สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

เรื่อง

สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี

(Novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province)

โดย
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นางสาวอรสา สุริยาพันธ์[2]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พ401 60613
20 พ.ย. 2556
329353

เสนอต่อ

เริ่มบริการ
21 ก.พ. 2557

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องสารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี (Novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province) สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 ข้าพเจ้าและคณะทำงานขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ
ตุลาคม 2556

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 ชนิดและเชื้อผสมในรูปแบบของส่วนใสและเซลล์แขวนลอยในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำนวน 60 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar โดยผลการศึกษาพบว่า รูปแบบเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกจำนวน 3 ชนิด (*Bacillus* BUU 004, *Bacillus* BUU 005 และ *Bacillus* BUU 001) และแบคทีเรียโพรไบโอติกผสม (5 ชนิด) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง 61.67, 26.67, 10.00 และ 8.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนรูปแบบส่วนใสพบว่ามีเพียง 2 ชนิด คือ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ 33.33% และ 13.33% ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าในรูปแบบเซลล์แขวนลอยและส่วนใสของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งได้ดี และควรนำมาศึกษาอย่างละเอียดเพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ : อาหารทะเลแห้ง; โพรไบโอติก; *Bacillus* sp.

Abstract

The purpose of the present study was to determine efficiency of single and mixture of five species of bacteria probiotics as supernatant and cell suspension against 60 isolates of bacteria contaminated in dried processed seafood products using agar well diffusion assay on mueller hinton agar. Results showed that cell suspensions of three bacterial probiotic species (*Bacillus* BUU 004, *Bacillus* BUU 005 and *Bacillus* BUU 001) and mixture of five bacterial species were able to inhibit those bacteria for 61.67%, 26.67%, 10.00% and 8.33%, respectively. Furthermore, supernatants of two bacterial species (*Bacillus* BUU 004 and *Bacillus* BUU 005) demonstrated the inhibitory activity on those bacteria for 33.33% and 13.33%, respectively. The present study concluded that *Bacillus* BUU 004 and *Bacillus* BUU 005 as cell suspension and supernatants were effectively capable of killing bacteria contaminated in dried processed seafood products. Therefore, they should be thoroughly investigated in order to apply in dried seafood products for further successfully inhibition of potential pathogenic bacteria.

Key words : Dried seafood; Probiotics; *Bacillus* sp.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
Abstract	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง	17
4 ผลการทดลอง	23
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	47
Output จากโครงการวิจัย	58

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก.....	12
2	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดต่าง ๆ.....	24
3	ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง.....	25
4	ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มทนเค็มที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง.....	26
5	ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง.....	27
6	ปริมาณของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสม.....	28
7	ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบส่วนใส.....	29
8	ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย.....	35

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันอาหารทะเลได้รับความนิยมมีผู้บริโภคมากขึ้นและยังเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง ผู้บริโภคมักนิยมรับประทานอาหารทะเลทั้งแบบดิบและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป อาหารทะเลดิบที่พร้อมบริโภค เช่น กุ้ง หอยนางรม เป็นต้น ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป เช่น กะปิ กุ้งแช่แข็ง กุ้งแห้ง ปลาเค็ม เป็นต้น ตามนโยบายของรัฐบาลที่กำหนดให้ปี พ.ศ. 2547 เป็นปีแห่งการสร้างระบบความปลอดภัยด้านอาหารเพื่อให้ประชาชนมีสุขภาพดีถ้วนหน้าและเพื่อให้อาหารที่ผลิตและบริโภคในประเทศมีความปลอดภัยได้มาตรฐานนำไปสู่การเป็น "ครัวโลก" ปัจจุบันสาธารณสุขจังหวัดชลบุรีได้ทำการตรวจสอบคุณภาพทั้งด้านเคมีและด้านจุลินทรีย์ พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและสารเคมีสังเคราะห์เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) นอกจากนั้นจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงและสีสังเคราะห์ร้อยละ 0.00-39.02 และ 14.89 - 100.00 ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงมากที่สุดคือ หมึกแห้งและหมึกแปรรูป (ร้อยละ 39.02) และผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของสีสังเคราะห์สูงที่สุด คือ ปูกรอบ (ร้อยละ 100) รวมทั้งปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮท-เทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปมีค่าอยู่ระหว่าง $1.00 \pm 0.50 \times 10^{2} - 5.23 \pm 0.63 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียที่พบมากกว่าร้อยละ 50 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีพบในช่วง $0.00 - 1.04 \pm 0.04 \times 10^{5}$ CFU/g โดยแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* และแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือมีปริมาณอยู่ในช่วง $1.00 \pm 0.00 \times 10^{2} - 3.12 \pm 0.18 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Pantoea* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ก, 2553ข; 2553ค; Chotmongcol et al. 2010; Samutsan et al., 2010)

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารและการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคยังเป็นปัญหาสำคัญอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Fisher and Phillips, 2006) จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขชี้ให้เห็นถึงอันตรายจากการเจ็บป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค สะท้อนจากตัวเลขของผู้ป่วยตลอด 15 ปีที่ผ่านมา โดยในปี พ.ศ. 2548 สำนักระบาดวิทยาได้รายงานว่าพบผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยรวมทั้งสิ้น 140,949 ราย คิดเป็นอัตราการป่วย 226.62 รายต่อประชากรแสนคน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2539 ที่มีอัตราการป่วยด้วยโรค

อาหารเป็นพิษเท่ากับ 136.87 รายต่อประชากรแสนคน (สำนักระบาดวิทยา, 2548) ซึ่งปัญหานี้กำลังเพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ในปี พ.ศ. 2552 พบว่ามีผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษมากกว่า 1.5 แสนรายต่อปี (ข้อมูลสถิติประจำปี พ.ศ. 2552 จากกระทรวงสาธารณสุข เรื่องผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ) จากรายงานการศึกษาข้อมูลของฝ่ายพัฒนา ระบบข้อมูลเฝ้าระวังโรค สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคพบว่า แบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษของคนไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Vibrio parahaernolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบบ้าง ได้แก่ *Clostridium butulinum*, *Clostridium perfringens* (สำนักระบาดวิทยา, 2545; 2548) จากปัญหาที่เพิ่มขึ้นนี้ทำให้มีการกำหนดมาตรฐานที่มุ่งเน้นการลดการปนเปื้อนโดยการออกกฎหมายและส่งเสริมแนวความคิดในการบริโภคอาหารที่ปราศจากสารกันเสีย มีความปลอดภัยและมีขั้นตอนการผลิตอาหารที่มีสุขอนามัย (Brul and Coote, 1999) ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมมาตรฐานของอาหารจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์คือการยับยั้งการเจริญหรือการทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารด้วยการปรับสภาวะไม่ให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ การใช้สารเคมีหรือสารต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในปัจจุบันสารเคมีสังเคราะห์หลากหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดแล็คติก (Lactic acid) กรดโพรพีโอนิก (Propionic acid) กรดซอร์บิก (Sorbic acid) ไนไทรต์ (Nitrite) และซัลไฟท์ (Sulfites) เป็นต้น (Beuchat and Golden, 1989; Davidson, 1997; Sofos et al., 1998)

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยและต้องการอาหารที่ไม่เจือปนสารเคมีจึงส่งผลให้บริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ หันมาสนใจเทคนิคที่ใช้สารที่ได้จากธรรมชาติหรือสารที่ไม่มีความเป็นพิษในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นทางเลือกจากธรรมชาติจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการควบคุมหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียจากการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้โดยการเติมแบคทีเรีย (Addition of live bacteria; Ananou et al., 2007) ยกตัวอย่างเช่น Matamoros et al. (2009a) รายงานว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเดี่ยว คือ *Lactobacillus piscium* สายพันธุ์ EU2241 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* และยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เย็นบรรจุแบบสุญญากาศ (Chillled vacuum-packaged shrimp) นอกจากนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียผสมยังเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเช่นเดียวกัน เช่น การใช้แบคทีเรียผสมของ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus* และ *Staphylococcus xylosus* สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมถึงแบคทีเรียที่ผลิตสารก่อภูมิแพ้ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มผลิตฮีสตามีน (Histaminogenic bacteria) และสารไบโอจีนิกเอมีนอื่น ๆ (Biogenic amines) ได้แก่ Tyramine, Cadaverine, Putrescine และ Tryptamine (Emborg and Dalgaard, 2006; Yongjin et al., 2007) และการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียในรูปของสารบริสุทธิ์ เช่น การใช้ไนซินและ

เพดิโอซินสามารถลดปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count) ในปลาสดหั่นชิ้น (Fresh fish fillets) และควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นปลา (Yin et al., 2007) รวมทั้งการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ เช่น Mesenterocin Y ที่ผลิตจาก *Lactobacillus sakei* สามารถลดปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci, Coagulase-negative cocci และยีสต์ รวมทั้งไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก (Zdolec et al., 2008)

ในปัจจุบันมีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ ไนซิน มาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากสารกลุ่มแบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและเป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547; Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดประการหนึ่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดนี้ คือ ไนซินมีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง (ประมาณ 1,990 บาทต่อกิโลกรัม) ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตอาหารแปรรูปเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นทีมงานวิจัยของเราจึงมีความมุ่งมั่นในการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ได้จากประเทศไทย ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์และมีราคาที่ถูกเพื่อทดแทนไนซินและสารเคมีสังเคราะห์ชนิดอื่นที่ใช้ในปัจจุบัน โดยได้เริ่มการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 และได้ค้นพบองค์ความรู้ในการจัดจำแนกและพัฒนาแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้ง ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทางอาหารมากที่สุดชนิดหนึ่ง รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลากชนิดในอาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* มากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลบางชนิด

โครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงการพัฒนาสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในปัจจุบัน เพื่อมุ่งยกระดับมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีด้วยการศึกษาถึงสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อส่งจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ และเพื่อให้มหาวิทยาลัยบูรพาซึ่งเป็นมหาวิทยาลัยในภาคตะวันออกสามารถช่วยเหลือทางด้านวิชาการให้แก่ชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเพื่อทำให้การศึกษาในเรื่องดังกล่าวได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้จากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ต่อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปเพิ่มเติมจาก *S. aureus* และ

ทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยประเมินถึงประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี และคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยยังได้วางแผนระเบียบการวิจัยในการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยวัสดุที่มีราคาถูกเพื่อมุ่งพัฒนาในการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากในปัจจุบันการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (ไนซิน) ที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปนั้นมีราคาค่อนข้างสูงอันมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ใช้ในกระบวนการผลิตมีราคาสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งของสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิต แต่ทั้งนี้ยังคงต้องคำนึงถึงปริมาณของสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกว่ามีครบถ้วนหรือไม่ และองค์ประกอบในอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเชื้อและการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป รวมทั้งจะต้องมีปริมาณมากพอ มีคุณสมบัติคงที่ จัดหาได้ง่ายและสามารถจัดการของเสียหรือน้ำเสียที่เกิดขึ้นได้โดยง่าย (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534) แหล่งของสารอาหารที่เหมาะสมและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งยังอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี ยกตัวอย่างเช่น กากน้ำตาล (Molasses) (ไวรุจน์ เดชมหิทกุล และคณะ, 2550; Khodair et al., 2008) น้ำแช่ข้าวโพด (Corn-steep liquor) (Amarty and Leung, 2000) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) (El Enshasy et al., 2008) และหางนม (Whey) (Rech and Ayub, 2007) เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการยกระดับมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีด้วยการศึกษาถึงสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์แล้ว ยังมุ่งในการเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาการกำจัดของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรอีกด้วย ซึ่งจะส่งผลให้ประเทศไทยมีความมั่นคงทางอาหารและมีศักยภาพในการแข่งขันทางด้านอุตสาหกรรมอาหารกับนานาประเทศได้อย่างเข้มแข็งและยั่งยืน อันเนื่องมาจากการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่สรรสร้างโดยคนไทยและเหมาะสมต่อประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งและแปรรูป

2.2 เพื่อศึกษาถึงปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่ทนต่อฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก

2.3 เพื่อศึกษาหาระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหารทะเลแห้งที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นานที่สุดและยังคงรักษาระดับมาตรฐานทั้งในประเทศและต่างประเทศ

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัย เรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 ที่ประสบความสำเร็จอย่างดีตลอดมาเป็นฐานองค์ความรู้และทำการศึกษาในปีงบประมาณครั้งนี้ คือ ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้งจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ ต่อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงและมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปต่อไป

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

4.1 ทราบถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์และสารปนเปื้อนตามมาตรฐานอาหารปลอดภัย

4.2 สามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์เพื่อควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรีย รวมทั้งลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากสารเคมีสังเคราะห์ ทำให้คุณภาพชีวิตของประชากรไทยในท้องถิ่นและประเทศชาติดีขึ้นเทียบกับมาตรฐานโลกและทำให้ผู้ส่งออกต่างประเทศมีความมั่นใจและยอมรับในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปซึ่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

1. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร
2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
3. โพรไบโอติก
4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

ความปลอดภัยของอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งอาหารทะเลเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ในแต่ละปีประเทศไทยผลิตและส่งออกสินค้าประเภทนี้จำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เหล่านี้ยังคงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ อันส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดโรคจากการบริโภคอาหารทะเล แบคทีเรียก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลยกตัวอย่างเช่น

B. cereus จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนตรง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (Endospore) บริเวณกลางเซลล์ เซลล์ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนระดับอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ คือ 72 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้จึงมักพบสปอร์เจริญอยู่ในอาหาร มักพบเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในดิน น้ำ ฝุ่นละออง ในอาหารสุกและอาหารดิบและธัญพืช *B. cereus* สามารถผลิตสารพิษออกมาอย่างน้อย 2 ชนิด และแต่ละชนิดจะทำให้เกิดอาการของโรคต่างกัน สารพิษจะสร้างออกมาในระหว่างการเจริญและยังคงอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์แตกสารพิษจึงถูกปล่อยออกมา อาการของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *B. cereus* มี 2 แบบ คือ 1) อาการท้องร่วง (Diarrheal form) เกิดจากสารพิษที่เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน (Thermolabile) ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ แต่ไม่อาเจียน ไม่มีไข้ ผู้ป่วยจะหายเองได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *C. perfringens* 2) อาการอาเจียน (Emetic form) เกิดจากสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งที่ทนความร้อนได้ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย โดยอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

Clostridium perfringens จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์รูปไข่ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญในที่ที่ไม่มีอากาศ เซลล์ปกติจะถูกทำลายได้โดยใช้ความร้อนต่ำแต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อนี้ได้ พบเซลล์ปกติและสปอร์ได้ทั่วไปในดิน น้ำ อาหาร เครื่องเทศ ฝุ่นละออง ลำไส้มนุษย์และสัตว์ น้ำโสโครกและสิ่งปฏิกูล เป็นต้น *C. perfringens* สามารถสร้างสารพิษได้ 5 ชนิด คือ A B C D และ E แต่สารพิษชนิด A มักเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษและสร้างก๊าซ อาการของโรคจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภค

อาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณมาก แบคทีเรียชนิดนี้ทนต่อความเป็นกรดของกระเพาะอาหารจึงมีชีวิตรอดผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็ก เจริญและสร้างสปอร์พร้อมๆ กับขับสารพิษออกมามากทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) อาการของโรคคือ ท้องเสีย ปวดท้อง เนื่องจากมีแก๊สในกระเพาะอาหารมาก คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อัตราการตายต่ำ ถ้ามีการตายจะพบในเด็กทารก คนชราและคนป่วยด้วยโรคอื่นที่มีร่างกายอ่อนแอ อาการต่างๆ จะหายเองภายใน 24 ชั่วโมง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) *C. perfringens* มักพบในอาหารแห้งทั่วๆ ไป แต่จะไม่พบในอาหารแช่แข็งเพราะสปอร์ไม่สามารถทนอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำ ผลิตภัณฑ์ประมงที่พบเชื้อนี้ เช่น กะปิ ปลาเค็ม ปลาร้า ปลาเจ่าและกุ้งแห้ง (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์และสัตว์ เช่น จมูก มือ ผิวหนัง รวมทั้งอากาศและฝุ่นละออง การปนเปื้อนของเชื้อนี้ในอาหารมาจากการไอ จามลงในอาหารหรือจากผิวหนัง เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนลงในอาหารและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจะสร้างสารพิษ (Enterotoxin) ภายในเซลล์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหาร ชนิดของสารพิษที่สร้างมี 5 ชนิด คือ A B C D และ E ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนความร้อน (Heat stable toxin) สารพิษชนิดนี้ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ผู้บริโภคจึงไม่สามารถทราบได้ว่ามีสารพิษเกิดขึ้นในอาหาร เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง จะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย เหงื่อแตก ปวดศีรษะ อ่อนเพลียและบางครั้งมีไข้ด้วย อาการป่วยจะดีขึ้นภายใน 8-24 ชั่วโมง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

***Salmonella* sp.** จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ไม่ทนความร้อนสามารถทำลายได้ในระยะเวลาอันสั้น พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า สัตว์ปีก เต่า กบ รวมทั้งแมลงต่างๆ สามารถแยกเชื้อได้จากดิน น้ำและสิ่งโสโครกต่างๆ ที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระ อาการของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *Salmonella* sp. ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาวสั่นและอุจจาระร่วง อ่อนเพลีย มีไข้ปานกลาง โดยสามารถจำแนกอาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* sp. ได้ 3 แบบคือ 1) โรคไข้เอนเทอริค (Enteric fever) ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ คือ *S. typhi* และเชื้อที่เป็นสาเหตุของพาราไทฟอยด์คือ *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B และ *S. paratyphi* C โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์เกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น โดยได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่ม แสดงอาการภายใน 12-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ปอดอักเสบ เบื่ออาหาร ท้องอืด ม้ามโต อาจมีอาการอุจจาระร่วง ระยะของโรคประมาณ 3-4 สัปดาห์ 2) โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีไข้สูง ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม อาจมีอาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ 3) กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) ส่วนใหญ่เชื้อนี้มักจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ภายใน 8-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง มีไข้เล็กน้อย อาจพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* sp. ในเนื้อสัตว์ เช่น ไก่ หมู ปลา และสัตว์มีเปลือก ในผลิตภัณฑ์ประมงประเภทสัตว์มี

เปลือกแช่แข็งพร้อมบริโภค (Precooked frozen crustaceans) ในระหว่างกระบวนการผลิตเพราะอาหารประเภทนี้จะสัมผัสกับคนงานโดยตรง ถ้าคนงานไม่ระมัดระวังเรื่องความสะอาด เชื้อจากคนงานจะปนเปื้อนเข้าไปในอาหาร เมื่อนำอาหารไปแช่แข็งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทนอยู่ได้ ดังนั้นเมื่อนำอาหารมาละลายแล้วนำไปรับประทานทันทีก็จะทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อเข้าไปด้วย (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

Vibrio parahaemolyticus จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลืออยู่ 3% พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อย สามารถทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อาการของโรคเกิดขึ้นภายหลังได้รับเชื้อ 10-24 ชั่วโมง โดยจะมีอาการปวดท้องอย่างรุนแรงภายใน 2-48 ชั่วโมง มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียนและอุจจาระร่วง ถ้าพิษรุนแรงจะทำให้ถ่ายออกมามีมูกเลือด (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538) สามารถแยกเชื้อได้จากอาหารทะเลต่าง ๆ ในระหว่างฤดูร้อน การระบาดของโรคเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวซึ่งเกิดจากผู้ป่วยรับประทานอาหารทะเลดิบ อาหารทะเลที่ปรุงไม่สุกหรือมีเชื้อปนเปื้อนภายหลังการปรุงอาหารสุกแล้ว ได้แก่ ปลา ปู เป็นต้น (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

นอกจากนั้นยังพบงานวิจัยหลายชนิดที่ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่

Hatha and Lakshmanaperumalsamy (1997) รายงานการตรวจพบ *Salmonella* ในปลาและสัตว์มีเปลือก จำนวน 370 และ 276 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยซื้อตัวอย่างจากตลาดในเมือง Coimbatore ทางตอนใต้ของประเทศอินเดียตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 1990 ถึงเดือนสิงหาคม ปี ค.ศ. 1992 ตรวจพบ *Salmonella* ในปลาและสัตว์มีเปลือกจำนวน 14.25% และ 17.39% ตามลำดับ สามารถจำแนก Serotype ได้ คือ *Salmonella weltevreden*, *S. typhi*, *S. paratyphi* B, *S. mgulani* และ *S. typhimurium* ซึ่งพบได้ทั้งในปลาและสัตว์มีเปลือก ส่วน *S. senftenberg* พบได้ในสัตว์มีเปลือกเท่านั้น

Hosseini et al. (2004) รายงานการตรวจพบ *Vibrio* spp. ในกุ้งที่จับได้จากชายฝั่ง Persian Gulf อยู่ทางตอนใต้ของประเทศอิหร่าน มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 770 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Vibrio* spp. ในตัวอย่าง 16 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus, V. damsela* และ *V. fluvialis* แต่จากการทดลองนี้ตรวจไม่พบ *V. cholerae*

Aycicek et al. (2005) รายงานการตรวจพบ *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภคจากร้านขายอาหารในกองทัพบกที่เมือง Ankara ประเทศตุรกี จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 512 ตัวอย่าง ได้แก่ ตับ สลัดผัก สลัดรัสเซีย พิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ Meatballs, Turkish lahmacun, Turkish pide และ Turkish doner ตรวจพบ *S. aureus* ที่ให้ผลการทดสอบโคแอ็กกูเลสเป็นบวก ในตัวอย่าง 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.4% มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 2.2 ถึง 4.3 log CFU/g ชนิดของอาหารพร้อมบริโภคได้แก่ สลัดผัก สลัดรัสเซียและ Meatballs มี *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารมากกว่าพิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ Turkish lahmacun, Turkish pide และ Turkish doner จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* อาจปนเปื้อนในอาหารได้จากการใช้มือสัมผัสกับอาหาร

Colakoglu et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในหอยและกุ้งที่ซื้อจากตลาดและห้องครัวของโรงแรมในเมือง Dardanelles ประเทศตุรกี จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 127 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอย 97 ตัวอย่าง และกุ้ง 30 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในตัวอย่าง 84 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *Vibrio alginolyticus* จำนวน 26.7%, *V. vulnificus* จำนวน 9.7%, *V. parahaemolyticus* จำนวน 0.8% และ *A. hydrophila* จำนวน 29.1%

Normanno et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Salmonella* spp., *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) ในหอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) จำนวน 600 ตัวอย่าง ซึ่งจำหน่ายที่ตลาดในเมือง Puglia ประเทศอิตาลี ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างจำนวน 47 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็น 7.83% และ 2.83% ตามลำดับ พบ *E. coli* ในตัวอย่างจำนวน 21 ตัวอย่าง คิดเป็น 3.5% แบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์มในตัวอย่างจำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.66% และ *Salmonella* ในตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.16%

Parihar et al. (2008) รายงานการตรวจพบ *Listeria* spp. ในอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาดในเมือง Goa ประเทศอินเดีย จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 115 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Listeria* spp. ในตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้คือ *L. monocytogenes* พบใน 10 ตัวอย่าง และ *L. innocua* พบใน 18 ตัวอย่าง โดย *L. monocytogenes* อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ถ้าปนเปื้อนในอาหารทะเลดิบแบบพร้อมบริโภค

2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

ตามปกติแล้วการเน่าเสียของอาหารจะทำให้ลักษณะทางด้านเคมีและทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณลักษณะของอาหาร เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รสชาติ สีและคุณค่าทางอาหาร ซึ่งการเน่าเสียของอาหารนี้สาเหตุหลักเกิดจากแบคทีเรีย (รังสินี โสธรวิทย์, 2550) โดยอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเป็นอาหารที่นอกจากจะพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารแล้วยังพบแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งไม่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้อาหารเน่าเสีย เกิดกลิ่น รสชาติและลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ไม่พึงประสงค์ ส่งผลให้ไม่สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารไว้บริโภคในระยะเวลานานได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ยกตัวอย่างเช่น *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Moraxella* และ *Pseudomonas* นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 1-3 องศาเซลเซียส จะพบแบคทีเรียกลุ่มชอบความเย็นอีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อเน่าเสีย ได้แก่ *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium* และ *Pseudomonas* เป็นต้น ซึ่งจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ชอบและทนอุณหภูมิต่ำได้เป็นอย่างดี จึงสามารถเจริญได้ในอาหารที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิระดับตู้เย็นและก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารติดตามมา แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งคือ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารหลากหลายชนิดเน่าเสีย ได้แก่ นม ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก ผลไม้ ขนมหวาน เครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมักดอง แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดเมือก กลิ่นและ

รสชาติที่ผิดแผกไปของผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้ลักษณะการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลคติก สภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร ตลอดจนคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์และการบรรจุหีบห่อ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) นอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่สำคัญที่สามารถทำให้อาหารเสียได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่มผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ แบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ที่มักพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *Shewanella putrefaciens* หรือ *Pseudomonas putrefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนและเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Non-fermentative bacilli คือ กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Khashe and Janda, 1998) อยู่ในวงศ์ Shewanellaceae เป็นแบคทีเรียทางทะเลที่สามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (Holt et al., 2005)

งานวิจัยหลายฉบับได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ดังนี้

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และคณะ (2532) ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีของกุ้งแห้งที่จำหน่ายทั่วไป พบว่ากุ้งแห้งมีจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนค่อนข้างสูง มีกลิ่นแอมโมเนียและมีปริมาณรงควัตถุแอสตาแซนทีนต่ำ กุ้งแห้งส่วนใหญ่มีความชื้นค่อนข้างสูงถึง 30% – 50% มีกลิ่นแอมโมเนียจึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูง มีค่าประมาณ 8.0 – 8.4 มีค่าปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ในช่วง 0.72 – 0.78 และมีปริมาณเกลือสูงถึง 9% – 13% และจากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *S. aureus* และเชื้อรามีค่าเท่ากับ 5.00×10^{5}, 1.00×10^{2} และ 5.00×10 CFU/g ตามลำดับ แต่ไม่พบ *E. coli และ Salmonella* sp. ในตัวอย่างกุ้งแห้ง

สินหทัย สมบูรณ์ยิ่ง (2545) ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี จำนวน 40 ตัวอย่าง ในเดือนตุลาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2544 โดยเก็บตัวอย่างจาก 4 ร้าน ร้านละ 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนเชื้อรา *E. coli* และแบคทีเรียก่อโรค คือ *S. aureus, Salmonella* sp. และ *Clostridium perfringens* พบว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสไม่ได้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเลขที่ มอก.972-2533 เนื่องจากมีเชื้อราเกินกำหนด และพบ *E. coli* เกินกำหนด 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวในตัวอย่าง

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ก) ศึกษาถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีจำนวน 21 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา (คิดเป็น 100%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มมากที่สุดคือ หมึกกะตอย มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.97\pm0.16\times10^{9}$ CFU/g และพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีจำนวน 3 ตัวอย่าง (คิดเป็น 12.5%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีมากที่สุดคือ หมึกไข่ มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.70\pm0.21\times10^{4}$ CFU/g เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มในผลิตภัณฑ์หมึกแห้ง พบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* มากที่สุด รองลงมาคือ *Micrococcus* และ *Bacillus* ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่จำแนกได้คือ *Proteus*, *Enterobacter* และ *Klebsiella* ดังนั้นควรมีการติดตามตรวจสอบและ

ตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหารเป็นระยะ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่บริโภคในแต่ละวันและผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออก

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ข) ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในอาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าอาหารทะเลแห้งมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปอยู่ในช่วง $6.00\pm2.00\times10^{2}$ ถึง $4.40\pm1.22\times10^{9}$ CFU/g โดยพบมากที่สุดในตัวอย่างหมึกกะตอยแห้ง และพบน้อยที่สุดในตัวอย่างหนวดหมึกชุบน้ำเชื่อม เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* มากที่สุด รองลงมาคือ *Bacillus* และ *Micrococcus* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Corynebacterium* spp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. ozaenae*, *Listeria* spp. และ *Proteus mirabilis* ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีคุณภาพทางจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น

Ayulo et al. (1994) ทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปลาและความปลอดภัยของอาหารทะเลที่จับได้จากบริเวณชายฝั่งของรัฐซานตา คาทารินาและจำหน่ายในเมืองฟลอเรียโนโปลิส ประเทศบราซิล จากการตรวจคุณภาพปลา Acoupa blanc (*Cynoscion leiarchus*) ทั้งที่อยู่ในรูปของปลาสดและแปรรูป กุ้งขาว (*Peneaus paulensis*) หอย (*Anomalocardia brasiliensis*) หอย Blue mussel (*Mytilus edulis*) และปูม้า (*Callinectes sapidus*) จากตลาดจำนวน 175 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่า ในตัวอย่าง 175 ตัวอย่าง ตรวจพบ *S. aureus* จำนวน 35 ตัวอย่าง คิดเป็น 20% และจากตัวอย่างเนื้อหอยคิดเป็น 60% และพบว่า *S. aureus* จำนวน 109 สายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวน 9 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ได้แก่ เอนเทอโรทอกซินเอ จำนวน 4 สายพันธุ์ เอนเทอโรทอกซินดี จำนวน 1 สายพันธุ์ และเอนเทอโรทอกซินเอบี จำนวน 4 สายพันธุ์ จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าควรมีการจัดการเอาใจใส่ในระหว่างการจับสัตว์น้ำและหลังการจับสัตว์น้ำที่ได้เพื่อลดการปนเปื้อนแบคทีเรียของปลาและอาหารทะเล

Jeyasekaran et al. (2004) ศึกษาการเก็บรักษาปลาบรีม (*Lethrinus miniatus*) โดยใช้น้ำแข็งแห้ง 20% ร่วมกับน้ำแข็ง 50% พบว่าเป็นสภาวะที่ดีในการเก็บรักษาได้ถึง 24 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติมน้ำแข็งเพิ่ม โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^{4}-10^{7} CFU/g ในขณะที่แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำมีปริมาณ 10^{2}-10^{4} CFU/g ปริมาณแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง 10^{1}-10^{2} CFU/g แบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟล์ตรวจพบที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณ 10^{2} CFU/g แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดและแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญและรีดิวซ์ซัลไฟท์ไม่แสดงแนวโน้มที่สอดคล้องกัน

3. โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้มากขึ้นและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ จุลินทรีย์โพรไบโอติกได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium* sp. มีการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาผลิตอาหารหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดอง และเนื้อหมัก และมีการผลิตในรูป

ของแคปซูลและเมล็ดออกมาจำหน่ายตามท้องตลาด นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในอาหารสัตว์เร่งการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดโรค (อุษามาส จริยวรานุกุล, 2548)

ซึ่งโพรไบโอติก แปลว่า For life คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่คัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีอยู่แล้วในลำไส้ของมนุษย์ที่แข็งแรงดี โดยจะให้เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ เพื่อไปสู่ระบบทางเดินอาหาร และเข้าไปเจริญตั้งรกรากในลำไส้ ทำหน้าที่เหมือนกับเป็นสมาชิกของจุลินทรีย์ในลำไส้ และก่อให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ อันจะเป็นผลดีต่อร่างกายหลายประการ ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacilli หรือ Bifidobacteria ในปัจจุบันมีหลักฐานการศึกษาในมนุษย์หรือสัตว์ทดลองพบว่า โพรไบโอติกมีบทบาทก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายหลายประการ (พีร์ เหมะรัชตะ, 2551)

การเจริญของโพรไบโอติกจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้นั้น เป็นไปตามกระบวนการธรรมชาติของจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากกว่าจะสามารถแย่งชิงอาหารได้ดีกว่า อีกทั้งยังปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีมากกว่านั้น ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถอยู่รอดได้ และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียจำพวกนี้ในระหว่างการเจริญจะทำให้ระดับความเป็นกรดด่างในสภาพแวดล้อมรอบ ๆ นั้นลดลง เป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้ออื่น ๆ รวมทั้งเชื้อโรคด้วยนั้นไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้พบว่าโพรไบโอติกบางชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะ (Adhesion) ของเชื้อโรคกับผนังเซลล์ภายในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ และบางชนิดยังสามารถช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิต้านทานชนิด Immunoglobulin A ซึ่งจะช่วยกำจัดเชื้อโรคได้ โพรไบโอติกใช้ได้ดีในการควบคุมโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ช่วยป้องกันโรคอุจจาระร่วง ซึ่งเกิดจากการที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนไปกับอาหาร เมื่อเข้าสู่ระบบการย่อยอาหารจะเกิดการแบ่งตัวอย่างมาก ทำให้เกิดสภาวะผิดปกติในทางเดินอาหาร เป็นเหตุให้เกิดอาการอุจจาระร่วงได้ ดังนั้นการที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกอยู่ในทางเดินอาหารในปริมาณเพียงพอ จะทำให้สภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการแบ่งตัวของเชื้อโรค เป็นเหตุให้เชื้อโรคไม่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคนั้น ๆ ได้ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2547)

โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นทารก ซึ่งมีมากมายหลายชนิด ดังแสดงในตางรางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

Lactobacillus species	*Bifidobacterium* species	อื่น ๆ
L. acidophilus	*B. bifidum*	*Bacillus cereus*
L. casei (rhamnosus) - LGG	*B. longum*	*Escherichia coli*
L. reuteri	*B. breve*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. bulgaricus	*B. infantis*	*Saccharomyces boulardii*
L. plantarum	*B. lactis*	*Enterococcus faecalis*
L. johnsonii	*B. adolescentis*	*Streptococcus thermophilus*
L. lactis	-	อื่น ๆ

(ที่มา: อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

บทบาทของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น กลุ่ม Lactobacilli จะสร้างน้ำย่อยเบต้า-กาแลกโตซิเดส ช่วยลดปริมาณน้ำตาลแล็คโตสในอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของอุจจาระร่วงได้ นอกจากนี้สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ช่วยกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร น้ำย่อยบางชนิดจากโพรไบโอติกจะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่พิษเข้าเซลล์และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียเข้าเกาะได้ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ไว้ต่อสู้กับเชื้อโรค และกระตุ้นการสร้างสารป้องกันโรคในร่างกาย เช่น Gamma-interferon, Interleukin-12 และ Interleukin-18 เป็นต้น (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) เป็นสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจงและสารนั้นจะต้องไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก แต่ถ้าหากสารใดก็ตามเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วมีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เราจะจัดสารนั้นเป็นพวกสารพิษ (Toxic substances) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้มุ่งศึกษาและพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารต้านจุลชีพหรือสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์ เภสัชวิทยาและอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันกำลังประสบกับปัญหาการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องมาจากมีการนำสารต้านจุลชีพมาใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการใช้ไม่ถูกวิธีส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการพัฒนาตนเองให้ทนต่อสารต้านจุลชีพ ทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นหรือสารต้านจุลชีพตัวเดิมใช้ไม่ได้ผล อีกทั้งในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการแพ้สารต้านจุลชีพ นอกจากนั้นการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้สร้างความกังวลเกี่ยวกับผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการรณรงค์และส่งเสริมการบริโภคอาหารที่มีความปลอดภัยและไม่เจือปนสารเคมีสังเคราะห์

ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามคิดค้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่เหมือนหรือให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานใกล้เคียงกันกับการสารต้านจุลชีพหรือสารเคมีสังเคราะห์ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน รวมทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Brink et al., 1994) สารชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างมากในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดนี้

ถือว่าเป็นสารป้องกันการเน่าเสียตามธรรมชาติ โดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) มนุษย์ได้นำสารชนิดนี้มาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อช่วยควบคุมคุณภาพอาหารและการป้องกันระบาดวิทยาของอาหารเป็นพิษที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร (Papagianni et al., 2006) แบคเทอริโอซินชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารและได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย คือ ไนซิน ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ในปัจจุบันไนซินได้ถูกนำมาใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายเชิงพาณิชย์ในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก ซึ่งช่วยแก้ปัญหาของการห้ามใช้สารต้านจุลชีพในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้เป็นอย่างดี (Li and O'Sullivan, 2002) ในประเทศสหรัฐอเมริกาไนซินได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยสามารถใช้ได้ในไข่เหลว ไส้กรอกและน้ำสลัด ในประเทศออสเตรเลียก็อนุญาตให้ใช้ไนซินได้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบที่มีองค์ประกอบของความชื้นสูง เพื่อป้องกันการเจริญของ *B. cereus* และยังมีรายงานอื่น ๆ อีกมากมายที่ได้ระบุว่าสามารถใช้ไนซินในการควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *Clostridium* spp. ได้ในผลิตภัณฑ์นมและสัตว์ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลกเพื่อช่วยรักษาคุณสมบัติของอาหารและยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมใช้ไนซิน เช่น เนยแข็งต่าง ๆ นมพาสเจอร์ไรซ์ นมสเตอริไรซ์ อาหารกระป๋อง เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เป็นต้น โดยปริมาณที่อนุญาตให้ใช้จะแตกต่างกันไปตามกฎหมายอาหารของแต่ละประเทศ ตัวอย่างเช่น ในประเทศไทยมีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 ไนซินในความเข้มข้นไม่เกิน 4,000 IU ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์อาหาร และอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งแปรรูป ส่วนคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญของอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ องค์การอนามัยโลกที่เกี่ยวกับสารเจือปนในอาหาร (Joint FAO/WHO Expert Committees on Food Additives) ได้มีการประเมินความเป็นพิษของสารนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1969 และได้กำหนดค่า Acceptable Daily Intake เป็น 0-33,000 หน่วยต่อกิโลกรัมของน้ำร่างกาย (ศิวาพร ศิวเวชช, 2546)

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการควบคุมและทำลายแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารและยืดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังรายงานการวิจัยต่อไปนี้

กรรณิการ์ เสนทอง และคณะ (2551) ได้คัดเลือกและแยก *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Lactobacillus* จากน้ำนมดิบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยก *Bacillus* และ *Lactobacillus* ด้วยวิธีกระจาย ได้เชื้อจำนวน 41 และ 40 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) ที่มีส่วนประกอบของนมซึ่งสกัดเอาไขมันออกความเข้มข้น 2% และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท BA26 และ BA27 สามารถ

ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 12.278 และ 12.058 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยสารตั้งต้นเคซีนความเข้มข้น 1.5% และเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเคซีนมากกว่าเจลลาติน ผลจากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบหลั่งออกนอกเซลล์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดัชนีด้วยวิธี Agar well diffusion ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมดจำนวน 81 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท คือ BA08, BA16, LA09, LA10, LA13, LA16, LA18, LA19 และ LA20 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 517 และ *Escherichia coli* TISTR 887 โดยมีวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร ซึ่งเมื่อจำแนกสายพันธุ์ โดยสังเกตลักษณะการติดสีย้อม สมบัติทางชีวเคมีและการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดคือ BA26 และ BA27 เป็น *Brevibacillus* Non reactive และจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 และ *E. coli* TISTR 887 โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งได้สูงสุดคือ BA08 เป็น *Brevibacillus laterosporus* และ BA16 เป็น *Geobacillus thermoglucosidasius* ส่วน *Lactobacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดัชนีทั้ง 2 ชนิด โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งสูงสุด คือ LA10 และ LA16 เป็น *Lactobacillus plantarum* 1 และ *Lactobacillus plantarum* 2 ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำเชื้อ *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์และอุตสาหกรรมเภสัชต่อไป

Anthony et al. (2009) ได้ศึกษาสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งการศึกษานี้ได้รับความสนใจมากขึ้นในการที่จะนำมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค การถนอมอาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียและการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียคือ *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากดินตะกอนจากน้ำทิ้งในโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด การผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. licheniformis* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Lactose, NH_4NO_3, Yeast extract, NaCl และศึกษาผลของสภาวะต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่มต่อประสิทธิภาพการผลิตสารเปปไทด์ จากการศึกษาพบว่าเมื่อมี Yeast extract และ NaCl ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลทำให้ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและกิจกรรมจำเพาะได้ดีตามลำดับ ซึ่งความเป็นด่างและอุณหภูมิสูงจะส่งเสริมให้ *B. licheniformis* AnBa9 ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี ถ้าในสภาวะที่เหมาะสม *B. licheniformis* AnBa9 สามารถผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าสภาวะที่ไม่เหมาะสมถึง 25 เท่า ซึ่งคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* มีคุณสมบัติเป็นสารแบคเทอริโอซิน

Matamoros et al. (2009b) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งโดยแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นและแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นมาศึกษาต่อเนื่องในการใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นทั้งหมด 5,575 ไอโซเลทที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล พบว่า 132 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการ

ยับยั้งแบคทีเรีย และมีจำนวน 52 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ 14 ไอโซเลท (สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารทะเลเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรค จากนั้นจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก 7 ไอโซเลทที่น่าสนใจประกอบด้วย *Leuconostoc gelidum* 3 ไอโซเลท *Lactococcus piscium* 2 ไอโซเลท *Lactobacillus fuchuensis* 1 ไอโซเลท และ *Carnobacterium alterfunditum* 1 ไอโซเลท แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ไม่ผลิตฮิสตามีนและไทรามีน และพบว่าไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนั้นยังได้ศึกษาถึงอัตราการเจริญที่อุณหภูมิต่างกันของ *L. piscium* 1 ไอโซเลท และ *L. gelidum* 1 ไอโซเลท เพื่อยืนยันคุณสมบัติความชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ หนึ่งในเจ็ดเชื้อที่แยกได้สามารถผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ส่วนกลไกในการยับยั้งของเชื้ออื่นที่แยกได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดเนื่องจากการแข่งขันในการจับกับสารตั้งต้น

Hemalatha and Shanthi (2010) ได้ทำการแยก *Bacillus subtilis* จากตัวอย่างนม โดยศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *B. subtilis* จากการศึกษาพบว่า *B. subtilis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Ampicillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Penicillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Erythromycin (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Amoxycillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ *B. subtilis* ทั้งหมดนี้ดื้อต่อ Bacitracin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) *B. subtilis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp. และ *E. coli* ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* ที่สกัดด้วยสารอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท พบว่าสารที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งสารนี้เป็นโปรตีนที่ผลิตจาก *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยโปรตีนมีปริมาณระหว่าง 0.05-0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่าสารที่ผลิตจาก *B. subtilis* เป็นสารเปปไทด์มีน้ำหนักน้อยกว่า 62 กิโลดาลตัน

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

1.1 หมึกกะตอยแห้ง

1.2 หมึกไข่

1.3 หอยหวานริวกิว

1.4 ปลาหวาน

1.5 เต่าทองสามรส

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

2.2 หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิลิตร

2.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.4 ลูป (Loop)

2.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettle-Toledo รุ่น PG 802-S ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.6 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Gilson รุ่น N21808C ประเทศฝรั่งเศส

2.7 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

2.8 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325 ประเทศญี่ปุ่น

2.9 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น KG 8540 ประเทศเยอรมนี

2.10 ไม้บรรทัด

2.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE400 ประเทศเยอรมนี

2.12 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30RE200 ประเทศเยอรมนี

2.13 เครื่องปั่นผสม (Vortex) ยี่ห้อ Genie-2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.14 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Helios Delta รุ่น 9423 UV 1002E ประเทศอังกฤษ

2.15 ไม้พันสำลี

2.16 หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Minisart ประเทศเยอรมนี

2.17 กระบอกตวง

2.18 หลอดปั่นเหวี่ยง

2.19 บีกเกอร์

2.20 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร

2.21 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

2.22 ถุงพลาสติก

2.23 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher)
2.24 กรรไกร

3. สารเคมี

3.1 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
3.2 Gram's crystal violet solution
3.3 Gram's safranin O solution
3.4 Gram's iodine solution
3.5 Gram's alcohol solution
3.6 Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
3.7 Catalase reagent
3.8 Oxidase reagent
3.9 Nitrate reagent
3.10 Kovac' s reagent
3.11 Methy red reagent

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 0.85% (w/v) Normal saline
4.2 Trypticase Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ Bacto ประเทศสหรัฐอเมริกา
4.3 Trypticase Soy Broth (TSB) ยี่ห้อ Bacto ประเทศสหรัฐอเมริกา
4.4 Mueller Hinton Agar (MHA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
4.5 Plate Count Agar ยี่ห้อ Difco ประเทสสหรัฐอเมริกา
4.6 Plate Count Agar ที่เติม 7.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) NaCl
4.7 MacConkey Agar ยี่ห้อ Difco ประเทสสหรัฐอเมริกา

5. แบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียทดสอบได้มาจากห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

5.1 แบคทีเรียโพรไบโอติก 5 สายพันธุ์
5.2 แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งแปรรูป
5.3 *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม
5.4 *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม

วิธีดำเนินการทดลอง

จากการศึกษางานวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 จากการดำเนินงานได้ประสบผลสำเร็จและได้องค์ความรู้ดังต่อไปนี้คือ ทราบถึงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งและแปรรูป ได้แก่ อาหารทะเลแห้งและแปรรูปมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีและแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มเท่ากับ $1.00 \pm 0.50 \times 10^{2} - 5.23 \pm 0.63 \times 10^{9}$, $0.00 - 1.04 \pm 0.04 \times 10^{5}$ และ $1.00 \pm 0.00 \times 10^{2} - 3.12 \pm 0.18 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากที่สุดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล (มากกว่าร้อยละ 50) นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นด้วยเช่นกัน ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* และต่อมาได้ทำการพัฒนาแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่พบว่าปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยเริ่มต้นจากแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งและพบอุบัติการณ์การเกิดโรคอาหารเป็นสูงที่สุดชนิดหนึ่งของประเทศไทย (สำนักระบาดวิทยา, 2545; 2548)

ดังนั้นเพื่อทำให้เกิดสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรีจึงทำการศึกษาต่อเนื่อง ดังนี้

1. แบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำมาศึกษาเพื่อการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารชนิดต่างๆ (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้งและทำการจำแนกสายพันธุ์เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรคจากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป (Nimrat et al., 2008)

คัดแยกแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลประเภทต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลประเภทต่าง ๆ จากโครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 มาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotroph; Jeyasekaran et al., 2004)

ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างอาหารให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างมา 50 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลาย Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BF) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-6} แล้วถ่ายตัวอย่างทีละระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ปริมาตรละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วด้วยวิธีสเปรดเพลท (Spread plete) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรป โดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Branner (1984); Jones and Collina (1986); Kocur (1986); Kloss and Schilefer (1986); Seeliger and Jones (1986); Sneath et al., (1986); Holt et al., (1994)

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ (Salt tolerant; Garcia Fontan et al., 2007)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ โดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Branner (1984); Jones and Collina (1986); Kocur (1986); Kloss and Schilefer (1986); Seeliger and Jones (1986); Sneath et al., (1986); Holt et al., (1994)

2.3 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae; Finney et al., 2003)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี โดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Branner (1984); Jones and Collina (1986); Kocur (1986); Kloss and Schilefer (1986); Seeliger and Jones (1986); Sneath et al., (1986); Holt et al., (1994)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป

การศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในครั้งนี้ได้วางแผนประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียชนิดอื่นเพิ่มเติมจากแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ที่ได้ทำการศึกษาไปก่อนหน้านี้ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 ทั้งนี้เพื่อให้การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความครอบคลุมและสามารถนำไปสู่การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งหรือควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยมีขั้นตอนการวิจัยดังนี้

3.1 การเตรียมส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาเลี้ยงเชื้อและนำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงตามวิธีของ Nimrat et al. (2008) แล้วนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งสารออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) ส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดเดียว

2) ส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน

3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำเซลล์แขวนลอยของโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาปรับความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 A.U. จากนั้นแบ่งเซลล์แขวนลอย ออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดเดียว

2) เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน

3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่คัดแยกได้จากการทดลองในข้อ 2 และคัดแยกได้จากโครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโพรไบโอติกในข้อ 3.1และ 3.2 โดยดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ตามวิธีการของ NCCLS (1997) และ Asha Devi et al. (2008) ดังนี้

ป้าย (Swab) แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^4 CFU/mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ วางจานเพาะเชื้อไว้ 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแล้ง แล้วเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Metallic borer ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมส่วนใสและเซลล์แขวนลอยของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม จากข้อ 3.1 และ 3.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA วัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบหลุมเป็นมิลลิเมตร หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม ต่อมาทำการคำนวณค่าประสิทธิภาพการยับยั้งตามวิธีการของ Leonel Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006)

$$[(\pi \times (\text{รัศมีบริเวณยับยั้ง})^2) - (\pi \times \text{รัศมีของหลุม } (3^2))] / (\pi \times 3^2)$$

และคำนวณดัชนีค่าการยับยั้ง ตามวิธีการของ Leonel Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006)

ดัชนีค่าการยับยั้ง: - (0), 1+ (0.01-0.5), 2+ (0.51-0.7), 3+ (0.71-1), 4+ (1.01-2), 5+ (2.01-3), 6+ (3.01-4), 7+ (4.01-5), 8+ (5.01-6), 9+ (6.01-7), 10+ (7.01-8)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มทนเค็ม และแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดต่าง ๆ ที่จัดจำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี เพิ่มเติมงานวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 และการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* BUU 001, *Bacillus* BUU 002, *Bacillus* BUU 003, *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 และเชื้อผสมในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง ได้ผลการทดลองดังนี้

1. จำนวนแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในอาหารทะเลแห้ง

จากการนำอาหารทะเลแห้งชนิดต่าง ๆ จำนวน 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี พบว่าอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมากที่สุดคือ หมึกไข่ โดยมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 1.14×10^{9} CFU/g รองลงมาคือ หมึกกะตอยแห้งและปลาหวานริวกิว มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 2.25×10^{6} และ 1.68×10^{6} CFU/g ตามลำดับ อาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มมากที่สุดคือ หมึกไข่ มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 1.68×10^{9} CFU/g รองลงมาคือ หมึกกะตอยแห้งและปลาหวานริวกิว มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 6.27×10^{5} และ 9.43×10^{4} CFU/g ตามลำดับ อาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีมากที่สุดคือ หมึกกะตอยแห้ง มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 8.33×10^{3} CFU/g รองลงมาคือ ปลาหวานริวกิวและหมึกไข่ มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 5.33×10^{3} และ 1.00×10^{2} CFU/g ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างหอยหวานและหมึกเต่าทองสามรสไม่พบแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ดังแสดงในตารางที่ 2

329353

579.3
ส823 ส
ฉ. 2

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)		
	กลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด	กลุ่มทนเค็ม	กลุ่มเอนเทอโร-แบคทีเรียซีอี
หมึกกะตอยแห้ง	$2.25\pm0.14\times10^{6}$	$6.27\pm1.55\times10^{5}$	$8.33\pm4.62\times10^{3}$
หมึกไข่	$1.14\pm0.32\times10^{9}$	$1.68\pm0.12\times10^{9}$	$1.00\pm1.00\times10^{2}$
ปลาหวานริวกิว	$1.68\pm0.40\times10^{6}$	$9.43\pm1.59\times10^{4}$	$5.33\pm4.20\times10^{3}$
หอยหวาน	$5.13\pm0.90\times10^{5}$	$3.50\pm1.40\times10^{4}$	<1
หมึกเต่าทองสามรส	$1.24\pm0.90\times10^{4}$	$6.67\pm1.77\times10^{3}$	<1

2. ชนิดของแบคทีเรียในอาหารทะเลแห้ง

2.1 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในอาหารทะเลแห้ง

จากการนำอาหารทะเลแห้งจำนวน 5 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด พบแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนจำนวน 11 ไอโซเลท คิดเป็น 61.11 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Bacillus cereus* subsp. *mycoides/ B.anthracis*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis* และ *B. cereus/ B. thuringiensis* และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมจำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็น 38.89 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Staphylococcus mucilagonosus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *Kocuria palustris* และ *Nesterenkonai lacusekhoensi* โดยตัวอย่างหอยหวานมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากที่สุดจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* subsp. *mycoides/ B. anthracis*, *B. macerans*, *B. licheniformis*, *B. cereus/ B. thuringiensis*, *S. saprophyticus* และ *S. hominis* รองลงมาคือหมึกกะตอยแห้งจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. cereus/ B. thuringiensis*, *S. hominis* และ *N. lacusekhoensi* และตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดปลาหวานริวกิวมีความหลากหลายของแบคทีเรียน้อยที่สุดจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *B. polymyxa* และ *S. hyicus* subsp. *chromogenes* ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

ชนิดของแบคทีเรีย / ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง	*Bacillus cereus* subsp. *mycoides*/ *B.anthracis*	*Bacillus macerans*	*Bacillus polymyxa*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus cereus*/ *B. thuringiensis*	*Staphylococcus mucilagonosus*	*Staphylococcus saprophyticus*	*Staphylococcus hominis*	*Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes*	*Kocuria palustris*	*Nesterenkonai lacusekhoensi*
หมึกกะตอยแห้ง	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	-	-	✓
หมึกไข่	✓	-	-	-	-	✓	-	-	-	✓	-
ปลาหวานริวกิว	-	-	✓	-	-	-	-	-	✓	-	-
หอยหวาน	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	-	-
หมึกเต่าทองสามรส	✓	✓	-	-	✓	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: ✓ คือ พบ
- คือ ไม่พบ

2.2 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มในอาหารทะเลแห้ง

จากการนำอาหารทะเลแห้งจำนวน 5 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มทนเค็ม พบแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนจำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *B. coagulans* และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมจำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *S. cohnii* subsp. 1 จำนวน 2 ไอโซเลท และ *S. hominis* และ *S. warneri* อย่างละ 1 ไอโซเลท โดยตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดหอยหวานมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากที่สุดจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *S. cohnii* subsp. 1 และ *S. warneri* ส่วนหมึกกะตอยแห้งและหมึกไข่พบแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มตัวอย่างละ 1 ไอโซเลท ได้แก่ *S. hominis* และ *S. cohnii* subsp. 1 ตามลำดับ ส่วนปลาหวานริวกิวและหมึกเต่าทองพบแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มตัวอย่างละ 1 ไอโซเลท เป็นชนิดเดียวกันคือ *B. coagulans* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มทนเค็มที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

ชนิดของแบคทีเรีย / ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง	*Bacillus coagulans*	*Staphylococcus hominis*	*Staphylococcus cohnii* subsp. 1	*Staphylococcus warneri*
หมึกกะตอยแห้ง	-	✓	-	-
หมึกไข่	-	-	✓	-
ปลาหวานริวกิว	✓	-	-	-
หอยหวาน	-	-	✓	✓
หมึกเต่าทองสามรส	✓	-	-	-

หมายเหตุ: ✓ คือ พบ
- คือ ไม่พบ

2.3 ชนิดแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในอาหารทะเลแห้ง

จากการนำอาหารทะเลแห้งจำนวน 5 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรีย-ซีอีพบแบคทีเรียทั้งหมด 9 ไอโซเลท ได้แก่ *Enterobacter agglomerans*, *Edwardsiella tarda* biogroup 1 และ *Xenorhabdus luminescens/ X. nematophilus* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) และ *E. cloacae*, *Serratia ficaria* และ *Citrobacter diversus* (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และพบความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดปลาหวานริวกิวมากที่สุดจำนวน 6 ชนิด คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *Edwardsiella tarda* biogroup 1, *S. ficaria*, *C. diversus* และ *X. luminescens/X. nematophilus* รองลงมาคือหมึกกะตอยแห้งพบแบคทีเรียจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *E. agglomerans* และ *C. diversus* และตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดหมึกไข่มีความหลากหลายของแบคทีเรียน้อยที่สุดคือพบ *S. ficaria* เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

ชนิดของแบคทีเรีย / ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง	*Enterobacter agglomerans*	*Enterobacter cloacae*	*Edwardsiella tarda* biogroup 1	*Serratia ficaria*	*Citrobacter diversus*	*Xenorhabdus luminescens*/ *X. nematophilus*
หมึกกะตอยแห้ง	-	✓	-	-	✓	-
หมึกไข่	-	-	-	✓	-	-
ปลาหวานริวกิว	✓	✓	✓	✓	✓	✓
หอยหวาน	-	-	-	-	-	-
หมึกเต่าทองสามรส	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: ✓ คือ พบ
- คือ ไม่พบ

3. ปริมาณของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสม

ปริมาณของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสมในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่ปรับความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 A.U. พบว่าเชื้อผสมมีปริมาณเชื้อมากที่สุด มีปริมาณเชื้อเท่ากับ $2.20 \pm 0.32 \times 10^9$ CFU /mL รองลงมาคือ *Bacillus* BUU 003, *Bacillus* BUU 004, *Bacillus* BUU 005, *Bacillus* BUU 002 และ *Bacillus* BUU 001 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.70 \pm 0.21 \times 10^9$, $1.68 \pm 0.11 \times 10^9$, $1.64 \pm 0.24 \times 10^9$, $1.59 \pm 0.51 \times 10^9$ และ $1.11 \pm 0.33 \times 10^9$ CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสม

แบคทีเรีย	ปริมาณเชื้อ (CFU/mL)
Bacillus BUU 001	$1.11 \pm 0.33 \times 10^9$
Bacillus BUU 002	$1.11 \pm 0.33 \times 10^9$
Bacillus BUU 001	$1.70 \pm 0.21 \times 10^9$
Bacillus BUU 001	$1.11 \pm 0.33 \times 10^9$
Bacillus BUU 001	$1.11 \pm 0.33 \times 10^9$
เชื้อผสม	$2.20 \pm 0.32 \times 10^9$

4. ประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสมในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

4.1 ประสิทธิภาพส่วนใสของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสมในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

จากการศึกษาพบว่าส่วนใสของ *Bacillus* BUU 004 สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำนวน 20 ไอโซเลท (33.33 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ถูกยับยั้งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (26.67 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae (13.33 เปอร์เซ็นต์) และ Micrococcaceae (13.33 เปอร์เซ็นต์) โดยสามารถยับยั้ง *Staphylococcus saprophyticus* ได้ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 17.33±0.63 มิลลิเมตร คิดเป็นดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 10+ รองลงมาคือ *Bacillus cereus/B. thuringiensis* 001 และ *B. cereus* subsp. *mycoides/ B. anthracis* 003 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17.10 ± 0.88 และ 16.00± 0.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีค่าดัชนีการยับยั้งคือ 10+ และ 9+ ตามลำดับ และส่วนใสของ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ 8 ไอโซเลท (13.33 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทุกไอโซเลตจัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae โดยสามารถยับยั้ง *B. cereus* subsp. *mycoides/ B. anthacis* 005 ได้ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 14.83±7.67 มิลลิเมตร ดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 8+ รองลงมาคือ *B. cereus* subsp. *mycoides/ B. anthacis* 006 และ *B. cereus/B. thuringiensis* 001 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.17 ± 0.63 และ 9.33 ± 0.14 ตามลำดับ และมีค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากันคือ 4+ แสดงให้เห็นว่าส่วนใสของ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่ในช่วงแคบเนื่องจากสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เท่านั้น สำหรับส่วนใสของเชื้อ *Bacillus* sp. อีก 3 สายพันธุ์ และเชื้อผสมไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยพิจารณาค่าดัชนีการยับยั้งพบว่า ส่วนใสของ *Bacillus* BUU 004 มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งได้ 20 ไอโซเลท ด้วยค่าดัชนีการยับยั้งอยู่ในช่วง 1+ ถึง 10+ รองลงมาคือ *Bacillus* BUU 005 โดยมีค่าดัชนีอยู่ในช่วง 1+ ถึง 8+ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบส่วนใส

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม
				บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	
วงศ์ Bacillaceae										
Bacillus laterosporus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus mycoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus sp.	-	-	-	-	-	-	7.33±0.14	0.49	1+	-
Bacillus coagulans 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus coagulans 001	-	-	-	-	-	-	8.17± 0.76	0.85	3+	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 001	-	-	-	14.33± 0.29	4.70	7+	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 002	-	-	-	13.75± 0.50	4.25	7+	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 004	-	-	-	-	-	-	7.08± 0.14	0.39	1+	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 002	-	-	-	-	-	-	14.83± 7.67	5.11	8+	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 006	-	-	-	-	-	-	10.17±0.63	1.87	4+	-
Bacillus macerans 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus macerans 001	-	-	-	6.92± 0.39	0.33	1+	-	-	-	-
Bacillus macerans 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus macerans 001	-	-	-	-	-	-	8.67± 0.80	1.09	4+	-
Bacillus polymyxa	-	-	-	7.33± 0.29	0.49	1+	-	-	-	-
Bacillus licheniformis 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus licheniformis 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบส่วนใส (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม
				บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	
Bacillus cereus/ B. thuringiensis 001	-	-	-	17.10± 0.88	7.12	10+	9.33±0.14	1.42	4+	-
Bacillus cereus/ B. thuringiensis 001	-	-	-	14.25±0.75	4.64	7+	-	-	-	-
Bacillus cereus/ B. thuringiensis 001	-	-	-	16.00±0.50	6.11	9+	-	-	-	-
Bacillus cereus/ B. thuringiensis 001	-	-	-	8.67±0.77	1.09	4+	8.33±1.15	0.93	3+	-
วงศ์ Micrococcaceae										
Micrococcus sedentarius	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micrococcus varians	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Planococcus halophilus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus simulans/ S. warneri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus cohnii subsp. 1/ *S. auricularis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus saccharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus auricula/ S. haemolyticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus hominis 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus hominis 002	-	-	-	15.58±0.38	5.74	8+	-	-	-	-
Staphylococcus hominis 002	-	-	-	14.17±1.44	4.58	7+	-	-	-	-
Staphylococcus hominis 004	-	-	-	12.92±0.95	3.64	8+	-	-	-	-
Staphylococcus capitis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus caprae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus hyicus subsp./ *S. chromogenes*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบส่วนใส (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม
				บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	
Staphylococcus saprophyticus/S. warneri/ S. hominis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus cohnii subsp. 1	-	-	-	7.17±0.29	0.43	1+	-	-	-	-
Staphylococcus warneri	-	-	-	11.00±0.25	2.36	5+	-	-	-	-
Staphylococcus mucilagonosus		-	-	8.00±0.00	0.78	3+	-	-	-	
Staphylococcus saprophyticus		-	-	17.33± 0.63	7.34	10+	-	-	-	-
Staphylococcus hyicus subsp. *chromogenes*		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kocuria palustris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nesterenkonai lacusekhoensi	-	-	-	12.67±0.38	3.46	6+	-	-	-	
วงศ์ Corynebactericeae										
Corynebacterium mycoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
วงศ์ Enterobacteriaceae										
Proteus mirabilis	-	-	-	7.17±0.14	0.43	1+	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacter sakazakii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacter cloacae 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Enterobacter cloacae 001		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacter agglomerans		-	-	-	-	-	-	-	-	
Edwardsiella tarda biogroup 1		-	-	7.10±0.14	0.40	1+	-	-	-	-
Serratia ficaria		-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบส่วนใส (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 001	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม
				บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	
Citrobacter diversus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xenorhabdus luminescens/ X. nematophilus 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xenorhabdus luminescens/ X. nematophilus 002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
วงศ์ Vibrionaceae										
Aeromonas schubertii	-	-	-	7.25±0.00	0.46	1+	-	-	-	-
วงศ์ Pseudomonaceae										
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sphingobacterium spiritivorum	-	-	-	14.92±3.60	5.18	8+	-	-	-	-

หมายเหตุ: 1. – คือ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 2. ดัชนีค่าการยับยั้ง: - (0), 1+ (0.01-0.5), 2+ (0.51-0.7), 3+ (0.71-1), 4+ (1.01-2), 5+ (2.01-3), 6+ (3.01-4), 7+ (4.01-5), 8+ (5.01-6), 9+ (6.01-7) และ 10+ (7.01-8)

4.2 ประสิทธิภาพเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสมในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

จากการศึกษาพบว่าเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 005, *Bacillus* BUU4, *Bacillus* BUU 001 และเชื้อผสม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง โดยเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 004 สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำนวน 37 ไอโซเลท (61.67 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแบคทีเรียที่ยับยั้งได้นั้นมีหลายชนิดในวงศ์ Bacillaceae, Micrococcaceae, Corynebactericeae, Enterobacteriaceae, Vibrionaceae และ Pseudomonaceae โดยแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (46.67 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียแกรมลบ (15.00 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* BUU 004 ในรูปแบบเซลล์แขวนลอยมีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งอยู่ในช่วงที่กว้างกว่าในรูปแบบส่วนใสและมีกลไกการยับยั้งที่แตกต่างกัน โดยยับยั้ง *Corynebacterium mycetoides* ได้ดีที่สุด (23.42±0.76 มิลลิเมตร) คิดเป็นค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 10+ รองลงมาคือ *S. auricula/S. haemolyticus*, *S. cohnii* subsp. 1/*S. auricularis*, *Enterobacter cloacae* 001, *S. hominis* 002, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. simulans/S. warneri*, *Planococcus halophilus*, *Micrococcus sedentarius* และ *S. saccharolyticus* มีค่าเท่ากับ 22.67±1.38, 22.17±1.77, 20.67±0.14, 19.91±1.01, 19.33±1.23, 19.08±0.29, 18.58±0.29, 18.33±0.14 และ 17.25±1.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ คิดเป็นค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 10+ ทุกไอโซเลท

ส่วนเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 005 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำนวน 16 ไอโซเลท (26.67 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแบคทีเรียที่ยับยั้งได้นั้นมีหลากหลายชนิดในวงศ์ Bacillaceae, Micrococcaceae, Corynebactericeae, Enterobacteriaceae และ Pseudomonaceae โดยยับยั้งแกรมบวกได้ 21.67 เปอร์เซ็นต์ และแกรมลบได้ 5.00 เปอร์เซ็นต์ โดยยับยั้ง *S. auricula/S. haemolyticus* ได้ดีที่สุด (18.33±0.14 มิลลิเมตร) คิดเป็นค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 10+ รองลงมาคือ *S. cohnii* subsp. 1/*S. auricularis* และ *C. mycoides* มีค่าเท่ากับ 17.67±0.01 และ 17.58±0.01 มิลลิเมตร ตามลำดับ คิดเป็นค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 10+

สำหรับ *Bacillus* BUU 001 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้เพียง 6 ไอโซเลท (10.00 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Bacillaceae 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Bacillus* sp., *B. coagulans* 001, *B. macerans* 003 และ *B. macerans* 004 และวงศ์ Micrococcaceae 2 ไอโซเลท ได้แก่ *S. hominis* 003 และ *Kocuria palustris* โดยยับยั้ง *B. coagulans* 001 ได้ดีที่สุด (8.83±0.38 มิลลิเมตร) คิดเป็นค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 4+ และเชื้อผสมมีการยับยั้งได้เพียง 5 ไอโซเลท (8.33 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *B. coagulans* 001 และ *B. cereus / B. thuringiensis* 002 และวงศ์ Micrococcaceae ได้แก่ *S. hominis* 003, *S. mucilaginosus* และ *K. palustris* โดยยับยั้ง *S. mucilaginosus* ได้ดีที่สุด (7.92±0.38 มิลลิเมตร) คิดเป็นค่าดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 3+

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง โดยพิจารณาค่าดัชนีการยับยั้งพบว่า เซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพดีที่สุด ด้วยค่าดัชนีการยับยั้งอยู่ในช่วง 1+ ถึง 10+ รองลงมาคือ *Bacillus* BUU

001 โดยมีค่าดัชนีอยู่ในช่วง 1+ ถึง 4+ และเชื้อผสม โดยมีค่าดัชนีอยู่ในช่วง 1+ ถึง 3+ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001			*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี			บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี
วงศ์ Bacillaceae														
Bacillus laterosporus	-	-	-	-	-	-	-	-	8.25±0.25	0.89	3+	-	-	-
Bacillus mycoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus sp.	7.17±0.14	0.43	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus coagulans 001	8.83±0.38	1.17	4+	-	-	-	-	-	7.27±0.25	0.46	1+	7.27±0.25	0.46	1+
Bacillus coagulans 002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 002	-	-	-	-	-	7.08±0.38	0.39	1+	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus subsp. *mycoides/ B.anthracis* 003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001			*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี			บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี
Bacillus macerans 001	-	-	-	-	-	6.38±0.14	0.30	1+	-	-	-	-	-	-
Bacillus macerans 002	-	-	-	-	-	10.17±0.14	1.87	4+	-			-	-	-
Bacillus macerans 003	8.50±0.70	1.00	3+	-	-	-		-	-		-	-	-	-
Bacillus macerans 003	7.08±0.14	0.39	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus polymyxa	-	-	-	-	-	8.08±0.14	0.81	3+	-	-	-	-	-	-
Bacillus licheniformis 001	-	-	-	-	-	-	-	-	7.42±0.38	0.53	2+	-	-	-
Bacillus licheniformis 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus/ *B. thuringiensis* 001	-	-	-	-	-	7.17±0.38	0.49	1+	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus/ *B. thuringiensis* 002	-	-	-	-	-	9.58±0.58	1.55	4+	-	-	-	7.67±0.29	0.63	2+
Bacillus cereus/ *B. thuringiensis* 002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus/ *B. thuringiensis* 004	-	-	-	-	-	10.67±0.14	2.16	5+	6.50±0.25	0.17	1+	-	-	-
วงศ์ Micrococcaceae														
Micrococcus sedentarius	-	-	-	-	-	18.33±0.14	8.33	10+	8.83±0.14	1.17	4+	-	-	-
Micrococcus varians	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001			*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี			บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี
Planococcus halophilus	-	-	-	-	-	18.58±0.29	8.59	10+	8.08±0.38	0.81	3+	-	-	-
Staphylococcus simulans/ S. warneri	-	-	-	-	-	19.08±0.29	9.11	10+	14.58±0.88	4.90	7+	-	-	-
Staphylococcus cohnii subsp. 1/ *S. auricularis*	-	-	-	-	-	22.17±1.77	13.27	10+	17.67±0.01	7.67	10+	-	-	-
Staphylococcus saccharolyticus	-	-	-	-	-	17.25±1.00	7.27	10+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus auricula/ S. haemolyticus	-	-	-	-	-	22.67±1.38	13.16	10+	18.33±0.14	8.33	10+	-	-	-
Staphylococcus hominis 001	-	-	-	-	-	14.08±0.72	4.51	7+	10.58±0.58	2.11	5+	-	-	-
Staphylococcus hominis 001	-	-	-	-	-	19.91±1.01	10.01	10+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus hominis 001	6.75±0.50	0.27	1+	-	-	16.67±0.38	6.27	9+	7.25 ±0.25	0.46	5+	6.92±0.14	0.33	1+
Staphylococcus hominis 004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus capitis	-	-	-	-	-	15.83±0.29	5.96	8+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001			*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี			บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี
Staphylococcus caprae	-	-	-	-	-	14.42±0.52	4.78	7+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus hyicus subsp./*S. chromogenes*	-	-	-	-	-	13.33±0.63	3.94	6+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus saprophyticus/S. warneri/ S. hominis	-	-	-	-	-	13.25±0.43	3.88	6+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus cohnii subsp. 1	-	-	-	-	-	14.33±0.38	4.70	7+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus warneri	-	-	-	-	-	16.00±0.50	6.11	9+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus mucilagonosus	-	-	-	-	-	11.08±0.14	3.94	5+	-	-	-	7.92±0.38	0.74	3+
Staphylococcus saprophyticus	-	-	-	-	-	13.00±0.87	3.69	6+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus hyicus subsp. *chromogenes*	-	-	-	-	-	15.17±0.14	5.39	8+	-	-	-	-	-	-
Kocuria palustris	7.17±0.29	0.43	1+	-	-	7.25±0.29	0.46	1+	7.00±0.00	0.36	1+	7.17±0.29	0.43	1+
Nesterenkonai lacusekhoensi	-	-	-	-	-	16.00±0.43	6.11	9+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001			*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			เชื้อผสม		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี			บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี
วงศ์ Corynebactericeae														
Corynebacterium mycoides	-	-	-	-	-	23.42±0.76	14.23	10+	17.58±0.01	7.58	10+	-	-	-
วงศ์ Enterobacteriaceae														
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia pestis	-	-	-	-	-	-	-	-	8.42±0.14	0.97	3+	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacter sakazakii	-	-	-	-	-	7.83±0.01	0.70	2+	-	-	-	-	-	-
Enterobacter cloacae 001	-	-	-	-	-	20.67±0.14	10.87	10+	15.83±0.38	5.96	8+	-	-	-
Enterobacter cloacae 002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacter agglomerans	-	-	-	-	-	7.08±0.14	0.39	1+	-	-	-	-	-	-
Edwardsiella tarda biogroup 1	-	-	-	-	-	13.42±0.14	4.00	6+	-	-	-	-	-	-
Serratia ficaria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrobacter diversus	-	-	-	-	-	11.25±0.50	2.52	5+	-	-	-	-	-	-
Xenorhabdus luminescens/ *X. nematophilus* 001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xenorhabdus luminescens/ *X. nematophilus* 001	-	-	-	-	-	9.25±0.25	1.38	4+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้งและดัชนีค่าการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แขวนลอย (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	*Bacillus* BUU 001			*Bacillus* BUU 002	*Bacillus* BUU 003	*Bacillus* BUU 004			*Bacillus* BUU 005			*Bacillus* เชื้อผสม		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี			บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนี
วงศ์ Vibrionaceae														
Aeromonas schubertii	-	-	-	-	-	11.08±0.14	2.41	5+	-	-	-	-	-	-
วงศ์ Pseudomonaceae														
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	19.33±1.23	9.38	10+	12.50±0.50	3.34	6+	-	-	-
Sphingobacterium spiritivorum	-	-	-	-	-	11.33±0.76	2.57	5+	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: 1. – คือ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 2. ดัชนีค่าการยับยั้ง: - (0), 1+ (0.01-0.5), 2+ (0.51-0.7), 3+ (0.71-1), 4+ (1.01-2), 5+ (2.01-3), 6+ (3.01-4), 7+ (4.01-5), 8+ (5.01-6), 9+ (6.01-7) และ 10+ (7.01-8)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในอาหารทะเลแห้งอยู่ในช่วง 1.24×10^{4} ถึง 1.14×10^{9}, 6.67×10^{3} ถึง 1.68×10^{9} และ 1.00×10^{2} ถึง 8.33×10^{3} CFU/g ตามลำดับ โดยหมึกไข่เป็นตัวอย่างที่พบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มมากที่สุด และปลาหวานเป็นตัวอย่างที่พบกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีมากที่สุด

2. จากการศึกษาพบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดจำนวน 18 ไอโซเลท ในอาหารทะเลแห้ง ได้แก่ *Bacillus cereus* subsp. *mycoides/ B. anthracis* และ *B. cereus/ B. thuringiensis* (อย่างละ 3 ไอโซเลท), *B. macerans*, *B. licheniformis* และ *Staphylococcus hominis* (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และ *B. polymyxa*, *S. mucilagonosus*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *Kocuria palustris* และ *Nesterenkonai lacusekhoensi* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) โดยตัวอย่างหอยหวานมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากที่สุด (6 ชนิด) ได้แก่ *B. cereus* subsp. *mycoides/ B. anthracis*, *B. macerans*, *B. licheniformis*, *B. cereus/ B. thuringiensis*, *S. saprophyticus* และ *S. hominis*

3. จากการศึกษาพบแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มจำนวน 6 ไอโซเลท ในอาหารทะเลแห้ง ได้แก่ *B. coagulans* และ *S. cohnii* subsp. 1 (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และ *S. hominis* และ *S. warneri* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) โดยตัวอย่างหอยหวานมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากที่สุด (2 ชนิด) ได้แก่ *S. cohnii* subsp. 1 และ *S. warneri*

4. จากการศึกษาพบแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีจำนวน 9 ไอโซเลท ในอาหารทะเลแห้ง ได้แก่ *Enterobacter agglomerans*, *Edwardsiella tarda* biogroup 1 และ *Xenorhabdus luminescens/ X. nematophilus* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) และ *E. cloacae*, *Serratia ficaria* และ *Citrobacter diversus* (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และพบความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งชนิดปลาหวานมากที่สุด (6 ชนิด) ได้แก่ *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *Edwardsiella tarda* biogroup 1, *S. ficaria*, *C. diversus* และ *X. luminescens/ X. nematophilus*

5. จากการศึกษาประสิทธิภาพในรูปแบบส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ ของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่าส่วนใสของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 เพียง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำนวน 20 ไอโซเลท (33.33 เปอร์เซ็นต์) และ 8 ไอโซเลท (13.33 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ โดยที่ส่วนใสของ *Bacillus* BUU 004 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยดัชนีการยับยั้งอยู่ในช่วง 1+ ถึง 10+ ซึ่งต่างจากส่วนใสของ *Bacillus* BUU 005 ที่มีประสิทธิในการยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนวงศ์ Bacillaceae เท่านั้น ด้วยดัชนีการยับยั้งในช่วง 1+ ถึง 8+

6. จากการศึกษาประสิทธิภาพในรูปแบบเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ ของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่า *Bacillus* BUU 004 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด 37 ไอโซเลท (61.67 เปอร์เซ็นต์) ด้วยดัชนีการยับยั้งอยู่ในช่วง 1+ ถึง 10+ รองลงมาคือรูปแบบเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 005 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 16 ไอโซเลท (26.67 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนั้นเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 001 และเชื้อผสมสามารถยับยั้งได้ 6 ไอโซเลท (10.00 เปอร์เซ็นต์) และ 5 ไอโซเลท (8.33 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

7. จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนใสและเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งได้ดี ดังนั้นจึงควรนำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งในรูปของส่วนใสและเซลล์แขวนลอยมาพัฒนาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและก่อโรคในอาหารทะเลแห้งได้ในอนาคตต่อไป

อภิปรายผลการทดลอง

1. อุบัติการณ์ของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ในอาหารทะเลแห้ง

จากการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารทะเลแห้งชนิดต่าง ๆ ที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี พบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มในทุกตัวอย่างของอาหารทะเลแห้ง (100.00 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี 3 ตัวอย่าง (60.00 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 1.24×10^{4} ถึง 1.14×10^{9}, 6.67×10^{3} ถึง 1.68×10^{9} และ 1.00×10^{2} ถึง 8.33×10^{3} CFU/g ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของบัญญัติ สุขศรีงาม และคณะ (2551) ที่ตรวจพบผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำพวกปลาหวานริวกิว หมึกกะตอยแห้งและหมึกไข่ จำนวน 75 ตัวอย่าง มีปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.33×10^{3} ถึง 1.48×10^{8} CFU/g นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของศิริโฉม ทุ่งเก้า และสุพัตรา เมืองฮาม (2551) ตรวจพบการปนเปื้อนแบคทีเรียในหมึกแห้งปรุงรส 90 ตัวอย่าง โดยมีค่าเท่ากับ 1.00×10^{2} ถึง 2.00×10^{5} CFU/g สำหรับในต่างประเทศพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารทะเลแห้งเช่นเดียวกัน โดย Can (2011) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีและกลุ่มชอบเกลือในปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) เค็ม โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.23×10^{4} ถึง 1.02×10^{7} และ 3.89×10^{3} ถึง 1.32×10^{7} CFU/g ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียชอบเกลือและแบคทีเรียรูปท่อนกลุ่มต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 10^{6} ถึง 10^{7} CFU/g (Gram and Huss, 1996)

แต่อย่างไรก็ตามมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่กำหนดโดยกรมประมง (2006) ได้กำหนดมาตรฐานการตรวจผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง ได้แก่ หมึกแห้ง และผลิตภัณฑ์ประมงแห้งอื่น ๆ พบแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 5×10^{4} CFU/g ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งทุกตัวอย่าง ยกเว้นหมึกเต่าทองสามรสไม่ผ่านมาตรฐาน เนื่องจากมีปริมาณแบคทีเรีย

ทั้งหมดเกินข้อกำหนดดังกล่าว ซึ่งการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง ถือว่าเป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อผู้บริโภคและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งนี้อาจเป็นแบคทีเรียก่อโรค และบ่งชี้ถึงความสะอาดของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและสุขอนามัยของกระบวนการผลิต

เมื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสามารถจัดจำแนกได้เป็นแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ได้แก่ *B. cereus* subsp. *mycoides/ B. anthracis* และ *B. cereus/B. thuringiensis* (อย่างละ 3 ไอโซเลท), *B. macerans*, *B. licheniformis* และ *S. hominis* (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และ *B. polymyxa*, *S. mucilagonosus*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *Kocuria palustris* และ *Nesterenkonai lacusekhoensi* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) แบคทีเรียกลุ่มทนเค็ม ได้แก่ *B. coagulans* และ *S. cohnii* subsp. 1 (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และ *S. hominis* และ *S. warneri* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) และแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ได้แก่ *E. agglomerans*, *E. tarda* biogroup 1 และ *X. luminescens/X. nematophilus* (อย่างละ 1 ไอโซเลท) และ *E. cloacae*, *S. ficaria* และ *C. diversus* (อย่างละ 2 ไอโซเลท) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน (39.39 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม (33.33 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับรายงานของศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์ (2550) ได้ทำการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของหมึกแห้งปรุงรสพร้อมบริโภค พบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มากที่สุด รองลงมา คือแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Acinetobacter* ตามลำดับ การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปในต่างประเทศตรวจพบอุบัติการณ์ของแบคทีเรียไม่แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้กล่าวคือ แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* (Kim et al., 2004) และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Micrococcus* และ *Staphylococcus* sp. ยกตัวอย่างเช่น *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. intermidius* และ *S. epidermidis* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดคือ *Citrobacter* และ *E. cloacae* (Himelbloom et al., 1996; Himelbloom and Crapo, 1998) การที่พบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ได้มากในอาหารทะเลแห้งเนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ทนความร้อนได้สูงจึงรอดชีวิตได้จากกระบวนการผลิต (Iurlina et al., 2006) แหล่งปนเปื้อนที่สำคัญของแบคทีเรียชนิดนี้น่าจะมาจากเครื่องปรุงรสโดยเฉพาะอย่างยิ่งพริกแห้งและน้ำตาล ซึ่งมีโอกาสพบสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ได้ (Frazier and Westhoff, 1988) สำหรับการตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่พบบนผิวหนังของมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจปนเปื้อนลงสู่อาหารระหว่างขั้นตอนการผลิตและการแปรรูปไม่ว่าจะเป็นการปรุงรสโดยการเติมเกลือ (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538) รวมทั้งเครื่องปรุงชนิดอื่น เช่น พริกไทย พริกไทยแดง พริกไทยดำ โหระพาและผงกะหรี่ เป็นต้น (Antai, 1988) นอกจากนั้นยังสามารถปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิตได้ ยกตัวอย่างเช่น การบรรจุผลิตภัณฑ์ในภาชนะที่ไม่สามารถป้องกันการปนเปื้อนอย่างเพียงพอ เป็นต้น (ศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์, 2550; Lee and Pfeifer, 1973; Okafor and Nzeako, 1985) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสามารถเจริญได้ใน

ระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการแปรรูป เช่น การรมควันและการตากแห้ง (Himelbloom et al., 1996; Himelbloom and Crapo, 1998) นอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*, *Micrococcus* และ *Staphylococcus* ยังเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงและความชื้นต่ำ (Peterson et al., 1964; Himelbloom and Crapo, 1998) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเหล่านี้จะมีค่าความเข้มข้นของเกลือและความชื้นอยู่ในช่วง 10 ถึง 14 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2524; มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538) และจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่สำคัญพบได้ในอาหารพร้อมบริโภค และสร้างสารพิษได้ จึงทำให้เกิดการเจ็บป่วย (Genigeorgis, 1989; Wieneke et al., 1993; Jablonski and Boach, 1997)

นอกจากนี้ในการศึกษาพบแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเป็น *B. cereus* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคจากการบริโภคอาหารชนิดหนึ่ง (Griffths and Schraft, 2002) โดยก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงและอาเจียน ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้จากผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อ นม ผัก และปลา (Feldhusen, 2000)

จากที่ได้กล่าวมาแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแห้งเป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคได้หลากหลายชนิด ดังนั้นควรจะมีการตระหนักถึงการระมัดระวังและการป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทะเลแห้ง เพราะการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนในปริมาณที่วัดได้ทุกตัวอย่างนั่นเอง ดังนั้นควรมีการป้องกันและปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง ยกตัวอย่างเช่น การป้องกันการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสามารถป้องกันด้วยการควบคุมขั้นตอนการผลิต การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ (ศิวาพร ศิวเวชช, 2542)

2. ประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ และเชื้อผสม ในการยับยั้งแบคทีเรียปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า แบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งได้แตกต่างกัน โดยพบว่ารูปแบบส่วนใสและเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียจากอาหารทะเลแห้งได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ยกตัวอย่างเช่น *B. licheniformis* สามารถยับยั้ง *S. aureus*, Beta-hemolytic streptococci, Non hemolytic streptococci, *B. cereus* (Al-Janabi, 2006) และ *Clostridium perfringens* (Ducluzeau et al., 1976) รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (He et al., 2006) นอกจากนั้น *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* อีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. และ *E. coli* (Hemalatha and Shanthi, 2010) รวมทั้ง *B. thuringiensis* และ *B. megatwerian* สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้เช่นเดียวกัน ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica* และ *Micrococcus* (Aslim et al., 2006)

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 ในการศึกษาครั้งนี้อาจเกิดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตขึ้น ซึ่ง *Bacillus* บางชนิด เช่น *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. circilans*, *B. thuringiensis* และ *B. cereus* สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Morikawa et al., 1992; Perez et al., 1993; Eltem and Ucar, 1998; Paik et al., 1997; Oscariz et al., 1999; Zheng et al., 1999; Bizani and Brandell, 2002) ยกตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะจำพวก Bacitracin, Pumulin และ Gramicidin (Torda, 2005) รวมทั้งแบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น Bacthuricin F4 (BF4) (Kamoun et al., 2005) และ Thuricin 17 (T17) (Gray et al., 2006), Subpeptin JM4-A, Subpeptin JM4-B (Wu et al., 2005) Lichenin, Bacillocin 490 และ P40 (Paltnaik et al., 2001; Martirani et al., 2002; Cladera-Olivera et al., 2004) ซึ่งสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (Mascher et al., 2003) ในขณะที่แบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซินก็มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียเช่นเดียวกัน โดยทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไซโตพลาสซึมไหลออกจากเซลล์อย่างรวดเร็ว ทำให้สูญเสียสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Jack et al., 1995) นอกจากสารปฏิชีวนะและสารแบคเทอริโอซินแล้ว แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ยังสามารถผลิต Surfactin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Cyclic lipopeptide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *Salmonella enterica* (Mireles II et al., 2001) โดยสารชนิดนี้มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดรูรั่วที่ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งกระบวนการ Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) และยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนมีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ (Kluge et al., 1988; Ullrich et al., 1991; Singh and Cameotra, 2004)

นอกจากนั้นการศึกษาในครั้งนี้พบว่าส่วนใสของ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้เฉพาะในกลุ่ม *Bacillus* sp. เท่านั้น ซึ่งต่างจาก *Bacillus* BUU 004 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ แสดงให้เห็นว่าส่วนใสของ *Bacillus* BUU 005 มีฤทธิ์ยับยั้งที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ารูปแบบเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าส่วนใส รวมทั้งยังแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเซลล์แขวนลอยและส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Con and Gokalp, 2000) และอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปเซลล์แขวนลอยสามารถผลิตสารให้มีความเข้มข้นและมีความหลากหลายชนิดมากขึ้นตามระยะเวลาของการเจริญ (Vater et al., 2002) และการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงของเซลล์แขวนลอยยังสามารถเกิดได้จากการเข้าครอบครองและแย่งสารอาหารกับแบคทีเรียก่อโรคบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (มณจันทร์ เมฆธน และกมลพร มาแสวง, 2543) ด้วยปัจจัยดังกล่าวทำให้ฤทธิ์ยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* BUU 004 และ *Bacillus* BUU 005 ที่นำมาทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์

อาหารทะเลแห้งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งและป้องกันแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. (2006). *มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา*. วันที่สืบค้นข้อมูล 15 มีนาคม 2554, เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/quality/analyse/Traditional4.pdf.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2550). *เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไปที่มิใช่อาหารควบคุมเฉพาะกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. วันที่ค้นข้อมูล 5 พฤศจิกายน 2550, เข้าถึงได้จาก http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/varity/cheme/confict22.htm

กรรณิการ์ เสนทอง, สุเมธ เนาว์รุ่งโรจน์, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, ภูวดล บางรักษ์ และวรางคณา จุ้งลก. (2551). *การคัดเลือกและการวิเคราะห์แยกชนิด Bacillus ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อนและ Lactobacillus จากน้ำนมดิบ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

กำเนิด สุภัณวงษ์. (2534). *จุลชีวอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

บัญญัติ สุขศรีงาม, นิสา ไกรรักษ์, พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล, ศิริพร เอื้ออังกูร, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, อภิรดี ปิลันธนภาคย์, กาญจนา หริ่มเพ็ง, ปริยา นุพาสันต์, ศิริโฉม ทุ่งเก้า, สุดสายชล หอมทอง, สุดารัตน์ สวนจิตร และวรนาฏ จงโยธา. (2551). *สถานการณ์การปนเปื้อนและพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแห้งเพื่อมุ่งสู่การเป็นศูนย์ตรวจจุลินทรีย์และการรับรองมาตรฐานสินค้าอาหารทะเลแห้ง*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. สงขลา: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. (2524). *ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ*. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, เนื้อทอง วนานุวัธ, สายสนม ประดิษฐดวง และวราภา วรพงษ์. (2532). *คุณภาพกุ้งแห้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีร์ เหมะรัชตะ. (2551). ความสำคัญของโพรไบโอติกต่อการแพทย์. *วารสารจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*, 52(3), 193-204.

มณจันทร์ เมฆธน และกมลพร มาแสวง. (2543). *ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย Vibrio harveyi ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาประมงและสาขาวิทยาศาสตร์ (หน้า 259-268). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มัทนา แสงจิดาวงษ์. (2538). *จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง*. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

รังสินี โสธรวิทย์. (2550). *เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์วิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไวรุจน์ เดชมหิทกุล, จันทร์จีรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. (2550). การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี*, 30(2), 251-260.

ศิวาพร ศิวเวชช. (2542). *การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์. (2550). *คุณภาพทางจุลชีววิทยาของหมึกแห้งปรุงรสพร้อมบริโภคที่จำหน่ายปลีกในตลาดหนองมนชลบุรี*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (หน้า 750-755). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า และสุพัตรา เมืองฮาม. (2551). *ความชุกของ Bacillus sp. และ Bacillus cereus ในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งปรุงรส*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (หน้า 138-146). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. (2547). *เทคโนโลยีชีวภาพอาหารการหมักและสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สินหทัย สมบูรณ์ยิ่ง. (2545). *การสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี*. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ปรียาพร ทองเนียม และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553ก). แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 38(4), 509-519.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรียาพร ทองเนียม. (2553ข). การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*, 2(1), 70-83.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสวามินี ธีระวุฒิ. (2553ค). รายงานวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2545). รายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำเดือยมีนาคม 2545. เอกสารอัดสำเนา.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2548). รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ ประจำปี พ.ศ. 2548: สรุปผลการเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2548. เข้าถึงได้จาก http://203.157.15.4/publish/outbreak/FPOI49/sur48.htm

เสาวนีย์ ธรรมสถิต. (2547). *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. นครปฐม: สถาบันพัฒนาสาธารณะสุขอาเซี่ยน.

อุทัย เก้าเอี้ยน. (2549). โปรไบโอทิกส์. *วารสารสงขลานครินทร์เวชสาร*, 24(4), 315-323.

อุษามาส จริยวรานุกูล. (2548). การรอดชีวิตของโพรไบโอติกและการนำไปใช้ประโยชน์. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 25(1), 84-93.

Al-Janabi, A. A. H. S. (2006). Identification of bacitracin produced by local isolate of *Bacillus licheniformis*. *Afican Journal of Biotechnology*, 5(18), 1600-1601.

Amarty, S. A., and Leung, J. P. C. (2000). Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* T-13. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedinia*, 9, 65-71.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. In: A. Mendez-Vilas (Ed.). *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, Vol. 1, pp. 475-486.

Antai, S. P. (1988). Study of the *Bacillus* flora of Nigeriam spices. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 259-261.

Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N., and Gunasekaran, P. (2009). Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, 100, 872-877.

Asha Devi, N. K., Balakrishnan, K., Gopal, R., and Padmavathy, S. (2008). *Bacillus clausii* MB9 from the east coast regions of India: Isolation, biochemical characterization and antimicrobial potentials. *Current Science*, 95, 627-636.

Aslim, B., Saglam, N., Beyatli, Y. (2006). Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, 26, 41-48.

Aycicek, H., Cakiroglu, S., and Stevenson, T. H. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16, 531-534.

Ayulo, A. M. R., Machado, R. A., and Scussel, V. M. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 171-178.

Beuchat, L. R. & Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134–142.

Bizani, D., and Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. stain 8A. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 512-519.

Branner, D. J. (1984). Section: 5 Facultative anaerobic Gram-negative rods. In N. R. Krieg, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1* (pp. 414-417). Baltimore: Williams & Wilkins.

Brink ten, B., Minekns, M., Vander Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J., Huis in't Veld, J. H. J. (1994). Antimcrobial activity of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 140-148.

Brul, S., and Coote, P. (1999). Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.

Can, O. P. (2011). Combine effect of potassium sorbate and dry salting on shelf life sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Technology*, 9(1), 43-49.

Chotmongcol K, Vuthiphandchai V, Theeravut S and Nimrat S (2010) Contamination of formalin, salicylic acid and synthetic dyes of foods distributed in the Eastern Thailand. The 9th National Environmental Conference, March 24-27, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center.

Cladera-Olivera, F. Caron, G. R., and Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 251-256.

Colakoglu, F. J., Sarmasik, A., and Koseoglu, B. (2006). Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles cost of Turkey. *Food Control*, 17, 648-652.

Con, A. H., and Gokalp, H. Y. (2000). Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*, 55, 89-96.

Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simarkd, R. E., Huang, J., and Lacroix, C. (1991). Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3450-3455.

Davidson, P. M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville, (Eds). *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: American Society for Microbiology.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., and Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *International Journal Antonie Van Leeuwenhoek,* 69, 193-202.

Ducluzeau, R., Dubos, F., Raibaud, P., and Abrams, G. D. (1976). Inhibition of *Clostridium perfringens* by an antibiotic substance produced by *Bacillus licheniformis* in the digestive tract of gnotobiotic mice: Effect on other bacteria from the digestive tract. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9(1), 20-25.

El Enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S., and El Azaly, Y. (2008). Optimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scale. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 583-593.

Eltem, R., and Ucar, F. (1998). The determination of antimicrobial activity spectrums of 23 *Bacillus* strains isolated from Denizli-Acigol (Bitter Lake) which is sodalake (Na_2SO_4). *Journal KUKEM*, 21, 57-64.

Emborg, J. and Dalgaard, P. (2006), Formation of histamine and biogenic amines in cold smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *Journal of Food Protection*, 69, 897-906.

Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 1651-1660.

Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S., and Storey, D. M. (2003). Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 353-358.

Fisher, K. and Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232-1240.

Foulds, J. D., and Shemin, D. (1969). Concomitant synthesis of bacteriocin and bacteriocin inactivator from *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 99, 661-666.

Frazier, W. C., and Westhoff, D. C. (1998). *Food Microbiology* (4^{th} ed.). New York: McGraw-Hill Book Company.

Garcia Fontan, M. C., Lorenzo, J. M., Martinez, S., Franco, I., and Carballo, J. (2007). Characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LTW*, 40, 1610-1622.

Genigeorgis, C. A. (1989). Present state of knowledge on Staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 327-360.

Gram, L., and Huss, H. H. (1996). Microbiology spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.

Gray, E. J., Leo, K. D., Seuleimanov, A., Di Falco, M. R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T. C., Driscoll, B. T., and Smith, D. L. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by PGPR strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: Isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 545-554.

Griffths, M. W., and Schraft, H. (2002). *Bacillus cereus* food poisoning. In: D. O. Cliver & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (2 nd Ed.)* (pp. 262), San Diego: Academic Press.

Hatha, A. A. M., and Lakshmanaperumalsamy, P. (1997). Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 14, 111–116.

He, L., Chen, W., and Liu, Y. (2006). Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. Microbiological Research, 161, 321-326.

Hemalatha, S., and Shanthi, S. (2010). In vitro characterization of bacteriocin producing *Bacillus subtilis* from milk samples. *African Journal of Microbiology Research*, 4(19), 2004-2010.

Himelbloom, B. H., and Crapo, C. A. (1998). Factors influencing the microbial quality of cold-smoked salmon strips. *Journal of Food Science*, 63, 356-358

Himelbloom, B. H., Crapo, C. A., and Pfutzenreuter, R. (1996). Microbial quality of an Alaska native smoked salmon process. *Journal of Food Protection*, 59, 56-58.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

Holt, H. M., Gahrn-Hansen, B., and Bruun, B. (2005). *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11, 347–352.

Hosseini, H., Cheraghali, A. M., Yalfani, R., and Razavilar, V. (2004). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control*, 15, 187–190.

Iurlina, M. O., Saiz, A. I., Fuselli, S. R., and Fritz, R. (2006). Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 39, 105-110.

Jablonski, L. M., and Boach, G. A. (1997). *Staphylococcus aureus*. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 353-375). Washington: ASM Press.

Jack, R. W., Tagg, J. R., and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59, 171-200.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Jeya Shakila, R., Maheswari, K., and Sukumar, D. (2004). Dry ice as a novel chilling medium along with water ice for short-term preservation of fish Emperor breams, lethrinus (*Lethrinus miniatus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 485–493.

Jones, D., and Collina, M. D. (1986). Section: 15 Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2* (pp. 1261-1440). Baltimore: Williams & Wilkins.

Kamoun, F., Mejdoub, H., Aeuissaoui, H., Reinbott, J., Hammami, A., and Jaoua, S. (2005). Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied and Microbiology*, 98, 881-886.

Khashe, S., and Jandaj, M. (1998). Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 783-787.

Khodair, T. A., Abdelhafez, A. A. M., Sakr, H. M., and Ibrahim, M. M. M. (2008). Improvement of *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticide production by fed-batch culture on low cost effective medium. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (6), 923-935.

Kim, S. H., Eun, J. B., Chen, T. Y., Wei, C. I., Clemens, R. A., and An, H. (2004). Evaluation of histamine and other biogenic amines and bacterial isolation in canned anchovies recalled by the USFDA. *Journal of Food Science*, 69, 157-162.

Kloss, W. E., and Schilefer, K. H. (1986). Section 12: Gram-positive cocci genus IV *Staphylococcus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2* (pp. 1016-1017). Baltimore: Williams & Wilkins.

Kluge, B., Vater, J., Salnikow, J., and Eckart, K. (1988). Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Federation of European Biochemical Societies*, 231, 107-110.

Kocur, M. (1986). Section 12: Gram-positive cocci genus III *Planococcus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2* (pp. 1011-1013). Baltimore: Williams & Wilkins.

Lee, J. S., and Pfeifer, D. K. (1973). Aerobic microbial flora of smoked salmon. *Journal of Milk and Food Technology*, 36, 143-145.

Leonel Ochoa-Solano, J., and Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519-525.

Li, H. and O'Sullivan, D. J. (2002). Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3392–3400.

Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., and De Felice, M. (2002). Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*., *FEMS Microbiology*, 1, 1-5.

Mascher, T., Margulis, N. G., Wang, T., Ye, R. W., and Helmann, J. D. (2003). Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: The regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1591-1604.

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prevost, F. and Pilet, M. F. (2009a). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, 72, 365-374.

Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Pre´vost, H., and Leroi, F. (2009b). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 638–644.

Mehrotra, S., Pandey, P. K., Gaur, R., and Darmwal, N. S. (1999). The production of alkaline protease by *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67, 201-203.

Mireles II, J. R., Toguchi, A., and Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5848-5854.

Morikawa, M., Ito, M., and Imanaka, T. (1992). Isolation of new surfactin producer sequence of the regulator gene, psf-1. *Fermentation and Bioengineering*, 74, 255-261.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Methods for determining bactericidal activity antimicrobial agents. Approved Standards M26-T, Wayne, Pa.

Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P., and Vuthiphandchai, V. (2008). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, 285, 123-129.

Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N. C., Dambrosio, A., Montag, C., and Chiocco, D. (2006). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 106, 219-222.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A. I., and Onilude A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.

Okafor, N., and Nceko, B. C. (1985). Microbial of fresh and smoked fish from Nigeriam freshwater. *Food Microbiology*, 2, 71-75.

Oscariz, J. C., Lasa, I., and Pisabarro, A. G. (1999). Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 337-341.

Paik, H. D., and Glatz, B. A. (1997). Enhanced bacteriocin production by *Propionibacterium thoenii* in fed-batch fermentation. *Journal of Food Protection*, 60, 1529-1533.

Paik, H. D., Bae, S. S., Park, S. H., and Pan, J. G. (1997). Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 294-298.

Paltnaik, P., Kaushik, J. K., Grover, S., and Batish, V. K. (2001). Purification and characterization of a bacteriocin-compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 636-645.

Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis1, G., Dasiou, D., and Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: Assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories*, 5(30), 1-14.

Parihar, V. S., Barbuddhe, S. B., Danielsson-Tham, M. L., and Tham, W. (2008). Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control*, 19, 566-569.

Perez, C., Suarez, C., and Castro, G. R. (1993). Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. *Folia Microbiology*, 38, 25-28.

Peterson, A. C., Black, J. J., and Gunderson, M. F. (1964). Staphylococci in competition III. influence of pH and salt on staphylococcal growth in mixed population. *Applied Microbiology*, 12, 70-76.

Rech, R., and Ayub, M. A. Z. (2007). Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochemistry*, 42, 873-877.

Samutsan S, Vuthiphandchai V, Theeravut S and Nimrat S (2010) Distribution of borax, sodium hydrosulfite and pesticide residues in food product from Eastern Thailand. The 9th National Environmental Conference, March 24-27, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center

Seeliger, H. R. P., and Jones, D. (1986). Section 14: Regular, nonsporing Gram-positive rods. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2* (pp. 1235-1246). Baltimore: Williams & Wilkins.

Singh, P., and Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, 22(3).

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2*. Baltimore: Williams & Wilkins.

Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P. M., and Johnson, E. A. (1998). *Naturally occurring antimicrobials in food: Task force report no.* 132. Ames: Council for Agricultural Science and Technology.

Torda, K. (2005). *Todar's Online Textbook of Bacteriology: The Genus Bacillus*. Madison: Department of Bacteriology, University of Wisconcin.

Ullrich, C., Kluge, B., Palacz, Z., and Vater, J. (1991). Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 30, 6503-6508.

Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., and Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cell and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210-6219.

Wieneke, A. A., Roberts, D., and Gilbert, R. J. (1993). Staphylococcal food poising in the United Kingdom, 1969-1990. *Epidemiology and Infection*, 110, 519-531.

Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, X., Zhong, J., and Huan, L. (2005). Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Current Microbiology*, 51, 292-296.

Yin, L. J., Wu, C. W. and Jiang, S. T. (2007). Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Science*, 73, 907-912.

Yongjin, H., Wenshui, X. and Xiaoyong, L. (2007). Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chemistry,* 104, 188-195.

Zdolec, N., Hadziosmanovic, M., Kozacinski, L., Cvrtila, Z., Filipovic, I., Skrivanko, S. and Leskovar, K. (2008). Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Science*, 80, 480–487.

Zheng, G., Yan, L. Z., Vederas, J. C., and Suber, P. (1999). Genes of the *Sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *Journal of Bacteriology*, 181, 7346-7355.