บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

1. ผลของความเข้มข้นของน้ำกะทิต่อการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

กระบวนการแช่เยือกแข็งอาจมีผลทำให้แบคทีเรียบางชนิดบาดเจ็บ หรือตาย ในระหว่างการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง เนื่องจากเกิดความเสียหายของผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ ไรโบโซม หรือแม้กระทั่งดีเอ็นเอ การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์สูญเสียองค์ประกอบที่สำคัญภายในเซลล์ เช่น โปรตีน ฟอสโฟลิปิด ไลโปโพลีแซคคาไรด์ จึงมีผลทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและเกิดการตายในที่สุด (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) แต่สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกบางสายพันธุ์ โดยเฉพาะ *S. aureus* มีรายงานว่าสามารถรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งได้โดยการแช่เยือกแข็งไม่มีผลหรือมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการบาดเจ็บของเซลล์ *S. aureus* โดย Douglas (2004) ได้อธิบายว่า แบคทีเรียแกรมบวกรูปไกลมจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน และแบคทีเรียแกรมบวกจะทนต่อการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำแข็งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบผลของระดับความเข้มข้นของน้ำกะทิที่มีต่อการบาดเจ็บและการรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งของ *S. aureus* พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำกะทิที่แตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 35 ถึงร้อยละ 75 ไม่มีผลต่อการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* เมื่อแช่เยือกแข็งน้ำกะทิที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนครบ 30 วัน โดยมีจำนวน *S. aureus* ที่ลดลงเพียง 0.04-0.09 Log_{10}CFU/ml และมีเซลล์ที่บาดเจ็บ 0.04-0.07 Log_{10}CFU/ml เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลของ Foley and Sheuring (n.d.) ที่ศึกษาอัตราการทำลายจุลินทรีย์ในไอศกรีมระหว่างแช่เยือกแข็ง โดยศึกษาอัตราการตายของ *S. aureus* ในไอศกรีมระหว่างการแช่เยือกแข็ง 30 นาที พบว่ากราฟอัตราการลดลงของจำนวนเชื้อต่อเวลาของ *S. aureus* แสดงถึงความสามารถในการต้านทานต่อการแช่เยือกแข็งได้ดี นอกจากนั้น Thusham et al. (2003) รายงานว่า *S. aureus* สามารถรอดชีวิตในกุ้งแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเชื้อลดลงจากเริ่มต้นเพียง 1 Log_{10}CFU/g รวมทั้งยังได้เปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *S. aureus* กับแบคทีเรียแกรมลบ คือ *S.* Typhimurium พบว่าเมื่อแช่เยือกแข็งกุ้งในสภาวะเดียวกัน *S.* Typhimurium จะลดลงมากกว่า 3 Log_{10}CFU/g แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถต้านทานต่อการแช่เยือกแข็งและมีชีวิตรอดมากกว่า *S.* Typhimurium ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษา

ของผู้วิจัยที่ศึกษาผลของการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ในน้ำกะทิแช่เยือกแข็งที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งพบว่า *S.* Typhimurium จะรอดชีวิตได้น้อยกว่า *S. aureus* โดยจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจะลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของน้ำกะทิลดลง และพบว่าจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นเป็นผลให้จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sheridan (1997) ที่ศึกษาการรอดชีวิตของ *Salmonella* Kentucky ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บดที่มีอัตราส่วนของไขมันที่แตกต่างกัน เมื่อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยพบว่า *S.* Kentucky ที่อยู่ในเนื้อบดที่มีไขมันระดับต่ำสุดจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อแช่เยือกแข็งในสัปดาห์แรก และจะรอดชีวิตมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของไขมันในเนื้อบดเพิ่มขึ้นจนถึงร้อยละ 20 และจะลดลงอีกครั้งเมื่ออัตราส่วนของไขมันเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 จากข้อมูลที่ได้จึงชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำกะทิมีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตและการบาดเจ็บของแบคทีเรียในสภาวะแช่เยือกแข็ง ซึ่งจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำกะทิพบว่า มีไขมันในสัดส่วนมากที่สุด ดังนั้นการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่แตกต่างกันจึงน่าจะเกิดจากการมีสัดส่วนของไขมันในน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าประชากรบางส่วนของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เกิดการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง โดยสังเกตได้จากจำนวนโคโลนีบนอาหารแข็ง TSA มีจำนวนมากกว่าเมื่อเทียบกับอาหารแข็ง TSA+10%NaCl หรืออาหารแข็ง XLD ซึ่งเป็นอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ตามลำดับ โดยส่วนต่างของจำนวนโคโลนีบนอาหารทั้งสองชนิดแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง (Miller et al., 2004; Yamamoto & Harris, 2001) จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่า *S. aureus* ที่อยู่ในน้ำกะทิที่แช่เยือกแข็งจะมีบางเซลล์เจริญได้บนอาหาร TSA แต่ไม่เจริญบนอาหาร TSA+10%NaCl ซึ่ง Ray and Speck (1973) อธิบายว่าการบาดเจ็บและการไวต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของ *S. aureus* น่าจะเกิดจากเยื่อเลือกผ่าน (Permeability Barriers) ที่ปกติจะป้องกันและยอมให้สารบางชนิดเข้าออกเซลล์ ถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็งจากภายในและนอกเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเยื่อเลือกผ่านเปลี่ยนแปลงไปและไม่สามารถคัดเลือกสารที่ผ่านเข้าออกเซลล์ได้ เมื่อนำ *S. aureus* ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ สูง เช่น อาหารแข็ง TSA+10%NaCl ที่ตามปกติมักใช้ในการเพาะเลี้ยง *S. aureus* จะทำให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ในปริมาณมากขึ้น จึงเป็นผลให้ยับยั้งการเจริญและทำให้เซลล์ของ *S. aureus* แตก (Lysis) ได้

ตามปกติการแช่เยือกแข็งจะมีผลทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เกิดความผิดปกติหรือความเสียหายบริเวณเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือบริเวณชั้นของเอาท์เทอร์เมมเบรน

โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้เกิดความผิดปกติต่อชั้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ทำให้มีความไวต่อสารอาหารเฉพาะ หรือสารต้านจุลชีพบางชนิดที่อยู่ในอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก ซึ่งเซลล์ปกติสามารถเจริญได้ดีเมื่อมีสารเหล่านั้นอยู่ (Wu, 2008) ในการศึกษานี้ผู้วิจัยใช้อาหารแข็ง XLD เป็นอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก *S.* Typhimurium อาหารชนิดนี้มีสาร โซเดียม ดีออกซีคอลเลท (Sodium Deoxycholate) ซึ่งเป็นเกลือน้ำดีชนิดหนึ่ง (Scheusner, Busta, & Speck, 1971) ทำให้มีผลรบกวนการทำงานต่อเซลล์ที่บาดเจ็บ ส่งผลให้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร XLD (Ray, Janssen, & Busta, 1972) ส่วน Gunn (2000) อธิบายว่าตามปกติแบคทีเรียแกรมลบจะมีกลไกการต้านทานต่อเกลือน้ำดี 2 ส่วนคือ Efflux Pumps ที่ทำหน้าที่กำจัดหรือขับเกลือน้ำดี หรือสารอื่น ๆ เช่น สารต้านจุลชีพ หรือ กรดอินทรีย์ (Organic Acid) เป็นต้น ออกจากไซโตพลาสซึมของเซลล์ และอีกส่วนคือ *Tol* Protein ซึ่งอยู่ในบริเวณเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะทำงานร่วมในกระบวนการ Efflux Pumps ดังนั้นในกระบวนการแช่เยือกแข็งที่มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เกิดความเสียหาย ก็จะทำให้กระบวนการ Efflux Pumps ผิดปกติไปด้วย ซึ่งมีผลทำให้ *Tol* Protein ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงเป็นผลให้การต้านทานต่อเกลือน้ำดีลดลงและสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้

2. ผลของความเข้มข้นของไขมันจากน้ำกะทิต่อการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

กระบวนการผลิตอาหารแช่เยือกแข็งรวมทั้งน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง มักใช้วิธีการแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็ว คือใช้อุณหภูมิต่ำมากและใช้เวลาสั้น เพื่อทำให้เซลล์ต่าง ๆ ของอาหารถูกทำลายได้น้อยที่สุดและเมื่อนำไปละลายน้ำแข็ง จะเสียคุณค่าทางโภชนาการน้อยกว่าวิธีการแช่เยือกแข็งแบบช้า แต่มีข้อเสียที่สำคัญคือ เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จะถูกทำลายได้น้อยลงตามไปด้วย (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) โดยเฉพาะอาหารที่มีองค์ประกอบของไขมันเป็นจำนวนมาก (Sheridan, 1997) ซึ่งเห็นได้จากการศึกษานี้ ที่พบว่าจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium จะลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของไขมันจากน้ำกะทิลดลง และพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งมีผลทำให้จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าน้ำกะทิซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบหลักมีคุณสมบัติในการป้องกันเซลล์ของ *S. aureus* และ *S* Typhimurium จากการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้ หากความเข้มข้นของไขมันลดลงจะส่งผลให้การรอดชีวิตต่ำลงไปด้วย โดยพบว่าองค์ประกอบหลักของไขมันจากน้ำกะทิคือ กรดลอริค (Lauric Acid) ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 41-56 ของไขมันทั้งหมด (กระทรวงสาธรณสุข, 2524)

มีปัจจัยหลายประการที่ส่งเสริมให้ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium สามารถรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งได้เป็นเวลานาน ได้แก่ อายุของเซลล์ อุณหภูมิที่เก็บรักษา การละลายของอาหารแช่เยือกแข็ง รวมทั้งชนิดและองค์ประกอบของอาหารที่จะแช่แข็ง ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของไขมันจากน้ำกะทิที่สูงที่สุดคือ ร้อยละ 28 ทำให้แบคทีเรียทดสอบมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดและมีอัตราการบาดเจ็บน้อยที่สุด โดย Sheridan (1997) ได้อธิบายว่าการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Kentucky ในการแช่เยือกแข็งเนื้อสัตว์ต่างชนิดกัน พบว่าเนื้อสัตว์ที่มีปริมาณไขมันที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการรอดชีวิตและการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งของเชื้อต่างกันด้วย และยังอธิบายว่า ไขมันไม่ใช่สารที่ช่วยป้องกันการทำลายเซลล์โดยตรง เพราะไม่สามารถแทรกเข้าไปในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่างกับกลีเซอรอล ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของไขมันซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ไขมันจากอาหารเพียงทำหน้าที่ช่วยห่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ไว้ไม่ให้ผลึกน้ำแข็งทำความเสียหายหรือทำลายเซลล์ได้ ส่วน El-Kest and Marth (1991) อธิบายว่าโปรตีนที่อยู่ในอาหารก็มีส่วนช่วยในการป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ต่อกระบวนการแช่เยือกแข็งอาหารได้ ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลองของผู้วิจัย ที่ศึกษาการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในไขมันจากน้ำกะทิเพียงองค์ประกอบเดียว เมื่อระดับความเข้มข้นของไขมันลดลง จะทำให้ *S. aureus* เกิดการบาดเจ็บเพิ่มมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงมากกว่าการศึกษาในน้ำกะทิที่มีองค์ประกอบทั้งไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน การบาดเจ็บของ *S. aureus* ที่เกิดจากการแช่เยือกแข็งนี้เป็นผลมาจากแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีชั้นของเอาท์เทอร์เมมเบรน เมื่ออยู่ในไขมันจากน้ำกะทิเพียงองค์ประกอบเดียวจึงไม่สามารถห่อหุ้มหรือป้องกันเซลล์ได้ดีเท่ากับแบคทีเรียแกรมลบ จึงถูกผลึกน้ำแข็งทำลายโปรตีนที่อยู่ในชั้นของผนังเซลล์ (Wesche et al., 2009) และทำลายหรือรบกวนการทำงานของ Efflux Pump (arcAB Efflux Pump) ที่อยู่ในชั้นของผนังเซลล์ของ *S. aureus* (Ganjian et al., 2012) ส่งผลให้เกิดความไวต่อสารอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดเลือก เกลือน้ำดี สารต้านจุลชีพ หรือแม้กระทั่ง เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bernard, 2000)

สำหรับการศึกษาการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S.* Typhimurium ในไขมันจากน้ำกะทิเพียงองค์ประกอบเดียว พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไขมันลดลง การบาดเจ็บเพิ่มมากขึ้น และการรอดชีวิตจะลดลงมากกว่าเมื่ออยู่ในน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่านอกจากไขมันแล้วองค์ประกอบอื่นในน้ำกะทิ เช่น โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ยังมีส่วนช่วยในการป้องกันเซลล์ของแบคทีเรียจากการแช่เยือกแข็งอีกด้วย

3. ผลของอาหารเหลวที่ส่งเสริมการเจริญต่อการฟื้นคืนชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บและรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งน้ำกะทิ

ตามปกติในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในอาหารมักนิยมใช้อาหารเฉพาะที่ส่งเสริมการเจริญ เพื่อกำจัดแบคทีเรียหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น และถ้าเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์เชื้อจะเจริญได้อย่างรวดเร็ว (Wesche et al., 2009) แต่เนื่องจากกระบวนการแช่เยือกแข็งน้ำกะทิมีผลทำให้เซลล์ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เกิดการบาดเจ็บและเมื่อแช่เยือกแข็งเป็นเวลานานขึ้นจะทำให้เซลล์ตายในที่สุด เนื่องจากเซลล์ถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นขณะแช่เยือกแข็งจากน้ำที่อยู่ภายในและรอบ ๆ เซลล์ (Intra- and Extra- Ice Crystallization) (อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ, 2540) ทำให้เซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บจากการเยือกแข็งไวต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่ *S.* Typhimurium ไวต่อเกลือน้ำดี และสีประเภทไตรฟีนิลมีเทน ได้แก่ โซเดียม ดีออกซีคอลเลท และ สีมาลาไคท์ กรีน (Malachite Green) (Bernard, 2000) ดังนั้นในการตรวจหาแบคทีเรียทั้งสองชนิดในน้ำกะทิที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง จึงจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารดังกล่าวก่อนเพื่อให้เชื้อได้ฟื้นคืนสภาพแล้วจึงเลี้ยงด้วยอาหารเหลวเฉพาะที่ส่งเสริมการเจริญเพื่อให้สามารถตรวจนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตได้อย่างถูกต้อง (Kang & Fung, 2000) ดังเห็นได้จากผลการวิจัยนี้ ที่พบว่า *S. aureus* ที่อยู่ในน้ำกะทิที่แช่เยือกแข็งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB จะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า และใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนน้อยกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB+10%NaCl ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ (2540) ที่ศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในอาหาร TSB ที่มีผลต่อการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บของ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิแช่แข็ง ซึ่งพบว่าการใช้อาหาร TSB ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง จะมีผลต่อเซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บและปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ ทำให้การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อดังกล่าวผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงควรใช้ TSB ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 เพื่อฟื้นสภาพของเซลล์ที่บาดเจ็บให้มีความสมบูรณ์ก่อนถ่ายลงสู่อาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์หา *S. aureus* ในอาหารแช่เยือกแข็งที่ถูกต้อง

สำหรับ *S.* Typhimurium ให้ผลการวิจัยที่แตกต่างไปจาก *S. aureus* โดยพบว่า *S.* Typhimurium ที่อยู่ในน้ำกะทิที่แช่เยือกแข็งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BPW จะมีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำกว่า และใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนมากกว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร RVS แต่เมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จะพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วย BPW จะมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นได้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้าย RVS เมื่อครบ 12 ชั่วโมงและ *S.* Typhimurium จะลดลงได้ช้ากว่า เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ที่บาดเจ็บอาจฟื้นคืนสภาพไม่สมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร RVS และเชื้อ

เจริญจนอยู่ในช่วง Stationary Phase เนื่องจากอาหารเริ่มหมด เชื้อที่บาดเจ็บและฟื้นคืนชีวิตแล้วจะเกิดความกดดันได้ง่ายกว่าเชื้อที่สมบูรณ์อาจกลับมาบาดเจ็บได้อีก และเมื่อมีสารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยกในอาหารจึงทำให้เชื้อบางส่วนตายได้ (Yuste & Fung, 2003) ดังนั้นควรใช้ BPW ในการฟื้นคืนสภาพของเซลล์ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งก่อนแล้วจึงถ่ายลงในอาหารเหลวเฉพาะที่ส่งเสริมการเจริญอย่างเช่น RVS ซึ่งตามวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (ISO 6579) กำหนดให้เพาะเลี้ยง *Salmonella* spp. ในอาหาร BPW ก่อนโดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งเสริมการเจริญหรือฟื้นคืนสภาพของ *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บหรือเหลือรอดจากกระบวนการผลิตอาหาร แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร RVS และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียสอีก 18-24 ชั่วโมง เพื่อคัดแยกให้เหลือเฉพาะ *Salmonella* spp. และตระกูล Enterobacteriaceae ซึ่งการใช้ BPW ในการฟื้นคืนสภาพของ *Salmonella* spp. ยังส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นเจริญได้ดีขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นการใช้ RVS เข้ามาช่วยในขั้นตอนการฟื้นคืนสภาพหลังจากใช้ BPW จึงเป็นวิธีที่จะช่วยกำจัดหรือลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มอื่นออกไป ทำให้การตรวจหา *Salmonella* spp. ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

จากผลการศึกษาทั้งหมดช่วยยืนยันว่า การผลิตกะทิแช่เยือกแข็ง หากไม่สามารถกำจัด *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ให้หมดไปก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่เยือกแข็ง จะส่งผลให้แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เหลือรอดชีวิตอยู่ในน้ำกะทิแช่เยือกแข็งได้เป็นเวลานาน รวมทั้งเซลล์บางส่วนอยู่ในสภาพที่บาดเจ็บ ซึ่ง *S. aureus* เหลือรอดชีวิตได้มากกว่า *S.* Typhimurium โดยที่เซลล์เกิดการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งน้อยกว่าด้วย และการตรวจหาแบคทีเรียทั้งสองชนิดในน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง จำเป็นต้องฟื้นคืนสภาพด้วยอาหารเหลวที่ส่งเสริมการเจริญที่ไม่เติมสารอาหารเฉพาะได้แก่ TSB และ BPW ก่อน เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ

4. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ในน้ำกะทิระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง ได้ข้อสรุปดังนี้

1. การแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ไม่สามารถกำจัด *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ให้หมดไปจากน้ำกะทิหรือไขมันจากน้ำกะทิทุกระดับความเข้มข้น

2. *S. aureus* สามารถรอดชีวิตได้ในน้ำกะทิที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แม้ในน้ำกะทิที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่ *S.* Typhimurium จะรอดชีวิตลดลงและบาดเจ็บเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของน้ำกะทิลดลง และการรอดชีวิตของ *S.* Typhimurium จะลดลงเมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งให้นานขึ้น

3. ระดับความเข้มข้นของไขมันจากน้ำกะทิที่ลดลงมีผลทำให้ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium รอดชีวิตลดลงเมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งเป็นเวลานานขึ้น

4. การเพาะเลี้ยง *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บและรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งน้ำกะทิโดยใช้ TSB+10%NaCl และ RVS ตามลำดับ ซึ่งมีสารอาหารเฉพาะในการคัดแยก จะทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งบาดเจ็บเพิ่มมากขึ้นหรือตายในที่สุด ทำให้ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบได้น้อยกว่าความเป็นจริงและส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องเลี้ยงในอาหารเหลวที่ส่งเสริมการเจริญชนิดที่ไม่มีสารเฉพาะในการคัดแยก เพื่อช่วยฟื้นคืนสภาพของเซลล์ที่บาดเจ็บก่อนแล้วจึงเลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่ส่งเสริมการเจริญชนิดที่มีสารเฉพาะในการคัดแยก

5. ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ในน้ำกะทิระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งเพียงชนิดเดียว ไม่ได้ศึกษาในอาหารแช่เยือกแข็งชนิดอื่น ๆ ที่มีน้ำกะทิเป็นวัตถุดิบหลักด้วย ซึ่งอาหารเหล่านี้มีวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ เป็นส่วนประกอบด้วย ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียทั้งสองชนิดเกิดการบาดเจ็บและรอดชีวิตได้แตกต่างออกไปจากงานวิจัยครั้งนี้ จึงควรมีการศึกษาการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ในอาหารแช่เยือกแข็งชนิดอื่น ๆ ที่มีน้ำกะทิเป็นองค์ประกอบหลักเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบข้อมูลเพิ่มเติมที่จะใช้ในการประเมินและการจัดการความเสี่ยงของอาหารแช่เยือกแข็งที่มีน้ำกะทิเป็นวัตถุดิบหลักได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University