ว.วิทย. มข. 40(3) 667-688 (2555) KKU Sci. J. 40(3) 667-688 (2012)

ความสำคัญของ *Clostridium perfringens* ต่อความปลอดภัยในอาหาร

The Significance of *Clostridium perfringens* in Food Safety

อรรณพ ทัศนอุดม[1] ยศยา ทุริสุทธิ์[2] และ วราภา มหากาญจนกุล[2]*

บทคัดย่อ

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียที่สำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์และก่อโรคอาหารเป็นพิษในหลายประเทศ การเจ็บป่วยเกิดขึ้นหลังรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อมากกว่า 10^5 เซลล์ เชื้อนี้สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญ เช่น สปอร์ทนต่อการต้มเดือดนานกว่า 1 ชั่วโมง และสามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารที่อุณหภูมิ 4-60°C ภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำได้เป็นเวลานาน เป็นต้น เมื่อรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเซลล์ปกติเข้าไปเซลล์ดังกล่าวจะสร้างสปอร์ขณะที่อยู่ภายในลำไส้ของคนและสัตว์ และสร้างสารพิษ (*C. perfringens* enterotoxin: CPE) ขึ้นในระหว่างการสร้างสปอร์และปล่อยสารพิษออกมาเป็นผลให้เกิดอาการท้องเสีย หรือท้องร่วงอย่างรุนแรงอันตรายถึงเสียชีวิต เซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* พบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน ฝุ่นละออง และพืชผัก โดยเฉพาะดินพบว่าเป็นแหล่งปนเปื้อนหลักของสปอร์สู่อาหาร มีรายงานว่าพบการปนเปื้อนของสปอร์ 10^3-10^4 สปอร์/กรัม ในตัวอย่างอาหาร โดยเฉพาะในเครื่องเทศ นมผง และแป้ง นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการปนเปื้อนกับอุปกรณ์ เครื่องจักร และน้ำที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ส่งผลให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตอาหาร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการลด หรือทำลายเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* ที่ปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับใช้ควบคุม *C. perfringens* คือการใช้สารออกซิไดซ์ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อในกระบวนการล้างวัตถุดิบ หรือผลิตผลทางการเกษตร อย่างไรก็ตามควรประยุกต์ใช้การสุขาภิบาลที่ดี GMP และ HACCP ซึ่งสามารถประกันความปลอดภัยของการผลิตอาหารมาใช้ร่วมด้วยเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในสินค้าอาหารมากขึ้น

[1]สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา เขตพื้นที่พิษณุโลก จ.พิษณุโลก 65000

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

*Corresponding Author, E-mail: unnop_tas@hotmail.com

ABSTRACT

Clostridium perfringens has been recognized as one of the most important bacteria causing a broad spectrum of human and foodborne diseases in many countries. Illness results when a large number of bacteria are consumed (> 10^5 cells), particularly in association with spore contaminated food. Spores survive extremely harsh conditions, including food processing such as boiling for over 1 hour and long term persistence in foods. Sporulation occurs when bacteria grow in the intestines of both human and animals. *C. perfringens* cells release an enterotoxin (CPE) when cell lysis resulting in diarrhea symptoms. Both cells and spores are widely distributed in the environment such as soil, dust and vegetation. Soil is regarded as a major habitat and a direct source of contamination into foods. Previous research reported *C. perfringens* spores have been detected in food samples (10^3-10^4 spores/g) especially in spices, milk powders or flours. Moreover, food processing facilities (equipments, machines and wash water) are also reported as the habitat of this organism, which lead to many problems in food industries. Therefore, it is very importance and challenge to reduce or inactivate *C. perfringens* cells and spores contaminated in foods and agricultural products. Oxidizing agents as the sanitizers in washing step may be the alternative way to assist the control measure of *C. perfringens* illnesses. However, the food safety strategies such as GMP and HACCP are the food safety management system to prevent the contamination of *C. perfringens* in foods.

คำสำคัญ: *Clostridium perfringens* เอนเทอโรท็อกซิน สปอร์ อาหารเป็นพิษ ความปลอดภัยอาหาร
Keywords: *Clostridium perfringens*, Enterotoxin, Spore, Food poisoning, Food safety

1.บทนำ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารนอกจากจะทำให้อาหารเน่าเสียแล้ว ที่สำคัญคือจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคในอาหาร (foodborne pathogen) แม้ว่าจะมีปริมาณปนเปื้อนน้อยก็สามารถทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ (Jay, 1996) อาหารที่ปนเปื้อนทำหน้าที่เป็นพาหะในการส่งต่อจุลินทรีย์ก่อโรค และสารพิษต่าง ๆ มาสู่ผู้บริโภคแบคทีเรียหลายชนิดทั้งในลักษณะของเซลล์ (vegetative cell) และสปอร์ (spore) ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการผลิต การขนส่ง รวมทั้งการเก็บรักษาก่อนถึงมือผู้บริโภค ดังได้กล่าวมาแล้วว่าไม่เพียงแต่ส่งผลต่อคุณภาพของอาหารเท่านั้นแต่แบคทีเรียที่ปนเปื้อนนี้ยังสามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) กับผู้บริโภค *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียชนิดก่อโรคสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นในหลาย ๆ ประเทศ ทั้งในประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศที่พัฒนาแล้ว รวมทั้งประเทศไทย เมื่อเซลล์ของ *C. perfringens* เข้าสู่ร่างกายแล้วจะไปอาศัยที่บริเวณลำไส้ และจะเริ่มต้นกระบวนการสร้างสปอร์ (sporulation) ขึ้นบริเวณลำไส้เล็ก พร้อมกับการสร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซินที่เรียกว่า

C. perfringens enterotoxin (CPE) โดยสารพิษนี้จะก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องร่วง (Dilbaghi and Sharma, 2007; Cary et al., 2000) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าประเทศไทยมีการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ในอาหารหลายชนิด ได้แก่ เนื้อปลาสด แหนม กุนเชียง พริกป่น เครื่องเทศและน้ำพริกชนิดต่าง ๆ และยังมีรายงานว่าพบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ในน้ำแข็ง น้ำเชื่อม น้ำตาล อาหารกระป๋อง รวมทั้งอาหารพร้อมรับประทานด้วย ซึ่งอาหารเหล่านี้มิใช่แหล่งอาศัยเดิมของเชื้อจึงคาดว่าเกิดจากการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) หรือปนเปื้อนหลังการผลิต แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังขาดการรวบรวมข้อมูลทางด้านวิชาการของเชื้อชนิดนี้ทั้งในส่วนของโรคระบาด (outbreak) และอุบัติการณ์เจ็บป่วย (incidence of illnesses) ที่มีสาเหตุจาก *C. perfringens* รวมถึงข้อมูลความเสี่ยงของอาหารที่มักพบการปนเปื้อน และประชากรกลุ่มเสี่ยง ดังนั้นบทความวิชาการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อชี้ให้เห็นความสำคัญของ *C. perfringens* โดยทำการรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ *C. perfringens* ด้านต่าง ๆ ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเพื่อให้ผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องได้ตระหนักถึงความสำคัญและอันตรายของเชื้อดังกล่าว รวมทั้งการเตรียมพร้อมเพื่อรับมือและป้องกันภัยจากการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ในอาหาร

2. ลักษณะทั่วไปและถิ่นอาศัยตามธรรมชาติของ *C. perfringens*

C. perfringens เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในกระเพาะอาหาร และระบบลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น มีความสามารถในการก่อโรคได้หลายชนิด (Lindström et al., 2011) เชื้อนี้ยังเป็นสาเหตุของการก่อโรคอาหารเป็นพิษจากสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (food intoxication) และโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียสร้างสารพิษขึ้นในร่างกาย (toxico-infection) (อัญชลี, 2548) สามารถจำแนกแบคทีเรียนี้ออกเป็น 5 ซีโรไทป์ คือ A B C D และ E โดยไทป์ A พบว่ามีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับโรคอาหารเป็นพิษ สูงกว่าไทป์อื่น ๆ (Finegold, 1977)

2.1 ลักษณะทั่วไป

C. perfringens ติดสีแกรมบวกมีรูปทรงเป็นท่อนตรงเสมอกัน มีขนาดค่อนข้างใหญ่ กว้างประมาณ 0.8-1.5 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 2-4 ไมโครเมตร (Labbe, 1989) ไม่เคลื่อนไหว เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ สร้างแคปซูล และสปอร์ได้ (Wringley, 1994) และบ่อยครั้งที่เห็นเซลล์มีรูปทรงเป็นแท่งที่เรียกว่า “box-car” (Labbe, 1989) เอนโดสปอร์ สปอร์รูปไข่จะถูกสร้างขึ้นที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ (oval subterminal spores) (Jay, 1996) เอนโดสปอร์ของ *C. perfringens* สามารถต้านทานความร้อนได้แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของสายพันธุ์โดยปกติสปอร์สามารถต้านทานความร้อนได้ ส่วนสปอร์ของ *C. perfringens* สายพันธุ์ที่ต้านทานความร้อนได้ดีสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลานานถึง 5 ชั่วโมง (Blaschek, 2000) แบคทีเรียสปีชีย์นี้ต่างจากคลอสตริเดียอื่น ๆ คือ มีขนาดใหญ่กว่า สามารถสร้างแคปซูล และไม่เคลื่อนที่ (Jay, 1996) แม้ว่าแบคทีเรียจะเจริญในสภาวะไร้อากาศ เนื่องจากขาดเอนไซม์คะตะเลส แต่ *C. perfringens* ก็อาจมีชีวิตรอดและเจริญได้พอสมควรในสภาวะที่มีอากาศที่มีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวลดออกซิเจนอยู่ด้วย (สุมณฑา, 2545) เชื้อชนิดนี้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปมักไม่สร้างสปอร์ แต่จะสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในลำไส้ หรือเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมก็สามารถกระตุ้นให้เชื้อ

สร้างสปอร์ได้ เช่น ราฟฟิโนส โซเดียมคาร์บอเนต โคบอลท์คลอไรด์ และโซเดียมแอสคอร์เบต เป็นต้น (อัญชลี, 2548; Vanderzant and Splittstoesser, 1992; Duncan, 1976)

2.2 ถิ่นอาศัยตามธรรมชาติ

ตามปกติแล้ว *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ และบางครั้งอาจพบเชื้อนี้ได้ตามผิวหนัง (Duncan, 1976; Gorbach,1998) ดินเป็นถิ่นอาศัยที่สำคัญของเชื้อนี้ โดยสามารถตรวจพบเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* ในดินสูงถึง 10^6–10^7 cells/g และ 10^3–10^4 spores/g ตามลำดับ การพบเชื้อนี้ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ และในอุจจาระถือเป็นเรื่องปกติ สำหรับผู้ที่แข็งแรงอาจตรวจพบสปอร์ของเชื้อนี้ในระดับประมาณ 10^3-10^4cell/g นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าอุปกรณ์และเครื่องมือในการแปรรูปอาหารเป็นแหล่งปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อชนิดนี้ (Duncan, 1976) นอกจากพบว่ามีการแพร่กระจายของ *C. perfringens* อยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ อากาศ และในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ยังพบว่ามีโอกาสปนเปื้อนเข้าสู่บาดแผลหรือลงสู่อาหารได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อไทป์ A ที่ก่อปัญหาการติดเชื้อที่สำคัญทั้งในคนและสัตว์มากกว่าไทป์อื่น ๆ (Olsen et al., 2000; Bean et al., 1996; Beckers,1986; Shandera et al., 1983; Todd, 1978)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *C. perfringens*

C. perfringens สามารถเจริญ และปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรและอาหารสัตว์ รวมทั้งอาหารที่ผ่านการแปรรูป เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ เครื่องเทศ น้ำพริก ซอส และอาหารแห้ง (McClane, 1997) โดยหากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเซลล์หรือสปอร์ที่ได้รับความร้อนไม่เพียงพอ หรืออาหารที่ปรุงสุกแล้วทิ้งไว้เป็นเวลานานและไม่ได้แช่เย็นจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *C. perfringens* ได้ (Rhodehamel and Harmon, 2001) ทั้งนี้การรอดชีวิตของเซลล์และสปอร์ที่ปนเปื้อน รวมถึงการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ดังนี้

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ปกติ

เชื้อ *C. perfringens* มีช่วงระยะเวลาการแบ่งตัวในแต่ละครั้ง (generation time) ค่อนข้างสั้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญ ช่วงเวลาการแบ่งตัวของเชื้อโดยทั่วไปจะน้อยกว่า 15 นาที แต่เชื้อในบางสายพันธุ์ เช่น NCTC 8328 เป็นต้น อาจแบ่งตัวในช่วงสั้น ๆ เพียง 7.1 นาที ที่อุณหภูมิ 41°C (Willardsen et al., 1978) เชื้อชนิดนี้ต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน เช่น กรดอะมิโน วิตามินหลายชนิด และเกลืออนินทรีย์ (เช่น แมงกานีส และเหล็ก) เป็นต้น รวมทั้งน้ำตาลกลูโคสช่วยสนับสนุนการเจริญของเชื้อนี้ได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผสมน้ำตาล อย่างไรก็ตามอาหารที่ผสมน้ำตาลที่เชื้อสามารถหมักย่อยได้อาจทำให้เชื้อมีชีวิตค่อนข้างสั้นเพราะจะไปลดการสร้างสปอร์ของเชื้อ อีกทั้งกรดที่เกิดขึ้นจากผลการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวยังเป็นอันตรายต่อเซลล์เชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์ปกติอีกด้วย (อัญชลี, 2548; Boyd et al., 1984) *C. perfringens* จัดเป็นเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (obligate anaerobe) โดยเจริญได้ในบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนได้บ้าง (2-8%) หรือสภาวะที่มี oxidation reduction potential (Eh) ต่ำ แต่ไม่เจริญใน candle jar ที่มี 5% CO_2 และ 15% O_2 (อัญชลี, 2548; Jay et al., 2005) มีรายงานการเจริญ

ของเชื้อนี้ที่ค่า Eh ค่อนข้างกว้างระหว่าง -125 และ +350 mV (Walden and Hentges, 1975) มีรายงานว่าหากทำให้ค่า Eh ลดลงเหลือ -45 mV ก็เพียงพอให้เชื้อเริ่มแบ่งตัวได้ (Blaschek, 1999) จากนั้นเชื้อจะหาทางปรับค่า Eh ที่อยู่แวดล้อมเอง โดยอาศัยเมตาบอลิซึมของเซลล์ในช่วงของการเจริญแบ่งตัว ทำให้เกิดสารรีดิวซ์ เช่น เฟอร์โรด็อกซิน (ferrodoxin) เป็นต้น เพื่อรักษาสภาวะรีดิวซ์เอาไว้ และทำให้ Eh ลดต่ำลงอยู่ตลอดเวลาที่เซลล์กำลังเจริญ (Labbe, 1989) ส่วนอุณหภูมิในการเจริญของเชื้อชนิดนี้อยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 20-50 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยทำให้เชื้อเจริญได้ดีและรวดเร็วที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศ อยู่ในช่วง 43-45 °C ถ้าอุณหภูมิสูงเกินกว่า 55 °C เชื้อจะไม่เจริญ (Blaschek, 1999) แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไป เช่นระหว่าง 0-10 °C เป็นต้น เซลล์ปกติที่ยังไม่สร้างสปอร์จะตายอย่างรวดเร็ว และการย้ายเซลล์ซึ่งกำลังเจริญแบ่งตัวอยู่ที่ 37 °C มาอยู่ที่ 4 °C ทันที จะฆ่าเชื้อให้ตายได้ถึง 96% ภายในเวลา 10 นาที (Traci and Duncan, 1974) ในขณะที่ค่าพีเอชของอาหารที่เชื้อเจริญได้จะอยู่ในช่วง 5.5-8.0 โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 6.0-7.0 แต่เชื้อจะไม่เจริญที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 หรือสูงกว่า 8.3 (Labbe, 1989) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนผสมและในอาหารที่มีความเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ เมื่อเพาะเลี้ยงไปหลาย ๆ ชั่วโมง พีเอชของอาหารจะต่ำลงจากเริ่มต้นที่พีเอช 7 ลดลงเหลือพีเอช 5 เป็นผลจากการหมักย่อยน้ำตาลแล้วได้กรดออกมา ซึ่งนอกจากจะส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อแล้ว ยังเป็นผลให้การผลิตสารพิษของเชื้อน้อยลงไปด้วย (Labbe and Duncan, 1975) *C. perfringens* มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มี a_w ต่ำได้น้อยกว่าแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษด้วยกัน (Labbe, 1989) ค่า a_w ต่ำสุดที่เชื้อเจริญอยู่ในช่วง 0.93-0.97 ทั้งนี้ขึ้นกับสารที่ใช้ปรับ a_w (เช่นถ้าใช้กลีเซอรอลปรับ a_w แบคทีเรียเจริญได้ที่ a_w ต่ำกว่าการใช้เกลือแกงหรือใช้น้ำตาลทรายปรับ) (สุมณฑา, 2545; Jay et al., 2005) ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7-8% จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Gough and Alford, 1965) หากมีโซเดียมคลอไรด์ 6 % ขึ้นไป เชื้อนี้จะไม่เจริญ (สุมณฑา, 2545)

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์

การสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นเมื่อมีความหนาแน่นของเซลล์สูง และเกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญ ซึ่งในกรณีของเชื้อกลุ่มบาซิลลัสจะเกิดขึ้นเมื่อสารอาหารหมดไป ส่วนในกรณีของพวกคลอสตริเดียมจะเกิดการสร้างสปอร์เมื่อมีสภาวะที่เป็นกรดเกิดขึ้น ซึ่งเป็นเรื่องที่พบปกติในกระบวนการสร้างสปอร์ที่แตกต่างกันระหว่าง *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. (Setlow and Johnson, 2007; Dworkin and Losick, 2005; Paredes et al., 2005; Dürre and Hollergschwandner, 2004; Errington, 2003) การสร้างสปอร์ของเชื้อจะเกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กับการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งสามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ได้ทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะพบจำนวนสปอร์สูงที่สุดในเวลาที่เร็วกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์จะต้องไม่มีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแล็คโตส หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่เชื้อหมักย่อยได้ แต่มักจะใช้แป้ง (soluble strach) เดกซ์ทริน (dextrin) หรือแรฟฟิโนส (raffinose) แทนน้ำตาลเหล่านั้น โดยอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อให้เกิดสปอร์ คือ อาหารของ Duncan-strong (DS) (Duncan and Strong, 1968) หรืออาจรู้จักกันในชื่อ

sporulation broth (Fluka) (Vanderzant and Splittstoesser, 1992) และอาหารของ Ellner (Ellner, 1956) การสร้างสปอร์ของเชื้อมีบทบาทสำคัญมาก เนื่องจากเอนเทอโรท็อกซินของ *C. perfringens* จะเกิดขึ้นในระหว่างการสร้างสปอร์นี้ โดยเกิดขึ้นภายในลำไส้เล็กของมนุษย์ (McClane, 2007) โดยสปอร์จะมีจำนวนสปอร์สูงสุดในเวลา 10-12 ชั่วโมง (สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน) หรือ 24 ชั่วโมง (สภาวะที่มีออกซิเจน) (Granum and Whitaker, 1980) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ ได้แก่ 1) สารที่พบว่าส่งเสริมการสร้างสปอร์ ได้แก่ เมทิลแซนทีน (methyl-xanthines) คาเฟอีน (caffeine) และทีโอฟีลลิน (theophyllin) แต่สารเหล่านี้อาจจะลดอัตราการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ปกติได้ (Sacks and Thompson, 1977) ส่วนกัวโนซีน (guanosine) พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อได้บางสายพันธุ์ (Sacks,1983) 2) ค่า Eh และปริมาณออกซิเจนที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อยังมีข้อมูลการศึกษาน้อย แต่พบรายงานค่า Eh ของอาหารที่ -450 mV จะเปลี่ยนเป็น -400 mV ในช่วงที่เชื้อสร้างสปอร์ (Naik and Dancan, 1977) 3) อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การสร้างสปอร์คือ 35-40 °C ถ้าอุณหภูมิต่ำเชื้อจะสร้างสปอร์ได้น้อย เช่น ที่ 5 °C จะได้สปอร์ประมาณ 2-37 spores/ml แต่ที่ 37 °C จะได้สปอร์ สูงถึง $12x10^6$ spores/ml (Kim et al., 1967) 4) ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ *C perfringens* คือ 6.0-8.0 (Labbe, 1989) และสปอร์จะเกิดขึ้นได้น้อยลงเมื่อเซลล์ปกติที่เจริญในอาหารหมักย่อยน้ำตาลให้กรดเกิดขึ้น

4. การปนเปื้อนของ *C. perfringens* ในอาหาร

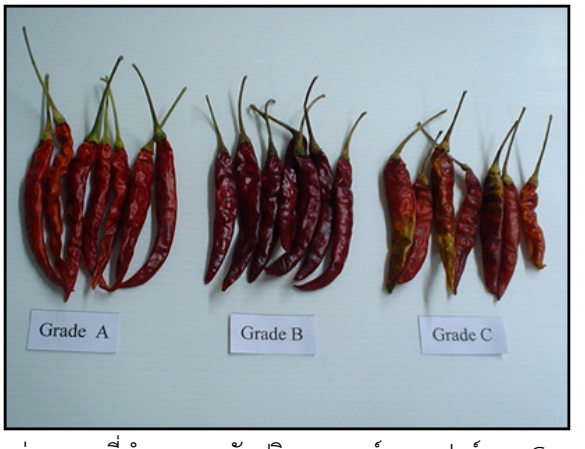
พบได้ทั้งในลักษณะการปนเปื้อนของเซลล์ปกติ และสปอร์ โดยเฉพาะในอาหารที่ปรุงสุกแล้วถูกทิ้งให้อยู่ที่อุณหภูมิ 4-60 °C เป็นเวลานาน (Jay et al., 2005) อาหารที่เป็นสื่อให้เกิดการะบาดขึ้นบ่อย ได้แก่ อาหารที่มีเนื้อสัตว์ น้ำเกรวี่ (gravy) ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า ทิ้งไว้ให้เย็นลงหลายชั่วโมงหรืออาจทิ้งค้างคืนเพื่อนำไปใช้บริโภคในวันถัดไป หรือความร้อนที่ใช้ทำให้อาหารสุกอาจไม่เพียงพอที่จะทำลายสปอร์ ขณะทิ้งไว้สปอร์จึงงอกขึ้นพร้อม ๆ กับผลิตสารพิษออกมาด้วย (สุมณฑา, 2545) สปอร์จะมีแหล่งปนเปื้อนมาจากห่วงโซ่อาหาร อาหารสัตว์ รวมทั้งส่วนผสมต่าง ๆ ในอาหารและในสายการผลิตอาหาร การสร้างสปอร์เกิดขึ้นได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร (Carlin, 2011) ดังกล่าวมาแล้วว่าดินเป็นแหล่งของคลอสตริเดียมและสปอร์ที่ปนเปื้อนลงสู่อาหารถูกนำเข้าสู่กระบวนการผลิตอาหารจากกระแสลม ฝุ่นละออง หรือพนักงานในสายการผลิต (Groenewald et al., 2009) อาหารจำพวกเนื้อสัตว์สด หรือแช่แข็งมีการปนเปื้อนเซลล์ประมาณร้อยละ 50 (McClane, 1997) จากการสำรวจอาหารอเมริกัน 510 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ร้อยละ 6 ของอาหารทั้งหมด โดยเชื้อกระจายอยู่ในอาหารประเภทต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อวัว เนื้อไก่ และเนื้อปลาดิบ (16.4%) เครื่องเทศ (5%) ผักและผลไม้ (3.8%) อาหารปรุงสำเร็จแช่แข็งที่วางจำหน่ายในตลาด (2.7%) และในอาหารพร้อมบริโภคที่ทำขึ้นภายในครัวเรือน (1.8%) (Strong et al., 1993) การเก็บตัวอย่างเครื่องเทศ 27 ชนิด จำนวน 154 ตัวอย่างจากร้านค้าปลีก 20 แห่งในประเทศอินเดียพบ *C. perfringens* ร้อยละ 59 ในพริกไทยดำผง คาราเวียร์

(caraway) กระเทียม และพริกแดง และในประเทศไทยก็พบ *C. perfringens* จำนวน 36 ตัวอย่าง จากตัวอย่างอาหารพร้อมปรุงบรรจุโฟมที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาเก็ตในพื้นที่กรุงเทพมหานคร นนทบุรี และปทุมธานี จากจำนวนทั้งหมด 173 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาเก็ต 34 แห่ง พบเชื้อดังกล่าวเป็นอันดับที่สองรองจาก *Salmonella* sp. (อรุณ และคณะ, 2544) สถาบันอาหารได้ทำการสุ่มตัวอย่างพริกป่นเพื่อวิเคราะห์หา *C. perfringens* ซึ่งกระทรวงอุตสาหกรรมได้กำหนดมาตรฐาน คือ ต้องไม่พบ *C. perfringens* ในอาหาร 0.01 กรัม จากการสุ่มตัวอย่างพริกป่นจำนวน 6 ตัวอย่าง จากร้านค้าในเขตกรุงเทพฯ ปรากฏว่ามี 2 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ *C. perfringens* เกินกว่ามาตรฐานกำหนด และอีก 1 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบแต่ไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ (ไทยรัฐ, 2542) และในปี 2547 จากการสุ่มตัวอย่างพริกแกงบรรจุถุงที่วางขายตามตลาดสดจำนวน 5 ตัวอย่าง จำหน่ายในร้านค้า 5 แหล่งในเขตกรุงเทพฯ ปรากฏว่าทุกตัวอย่างพบการปนเปื้อน *C. perfringens* ตั้งแต่ 50-100 โคโลนี ในตัวอย่างพริกแกง 1 กรัม ซึ่งตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กำหนดให้อาหารดิบรวมถึงเครื่องแกง ต้องไม่พบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ในตัวอย่างอาหาร 0.01 กรัม (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553; ไทยรัฐ, 2547ก) และเมื่อสุ่มตรวจเครื่องแกงชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แกงส้ม แกงเผ็ด แกงน้ำยา แกงเขียวหวาน และแกงกะหรี่ที่วางขายตามตลาดสดจำนวน 5 ตัวอย่าง จาก 3 แหล่งการค้าในเขตกรุงเทพฯ ผลปรากฏว่าทุกตัวอย่างพบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* (ในตัวอย่างเครื่องแกง 1 กรัม) (ไทยรัฐ, 2547) นอกจากนี้จากการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำพริกสำเร็จรูป ได้แก่ หัวหอม กระเทียม กุ้งแห้ง พริกแห้ง และกะปิ (ชนิดละ 3 ตัวอย่าง) พบ *C. perfingens* ปนเปื้อนมากที่สุด (โดยเฉลี่ย 4.3 log CFU/g) แม้ว่าจะนำวัตถุดิบไปให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อมีจำนวนลดน้อยลงมาก (0.1-0.3 log CFU/g) หากต้องการทำลายแบคทีเรียนี้ต้องใช้เวลาถึง 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิดังกล่าว (สิริพรและคณะ, 2539) ซึ่งก่อนหน้านั้นสิริพรและคณะ (2538) ได้ตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำพริกสำเร็จรูปบรรจุในภาชนะปิดผนึกจำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าแม้น้ำพริกสำเร็จรูปที่มีค่า a_w โดยเฉลี่ยต่ำกว่า 0.85 มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูงโดยสูงเกินกว่าที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนด กล่าวคือ จุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1.0×10^4 โคโลนี/กรัม และที่สำคัญพบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* สูงถึงร้อยละ 11 โดยจำนวนที่พบอยู่ในช่วง 2.00-3.32 log CFU/g และในปี 2547 จากการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำพริกสำเร็จรูป จำนวน 22 ตัวอย่าง บางตัวอย่างตรวจพบ *C. perfringens* สูงกว่าเกณฑ์จุลินทรีย์ในอาหารพร้อมบริโภคที่กำหนดโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชิดชม และคณะ, 2547) และในปี 2548 จากการสำรวจเก็บตัวอย่างน้ำพริกเปียกจำนวน 11 ชนิด ที่กระบวนการผลิตไม่ผ่านกระบวนการ ให้ความร้อนก่อนการบรรจุ จากกลุ่มผู้ผลิตกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ซึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนของ *C. perfringens* อยู่ (ชิดชม และคณะ, 2548) อาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนเซลล์ของ *C. perfringens* ดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อเร็ว ๆ นี้ในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม 2554 จากการเก็บตัวอย่างพริกแห้งจำนวน 40 ตัวอย่าง เพื่อตรวจนับปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* สามารถแบ่งกลุ่มพริกแห้งออกเป็น 3 เกรดด้วยกันตามลักษณะและคุณภาพที่ปรากฏ (รูปที่ 1) โดยจาก

การศึกษาครั้งนี้พบว่าทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ แต่พบในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ชนิดของอาหารและปริมาณการปนเปื้อนเซลล์ของ *C. perfringens*

ชนิดอาหาร	ร้อยละที่พบ (จำนวนตัวอย่าง)	ปริมาณที่พบ (log CFU/g)	ประเทศ	อ้างอิง
เนื้อปิ้ง-ย่าง	ไม่รายงาน	2.29	ไนจีเรีย	Abdullahi et al. (2006)
เครื่องเทศ	59.0 (154)	1.00-6.00	อินเดีย	Banerjee and Sarka (2003)
prepared frozen foods	2.7 (510)	ไม่รายงาน	อเมริกา	Strong et al. (1993)
ผักและผลไม้	3.8 (510)	ไม่รายงาน	อเมริกา	Strong et al. (1993)
เครื่องเทศ (อเมริกา)	5 (510)	ไม่รายงาน	อเมริกา	Strong et al. (1993)
อาหารที่เตรียมในบ้าน	1.8 (510)	ไม่รายงาน	อเมริกา	Strong et al. (1993)
เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก และปลา	16.4 (510)	ไม่รายงาน	อเมริกา	Strong et al. (1993)
น้ำพริกสำเร็จรูป	72.7 (22)	1.30-2.60	ไทย	ชิดชม และคณะ (2547)
พริกแกงสด	100.0 (5)	1.69-2.00	ไทย	ไทยรัฐ (2547ก)
อาหารพร้อมปรุงบรรจุโฟม	20.8 (173)	ไม่รายงาน	ไทย	อรุณ และคณะ (2544)
พริกป่น	50.0 (6)	ไม่รายงาน	ไทย	ไทยรัฐ (2542)
วัตถุดิบในการผลิตน้ำพริก	ไม่รายงาน	4.30	ไทย	สิริพร และคณะ (2539)



รูปที่ 1 ตัวอย่างพริกแห้งในแต่ละเกรดที่นำมาตรวจวัดปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* (เกรด A คือ พริกแห้งที่มีเม็ดสมบูรณ์ ไร้ตำหนิ และการเน่าเสีย จำนวน 6 ตัวอย่าง; เกรด B คือ พริกแห้งที่เม็ดมีตำหนิไม่เกินร้อยละ 5 และการเน่าเสียไม่เกินร้อยละ 30 จำนวน 16 ตัวอย่าง; เกรด C คือ พริกแห้งที่เม็ดมีตำหนิเกินร้อยละ 5 และการเน่าเสียเกินกว่าร้อยละ 30 จำนวน 18 ตัวอย่าง (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526))

ตารางที่ 2 ปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* ในตัวอย่างพริกแห้ง จำนวน 40 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลีกในกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม ปี 2554

พริกแห้งเกรดต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่าง)	ตัวอย่างที่ปนเปื้อน/ตัวอย่างทั้งหมด (ร้อยละ)	ระดับการปนเปื้อน *C. perfringens* (MPN/g)	
		เซลล์	สปอร์
เกรด A (6)	6/6 (ร้อยละ 100)	9–23	4–23
เกรด B (16)	16/16 (ร้อยละ 100)	43–240	9–43
เกรด C (18)	18/18 (ร้อยละ 100)	460– >1,100	15–93

จากผลการสำรวจพบว่าพริกแห้งทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* โดยลักษณะปรากฏของพริกแห้งมีความสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของเซลล์ *C. perfringens* ซึ่งพริกแห้งเกรด A ที่มีลักษณะปรากฏของเม็ดที่สมบูรณ์ ไร้ตำหนิ และการเน่าเสียจะมีปริมาณการปนเปื้อนของเซลล์ต่ำกว่าพริกแห้งเกรด B และ C ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีการปนเปื้อนของสปอร์ความสัมพันธ์ดังกล่าวยังไม่ชัดเจนนัก นอกจากนี้จากการเก็บตัวอย่างพริกสด (fresh chili) จำนวน 54 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลีกในกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม ปี 2554 พบว่าทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* เช่นเดียวกับพริกแห้ง แต่ปริมาณที่ปนเปื้อนจะต่ำกว่าที่พบในพริกแห้ง ซึ่งพบปริมาณการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ในพริกสดเท่ากับ 4-150 และ 4-460 MPN/g ตามลำดับ โดยที่ลักษณะปรากฏของพริกสดนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* เช่นเดียวกับที่พบความสัมพันธ์ในพริกแห้งอีกทั้งจากผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำพริก ได้แก่ กลุ่มของน้ำพริกแกง (fresh chili) น้ำพริกเผา (cooked chili) และน้ำจิ้มไก่และซอส-พริก (chili sauces) จากร้านค้าปลีกและห้างสรรพสินค้า จำนวน 58 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 59 ของตัวอย่างทั้งหมด มีการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ *C. perfringens* ในระดับที่เท่ากันคือ 3->1,100 MPN/g โดยพบว่าพริกแกง (35 ตัวอย่าง) เป็นกลุ่มที่มี การปนเปื้อนสูงที่สุด เนื่องจากมีค่าพีเอช และค่า a_w ที่สูง คือ 5.3-5.9 และ 0.8-0.9 ตามลำดับ ซึ่งเป็นปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *C. perfringens* ในขณะที่กลุ่มน้ำจิ้มไก่และซอสพริกนั้นมีค่าพีเอช และค่า a_w ต่ำ ไม่เหมาะกับการเจริญ จึงพบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ปริมาณน้อย และยังพบว่าตัวอย่างจากร้านค้าปลีกมักพบการปนเปื้อนของเชื้อที่สูงกว่าที่มาจากห้างสรรพสินค้า

5. การก่อโรคอาหารเป็นพิษของ *C. perfringens*

C. perfringens ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ผู้ป่วยจะเกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงและปวดท้อง โดยทั่วไปไม่มีอาการคลื่นเหียนอาเจียน ไม่มีไข้ หรือปวดศีรษะ ระยะเวลาฟักตัวอยู่ในช่วง 8-24 ชั่วโมง โดยอาการจะทุเลาลงภายใน 12-24 ชั่วโมง บุคคลที่อ่อนแออาจมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต บุคคลที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง ได้แก่ คนแก่ และเด็กทารกอายุต่ำกว่า 1 ปี (Blaschek, 2000) อาการของ โรคอาหารเป็นพิษมีสาเหตุมาจาก เชื้อไทป์ A จะสร้างสารพิษที่เรียกว่า เอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็น spore specific protein สร้างขึ้นระหว่างการสร้างสปอร์ของเซลล์ในลำไส้ของมนุษย์หรือสัตว์ (Jay, 1996) เนื่องจากเซลล์ของ *C. perfringens* สามารถทนใน

สภาวะกรดของกระเพาะอาหาร จึงไม่ถูกทำลายจากกรดในกระเพาะอาหาร (McClane, 1997) การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียชนิดนี้จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน *C. perfringens* ตั้งแต่ 10^6-10^7 เซลล์ต่อกรัม (Blaschek, 2000) บางรายงานระบุ >10^5 เซลล์ต่อกรัม (McClane, 1997)

5.1 อาการของโรค

อาการของโรคที่มีสาเหตุจาก *C. perfringens* พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลุ่มของสารพิษที่ร่างกายได้รับเข้าไป โดยทั่วไปแล้วสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

1.เอกซ์โซท็อกซิน (exotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในระยะที่เป็นเซลล์ปกติ แล้วขับออกสู่นอกเซลล์ ส่วนมากที่พบได้แก่สารพิษชนิดแอลฟา (α toxin) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดแก๊สแกงกรีน (gangrene gas) เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังชั้นลึกอักเสบ (cellulitis) และการติดเชื้อในกระแสเลือดหรือภาวะเลือดเป็นพิษ (septiccemia) และสารพิษชนิดเบต้า (β toxin) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดลำไส้อักเสบมีเนื้อเยื่อตายเน่า (enteritis necroticans หรือ pigbel)

2. เอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในระหว่างการสร้างสปอร์ภายในลำไส้ของสัตว์และมนุษย์ ซึ่งสารพิษที่ได้จะถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ก่อน จนกระทั่งเกิดการสลายตัวของเซลล์ (cell lysis) จึงทำให้สปอร์และสารพิษดังกล่าวถูกปล่อยออกมา เอนเทอโรทอกซินเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะอุจจาระร่วง และภาวะอุจจาระร่วงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic associated diarrhea) (อัญชลี, 2548; McClane, 2007; Blaschek, 2000)

5.2 ปัจจัยความรุนแรงในการเกิดโรค

ปัจจัยความรุนแรงในการเกิดโรค (virulence factors) สาเหตุที่ทำให้เกิดการตอบสนองของโรคที่เกิดขึ้นกับโฮสต์ โดยปัจจัยความรุนแรงดังกล่าวจะไปยับยั้งการทำงานของกลไก หรือวิถีเมตาบอลิซึมบางอย่างของโฮสต์ (host) ตัวอย่างปัจจัยความรุนแรงได้แก่ แคปซูล และสารพิษชนิดต่าง ๆ ในกรณีของ *C. perfringens* คือสารพิษกลุ่มที่เป็นเอกซ์โซท็อกซินได้แก่ alpha (α) beta (β) epsilon (ε) และ iota (ί) และกลุ่มของเอนเทอโรท็อกซิน (CPE) (McClane, 1997) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับโฮสต์ และตัวเชื้อเองอีกด้วยโดยมีรายละเอียด ดังนี้

1.เอนเทอโรท็อกซิน เป็นสารพิษที่ไวต่อความร้อนจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 °C ภายในเวลา 60 นาที และมีความไวต่อเอนไซม์โปรติเนส สามารถต้านทานต่อเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และปาเปนได้ เอนเทอโรท็อกซินสร้างจากเซลล์ที่อยู่ระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ในช่วงปลายของการเจริญ ปริมาณสารพิษจะผลิตสูงสุดก่อนอับสปอร์ (sporangium) แตก และเอนเทอโรท็อกซินจะปล่อยออกมาพร้อมกับอับสปอร์ (Jay, 1996) แต่ก็พบรายงานว่าเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์ปกติสร้าง เอนเทอโร-ท็อกซินได้แต่จะมีปริมาณน้อย ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคจะไม่ผลิตสารพิษนี้ (อัญชลี, 2548) ดังนั้นหากบริโภคอาหารที่มีปนเปื้อนเซลล์ของ *C. perfringens* เป็นปริมาณมากพอเซลล์บางเซลล์จะอยู่รอดจากสภาวะกรดในกระเพาะอาหารและเข้าสู่ลำไส้เล็กได้ จากนั้นเซลล์ที่เพิ่มปริมาณและสร้างสปอร์จะปล่อยสารพิษ (enterotoxin) ออกมาต่อมาสารพิษจับกับผนังลำไส้ และทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ (epithelial cell) เกิดการกระตุ้นการหลั่งของเหลว รบกวนการดูดซึมกลับของน้ำและสารอาหาร ทำให้เกิดอาการท้องเสีย (McClane, 1997)

2.อายุของโฮสต์ อายุเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้โฮสต์ไวต่อการติดเชื้อ เด็กเล็กและผู้สูงอายุนอกจากจะ

ไวต่อการติดเชื้อแล้วยังเสี่ยงต่อการเสียชีวิตค่อนข้างสูง เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของทารก หรือเด็กเล็กยังไม่สมบูรณ์เพียงพอต่อการปกป้องการรุกรานของเชื้อ โดยเฉพาะฟาโกไซท์ (phagocytes) หรือเม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทสำคัญในการจับกินและทำลายเชื้อ ส่วนในผู้สูงอายุซึ่งมีความเสื่อมถอยของระบบการทำงาน จึงทำให้มีความไวต่อการติดเชื้อและแสดงอาการของโรคที่รุนแรง ในขณะที่คนวัยหนุ่มสาว อาการของโรคจะไม่รุนแรง และมักหายจากโรคได้เอง (อัญชลี, 2548)

3.การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็น ส่วนใหญ่มักเกิดจากการซื้อยากินเองโดยไม่ปรึกษาแพทย์ ซึ่งจะส่งเสริมให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เกิดขึ้นในระหว่างการกินยาปฏิชีวนะ (antibiotic associated diarrhea) การใช้ยาปฏิชีวนะในลักษณะดังกล่าวจะทำลายสมดุลของเจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ เป็นเหตุให้ *C. perfringens* ไทป์ A (ซึ่งเดิมมีจำนวนไม่มากนัก) แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้นจนก่อโรคได้ (อัญชลี, 2548; Borriello et al., 1984) ซึ่งมีอาการแตกต่างไปจากอาการของโรคอาหารเป็นพิษ โดยมีความรุนแรงและระยะเวลาของการเกิดโรคนานกว่า และมีเลือดและเยื่อมูกออกมาออกมากับอุจจาระด้วย (Borriello, 1995)

4.การที่เชื้อขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เชื้อนี้มีระยะเวลาในการแบ่งตัวแต่ละครั้งค่อนข้างสั้น คือประมาณ 10-15 นาที ดังนั้นหากยังไม่บริโภคอาหารทันทีและเก็บในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อยู่ในหม้ออุ่นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 °C หรือในสภาวะที่ทำให้ออกซิเจนในอาหารลดต่ำลง เป็นต้น จะส่งเสริมให้เชื้อเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาไม่นานเชื้ออาจเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนถึง 10^8 เซลล์ ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการก่อโรค (อัญชลี, 2548)

6. การควบคุม *C. perfringens* ในอาหาร

การป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *C. perfringens* สามารถทำได้โดยการกำจัดเซลล์ปกติหรือสปอร์ออกจากอาหาร หรือยับยั้งการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร หรือการทำให้อาหารเย็นลงอย่างเหมาะสมและให้ความร้อนอย่างเพียงพออีกครั้งเพื่อกำจัดเซลล์ของ *C. perfringens* (Wringley, 1994) ตัวอย่างเช่น Jay (1996) ได้เสนอแนะวิธีการเตรียมไก่งวงและน้ำซอสราดเพื่อบริโภคได้อย่างปลอดภัย ได้แก่ ปรุงไก่งวงภายนอกให้มีอุณหภูมิสูงถึง 74 °C ล้างและ ฆ่าเชื้อภาชนะและอุปกรณ์เครื่องมือทั้งหมด หลังจากสัมผัสกับไก่งวงดิบและแยกเนื้อไก่งวงและน้ำสต๊อกออกจากกันก่อนการแช่เย็น เป็นต้น นับจากอดีตมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการต่าง ๆ ในการแปรรูปอาหารเพื่อควบคุมและการลดการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ทั้งในส่วนของการให้ความร้อน การใช้ความดัน การเติมสารเคมีหรือสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ รวมทั้งการใช้สารออกซิไดซ์ซึ่งในการทำความสะอาดวัตถุดิบก่อนการแปรรูป (ตารางที่ 3) (Akhtar et al., 2009; Juneja, 2006; Novak and Yuan, 2004a,b; Juneja et al., 2001; Juneja and Marmer,1996; de Jong, 1989) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่น และความปลอดภัยในการบริโภคอาหารชนิดต่าง ๆ ทั้งอาหารสด และอาหารแปรรูป ปัจจุบันมีการศึกษาใช้สารออกซิไดซ์ซึ่งลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กันมาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการใช้เป็นน้ำล้างทำความสะอาดในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์แปรรูปและอุตสาหกรรมผักผลไม้ส่งออก รวมทั้งการนำมาใช้ล้างวัตถุดิบตั้งต้นของอาหารแปรรูปหลายชนิด สารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ส่วนมากเป็นพวกคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีน เช่นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ คลอรีนไดออกไซด์

โซเดียมไบซัลไฟท์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และแคลเซียมคลอไรด์ (Izumi, 1999) เป็นต้น คลอรีนมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้กว้างขวาง แม้ใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยในเวลาอันสั้น แต่งานวิจัยในปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของคลอรีน เนื่องจากเมื่อนำมาใช้กับสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเช่น สารไตรโคลซาน (triclosan) ที่มีในเขียงจะทำให้เกิดพวกสารคลอโรฟอร์ม (chloroform) ซึ่งอาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ได้ นอกจากนี้ Stevens (1982) รายงานว่าคลอรีนสามารถทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์และกระตุ้นให้เกิดสาร carcinogenic trihalomethane teratogenic trihalomethane และ haloacetic acid ได้ ในขณะที่คลอรีนไดออกไซด์จะไม่ทำปฏิกิริยา และเกิดสารพลอยได้ (by products) ที่เป็นอันตรายเหมือนการใช้คลอรีน (Keskinen et al., 2009)

ตารางที่ 3 การศึกษาการใช้กระบวนการต่าง ๆ เพื่อควบคุมและลดการปนเปื้อนของ *C. perfringens*

กระบวนการที่ใช้	ชนิดของอาหาร	สภาวะที่ใช้	จำนวนเซลล์/สปอร์ที่ลดลง	แหล่งอ้างอิง
การใช้ความร้อน	เนื้อวัวหมัก (เกลือ) ปรุงสุก	ให้อุณหภูมิที่ 60 °C นาน 1 ชม. จากนั้นลดอุณหภูมิผลิตภัณฑ์ลงตั้งแต่ 51-11°C ภายในเวลา 8 ชม.	ลดลงเป็นเส้นตรงตามอุณหภูมิและเวลา	Juneja et al. (2001)
การใช้ความร้อนร่วมกับความดัน	ผลิตภัณฑ์เนื้อ	ใช้ความดันร่วมกับกระบวนการให้ความร้อน (568 MPa, 73 °C, 10 min) (จำนวนสปอร์เริ่มต้น 6.0 log)	สปอร์ลดลงประมาณ 4.0 log	Akhtar et al. (2009)
การใช้สารยับยั้ง	ผลิตภัณฑ์ซูวี (ไก่งวง) (sous-vide turkey products)	ใช้โซเดียมไพโรฟอสเฟต (0.3%) ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ (0, 1, 2, or 3%) ยับยั้งการงอกสปอร์ (จำนวนสปอร์เริ่มต้น 2.5 log)	การใช้โซเดียมคลอไรด์ (3%) เพียงชนิดเดียวที่ 28 °C ชะลอการงอกของสปอร์ได้นาน 12 ชม. ที่ 15 °C ชลอได้นาน 72 ชม.	Juneja and Marmer (1996)
การใช้สารยับยั้ง	ถั่วงอกในน้ำเกลือบรรจุกระป๋อง (พีเอช 4-4.5)	น้ำเกลือที่มีสปอร์ Brine with contain 10^3 ปรับพีเอชเป็น 3.2, 3.5, 3.7, 4.0, 4.2 และ 4.5 ด้วยกรดแลคติก (10%) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M)	ที่พีเอช <3.7 ไม่พบการเจริญของ *C. perfringens* ที่ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ แต่ที่พีเอช 3.7 พบการเจริญของเชื้อ 2 สายพันธุ์	de Jong (1989)
การใช้สารยับยั้ง	เนื้อไก่งวงบดในซอส (เนื้ออก)	ใช้โซเดียมแลคเตต (1%) และโซเดียมอะซีเตต (1%) แช่เย็น 15 ชม. ใช้โซเดียมไดอะซีเตต (1%) แช่เย็น 15, 18 และ 21 ชม. (จำนวนสปอร์เริ่มต้น 2.8 log)	ลดสปอร์ลงได้ > 1.8 log ลดสปอร์ลงได้ > 1.8 log	Juneja and Thippareddi (2004)
การใช้สารยับยั้ง	ผลิตภัณฑ์ซูวีเนื้ออกไก่ในน้ำซอส (sous-vide chicken products)	ใช้โซเดียมแลคเตต (0, 1.5, 3, และ 4.8%) ยับยั้งการงอกของสปอร์ในระหว่างการเก็บรักษาที่ 25 °C นาน 480 ชม. (จำนวนสปอร์เริ่มต้น 2.5 log)	ณ อุณหภูมิ 19 °C ที่ความเข้มข้น 4.8% ไม่พบสปอร์ของ *C. perfringens* ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 1.5 และ 3% สปอร์ไม่สามารถงอกได้	Juneja (2006)

ตารางที่ 3 การศึกษาการใช้กระบวนการต่าง ๆ เพื่อควบคุมและลดการปนเปื้อนของ *C. perfringens* (ต่อ)

กระบวนการที่ใช้	ชนิดของอาหาร	สภาวะที่ใช้	จำนวนเซลล์/สปอร์ที่ลดลง	แหล่งอ้างอิง
การใช้สารออกซิไดซ์ซิ่ง	เนื้อวัวบรรจุสุญญากาศ	ใช้สารละลายโอโซน (5 ppm O_3 ที่ 4 °C นาน 5 นาที) ร่วมกับบรรจุแบบสุญญากาศ และความร้อนที่ 60 °C นาน 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 25 และ 37 °C 1. ใช้ความร้อนร่วมกับบรรจุแบบสุญญากาศ (ควบคุม) 2. ใช้โอโซนร่วมกับบรรจุแบบสุญญากาศ 3. ใช้โอโซนร่วมกับบรรจุแบบสุญญากาศแล้วให้ความร้อน	**ที่อุณหภูมิ 25 °C** แบบที่ 1. ลดสปอร์ลงได้ 0.06 log แบบที่ 2. ลดสปอร์ลงได้0.72 log แบบที่ 3. ลดสปอร์ลงได้ 0.76 log **ที่อุณหภูมิ 37 °C** แบบที่ 1. ลดสปอร์ลงได้ 0.58 log แบบที่ 2. ลดสปอร์ลงได้ 0.97 log แบบที่ 3. ลดสปอร์ลงได้ 1.49 log	Novak and Yuan (2004a)
การใช้สารออกซิไดซ์ซิ่ง	ผิวหน้าเนื้อวัว	ใช้ความร้อนและโอโซน	ลดเซลล์ลงได้ 2.09 log ลดสปอร์ลงได้ 1.24 log	Novak and Yuan (2004b)
การใช้แสงร่วมกับ TiO_2	น้ำดื่ม	ใช้ *Degussa*-Ti alloy electrode เวลาในการฉายรังสีนาน 120 นาที	ลดสปอร์ลงได้ 2.53 log (99.7%)	Dunlop et al. (2008)
การใช้แสงร่วมกับไทเทเนียมไดออกไซด์ (Titanium Dioxide: TiO_2)	น้ำธรรมชาติ	ใช้ photolysis และ TiO_2 photocatalysis: 1. Light treatment *นาน 5 นาที, **นาน 30 นาที 2. Combined light/TiO_2 system *นาน 5 นาที 3. Light/H_2O_2 and light/TiO_2/H_2O_2 *นาน 5 นาที	*ลดเซลล์ลงได้ 1.2 log, **ลดสปอร์ได้ <0.5 log *ลดเซลล์ลงได้ 6.0 log, ลดสปอร์ได้ 0.6 log *ลดเซลล์ลงได้ >6.0 log, ลดสปอร์ได้ 1.0 log	Lanao et al. (2010)

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำสารออกซิไดซ์ซิ่งได้แก่ น้ำโอโซน (ozonate water) สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (aqueous chlorine dioxide solution) หรือน้ำอิเล็กโทรไลซ์ (electrolyzed oxidizing: EO) มาใช้เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อโรคดังกล่าวมากขึ้น เนื่องจากสารฆ่าเชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติสามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อของเชื้อโรคแบบเฉียบพลันและมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งรา สปอร์ของรา ไวรัส และโปรโตซัวได้ดี (Foegeding, 1985; Foegeding and Hemstapat, 1985) ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของคลอรีนไดออกไซด์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น Rodgers et al. (2004) พบว่าการใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 ppm สามารถลดเชื้อ *L. monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 บนผิวแอปเปิ้ล ผักกาดหอม และแคนตาลูปได้มากกว่า 5 log CFU/g สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Zhang and Farber (1996) ที่พบว่าการใช้สารละลายคลอรีนได

ออกไซด์ความเข้มข้น 5 ppm เช่นเดียวกัน สามารถลด *L. monocytogenes* ในผักกาดหอมได้ 1.7 log CFU/g และล่าสุดในปี 2009 Keskinen et al. (2009) ได้ศึกษาถึงการใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากใบผักกาด-หอม ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 8 log CFU/g แช่ด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่มีคลอไรท์อิออน 20-200 ppm เป็นเวลานาน 2 นาที พบว่าสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่มีคลอไรท์อิออน 100 ppm มีประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดเชื้อลงได้มากกว่า 1.25 log CFU/g

ในขณะที่โอโซนเป็นสารออกซิไดซ์ซึ่งอีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์รุนแรง (Kim et al.,1999) การนำมาใช้นิยมผสมให้อยู่ในรูปของสารละลายโอโซน (aqueous ozone) ข้อดีของโอโซนคือเป็นก๊าซธรรมชาติที่ปราศจากสี มีพลังงานในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงและไม่เหลือสารพิษตกค้างใด ๆ นอกจากออกซิเจน (Xu, 1999) Foegeding (1985) ศึกษาการใช้โอโซนที่มีค่าพีเอช 3,4 และ 5 เพื่อยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* พบว่าค่าพีเอชที่เป็นกรดของสารละลายจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของโอโซนในการทำลายสปอร์ สารละลายโอโซนที่ความเข้มข้น 1.5 mg/L (1.5 ppm) พีเอชเท่ากับ 3 เวลานาน 15 นาที สามารถลดสปอร์ของ *B. cereus* ได้ 90-99.9% จากจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 CFU/ml ส่วนการใช้สารละลายโอโซนที่ความเข้มข้น 2.2 mg/L (2.2 ppm) พีเอชเท่ากับ 3 เวลานาน 15 นาที พบว่าสามารถลดสปอร์ของ *B. stearothermophilus* และ *C. perfringens* ได้ 60% จากจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^5 cfu/ml แสดงให้เห็นว่าสปอร์ของเชื้อแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อโอโซนแตกต่างกัน สปอร์ของ *B. stearothermophilus* และ *C. perfringens* มีความต้านทานสูงกว่าสปอร์ของ *B. cereus* จากการศึกษานี้ยังพบว่าสปอร์ของ *B. cereus* ที่ไม่มี coat protein เริ่มต้น 5.5×10^6 CFU/ml เมื่อสัมผัสด้วยสารละลายโอโซนที่ความเข้มข้น 0.2 mg/L (0.2 ppm) พีเอชเท่ากับ 3 เวลานาน 15 นาที จะสามารถลดจำนวนสปอร์ดังกล่าวลงได้ 99.995% แสดงให้เห็นว่า spore coat เป็นเกราะป้องกันด่านแรกต่อการทำลายด้วยโอโซน นอกจากนี้ยังมีการใช้สารละลายโอโซน กับผิวหน้าชิ้นเนื้อวัวขนาด (7.5×10.0×1.0 cm) ที่ความเข้มข้น 5 ppm กวนนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่พบการงอกและการเจริญของสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* หลังเก็บแบบสุญญากาศ (vacuum packaged storage) ที่ 25 °C นาน 1 วัน ในขณะที่การเก็บเนื้อวัวล้างด้วยน้ำโอโซน 5 ppm ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าป้องกันการงอกและการเจริญของสปอร์ของ *C. perfringens* (Novak and Yuan, 2003; Novaka and Yuan, 2004b) พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจะเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันของการให้ความร้อนหลังผ่านกระบวนการใช้โอโซนแล้ว สามารถลดจำนวนเซลล์ของ *C. perfringens* ลงได้ 2.09 log CFU/g และในขณะเดียวกันก็สามารถลด spores ของเชื้อดังกล่าวลงได้ 1.24 $\log_{10}$ spores/g (Novak and Yuan, 2004a) น้ำอิเล็กโทรไลซ์มีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในงานด้านการเกษตร งานทันตแพทย์ การแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร โดยพบรายงานว่า น้ำอิเล็กโทรไลซ์เป็นสารทำลายจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อบนเขียง ซากสัตว์ปีก ไข่ ผักกาดหอม เมล็ดอัลฟัลฟา (alfalfa) และต้นอ่อนงอก (อัลฟัลฟางอก) ลูกแพร์ แอปเปิ้ล ลูกพีช มะเขือเทศ สตรอเบอรี่ และอุปกรณ์เครื่องใช้ในการแปรรูปอาหาร

(Koseki et al., 2004a) เมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อที่มีใช้งานอยู่ทั่วไปน้ำอิเล็กโทรไลซ์มีประสิทธิภาพที่เหนือกว่าและมีราคาถูกกว่า ข้อดีที่โดดเด่นที่สุดของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ คือ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้โดยมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพผู้ใช้น้อยมาก เนื่องจากในกระบวนการผลิตน้ำ อิเล็กโทรไลซ์นี้ไม่มีการเติมสารเคมีอันตรายใด ๆ ลงไป นอกจากนี้ได้มีผลพิสูจน์ว่า น้ำอิเล็กโทรไลซ์ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Mori et al., 1997) และมีประสิทธิรวมทั้งราคาถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันการเน่าเสียที่มีการใช้อยู่แต่เดิม เช่น กลูตาราลดีไฮด์ (Sakurai et al., 2003; Sakurai et al., 2002) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และกรดอะซีติก เป็นต้น (Ayebah and Hung, 2005) จากรายงานของ Osafune et al. (2006) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ในการทำลายหรือฆ่าแบคทีเรีย *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* และ *Bacillus sphaericus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลซ์จะมีผนังเซลล์เหี่ยวย่นและมีรูกลมจนเห็นโครงสร้างส่วนที่เป็นไซโตพลาสซึมของเซลล์ Izumi (1999) ได้แสดงให้เห็นว่าน้ำอิเล็กโทรไลซ์สามารถนำมาใช้ในการทำความสะอาดพืชผลที่ตัดแต่งแล้ว เช่น แครอท พริกหวาน ผักขม หัวไชเท้าญี่ปุ่น (Japanese radish) และมันฝรั่ง เป็นต้น เมื่อนำผักสดที่ตัดแต่งแล้ว มาลดจำนวนเชื้อด้วยน้ำอิเล็กโทรไลซ์ (pH 6.8, 20 mg/l free chlorine) โดยการจุ่มแช่ การล้างด้วยน้ำไหลผ่านหรือจุ่มแช่แล้วเป่าแห้ง ผลปรากฏว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ 0.6–2.6 logs CFU/g เมื่อตรวจปริมาณคลอรีนในน้ำอิเล็กโทรไลซ์พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลซ์ที่มีคลอรีน 50 mg/l จะให้ผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียมากกว่าน้ำอิเล็กโทรไลซ์ที่มีคลอรีน 15 หรือ 30 mg/L นอกจากนี้ยังพบว่าทรีตเมนต์ที่ทดลองศึกษาไม่ทำให้พืชผลตัดแต่งที่ศึกษามีการเปลี่ยนสีแต่อย่างใด ส่วน Koseki and Itoh (2001) ได้ศึกษาผักกาดหอมที่ล้างด้วยน้ำอิเล็กโทรไลซ์เบสเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการล้างด้วยน้ำอิเล็กโทรไลซ์กรด 1 นาที และทรีตเมนต์ที่ล้างโดยใช้น้ำอิเล็กโทรไลซ์กรดเพียงอย่างเดียวเป็นเวลา 10 นาที พบว่าทั้ง 2 ทรีตเมนต์ สามารถลดจำนวน aerobic bacteria ลงได้ 2 log CFU/g ในขณะที่การล้างด้วยน้ำอิเล็กโทรไลซ์-กรดซ้ำสองครั้งไม่ได้ช่วยให้การลดลงของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ต่อมาในปี 2004 Koseki และคณะทดลองใช้น้ำอิเล็กโทรไลซ์เบสอุ่น (อุณหภูมิ 50 °C) ในการล้างผักกาดหอมเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้น้ำอิเล็กโทรไลซ์กรดที่แช่เย็น อุณหภูมิ 4 °C ล้างต่อเป็นเวลา 1 หรือ 5 นาที และพบว่าทรีตเมนต์ที่ศึกษาสามารถลดทั้งจำนวน *E. coli* O157:H7 และ *Salmonella* ลงได้ 3–4 log CFU/g (Koseki et al., 2004c) และในปีเดียวกันนี้เอง Koseki และคณะยังได้รายงานว่าแตงกวาที่ล้างด้วยน้ำอิเล็กโทรไลซ์เบส (pH 11.3 ORP -870 mV) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำอิเล็กโทรไลซ์ หรือ EO (pH 2.6 ORP 1130 mV และ free chlorine 30 mg/l) เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มแอโรบิกมีโซไฟล์ได้มากกว่าการใช้วิธีการแช่เพียงอย่างเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการล้างระหว่างน้ำอิเล็กโทรไลซ์ (30 mg/l free chlorine) น้ำโอโซน (ozonated water; 5 mg/l ozone) หรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite solution; NaOCl, 150 mg/l free chlorine) เป็นเวลา 10 นาที พบว่าสามารถทำให้การลดลงของจุลินทรีย์มากขึ้นกว่าเดิมอย่างน้อย 2 log CFU ต่อผลแตงกวา (Koseki et al., 2004b)

7.สรุปผล

C. perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนที่สามารถสร้างสปอร์ได้จึงทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมในรูปของสปอร์ เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและอาหาร สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษพบได้ในดิน น้ำ ฝุ่นละออง อาหาร เครื่องเทศ และยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้เล็กของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *C. perfringens* เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเซลล์หรือสปอร์ของเชื้อดังกล่าวเข้าไปเป็นจำนวนมาก แบคทีเรียจะสร้างสปอร์ในขณะที่อยู่ในลำไส้พร้อมทั้งสร้าง *C. perfringens* enterotoxin (CPE) ออกมา เป็นผลให้เกิดอาการท้องเสีย หรือท้องร่วงอย่างรุนแรง ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อ ได้แก่ สารอาหาร ปริมาณออกซิเจนอุณหภูมิ ค่าพีเอช และค่า a_w โดยในระบบของอาหารแต่ละปัจจัยการเจริญและการสร้างสปอร์นี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและวิธีการผลิต การปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อชนิดนี้พบได้ทั้งในประเทศที่กำลังพัฒนา และประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งพบได้ในอาหารหลากหลายชนิด ได้แก่ ไส้กรอกสด ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก และเนื้อสัตว์ อาหารแช่เยือกแข็งพร้อมปรุง ผักและผลไม้ น้ำพริก และเครื่องเทศ การปนเปื้อนดังกล่าวทำให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรม ทั้งในส่วนที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพอาหาร เช่น อายุการเก็บรักษาและด้านความปลอดภัยอาหาร เช่น ในน้ำพริก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการหาวิธีการควบคุม ลด หรือทำลายเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* ในกระบวนการผลิตอาหาร มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น การใช้ความร้อน สารเคมีและสารยับยั้งการเจริญ หรือการใช้สารออกซิไดซ์ซึ่งในกระบวนการล้าง (เช่น โอโซน คลอรีนไดออกไซด์ หรือน้ำอิเล็กโทรไลซ์กรด ที่เป็นสารฆ่าเชื้อทางเลือกใหม่ที่นำมาใช้แทนที่สารประกอบคลอรีน เป็นต้น) เป็นต้น มีรายงานว่าโอโซน คลอรีนไดออกไซด์ และน้ำอิเล็กโทรไลซ์กรด มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ แม้ใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (ประมาณ 1–3 ppm, 5–10 ppm และ 50-70 ppm ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลในการนำสารออกซิไดซ์ซึ่งทั้ง 3 ชนิด มาใช้เพื่อลดจำนวนเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* ดังนั้นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกซิไดซ์ซึ่งในอนาคตจึงควรมุ่งประเด็นการนำสารดังกล่าวมาใช้ในสภาวะที่เหมาะสม (ความเข้มข้น และระยะเวลาสัมผัส) เพื่อลดหรือทำลายเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* ที่ปนเปื้อนในอาหาร และผลิตผลทางการเกษตรแต่ละชนิด

8.เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2553). เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร. (ฉบับที่ 2). กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

ชิดชม ฮิรางะ วราภา มหากาญจนกุล สิริพร สธนเสาวภาคย์ และสุขเกษม สิทธิพจน์. (2547). การพัฒนาคุณภาพและมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำพริกในโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชิดชม ฮิรางะ สุขเกษม สิทธิพจน์ สิริพร สธนเสาวภาคย์ และวราภา มหากาญจนกุล. (2548). การพัฒนากระบวนการผลิตและการบรรจุของผลิตภัณฑ์น้ำพริกชนิดเปียก. แหล่งที่มา: http://www.rdi.ku.ac.th/exhibition/Year2548/01-KasetNational/Project/index_72.htm, วันที่สืบค้น 4 ตุลาคม 2553.

ไทยรัฐ. (2542). อันตรายในพริกป่น. คอลัมน์มันกับอาหาร. ฉบับวันที่ 16 เมษายน, หน้า 7.

ไทยรัฐ. (2547ก). พริกแกงหากินง่าย แต่ไม่สบายท้อง. คอลัมน์มันกับอาหาร. ฉบับวันที่ 17 กันยายน, หน้า 7.

ไทยรัฐ. (2547ข). จุลินทรีย์ในเครื่องแกง. คอลัมน์มันกับอาหาร. ฉบับวันที่ 17 กันยายน, หน้า 7.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). จุลชีววิทยาทางอาหาร. (พิมพ์ครั้งที่ 1). โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิริพร สธนเสาวภาคย์ ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และกาญจนิจ วาจนะวินิจ. (2538). สุขลักษณะของน้ำพริกสำเร็จรูป. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ 29(4): 471–478.

สิริพร สธนเสาวภาคย์ ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และกาญจนิจ วาจนะวินิจ. (2539). การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในวัตถุดิบสำหรับผลิตน้ำพริกสำเร็จรูปและการศึกษาระยะเวลาในการอบเพื่อลดปริมาณ. Kasetsart J. (Nat. Sci.) (30): 193–199.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมพริกแห้ง. มอก.456/2526.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และสุมาลี บุญมา. (2544). การสำรวจเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารพร้อมปรุงที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาเก็ตจากเขตพื้นที่ 3 จังหวัด. ภาควิชาจุลชีววิทยาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตว์แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ. (2548). คลอสตริเดียมเปอร์ฟริงเจนส์ที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. (พิมพ์ครั้งที่ 1). บริษัทสยาม แอดมินนิสเทรทีฟ แมเนจเม้นท์ จำกัด. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

Abdullahi, I.O, V.J. Umoh, J.B. Ameh and M. Galadima. (2006). Some hazards associated with the production of a popular roasted meat (*tsire*) in Zaria, Nigeria. Food Control 17 (5): 348–352.

Aguileraa, M.O., P.V. Stagnitta, B. Micalizzi and A.M. Stefanini de Guzmana. (2005). Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. Anaerobe (11): 327–334.

Akhtar, S,. D. Paredes-Sabja, J.A. Torres and M.R. Sarker. (2009). Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. Food Microbiology (26): 272–277.

Ayebah, B. and Y.C. Hung. (2005). Electrolyzed water and its corrosiveness on various surface materials commonly found in food processing facilities. Journal of Food Process Engineering (28): 247–264.

Banerjee, M. and P.K. Sarka. (2003). Microbiological quality of some retail spices in India. Journal of Food Research International (36): 469–474.

Bean, N.H., J.S. Goulding, C. Lao and F.J. Angulo. (1996). Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992. Morbidity and Mortality Weekly Report (45): 1–66.

Beckers, H.J. (1986). Incidence of foodborne diseases in the Netherlands: Annual summary – 1981. Journal of Food Protection (49): 924–931.

Blaschek, H.P. (1999). *Clostridium perfringens In* Robinson, R.K., C.A. Batt and P.D.Patel. Encyclopedia of Food Microbiology. New York: USA. Academic Press. p. 433–438.

Blaschek, H.P. (2000). *Clostidium pertringens* ln Robinmson, R.K., C.A. Batt, and P.D Patel.(eds). Encyclopedia of Food Microbiology. 1st ed. New York: USA. Academic Press. p. 433-438.

Borriello, S.P., H.E. Larson, and A.R.Welch. (1984). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a

possible cause of antibiotic-associated diarrhea. Lancet (i): 305–307.

Borriello, S.P. (1995). Clostridial diseases of the gut. Clinical Infectious Diseases (20): 242–250.

Boyd, M.J., A. Logan and A.A. Tytell. (1984). The Growth Requirements of *Clostridium perfringens* BP6K. Journal of Biological Chemistry (174): 1013–1025.

Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiology (28): 177–182

Cary, J.W., J.E. Linz and D. Bhatnagar. (2000). Microbial Foodborne Diseases: Mechanisms of Pathogenesis and Toxin Synthesis. 1st ed. Pennsylvania: USA. Technomic Publishing Company Inc.

De Jong, J. (1989). Spoilage of an acid food product by *Clostridium perfringens, C. barati* and *C. butyricum*. International Journal of Food Microbiology (8): 121–132.

Dilbaghi, N. and S. Sharma. (2007). Food and Industrial Microbiology: Food spoilage, food infections and intoxications caused by microorganisms and methods for their detection. Available source:http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/386/2/FoodSpoilage.pdf, February 1, 2011.

Dworkin, J. and R. Losick. (2005). Developmental commitment in a bacterium. Cell (121): 401–409.

Duncan, C.L. (1976). *Clostridium perfringens* p. 170–197 *In*: de Figueiredo, M.P. and D.F. Splittstoesser. Food Microbiology. (1st ed). CT: AVI, Westport: USA. Public Health and Spoilage Aspects.

Duncan, C.L. and D.H. Strong. (1968). Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. Journal of Applied Microbiology 16: 82–89.

Dunlop, P. S.M., T.A. McMurray, J.W.J. Hamilton and J.A. Byrne. (2008). Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* spores on TiO_2 electrodes. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry (196): 113–119.

Dürre, P. and C. Hollergschwandner. (2004). Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. Anaerobe (10): 69–74.

Ellner, P.D. (1956). A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*. Journal of Bacteriology (71): 495–496.

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nature Reviews Microbiology (1): 117–126.

Finegold, S. (1977). Anaerobic Bacteria in Human Disease. New York: USA. Academic.

Foegeding, P M. (1985). Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. Food Microbiology (2): 123–134.

Foegeding, P.M. and V. Hemstapat. (1985). Chlorine dioxide inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores and importance of the spore coat to resistance. Journal of Food Science (51): 179–201.

Gorbach SL. (1998). *Clostridium perfringens* and other *Clostridia*. *In* Gorbach, S.L., J.G. Bartlett and N.R. Blacklow. Infections Diseases. (2nd ed). Philadelphia: USA. Pa: W.B. Saunders Co.

Gough, B.J. and J.A. Alford. (1965). Effect of curing agents on the growth and survival of food-poisoning strains of *Clostridium perfringens*. Journal of Food Science (30): 1025–1029.

Granum, P.E. and J.R. Whitaker. (1980). Improved method for purification of enterotoxin for

Clostridium perfringens type A. Applied and Environmental Microbiology (39): 1120–1122.

Groenewald, W.H., P.A. Gouws and R.C. Witthuhn. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. Food Microbiology (26): 71–76.

Izumi, H. (1999). Electrolyzed water as disinfectant for fresh-cut vegetables. Journal of Food Science 64(3): 536–539.

Jay, J.M. (1996). Moderm Food Microbiology. (5th ed.). New York: USA. Chapman and Hall.

Jay, J.M., M.J. Loessner and D.A. Golden. (2005). *Clostridium perfringens* of Medical and Public Health Importance and Laboratory Diagnosis. (7th ed.). New York: USA. Springer Science+Business Media, Inc.

Juneja, V.K. and B.S. Marmer. (1996). Growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in sous-vide turkey products. International Journal of Food Microbiology (32): 115–123.

Juneja,V.K., J.S. Novak, H.M. Marks and D.E. Gombas. (2001). Growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in cooked cured beef: Development of a predictive model. Innovative Food Science and Emerging Technologies (2): 289–301.

Juneja, V.K. and H. Thippareddib. (2004). Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. International Journal of Food Microbiology (93): 155– 163.

Juneja,V.K. (2006). Delayed *Clostridium perfringens* growth from a spore inocula by sodium lactate in sous-vide chicken products. Food Microbiology (23): 105–111.

Keskinen, L.A., A. Bruke and B.A. Annous. (2009). Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminated *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. International Journal of Food Microbiology (132): 134–140.

Kim, C.J, R. Cheney and M. Woodburn. (1967). Sporulation and *Clostridium perfringens* in a modified medium and selected foods. Journal of Applied Microbiology (15): 871–876.

Kim, J.M, T.S.Huang, M.R. Marshall, and C.I. Wei. (1999). Chlorine dioxide treatment of seafoods to reduce bacterial loads. Journal of food science 64(6): 1089–1093.

Koseki, S. and K. Itoh, K. (2001). Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions. Journal of Food Protection (64): 1935–1942.

Koseki, S., S. Isobe and K. Itoh. (2004a). Efficacy of acidic electrolyzed water ice for pathogen control on lettuce. Journal of Food Protection. (67X: 2544–2549.

Koseki, S., K. Yoshida, S. Isobe and K. Itoh. (2004b). Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial decontamination of cucumbers and straw-berries. Journal of Food Protection (67): 1247–1251.

Koseki, S., K. Yoshida, Y. Kamitani, S. Isobe and K. Itoh. (2004c). Effect of mild heat pre-treatment with alkaline electrolyzed water on the efficacy of acidic electrolyzed water against

Escherichia coli O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. Food Microbiology (21): 559–566.

Labbe, R.G. and C.L. Duncan. (1975). Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* type A. Journal of Applied Microbiology (29): 345–351.

Labbe, R.G. (1989). *Clostridium perfringens*. In: Doyle, M.P., (1st ed.). Foodborne Bacterial Pathogens. New York: USA. Marcel Dekker.

Lanao, M., M.P. Ormad, P. Goni, N. Miguel, R. Mosteo and J.L. Ovelleiro. (2010). Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO_2 photocatalysis with H_2O_2. Solar Energy (84): 703–709.

Lindström, M., A. Heikinheimo, P. Lahti and H. Korkeala. (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. Food Microbiology (28): 192–198.

McClane, B.A. (1997) .*Clostridium perfringens* p 305–326. *In* Doyle, M.P., L.R. Beuchat, and T.J. Montville. Food Microbiology: Fundamental and Frontiers. Washington D.C.: USA. ASM Press.

McClane, B.A., (2007). *Clostridium perfringens* p. 423–444. *In*: Doyle, M.P., L.R. Beuchat (Eds.), Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, (3rd ed.). Washington D.C.: USA. ASM Press.

Mori, Y., S. Komatsu and Y. Hata. (1997). Toxicity of electrolyzed strong acid aqueous solution-subacute toxicity test and effect on oral tissue in rats. Odontology (84): 619–626.

Naik, S. and C.L. Dancan. (1977). Enterotoxin formation in foods by *Clostridium perfringens* type A. Journal of Food Safety (1): 7–18.

Novak, J.S., J.T.C, Yuan. (2003). Viability of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* surviving mild heat or aqueous ozone treatment on beef followed by heat, alkali, or salt stress. Journal of Food Protection (66): 382–389.

Novak, J.S., J.T.C, Yuan. (2004a). Increased inactivation of ozone-treated *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores on fabricated beef surfaces using mild heat. Journal of Food Protection (67): 342–346.

Novak, J.S. and J.T.C. Yuan. (2004b). The fate of *Clostridium perfringens* spores exposed to ozone and/or mild heat pretreatment on beef surfaces followed by modified atmosphere packaging. Food Microbiology (21): 667–673.

Olsen, S.J., L.C. Mackinon, J.S. Goulding, N.H. Bean and L. Slutsker. (2000). Surveillance for foodborn – disease outbreaks-United States, 1993-97. Morbidity and Mortality Weekly Report (49): 1–51.

Osafune, T., T. Ehara and T. Ito. (2006). Electron microscopic studies on bactericidal effects of electrolyzed acidic water on bacteria derived from kendo protective equipment. Environmental Health and Preventive Medicine (11): 206–214.

Paredes, C.J. K.V. Alsaker and E.T. Papoutsakis. 2005. A comparative genomic view of Clostridial sporulation and physiology. Nature Reviews Microbiology 3: 969–978.

Rhodehamel, E.J. and S.M. Harmon. (2001). *Clostridium perfringens*: FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online. Available Source: http://www. fda.gov/Food/Science Research/LaboratoryMethods/Bacteriological

AnalyticalManualBAM/UCM070878, January 10, 2011.

Rodgers, S.L., J.N. Cash, M. Siddiq and E.T. Ryser. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli O157:H7* and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples lettuce strawberries andcantaloupe. Journal of Food Protection (67): 721–731.

Sacks, L.E. and P.A. Thompson. (1977). Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. Applied and Envi-ronmental Microbiology (34): 189–193.

Sacks, L.E. (1983). Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in a defined medium with or without guanosine. Applied and Environmental Microbiology (46): 1169–1175.

Sakurai, Y., K. Ogoshi, M. Kaku and I. Kobayashi. (2002). Strongly acidic electrolyzed water: Valuable disinfectant of endoscopes. Digestive Endoscopy (14): 61–66.

Sakurai, Y., M. Nakatsu, Y. Sato and K. Sato. (2003). Endoscope contamination from HBV-and HCV-positive patients and evaluation of a cleaning/disinfecting method using strongly acidic electrolyzed water. Digestive Endoscopy (15): 19–24.

Setlow, P. and E.A. Johnson. (2007). Spores and their significance. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.), Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Washington D.C.: USA. ASM Press. pp. 35–68.

Shandera, W.X., C.O. Tacket and P.A. Blake. (1983). Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. Journal of Infectious Diseases (147): 167–170.

Stevens, A.A. (1982). Reaction production of chlorine dioxide. Environmental Health Perspectives (46): 101–110.

Strong, D.H., J.C. Canada and B.B. Griffiths. (1993). Incidence of *Clostridium perfringens* in American Foods. Journal of Applied Microbiology (11): 42–44.

Todd, E.C.D. (1978). Foodborne disease in six countries-A comparison. Journal of Food Protection (41): 559–565.

Traci, P.A. and C.L. Duncan. (1974). Cold shock lethality and injury in *Clostridium perfringens*. Journal of Applied Microbiology (28): 815–821.

Vanderzant, C. and D. Splittstoesser. (1992). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (3rd ed.). Washington D.C.: USA. American Public Health Association (APHA).

Walden, W.C. and D.J. Hentges. (1975). Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. Journal of Applied Microbiology (30): 71–85.

Willardsen, R.R., F.F. Busta, C.E. Allen and L.B. Smith. (1978). Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. Journal of Food Science (43): 470–475.

Wringley, D.M. (1994). *Clostridium perfringens* p. 133–167. *In* Hui, Y.H., J.R. Gorham, K.D. Murrell, and D.O. Cliver. Foodborne Disease Handbook, disease caused by bacteria. (1st ed.). New York: USA. Marcel Dekker.

Xu, L. (1999). Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. Food Technology (53): 58–62.

Zhang, S. and J.M. Farber. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. Food Microbiology (13): 311–321.

❑❑❑❑❑