วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

การปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารทของผลิตภัณฑ์ชุมชนในจังหวัดกำแพงเพชร

Bacillus cereus Contamination in Thai Sweet Cereal Bar of Community Products in Kamphaeng Phet Province

นิภัชราพร สภาพพร* และปรัชญา ชะอุ่มผล
Nipatcharaporn Sapapporn* and Pratya Chaumphol

โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร 62000
Biology, faculty of Science and Technology, KamphaengPhet Rajabhat University, 62000
*Corresponding author, e-mail: nipatchkk@kpru.ac.th
(Received: Sep 6, 2022; Revised: Dec 2, 2022; Accepted: Dec 2, 2022)

บทคัดย่อ

กระยาสารทเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชนที่ประชาชนทั่วไปนิยมซื้อเป็นของฝากประจำจังหวัดกำแพงเพชร การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารท ด้วยวิธี Standard Plate Count ตามมาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) ระหว่างวันที่ 7 กันยายน ถึงวันที่ 10 พฤศจิกายน 2562 จำนวน 7 ยี่ห้อ สุ่มตรวจทั้งหมด 6 ครั้ง ตัวอย่างทั้งหมด 42 ตัวอย่าง พบว่า ผลิตภัณฑ์กระยาสารทปนเปื้อนเชื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.52% ของตัวอย่างทั้งหมด อยู่ในช่วง 5-10 โคโลนีต่อกรัม นำเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสุ่มเลือกเชื้อมา 1 รหัส คือ ไอโซเลท 4-1-3(2) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16s RNA เพื่อยืนยันชื่อพบว่า เป็นเชื้อในกลุ่มของ *B. cereus* จากการวิเคราะห์คุณภาพกระยาสารทถือว่ามีความเสี่ยงต่ำต่อการเกิดอาการท้องร่วงหรืออาเจียน อันเนื่องมาจากสารพิษที่สร้างจาก *B. cereus* ต่อผู้บริโภค และผ่านมาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 416) พ.ศ. 2563 กำหนดไว้ว่า อาหารพร้อมบริโภคที่มีปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (a_w) < 0.85 ที่มีธัญพืชหรือถั่วเป็นส่วนประกอบพบ *B. cereus* ได้ไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อกรัม

คำสำคัญ: *Bacillus cereus* กระยาสารท การปนเปื้อน ผลิตภัณฑ์ชุมชน

Abstract

Krayasart is a community product that the general public buys as a souvenir of Kamphaeng Phet Province. The purpose of this research aims to analyze Bacillus cereus (*B. cereus*) in Krayasart products by the Standard Plate Count method using the standard of the Bacteriological Analytical Manual (BAM) from 7 September to 10 November 2019. To determine the bacterial contamination, seven brands of Krayasart products were randomly examined six times in a total of 42 samples. The results showed that the average amount of bacteria contamination in the samples examined was 5 – 10 CFU/g (9.52%). All isolates were tested for biochemical properties. 4-1-3(2) isolates were randomly collected and investigated the 16s rRNA nucleotide sequence analysis to confirm the name in which it was found to be a subtype of *B. cereus*. From all results, Krayasart could be considered at low risk of diarrhea or vomiting caused by toxins generated from *B. cereus* to consumers and passed standards for pathogenic microorganisms in food. Notification of the Ministry of Public Health (No. 416) B.E. 2563 stipulates that ready-to-eat foods with free water content (a_w) < 0.85 containing cereals or beans in which the level of *B. cereus* contamination shall not be more than 1,000 CFU/g.

Keywords: *Bacillus cereus*, Thai Sweet Cereal Bars, Contamination, Community products

บทนำ

กระยา หมายถึง เครื่อง สิ่งของ เครื่องกิน สารท หมายถึง เทศกาลทำบุญในวันสิ้นเดือนสิบ โดยนำธัญพืชเก็บเกี่ยวมาปรุงเป็นข้าวทิพย์ และข้าวมธุปายาส ถวายพระสงฆ์ จังหวัดกำแพงเพชรมีการกวนกระยาสารทกันโดยทั่วไป ในอดีตกวนกันเกือบทุกบ้าน ไม่มีจำหน่าย แต่จะแจกกันเมื่อกวนเสร็จแล้ว มีกล้วยไข่เป็นเครื่องเคียง กระยาสารทเป็นขนมไทยที่ได้รับความนิยมมาก เป็นภูมิปัญญาไทยในการถนอมอาหารในฤดูที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์ จึงเก็บอาหารที่เหลือไว้รับประทานในฤดูขาดแคลน ปัจจุบันกระยาสารทเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชนที่ประชาชนนิยมซื้อเป็นของฝาก หาซื้อได้ง่ายมีหลายยี่ห้อ ซึ่งจะมีรูปลักษณ์และความอร่อยแตกต่างกัน (Kukkong *et al*., 2018)

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สร้างสปอร์ได้ อาศัยอยู่ในดินก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดการอาเจียนหรือการได้รับสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร (Intoxication) ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและปวดท้อง (Dietrich *et al*., 2021) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญด้านความปลอดภัยของอาหาร สามารถปนเปื้อนอาหารได้หลากหลายทั่วโลก พบ *B. cereus* ในอาหารกลุ่มธัญพืชและถั่ว เท่ากับ 41.489 เปอร์เซ็นต์ และ 44.901 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบในผัก (37.279 เปอร์เซ็นต์) และผลิตภัณฑ์จากนม (36.385 เปอร์เซ็นต์) (Rahnama *et al.,* 2023) Berthold-Pluta *et al*. (2019) รายงานการพบ *B. cereus* ในอาหาร ได้แก่ สมุนไพร เครื่องเทศ ธัญพืชที่ใช้รับประทานในมื้อเช้า พาสต้า นมผงสำหรับเด็ก นมพลาสเจอร์ไรซ์ ชีส ซึ่งขายในตลาดประเทศโปแลนด์ร้อยละ 38.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.3 – 3.8 log CFU/g หรือ ml Sapapporn & Noiphan (2016) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในน้ำพริกแต่ละชนิดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364, 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานไว้ว่า ให้พบเชื้อ *B. cereus* ในแกงและน้ำพริกต่าง ๆ ได้ แต่ต้องน้อยกว่า 1,000 CFU/g ทำการเก็บตัวอย่างจากร้านขายน้ำพริกทั้งหมด 5 ร้าน พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในน้ำพริกทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยชนิดที่พบการปนเปื้อนในระดับที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน คือ น้ำพริกปลาย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของเชื้อ *B. cereus* เท่ากับ 4,290 CFU/g และน้ำพริกที่มีการปนเปื้อน *B. cereus* น้อยที่สุด คือน้ำพริกปลาทู โดยมีค่าเฉลี่ยของเชื้อ *B. cereus* เท่ากับ 150 CFU/g และร้านจำหน่ายน้ำพริกที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุขคือร้านที่ 2 สามารถตรวจพบปริมาณเชื้อ *B. cereus* เฉลี่ยน้อยกว่า 1,000 CFU/g

จากงานวิจัยดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญของการวิเคราะห์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารทซึ่งเป็นของฝากขึ้นชื่อประจำจังหวัดกำแพงเพชร โดยตรวจตามเกณฑ์ของประกาศกระทรวงสาธารณสุขล่าสุด (ฉบับที่ 416) พ.ศ. 2563 อาหารพร้อมบริโภคที่มีปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (a_w) < 0.85 ที่มีธัญพืชหรือถั่วเป็นส่วนประกอบ พบ *B. cereus* ได้ไม่เกิน 1,000 CFU/g เพื่อวิเคราะห์ความชุกของเชื้อ *B. cereus* ในกระยาสารท

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทราบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในกระยาสารท

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกระยาสารทจากร้านค้า 7 ยี่ห้อ นำมาวิเคราะห์การปนเปื้อน *B. cereus* ภายในห้องปฏิบัติการ ทำการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าจำนวน 6 ครั้ง แบ่งเป็นเดือนละ 2 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2562 ถึง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562

การวิเคราะห์ *B. cereus*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Polymyxin B agar (MYP agar) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหม้อนึ่งความดันไอ รอให้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติม Egg Yolk Emulsion ลงไป

เตรียม Egg Yolk Emulsion 50 เปอร์เซ็นต์ โดยนำไข่ไก่แช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตอกไข่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ ใช้หลอดเข็มฉีดยาพลาสติกดูดเอาเฉพาะไข่แดงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยวิธีการปลอดเชื้อ เติม Egg Yolk Emulsion 50 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP Agar โดยวิธีการปลอดเชื้อปริมาตรขวดละ 10 มิลลิลิตร และเติม Polymyxin B sulphate ความเข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่ผ่าน

การฆ่าเชื้อแล้ว รอจนอาหารเย็นคว่ำจานอาหารลง ทิ้งไว้ค้างคืนก่อนนำมาใช้งาน เพื่อรอให้ผิวหน้าของอาหารแห้งและยังเป็นการตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อว่ามีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นด้วยหรือไม่

การวิเคราะห์ *B. cereus* ดำเนินการตามวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ใน BAM online (Tallent *et al*., 2020) เจือจางตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ *B. cereus* ประกอบด้วย 1 ค่าการเจือจาง ได้แก่ 10^{-1} โดยทำการชั่งตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดเชื้อปริมาณ 50 กรัม เติมลงใน Butterfield 's Phosphate Buffered Dilution Water (BPB) ปริมาณ 450 มิลลิลิตร จากนั้น เขย่าให้เข้ากันจะได้ค่าการเจือจางเป็น 10^{-1}

ทำการถ่ายเชื้อโดยปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 3 เพลท โดยเพลทที่ 1 ใช้ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เพลทที่ 2 ใช้ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเพลทที่ 3 ใช้ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จากนั้น Spread plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยนำไปจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปเผาไฟและทิ้งไว้ให้เย็นเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่ถูกล้อมรอบด้วยโซนสีขาว บ่งชี้ว่ามีการผลิตเอนไซม์ Lecithinase โคโลนีของ *B. cereus* ที่ได้มักจะเป็นสีชมพูหรือสีขาวอมชมพู (ในกรณีที่โคโลนียังปรากฏไม่ชัดเจนให้บ่มเชื้อเพิ่มอีก 24 ชั่วโมงก่อนทำการนับโคโลนี) ทำการนับจำนวนโคโลนีปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar และจดบันทึกไว้เพื่อคำนวณค่า CFU ต่อไป จากนั้นถ่ายเชื้อที่เป็นโคโลนีสีชมพูหรือสีขาวอมชมพูเดี่ยว ๆ ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) (หากไม่พบโคโลนีเดี่ยวจะต้องนำไป Cross streak ลงบน MYP เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ก่อน) บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเก็บรักษาเชื้อ *B. cereus* ทำการย้อมสีแกรม และทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้

การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) ทำการเตรียมอาหาร Motility test medium นำส่วนผสมปริมาณ 22 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตส่วนผสมที่ได้ใส่หลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดอาหารด้วยสำลีทุกหลอด นำอาหารไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทดสอบความสามารถของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อจาก NA แทงตรง ๆ ลงไปในอาหาร Motility medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้จะเจริญออกรอบ ๆ แนวที่เพาะเชื้อทุกทิศทาง พวกที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะเจริญเฉพาะบริเวณแนวที่แทงลงไปเท่านั้น โดย *B. cereus* จะเคลื่อนที่ออกจากรอยแทง

การทดสอบเชื้อ Voges-proskauer (VP) ทำการเตรียมอาหาร MR-VP broth นำส่วนผสมปริมาณ 17 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว จากนั้นปิเปตส่วนผสมที่ได้ใส่หลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดอาหารด้วยสำลีทุกหลอด นำอาหารไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทำการถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้จาก NA ลงในหลอดอาหาร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อเติม 5% α naththol solution ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันหากเกิดสีแดงภายใน 5 นาที แสดงว่าให้ผลบวก หากเกิดสีเหลืองแสดงว่าให้ผลลบ โดย *B. cereus* จะให้ผลบวก

การระบุชื่อจุลินทรีย์โดยใช้ 16s RNA gene

ทำการสุ่มเลือก *B. cereus* ที่คัดแยกได้ถ่ายลงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Eppendorf ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป เขย่าด้วย Vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำส่งให้กับบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อระบุชื่อเชื้อโดยวิธีทางโมเลกุล ซึ่งมียีนเป้าหมายเป็น 16s rRNA gene โดยใช้ Universal eubacterial primer จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA gel extraction kit นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ sequencing และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ BLAST บนฐานข้อมูลของ NCBI ทำให้ทราบชื่อสายพันธุ์

ผลการวิจัย

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์กระยาสารท เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *B. cereus* โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในอำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร ทั้งหมด 5 ร้าน ได้ตัวอย่างทั้งหมด 7 ยี่ห้อ แบ่งระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 เดือน รวมตัวอย่างทั้งหมด 42 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ร้านค้าและยี่ห้อของกระยาสารทที่ใช้ในการวิเคราะห์ *Bacillus cereus*

ร้านค้า	ยี่ห้อ
1. ร้านเมี่ยงชากังราว	กระยาสารทวิไลวรรณ กระยาสารทป้าใหญ่ชากังราว กระยาสารทแม่ทองพิณ
2. ตลาดมอกล้วยไข่	กระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง
3. ร้านค้าในสถานีขนส่งผู้โดยสารจังหวัดกำแพงเพชร	กระยาสารทบุญเชิญ
4. ร้านกระยาสารทแม่น้ำวน	กระยาสารทแม่น้ำวน
5. ร้านเมี่ยงแม่คำอุ่น	กระยาสารททรายเงิน

ทำการวิเคราะห์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารททั้งหมด 42 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 6 ครั้ง ๆ ละ 7 ตัวอย่าง เพื่อนำผลการวิเคราะห์มาเทียบตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 416) พ.ศ. 2563 พบ *B. cereus* ได้ไม่เกิน 1,000 CFU/g แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การปนเปื้อน *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารท

ยี่ห้อ	วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง	Total plate count of *B. cereus* (CFU/g)	เกณฑ์คุณภาพ
กระยาสารท วิไลวรรณ	13/09/62	-	ผ่าน
	30/09/62	-	ผ่าน
	10/10/62	-	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน
กระยาสารทป้าใหญ่ ชากังราว	13/09/62	-	ผ่าน
	30/09/62	-	ผ่าน
	10/10/62	-	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน
กระยาสารทแม่ทองพิณ	13/09/62	-	ผ่าน
	30/09/62	-	ผ่าน
	10/10/62	-	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน
กระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง	13/09/62	5	ผ่าน
	30/09/62	5	ผ่าน
	10/10/62	5	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ยี่ห้อ	วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง	Total plate count of *B. cereus* (CFU/g)	เกณฑ์คุณภาพ
กระยาสารทบุญเชิญ	13/09/62	10	ผ่าน
	30/09/62	-	ผ่าน
	10/10/62	-	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน
กระยาสารทแม่น้ำวน	13/09/62	-	ผ่าน
	30/09/62	-	ผ่าน
	10/10/62	-	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน
กระยาสารททรายเงิน	13/09/62	-	ผ่าน
	30/09/62	-	ผ่าน
	10/10/62	-	ผ่าน
	22/10/62	-	ผ่าน
	02/11/62	-	ผ่าน
	11/11/62	-	ผ่าน

จากการวิเคราะห์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารทด้วยวิธี Standard Plate Count ตามมาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) ทั้งหมด 6 ครั้ง 7 ยี่ห้อ ตัวอย่างทั้งหมด 42 ตัวอย่างพบว่า ทุกตัวอย่างผ่านเกณฑ์คุณภาพตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่ได้กำหนดไว้ ตัวอย่างยี่ห้อกระยาสารทวิไลวรรณ กระยาสารทป้าใหญ่ ชากังราว กระยาสารทแม่ทองพิณ กระยาสารทแม่น้ำวน และกระยาสารททรายเงิน ไม่พบการปนเปื้อน *B. cereus*

ในการวิเคราะห์ทั้ง 6 ครั้ง กระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง พบการปนเปื้อน *B. cereus* ในครั้งที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 5 5 และ 5 CFU/g ตามลำดับ และกระยาสารทบุญเชิญ พบการปนเปื้อน *B. cereus* ในครั้งที่ 1 เท่ากับ 10 CFU/g

เมื่อทำการนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะสีชมพูหรือสีขาวอมชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar และจดบันทึกไว้เพื่อคำนวณค่า CFU แล้ว จากนั้นถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ลงบนอาหาร NA slant กำหนดรหัสตัวอย่างเพื่อนำไปยืนยันเชื้อทางชีวเคมี โดยผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus cereus*

ครั้งที่	ยี่ห้อ	รหัสตัวอย่าง	Gram staining	Motility test	VP test
1	กระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง	4-2-3(1)	+	+	+
2	กระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง	4-1-3(2)	+	+	+
3	กระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง	4-1-2(3)	+	+	+
1	กระยาสารทบุญเชิญ	5-1-2(1)	+	+	+

หมายเหตุ : + คือ ผลการทดสอบให้ผลบวก - คือ ผลการทดสอบให้ผลลบ

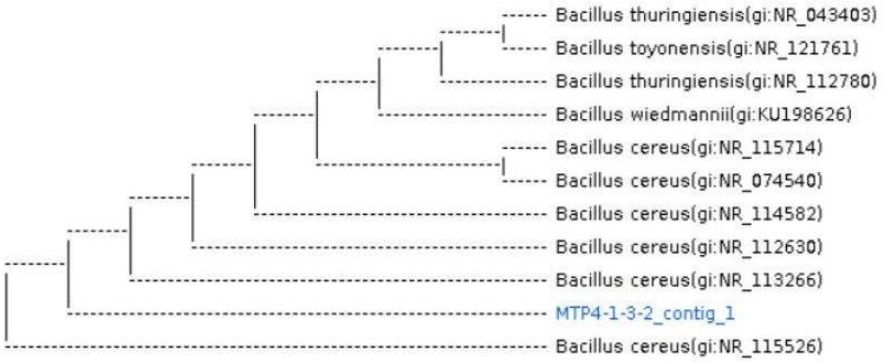
จากการนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบยืนยันเชื้อทางชีวเคมี รหัสตัวอย่าง 4-2-3(1), 4-1-3(2) และ 4-1-2(3) ที่คัดแยกได้จากยี่ห้อกระยาสารทกลุ่มแม่บ้านปากดง ในครั้งที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ และรหัสตัวอย่าง 5-1-2(1) ที่คัดแยกได้จากยี่ห้อกระยาสารทบุญเชิญ ในครั้งที่ 1 มาทำการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ย้อมติดสี

น้ำเงินของคริสตัลไวโอเลต เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของเปปติโดไกลแคนที่หนา ซึ่งสามารถจับกับสารประกอบเชิงซ้อน Crystal violet-iodine complex ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างคริสตัลไวโอเลตและไอโอดีนได้ดี จึงไม่ถูกล้างออกไปในขั้นตอนล้างสี มีรูปร่างเป็นท่อน มีการสร้างสปอร์ อยู่ตรงกลางเซลล์ หรือค่อนไปทางใดทางหนึ่งของเซลล์ และมีการเรียงตัวต่อกันตั้งแต่ 2 ท่อนขึ้นไป หรืออาจมีการเรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของ *B. cereus*

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเคลื่อนที่ในอาหารทดสอบพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นให้ผลบวกคือ มีการเจริญเติบโตบริเวณรอบ ๆ รอยแทงเชื้อในอาหารทดสอบ เนื่องจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้โดย *B. cereus* มีแฟกเจลลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ส่วนการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง Acetyl-methyl carbinol (Acetoin) จากกลูโคสพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นให้ผลบวก ถูก Oxidise โดย KOH และอากาศ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Acetyl-methyl carbinol (Acetoin) ได้โดยอาหารทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

จากตารางที่ 3 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดเมื่อนำมาทดสอบการย้อมสีแกรม การทดสอบ Motility test และ VP test พบว่าให้ผลเป็นบวกทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *B. cereus* ที่ระบุไว้ใน BAM online เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก มีการผลิตเอนไซม์ Lecithinase และมีการสร้าง Acetyl-methyl carbinol (Acetoin) และ *B. cereus* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้

เมื่อทดสอบทางชีวเคมีแล้วทำการสุ่มเลือกเชื้อมา 1 รหัส คือ ไอโซเลท 4-1-3(2) นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16s RNA เพื่อยืนยันชื่อ ผลที่ได้ดังแสดงในภาพ 1



ภาพ 1 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไอโซเลท 4-1-3(2)

จากภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16s RNA ไอโซเลท 4-1-3(2) คัดแยกได้จากร้านที่ 4 ในครั้งที่ 2 พบเชื้อที่คัดแยกได้นั้นคือ *B. wiedmannii* sp. nov. มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง เท่ากับ 99% ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ความยาวเฉลี่ย 2.8 ไมโครเมตร และความกว้างเฉลี่ย 1.2 ไมโครเมตร เอนโดสปอร์รูปวงรีอยู่ตรงกลางเซลล์ โคโลนีให้ผลบวกในการทดสอบ Egg yolk lecithinase มีความสามารถในการย่อยเคซีนและแป้ง โคโลนีเจริญบนอาหาร BHI Agar มีลักษณะกลมและแบน สีครีม และผิวหน้าขรุขระ เจริญที่อุณหภูมิ 5-43 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20-40 องศาเซลเซียส ได้เสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่แทนสายพันธุ์ FSL W8-0169 คัดแยกได้ในปี 2012 จากน้ำนมดิบ ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *B. cereus* จากการวิเคราะห์ Single nucleotide identity ของจีโนมหลัก โดย *B. wiedmannii* sp. nov. มีความสามารถที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม *B. cereus* คือ ไร้ความสามารถในการผลิตกรดจากการหมักน้ำตาลซูโครส และไร้ความสามารถในการย่อยอาร์จินีน *B. wiedmannii* sp. nov. สามารถสร้างความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ ในกลุ่ม *B. cereus* จากการเปรียบเทียบลำดับยีน *panC* (Rachel *et al*., 2016) ถือว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16s RNA ของไอโซเลท 4-1-3(2) เป็น *B. cereus*

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบ *B. cereus* ในกระยาสารททั้งหมด 7 ยี่ห้อ ในปริมาณน้อย เนื่องจาก *B. cereus* สามารถเจริญได้ที่ค่า a_w มากกว่า 0.93 (Rodrigo *et al*., 2021) เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อน (กวน) เป็นผลิตภัณฑ์กระยาสารทยิ่งทำให้ค่า a_w ลดลง ทำให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญของ *B. cereus* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cynthia *et al*. (1998) ทำการวิเคราะห์การรอดชีวิตของ *B. cereus* ในซีเรียลข้าวจากห้างสรรพสินค้าท้องถิ่น โดยมีการนำไปอบแห้งเพื่อกำหนดค่า a_w = 0.27-0.28, 0.52-0.55 และ 0.75-0.78 ของซีเรียลข้าวที่ใช้ในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีการควบคุม pH และอุณหภูมิ พบว่าสปอร์ของ *B. cereus* สัปดาห์ที่ 16 และ 24 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ a_w = 0.78 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Xu, J. et al. (2021) ศึกษาอิทธิพลของ pH และ aw ต่อการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* โดยใช้ผลของความดัน-ความร้อนร่วมกันที่ 600 MPa และ 70 °C พบว่า a_w เป็นปัจจัยสำคัญยิ่งที่ส่งผลต่อความต้านทานของสปอร์ *B. cereus* ในระหว่างการกดทับด้วยแรงดัน ด้วย aw ที่ลดลง จะทำลายสปอร์ *B. cereus* ในระหว่างการกดค้างไว้ด้วยแรงดันลดลง

แต่อย่างไรก็ตามพบเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารท 2 ยี่ห้อ เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น ถั่วลิสง งาขาว และข้าวตอก เป็นพืชพันธุ์ที่ปลูกในดิน หรือมีการนำมาวางตากกับพื้นดิน ทำให้สามารถเกิดการปนเปื้อนได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jovanovic *et al*. (2022) คัดแยก *B. cereus* ที่มียีนเอนเทอโรทอกซินและซีรีไลด์ทอกซิน จากผลิตภัณฑ์อาหารจำนวน 250 ชนิด พบ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์จากธัญพืช รวมทั้งข้าวและเมล็ดพืช เมล็ดถั่ว ผลิตภัณฑ์จากนม ผักแห้ง ผสมอาหาร สมุนไพร และเครื่องเทศ นอกจากนี้ยังพบว่า *B. cereus* สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิประมาณ 4-8 องศาเซลเซียส หรืออาจปนเปื้อนมาจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไม่สะอาด Simmonds *et al*. (2003) กล่าวว่าเอนโดสปอร์ของ *B. cereus* ทนต่อความร้อน มีความเป็น hydrophobic และสามารถยึดติดกับโลหะแสตนเลสของกระบวนการผลิตได้ จึงไม่สามารถกำจัดเชื้อ *B. cereus* ได้หมด จึงพบ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารท แม้ว่าในกระบวนการผลิตจะผ่านความร้อน แต่ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารทให้หมดไปได้

นอกจากนี้ขั้นตอนการผลิตกระยาสารทที่เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน ขั้นตอนหลังการผลิต โดยเฉพาะหลังกวนกระยาสารทเสร็จแล้ว ผู้ผลิตมีการวางขายในภาชนะแบบเปิด คือ วางขายในกะละมังโดยมีการเปิดและปิดพลาสติกใสครอบที่ใช้ในการปิดป้องกันอยู่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อน *B. cereus* ในอากาศได้ จึงมีโอกาสพบเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น Frankland & Frankland (1887) คัดแยกเชื้อ *B. cereus* ได้ครั้งแรกจากอากาศ สุดท้ายผลจากการสุ่มเลือกเชื้อมา 1 รหัส เพื่อระบุชื่อโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16s RNA พบว่า เป็น *B. wiedmannii* จากผลการทดลองดังกล่าวได้เป็นเชื้อในกลุ่ม *B. cereus* และเพิ่งถูกตั้งชื่อใหม่เมื่อปี 2016 โดย Rachel *et al*. (2016) ดังนั้นการศึกษาการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในงานวิจัยนี้ถือว่าประสบผลสำเร็จ เนื่องจากสามารถคัดแยกเชื้อ *B. cereus* จากกระยาสารทและยืนยันผลการระบุชื่อด้วยวิธี 16s RNA ร่วมกับวิธีการทางชีวเคมีได้

สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบคุณภาพกระยาสารท โดยวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ด้วยวิธี Standard plate count ตามวิธีมาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) online : Chapter 14 จำนวน 7 ยี่ห้อ แบบสุ่มทั้งหมด 6 ครั้ง รวมทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.52 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด มีค่าปริมาณอยู่ในช่วง 5-10 โคโลนีต่อกรัม และทำการยืนยันเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธี 16s rRNA พบว่า เป็น *B. cereus* จากผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์กระยาสารทผ่านมาตรฐานจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 416) พ.ศ. 2563 ถือได้ว่ากระยาสารทจากร้านค้าในจังหวัดกำแพงเพชรนั้นมีปลอดภัยจาก *B. cereus* ต่อผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์กระยาสารท ควรนำผลิตภัณฑ์ไปตรวจหาค่าวอเตอร แอกทิวิตี (a_w) ร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยให้การบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์กระยาสารทที่ปราศจาก *B. cereus* มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Berthold-Pluta, A., Pluta, A., Garbowska, M. & Stefańska, I. (2019). Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods, 8*(7), 1-12.

Cynthia, B. J. & Larry, R. B., (1998). Survival and growth of Psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *Journal of Food Protection*, *61*(12), 1629-1635.

Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., & Granum, P.E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins, 13,* 98.

Frankland, G. C. & Frankland, P. F. (1887). Studies in some new micro-organisms obtained from air. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., 178*, 257–287.

Rahnama, H., Azari R., Yousefi, M.H., Berizi, E., Mazloomi, S. M., Hosseinzadeh, S., Derakhahan, Z., Ferrante, M., & Conti, G. O. (2022). A systematic review and meta-analysis of the prevalence of *Bacillus cereus* in foods. *Food control, 143*, 109250

Rodrigo, D., Rosell, C. M., & Martinez, A. (2021). Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods, 10*(2), 1-11.

Xu, J., Janahar, J. J., Park, H. W., Balasubramaniam, V. M., & Yousef, A. E. (2021). Influence of water activity and acidity on *Bacillus cereus* spore inactivation during combined high pressure-thermal treatment. *LWT - food science and technology, 146*, 111465.

Jovanovic, J., Tretiak, S., Begyn, K., & Rajkovic, A. (2022). Detection of enterotoxigenic psychrotrophic presumptive *Bacillus cereus* and cereulide producers in food products and ingredients. *Toxins, 14,* 289.

Kukkong, P., Plansae, S., Thimthai, T., Thammakhanthaun, P. & Phumnoi, N. (2018). *The Methods to improve marketing of Mea Sanong's Thai sweet cereal bar product in Lan Dok Mai Sub-District, Kosamphi Nakhon District, Kamphaeng Phet.* The 5th National conference KPRU, December 21, 2018. Kamphaeng Phet Rajabhat University. (in Thai).

Sapapporn, N. & Noiphan, P. (2016). *Prevalence of Bacillus cereus in chili paste, Amphur muang, Kamphaeng Phet.* The 12nd Naresuan research conference, July 21-22, 2016. Phitsanulok: Naresuan University. (in Thai).

Rachel, M. A., Sarah, B. M., David K. J., Laura C. M., Nicole M. H., Kathryn, B. J. & Jasna, K. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66*(11), 4744–4753.

Simmonds, P., Mossel, B. L., Intaraphan, T. & Deeth, H. C., (2003). Heat resistance of Bacillus spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of Food Protection, 66* (11), 2070–2075.

Tallent, S. M., Knolhoff, A., Rhodehamel, E. J., Harmon, S. M., & Bennett R. W. (2020). Chapter 14: *Bacillus cereus*. In: Bacteriological analytical manual (BAM). [Online]. Retrieved Nov 12, 2022, from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory - methods - food/bam - bacil- lus - cereus.