การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ อี.โคไลและซาลโมเนลลาในใบกะเพรา

Ultraviolet-C Treatments for Holy Basil Decontamination of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.

จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล[1] และ ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์[2]

Poubol, J.[1] and Jitareerat, P.[2]

Abstract

This work was to evaluate the effect of ultraviolet-C (UV-C) radiation on holy basil leaves decontaminated with *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.. Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. were evaluated *in vitro* after exposition to different UV-C radiation doses (0, 0.6, 1.2, 1.8, and 3.6 kJ/m^2). In the *in vivo* assays, holy basil leaves were inoculated with the cocktail cell suspension of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Then submitted to UV-C radiation at 3.6 kJ/m^2. The treated leaves were stored at 13°C for 4 days and evaluated for microbial growths. The results showed that all UV-C doses was able to inhibit *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. growth *in vitro*, particularly the dose of 3.6 kJ/m^2 showed the best inhibition. However, the UV-C radiation 3.6 kJ/m^2 did not inhibit the growth of both pathogens on the holy basil leaves.

Keywords: ultraviolet-C, holy basil, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการฉายแสงยูวีซีต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ในใบกะเพรา โดยวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonell*a sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) ที่ฉายแสงยูวิซีที่ปริมาณแสง 0 (ไม่ฉาย) , 0.6, 1.2, 1.8 และ 3.6 kJ/m^2 สำหรับการวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในใบกะเพรา (*in vivo*) ทำโดยปลูกเซลล์แขวนลอยผสมของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ลงบนใบกะเพราแล้วนำไปฉายแสงยูวีซีที่ปริมาณแสง 3.6 kJ/m^2 จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากการทดลองพบว่าการฉายแสงยูวีทุกระดับปริมาณแสงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการฉายแสงยูวีซีที่ปริมาณแสง 3.6 kJ/m^2 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามการฉายแสงยูวีซีที่ปริมาณแสง 3.6 kJ/m^2 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรย์ทั้งสองชนิดบนใบกะเพรา

คำสำคัญ: ยูวีซี กะเพรา อี.โคไล ซาลโมเนลลา

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกพืชผักสด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง ต้นหอม ผักชี คื่นไช่ ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบโหระพา ใบสะระแหน่และใบกะเพราไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ในช่วงปี พ.ศ. 2548 มีการส่งออกพืชผักสดไปจำหน่ายยังประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปประมาณ 1.2 หมื่นตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 323 ล้านบาท แต่ในช่วงปีดังกล่าวประเทศไทยประสบปัญหาการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในพืชผักเมื่อส่งไปถึงประเทศปลายทาง ทำให้ส่งผลกระทบต่อการส่งออกพืชผักสดรวมถึงสินค้าเกษตรอื่นๆ จากปัญหาดังกล่าวประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปได้แจ้งเวียนข้อมูลการตรวจพบสินค้าอาหารที่ไม่ได้มาตรฐานให้ประเทศสมาชิกทราบเพื่อเป็นมาตรฐานในการห้ามนำเข้า กักกัน ยึดไว้ ส่งคืนหรือทำลายเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค การตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในผักและเครื่องปรุงรสประเภทสมุนไพรทำให้ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป โดยเฉพาะประเทศนอรเวย์สั่งห้ามนำเข้าสินค้าพืชผักสดและสมุนไพรจากประเทศไทยเป็นการชั่วคราว (กรมวิชาการเกษตร, 2549) จากปัญหาที่เกิดขึ้นกรมการค้าต่างประเทศ (2550) ได้ออกประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 55 ง. เรื่องกำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ที่ต้องมีหนังสือรับรองการส่งออก โดยประกาศให้ผักสดจำนวน 23 ชนิด

[1]**สาขาวิชาจุลชีววิทยา สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม** 73140

[1]Division of Microbiology, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2]**สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ** 10140

[2]Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, 10140

รวมถึงใบกะเพราที่ส่งออกไปยังสาธารณรัฐไอซ์แลนด์ ราชอาณาจักรนอร์เวย์และสหภาพยุโรป เป็นสินค้าที่ต้องมีหนังสือรับรองการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* spp.

ยูวีซี (UV-C) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 200-280 นาโนเมตร (Gomez-Lopez และคณะ, 2007) มีคุณสมบัติเป็น germicidal จึงสามารถใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกรวมถึงสปอร์ของเชื้อรา (Rowan และคณะ, 1999; Anderson และคณะ, 2000) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเชื้อสาเหตุโรคระบบทางเดินอาหาร เช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis และ *Pseudomonas aureginosa* เป็นต้น (Rowan และคณะ, 1999) มีรายงานว่าการฉายแสง UV-C สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตผลสด (Erkan และคณะ, 2001; Allende และ Artes, 2003; Allende และคณะ, 2006; Fonseca และ Rushing, 2006; Cia และคณะ, 2007) แต่อย่างไรก็ตามการฉายแสง UV-C ก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติ เช่น การเกิดสีน้ำตาลบนผลิตผล (Erkan และคณะ, 2001; Hoornstra และคณะ, 2002; Allende และคณะ, 2006) การฉายแสง UV-C เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ลงทุนไม่สูงและเป็นวิธีที่ไม่ใช้สารเคมี แต่การฉายแสง UV-C จะสามารถใช้ได้ผลดีโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพของใบกะเพรานั้นจะต้องมีการศึกษาถึงระดับปริมาณแสง UV-C ที่เหมาะสมในการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้ศึกษาถึงผลของการฉายแสง UV-C ต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) และบนใบกะเพรา (*in vivo*) ที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* spp.

อุปกรณ์และวิธีการ

งานวิจัยนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella choleraesuis* โดยเจือจางเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ที่ subculture ในอาหาร Nutrient Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 24$\pm$3 ชั่วโมง ด้วย 0.1% peptone water จนได้ cell suspension ที่มีค่า optical density (OD_{600}) เท่ากับ 0.4 สำหรับการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) ทำโดยดูด cell suspension ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร EMB agar สำหรับเลี้ยง *E. coli* และอาหาร XLD agar สำหรับเลี้ยง *S. choleraesuis* จากนั้นนำไปฉายแสง UV-C ที่ปริมาณแสง 0 kJ/m^2 (ไม่ฉายแสง UV-C), 0.6, 1.2, 1.8 และ 3.6 kJ/m^2 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 24$\pm$3 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนโคโลนีที่พบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการทดลองในใบกะเพราะ (*in vivo*) ทำโดยเตรียม cocktail suspension ของเชื้อผสม *E. coli* และ *S. choleraesuis* (อัตราส่วน 1:1) แล้วดูดมา 0.1 มิลลิลิตร ปลูกลงบนใบกะเพรา ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 11×15×6.5 เซนติเมตร กล่องละ 25 กรัม ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ Biohazard laminar flow แล้วนำไปฉายแสง UV-C โดยเลือกใช้ปริมาณแสงที่สามารถลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดจากการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิดฝากล่องแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 2 วัน จนสิ้นสุดอายุการวางจำหน่าย โดยตรวจนับจำนวน *E. coli Salmonella* spp. แบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และรา และตรวจคุณภาพของใบกะเพรา ได้แก่ สี กลิ่น ความสด และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภค การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยตีผสมตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลาย 0.1% peptone water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง stomacher (Masticator Nr2557/400, IUL instruments; Barcelona, Spain) จากนั้นทำ dilution plate count สำหรับเพาะเลี้ยง *E. coli Salmonella* spp. แบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และรา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar, XLD agar, Plate Count Agar (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India) และ Potato Dextrose Agar (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India) ตามลำดับ นับจำนวนโคโลนีแล้วรายงานผลเป็นค่า $\log_{10}$CFU/ml สำหรับการเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น ความสด และคุณภาพโดยรวมของผู้บริโภค ทำโดยใช้ผู้บริโภคที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน ให้คะแนนโดยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ 5 = excellent หรือ fresh appearance, 4 = very good, 3 = good, 2 = fair และ 1 = poor จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติแบบ Duncan's multiple range test

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฉายแสง UV-C มีปริมาณ *E. coli* และ *Salmonella* ต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ฉายแสง UV-C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) โดยการฉายแสง UV-C ที่ปริมาณ 3.6 kJ/m^2 สามารถลดการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella* ได้ดีที่สุด คือ สามารถลดได้มากกว่า 6 $\log_{10}$CFU/ml ทั้งนี้เนื่องจากการฉายแสง UV-C สามารถชักนำให้เกิด pyrimidine dimers ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง DNA helix ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Lado และ Yousef, 2002) ดังนั้นจึงเลือก UV-C ที่ปริมาณแสง 3.6 kJ/m^2 ไปใช้ในการทดลองกับใบกะเพรา จากการทดลองพบว่าใบกะเพราที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายแสง UV-C มีปริมาณจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันทางสถิติตลอดอายุการเก็บรักษา โดยมีปริมาณ *E. coli*,

Salmonella spp., แบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และรา อยู่ในช่วง 5.9-6.0, 5.8-6.0, 6.3-6.6 และ 4.5-4.8 $\log_{10}$CFU/ml ตามลำดับ (ไม่แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนใบกะเพราแทรกตัวอยู่ตามบริเวณรอยหยัก ขนใบ หรือร่องกลางใบจึงทำให้แสง UV-C กระจายได้ไม่ทั่วพื้นที่ผิวใบ หรืออาจเนื่องมาจากแสง UV-C ที่ปริมาณ 3.6 kJ/m^2 เป็นปริมาณแสงที่ไม่สูงพอในการลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในใบกะเพรา ดังที่มีรายงานการฉายแสง UV-C ที่ปริมาณสูงกว่า คือ 4.07 และ 8.14 kJ/m^2 สามารถลดการเจริญของ Psychrotrophic Coliform bacteria และยีสต์ในผักสลัด (Allende และ Artes, 2003) และการฉายแสง UV-C ที่ปริมาณ 4.93 และ 9.86 kJ/m^2 สามารถลดการเจริญของ Total mesophilic aerobic microorganism ยีสต์และราในชิ้น zucchini squash (Erkan และคณะ, 2001)

Table 1 Counts of *E. coli* and *Salmonella choleraesuis* on agar plates after exposition to UV-C radiation at the different doses (0, 0.6, 1.2, 1.8, and 3.6 kJ/m^2).

Population ($\log_{10}$CFU/ml)	UV-C dose (kJ/m^2)[1]				
	0	0.6	1.2	1.8	3.6
E. coli	7.38 a	2.00 b	1.24 b	2.30 b	1.24 b
Salmonella	7.02 a	3.57 b	2.15 bc	2.00 bc	1.00 c

[1] Means presented in the same row are different at the 0.05 level of significance

Table 2 Sensory properties of holy basil exposition to UV-C at the dose of 3.6 kJ/m^2 prior stored at 13°C for 4 days.

Sensory properties	Days of storage	Scores[/1]	
		Control	UV-C
Color	0	5.0	4.9
	2	3.3	3.0
	4	1.5	1.2
Odor	0	5.0	5.0
	2	3.9 a	3.0 b
	4	1.6 a	1.3 b
Freshness	0	5.0	5.0
	2	3.3 a	2.7 b
	4	1.0	1.0
Overall acceptance	0	5.0	4.8
	2	2.6	2.3
	4	1.4	1.1

[/1] means presented in the same row at each day are different at the 0.05 level of significance

จากการศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคในด้าน สี กลิ่น ความสด และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภค พบว่าผู้บริโภคไม่ยอมรับใบกะเพราที่มีคะแนนต่ำกว่า 2 โดยใบกะเพราที่ไม่ผ่านการฉายแสง UV-C มีคะแนนการยอมรับในด้าน สี กลิ่น ความสด และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภคสูงกว่าใบกะเพราที่ผ่านการฉายแสง UV-C ที่ปริมาณแสง 3.6 kJ/m^2 (2) ทั้งนี้เนื่องจากการฉายแสง UV-C ก่อให้เกิดจุดสีน้ำตาลขึ้นบนใบกะเพราโดยลักษณะอาการจะปรากฏให้เห็นชัดขึ้นในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา ซึ่งมีรายงานการพบการเกิดสีน้ำตาลในผักสลัดที่ฉายแสง UV-C ที่ปริมาณ 7.11 kJ/m^2 (Allende และคณะ, 2006) และในชิ้น zucchini squash ที่ฉายแสง UV-C ที่ปริมาณ 4.93 และ 9.86 kJ/m^2 (Erkan และคณะ, 2001) ภายหลังจากที่เก็บรักษา

ใบกะเพราที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส พบว่าใบกะเพราที่ไม่ผ่านการฉายแสง UV-C มีการอ่อนนุ่มของใบและมีจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพตามธรรมชาติ เป็นผลให้ใบกะเพรามีคะแนนการยอมรับในด้าน สี กลิ่น ความสด และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภคต่ำกว่า 2 และสิ้นสุดอายุการวางจำหน่ายประมาณ 3 วัน เช่นเดียวกับใบกะเพราที่ผ่านการฉายแสง UV-C

สรุปผล

การฉายแสง UV-C บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ฉายแสง UV-C แต่อย่างไรก็ตามการฉายแสง UV-C ที่ปริมาณแสงที่ดีที่สุดที่สามารถลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (3.6 kJ/m^2) ไม่มีผลในการลดการเจริญของ *E. coli Salmonella* spp. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และราบนใบกะเพราที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังก่อให้เกิดจุดสีน้ำตาลขึ้นบนใบกะเพราและทำให้มีอายุการวางจำหน่ายเพียง 3 วัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี (ศสวท) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประจำปี 2551

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ, 2550, ประกาศกรมการค้าต่างประเทศ เรื่อง กำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ที่ต้องมีหนังสือรับรองในการส่งออก พ.ศ. 2550, ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 55 ง, หน้า 22-24.

กรมวิชาการเกษตร, 2549, งานวิจัยดีเด่น: แก้ปัญหาพืชผักที่ถูกกักกัน, ผลิใบ ปีที่ 9 ฉบับที่ 4, http://www.doa.go.th/th/ShowArticles.aspx?id=2299

Allende, A. and Artes, F., 2003, Combined Ultraviolet-C and Modified Atmosphere Packaging Treatments for Reducing Microbial Growth of Fresh Processed Lettuce, Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 36: 779-786.

Allende, A., McEvoy, J.L., Luo, Y., Artes, F. and Wang, C.Y., 2006, Effectiveness of Ttwo-sided UV-C Treatments in Inhibiting Natural Microflora and Extending the Shelf-life of Minimally Processed 'Red Oak Leaf' Llettuce, Food Microbiology, 23: 241-249.

Anderson, J.G., Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Fouracre, R.A. and Farish, O., 2000, Inactivation of Food-Borne Enteropathogenic Bacteria and Spoilage Ffungi Using Pulsed-light, IEEE Transactions on Plasma Science, 28: 83-88.

Cia, P., Pascholati, S.F., Benato, E.A., Camili, E.C. and Santos, C.A., 2007, Effects of Gamma and UV-C Irradiation on the Postharvest Control of Papaya Anthracnose, Postharvest Biology and Technology, 43: 366-373.

Erkan, M., Wang, C.Y. and Krizek, D.T., 2001, UV-C Irradiation Reduces Microbial Populations and Deterioration in *Cucurbita pepo* Fruit tissue, Environmental and Experimental Botany, 45: 1-9.

Fonseca, J.M. and Rushing, J.W., 2006, Effect of Ultraviolet-C Light on Quality and Microbial Population of Fresh-cut Watermelon, Postharvest Biology and Technology, 40: 256-261.

Gomez-Lopez, V.M., Ragaert, P., Debevere, J. and Devlieghere, F., 2007, Pulsed Light for Food Decontamination: a Review, Trends in Food Science and Technology, 18: 464-473.

Hoornstra, E., deJong, G. and Notermans, S., 2002, Preservation of Vegetables by Light. In Society for Applied Microbiology (Ed.), Frontiers in Microbial Fermentation and Preservation, Wageningen, Netherlands, pp.75-77.

Lado, B. and Yosef, A., 2002, Alternative Food-Preservation Technologies: Efficacy and Mechanisms, Microbes Infection, 4: 433-440.

Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., fouracre, R.A., McIlvaney, L. and Farish, O., 1999, Pulsed-light Inactivation of Food-Related Microorganisms, Applied and Environmental Microbiology, 65: 1312-1315.