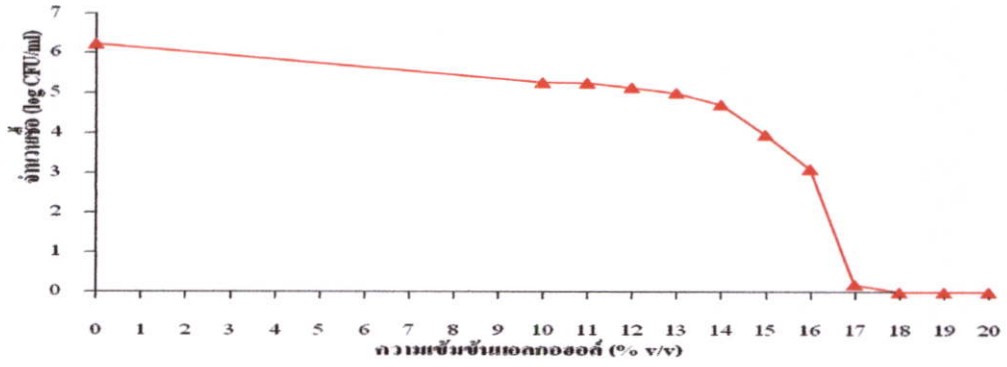
ภาคผนวก จ

กราฟสรุปผลของน้ำส้มสายชูหมักและเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* ในหลอดทดลอง

1. ผลของน้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้น 0.0% (v/v) และตั้งแต่ 1.0-3.0% (v/v) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C)



2. ผลของเอทานอลที่ความเข้มข้น 0% และตั้งแต่ 10-20% (v/v) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. pneumoniae* โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ณ อุณหภูมิห้อง (30±1°C)



ประวัติผู้เขียน

นางสาวฐิตินันท์ ชยาวัชรกุล เกิดเมื่อวันที่ 21 พฤศจิกายน 2525 ที่ จังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการสัตวแพทย์ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ปีการศึกษา 2548 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหารปี พ.ศ. 2551 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2555

ประวัติการทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ.2548-2550 นักวิทยาศาสตร์ แผนกวิเคราะห์คุณภาพน้ำนม สำนักตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

พ.ศ.2550-2552 นักวิทยาศาสตร์ แผนกชีวเคมีและพิษวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

พ.ศ.2553 นักจุลชีววิทยา แผนกจุลชีววิทยา บริษัท Chem Lab Services ประเทศไทย

พ.ศ.2555 ผลงานวิชาการ

Chayawatcharakul, T. and W.Krusong. 2012. *In vitro* Impact of Fermented Vinegar and its Vapor on *Klebsiella pneumoniae*. Proceedings on 1st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2011), King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, 26-29 January 2012, pp. 415-418.