

บทปฏิบัติการที่ 1

ความรู้พื้นฐานสำหรับการปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาเป็นสถานที่ที่ควรปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากภายในห้องปฏิบัติการอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอากาศ บนพื้นห้องและบริเวณรอบๆได้ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นการสูดดม การสัมผัส เชื้อจุลินทรีย์จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพต่างๆ ตามมาได้ ผู้เรียนจึงควรปฏิบัติตามคำแนะนำดังต่อไปนี้อย่างเคร่งครัดเพื่อความปลอดภัยทั้งต่อตนเองและผู้อื่น

1 ข้อควรปฏิบัติในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

1.1 การแต่งกายให้ผู้เรียนสวมเสื้อคลุมสำหรับทำปฏิบัติการตลอดชั่วโมงการเรียน และหลังจากเสร็จสิ้นชั่วโมงการเรียนไม่ควรเก็บเสื้อคลุมไว้ภายในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในเสื้อคลุมได้ และควรทำความสะอาดเสื้อคลุมสำหรับปฏิบัติการทุกครั้งหลังใช้งาน



ภาพที่ 1.1 ตัวอย่างการแต่งกายสำหรับทำปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร

ผู้เรียนทุกคนต้องทำการล้างมือและสวมถุงมือทุกครั้งก่อนเริ่มทำปฏิบัติการ ผู้เรียนสวมรองเท้าหุ้มส้นพื้นกันลื่นเข้าทำปฏิบัติการ สำหรับนักศึกษาที่มีผมยาวเกินไหล่ให้ทำการรวบผมให้เรียบร้อยก่อนลงมือทำปฏิบัติการ และหากบทปฏิบัติการใดมีการใช้สารเคมีเข้าร่วมด้วย ผู้เรียนต้องใส่แว่นตาเพื่อป้องกันดวงตาซึ่งทางห้องปฏิบัติการจะจัดเตรียมไว้ให้ ดังภาพที่ 1.1

1.2 หากผู้เรียนทำเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการและใส่เสื้อคลุมปฏิบัติการให้นำเสื้อคลุมนั้นไปแจ้งแก่ผู้ควบคุมปฏิบัติการเพื่อทำการฆ่าเชื้อเสื้อคลุมนั้นก่อนนำไปทำการซักล้างต่อไป

1.3 ผู้เรียนต้องสวมถุงมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตลอดเวลาในระหว่างทำการทดลอง และในระหว่างการตรวจผลการทดลอง และไม่ควรใส่ถุงมือที่เก่า ขาด และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพราะอาจก่อให้เกิดการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ผิวหนังได้

1.4 ห้ามบริโภคเครื่องดื่มและอาหารในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหารโดยเด็ดขาด

1.5 ในการเขียนข้อความลงบนเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทุกชิ้น ให้ผู้เรียนเขียนโดยใช้ปากกาสำหรับเขียนแก้ว และไม่ควรนำส่วนใดๆของปากกาเขียนแก้วเข้าไปในปากโดยเด็ดขาด

1.6 ก่อนและหลังจากที่เสร็จสิ้นปฏิบัติการทุกครั้ง ผู้เรียนต้องทำการล้างทำความสะอาดมือและบริเวณแขนจนถึงข้อศอกด้วยน้ำยาสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทางห้องปฏิบัติการได้จัดเตรียมไว้ให้ และให้รีบกลับไปอาบน้ำชำระร่างกายให้สะอาดทุกครั้ง

1.7 หากมีการใช้ลูป (Loop) หรือเข็มเย็บเชื้อ (Needle) ในการขีดเชื้อจุลินทรีย์ ควรทำการลนไฟให้แดงและรอให้เย็นสักครู่ก่อนลงมือปฏิบัติการ และผู้เรียนต้องระวังความร้อนจากลูปหรือเข็มเย็บเชื้อ โดยไม่นำมือไปสัมผัส ลูปและระวังบริเวณปลายแหลมไม่ให้แทงเข้าสู่ผิวหนังและดวงตา ในกรณีที่ได้รับอุบัติเหตุจากความร้อนต้องแจ้งผู้ควบคุมปฏิบัติการทันทีเพื่อจะได้ทำการปฐมพยาบาลในเบื้องต้นได้ทัน

1.8 ผู้เรียนไม่ควรวางหลอดทดลองหรือที่เก็บหลอดทดลอง (Test tube racks) ไว้ใกล้ลมม้วนโต๊ะ และไม่ควรวางไว้บนบีกเกอร์ ควรหลอดทดลองไว้บนโต๊ะที่สามารถมองเห็นได้ง่ายและไม่หล่นลงพื้นได้ง่าย

1.9 ทางห้องปฏิบัติการได้จัดเตรียมไมโครปิเปต (Micropipette) เอาไว้ให้ใช้งานอย่างเพียงพอ เมื่อใช้งานเสร็จแล้วจะมีทิป (Tip) ที่ผ่านการใช้งานแล้ว ให้ผู้เรียนทิ้งทิปที่ผ่านการใช้งานแล้วลงในน้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทางห้องปฏิบัติการได้จัดเตรียมไว้เท่านั้น ห้ามนำไปทิ้งลงในถังขยะโดยเด็ดขาด

1.10 ให้ผู้เรียนทำการเก็บกวาดทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาอยู่เสมอหลังใช้งาน ให้ช่วยกันรักษาความสะอาดโดยหากมีขยะที่ต้องการทิ้งต้องพิจารณาว่าเป็นขยะติดเชื้อหรือไม่ โดยหากเป็นขยะที่ติดเชื้อมีทั้งลงในถังสีแดงที่ทางห้องปฏิบัติการจัดเตรียมไว้เท่านั้น และหากเป็นขยะทั่วไปให้ทิ้งลงในถังขยะสีเขียวที่ทางห้องปฏิบัติการได้จัดเตรียมไว้ให้

1.11 ภายหลังจากการทำปฏิบัติการและการตรวจผลการปฏิบัติการ ให้ผู้เรียนแยกอุปกรณ์ที่ต้องคืนส่งให้ทางห้องปฏิบัติการออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่มีเชื้อจุลินทรีย์ให้ทำการคืนโดยการใส่ถุง

ท่อนเพื่อนำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ทางห้องปฏิบัติการได้จัดเตรียมไว้ให้ และหากเป็นอุปกรณ์เครื่องแก้วปกติที่ไม่มีการสัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ให้ผู้เรียนล้างทำความสะอาดในอ่างล้างอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการก่อนนำคืนให้แก่เจ้าหน้าที่ทุกครั้ง

2 อุบัติเหตุที่อาจเกิดขึ้นและวิธีการปฏิบัติตัวเมื่อได้รับอุบัติเหตุ

อุบัติเหตุเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นได้เสมอ อุบัติเหตุที่อาจเกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ได้แก่

2.1 การทำสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่หกราบบนพื้นโต๊ะปฏิบัติการ กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์หกราบบนพื้นโต๊ะ ไม่ควรทำการเช็ดทำความสะอาดทันที ควรใช้แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ที่ทางห้องปฏิบัติการเตรียมไว้สเปรย์ให้ทั่วบริเวณสารละลายที่หก โดยราดน้ำยาทิ้งไว้ 15-30 นาที ก่อนที่จะทำความสะอาดและกลับมาทำปฏิบัติการ ณ บริเวณนั้นได้อีก

2.2 สำหรับโต๊ะปฏิบัติการใดที่ใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์หากไฟลุกท่วมตะเกียงหรือลูกบนโต๊ะที่มีแอลกอฮอล์หก เมื่อเกิดอุบัติเหตุขึ้นสิ่งแรกที่ผู้เรียนควรปฏิบัติคือการตั้งสติ จากนั้นให้ผู้เรียนรีบแจ้งต่ออาจารย์ หรือนักวิทยาศาสตร์ที่คุมปฏิบัติการทันที ในเบื้องต้นให้หาภาชนะ เช่น ปีกเกอร์ กาละมัง คว่ำลงในบริเวณที่มีไฟลุก เพื่อจำกัดออกซิเจนในบริเวณที่มีไฟลุกอยู่ให้หมดไป หรือคว่ำภาชนะนั้นจนกว่าไฟจะดับ หรือหากมีเพลิงไหม้เกิดขึ้น ให้มองหาถังดับเพลิงที่อยู่ด้านหน้าของห้องปฏิบัติการมาใช้ในการดับไฟ ถ้ามีควันไฟมากควรหมอบตัวให้ต่ำกว่าควันไฟและหาทางออกจากบริเวณนั้นหรือใช้บันไดหนีไฟที่อยู่ด้านข้างของตึกทันที

2.3 ในกรณีที่มีแก้วหรือได้กลืนแก้วหักตำเข้มข้นผิดปกติ ให้รีบแจ้งต่ออาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ที่คุมปฏิบัติการทันที ห้ามทำการจูดไฟโดยใช้ไม้ขีด ไฟแช็คหรือปืนจุดแก๊ส **โดยเด็ดขาด**

2.4 หากมีเครื่องแก้วแตกและหากเครื่องแก้วนั้นๆสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ให้ทำการเก็บกวาดโดยใช้อุปกรณ์ที่ทางห้องปฏิบัติการได้จัดเตรียมไว้ให้เท่านั้น จากนั้นให้นำอุปกรณ์และนำเศษเครื่องแก้วทั้งหมดไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปรวมกับเศษแก้วปกติต่อไป

2.5 ในห้องปฏิบัติการมีตู้ยาสำหรับปฐมพยาบาลเบื้องต้น ดังนั้นผู้เรียนจึงควรมองหาและทราบจุดที่ตั้งของตู้ยาสำหรับปฐมพยาบาลเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการนั้นๆ ทั้งนี้หากผู้เรียนมีอาการไม่สบายใดเกิดขึ้นในระหว่างการทำปฏิบัติการให้แจ้งต่ออาจารย์หรือนักวิทยาศาสตร์ทันที

3. การเตรียมอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคพื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยาอาหาร

อุปกรณ์ในการทำปฏิบัติการทางจุลชีววิทยามีอยู่มากมาย ซึ่งอุปกรณ์แต่ละชนิดมีวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (Aseptic) ก่อนนำมาใช้งานต่างกัน ดังนี้

3.1 เครื่องแก้ว เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขวดรูปชมพู่ (Flask) และปิเปตต์ (Pipettes) ควรนำมาทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยการนำไปวางไว้ในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อควรเก็บในกระบอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1.2) และปิเปตต์ควรเก็บในกระบอกปิเปตต์ให้เรียบร้อย โดยกระบอกสำหรับใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อและกระบอกปิเปตต์นี้ได้ออกแบบโดยการใช้วัตถุจากสแตนเลสเพื่อความคงทนและถูกสุขลักษณะ เมื่อนำจานอาหารหรือปิเปตต์ใส่เข้าไปในกระบอกแล้วควรหมุนรูของตัวกระบอกและปากกระบอกให้ตรงกัน เมื่ออบจนครบ 3 ชั่วโมงแล้ว ควรรอให้เครื่องแก้วเย็นเสียก่อนที่จะเปิดตู้อบได้



ก.



ข.



ค.

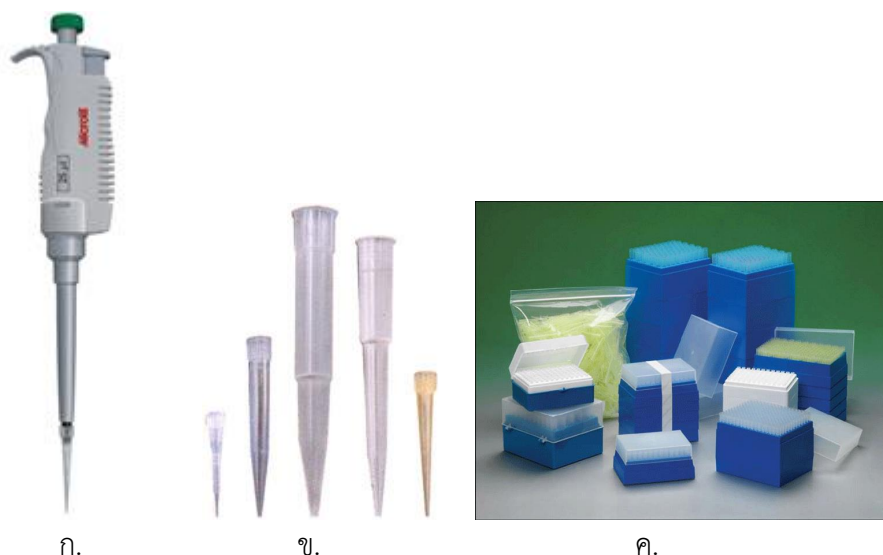
ภาพที่ 1.2 ขั้นตอนการทำให้จานอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

ก = การนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในกระบอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข = การปิดฝากระบอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค = การอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2 ไมโครปิเปตต์และทิป (Micropipette and Tip) ไมโครปิเปตต์และมีทิปสำหรับดูดของเหลวดังภาพที่ 1.3 ซึ่งไมโครปิเปตต์มีทั้งแบบที่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันได้ แต่บางชนิดไม่สามารถนำไปใส่ในหม้อนึ่งความดันได้ ดังนั้นควรสังเกตข้อความข้างไมโครปิเปตต์ที่เขียนว่า Autoclavable จึงสามารถนำไปใส่ในหม้อนึ่งได้ นอกจากนั้นทิปที่ใช้สำหรับดูดของเหลว ควรนำไปใส่ในกล่องสำหรับเก็บทิป แล้วนำทั้งกล่องนั้นไปใส่ในหม้อนึ่ง



ภาพที่ 1.3 ไมโครปิเปตต์และทิป ก = ไมโครปิเปตต์ ข = ทิป ค = กล่องใส่ทิป

4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละประเภททำให้วิเคราะห์ผลทางด้านจุลชีววิทยาได้ถูกต้อง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อในปัจจุบันได้พัฒนามาเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูปซึ่งสามารถนำมาละลายในน้ำกลั่นและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อใช้ได้เลย

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อกับแหล่งอาหารของเชื้อแบคทีเรีย

การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารจำเป็นต้องได้รับอาหารจากแหล่งต่างๆ โดยสามารถจำแนกแหล่งอาหารที่สำคัญที่เชื้อแบคทีเรียต้องการดังนี้

แหล่งคาร์บอน

ในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องได้รับพลังงานจากแหล่งคาร์บอน ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต แหล่งคาร์บอนที่สำคัญคือน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวพวกกลูโคส (Glucose) ฟรุคโตส (Fructose) กาแลคโตส (Galactose) แลคโตส (Lactose) มอลโตส (Maltose) หรือน้ำตาลที่มีสายยาว จำพวกแป้ง เด็กซ์ทริน เป็นต้น เมื่อแบคทีเรียมีแหล่งคาร์บอนแล้ว แบคทีเรียจะผลิตเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อทำการย่อยแหล่งคาร์บอนนั้นๆ ดังนั้นการเติมอินดิเคเตอร์ (Indicator) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถใช้เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากการย่อยแหล่งคาร์บอนนั้นๆ โดยภายหลังจากการย่อยอาจพบกรดหรือด่างซึ่งทำให้สีของอินดิเคเตอร์นั้นเปลี่ยนไปตามสภาวะกรดหรือด่างที่เกิดขึ้น นอกจากนั้นแล้วยังสามารถพบการเปลี่ยนแปลงจากการย่อยคาร์บอนได้เช่นตรวจพบแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ในหลอดอาหาร เป็นต้น การจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามแหล่งคาร์บอนยัง

สามารถทำได้เพราะแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้หากมีน้ำตาลชนิดหนึ่งแต่กลับไม่เจริญเติบโต หากมีน้ำตาลชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น

แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนจัดเป็นแหล่งพลังงานรวมถึงแหล่งของสารอาหารที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยแหล่งไนโตรเจนส่วนใหญ่ได้มาจากโปรตีนทั้งจากสัตว์และจากพืช ตัวอย่างของแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อแบคทีเรีย เช่น โปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น สาร Peptic digest of animal tissue และ สาร Peptone ซึ่งเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้เพื่อสังเคราะห์เอ็นไซม์ต่างๆเพื่อนำไปทำกิจกรรมต่างๆของเซลล์รวมถึงนำไปสร้างโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย ใช้เพื่อสร้างพลังงานและใช้ในการเจริญเติบโต ทั้งนี้การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียอาจใช้ความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกันในแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน โดยเฉพาะความสามารถในการย่อยกรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

แหล่งเกลือแร่และวิตามิน

เกลือแร่ส่งผลในการควบคุมอิลคโตรไลต์ (Electrolyte) ของเซลล์ โดยควบคุมกระบวนการผ่านเข้าออกของสารอาหารและตัวเซลล์ เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญในเกลือที่เข้มข้นกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงใช้คุณสมบัตินี้ในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้ ส่วนวิตามินมีความสำคัญในการสร้างเอ็นไซม์ต่างๆสำหรับการดำรงชีวิต นอกจากนั้นแล้วในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดอาจผลิตวิตามินออกมาได้ เช่นวิตามินบีที่อาจถูกผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้มนุษย์ (Najjar และ Barrett, 1945) เป็นต้น

4.2 ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งออกได้ 4 ประเภทตามการใช้ประโยชน์โดยวัตถุประสงค์ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละประเภทแตกต่างกันออกไปดังนี้ (Bauman, 2007)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Enrichment

อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารที่อุดมสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพื่อช่วยในการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจให้มีปริมาณมากพอระดับหนึ่งจนสามารถเจริญเป็นโคโลนีให้สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าเมื่อต้องการตรวจสอบหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีนั้นในอาหารคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป หรือช่วยเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียให้มีปริมาณมากพอที่จะทำการทดสอบทางชีวเคมีได้ เพราะแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหาอาจมีจำนวนเซลล์ที่ได้รับการบาดเจ็บเป็นจำนวนมากในระหว่างการแปรรูป ทำให้อาจตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีนั้นๆแม้ว่าอาจปนเปื้อนในอาหาร การเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร Enrichment จึงจำเป็นต้องใช้เวลาตั้งแต่ 6 ถึง 24 ชั่วโมงแล้วแต่ชนิดของอาหาร อาหารเลี้ยงเชื้อ Enrichment อาจมีการเติมสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งลงไปด้วย เพื่อทำให้โอกาสในการ

ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนั้นมีสูงขึ้น หรือในบางครั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการนำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อหาว่าปนเปื้อนในอาหารหรือไม่ อาจมีปริมาณน้อยมากโดยเฉพาะในอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้วอาจมีโอกาสดตรวจพบได้น้อยกว่าการตรวจในวัตถุดิบสด บางกรณีอาจพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆปนเปื้อนอยู่มากเกินไปจึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ต้องตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทั้งที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรครอยู่ในอาหารนั้นๆ ทำให้จำเป็นต้องเพิ่มสารคัดเลือก (Selective agent) ซึ่งเป็นสารที่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหาสามารถเจริญได้แต่แบคทีเรียชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการไม่สามารถเจริญได้หากมีสารคัดเลือกนั้นๆ ข้อที่ควรระวังอีกประการคือหากพบแบคทีเรียที่ก่อโรคบางชนิดแม้ในปริมาณเล็กน้อยแต่อาจก่อให้เกิดโรคในมนุษย์หลังจากรับประทานได้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Enrichment จึงมีสารอาหารที่ทำให้เซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บฟื้นตัวหรือทำให้เชื้อจุลินทรีย์แข็งแรงก่อนที่จะนำไปทดสอบในขั้นต่อไป (Vaz-Velho และคณะ, 2001) แบคทีเรียบางชนิดต้องมีการบ่มเพื่อพักฟื้นเซลล์ถึง 2 ครั้งโดยครั้งแรกเรียกว่า Pre-Enrichment และครั้งที่ 2 เรียกว่า Enrichment

ปัจจัยเสริมที่ทำให้อาหาร Enrichment สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหา และส่งเสริมให้มีการฟื้นตัวของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับบาดเจ็บคือ การปรับให้มีค่า Osmotic stress ที่เหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหาเนื่องจากค่านี้มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรียในระยะ Lag phase (Shida และคณะ, 1975) ตัวอย่างเช่นการเติมเกลือและปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมในอาหาร Enrichment ของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* จะช่วยให้เซลล์ของแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถซ่อมแซมตัวเองได้อย่างรวดเร็ว รวมถึงมีการปรับตัวของเซลล์ในการหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยอาหารได้อย่างรวดเร็วและเหมาะสม (Taskila และคณะ, 2011)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือก โดยสามารถใช้คุณสมบัติที่แตกต่างกันของชนิดของเชื้อแบคทีเรียมาใช้ในการแยกแบคทีเรียที่ต้องการออกจากแบคทีเรียอื่นๆ จึงมีการเติมสารเคมีบางชนิดเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและคัดเลือกให้เฉพาะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการให้สามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ โดยหากเชื้อแบคทีเรียใดสามารถเจริญในอาหารคัดเลือกชนิดนั้นได้จึงสามารถระบุอย่างคร่าวๆได้ว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการ การใช้สารคัดเลือกเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียจึงให้ผลได้ในระดับหนึ่ง แต่เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ต้องการตรวจหาจึงควรนำโคโลนีที่พบบนอาหารคัดเลือกไปทำการตรวจยืนยันด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีอีกครั้งหนึ่ง ตัวอย่างของการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Selective ในการแยกเชื้อกลุ่มทนเกลือ (Halophilic bacteria) ออกมาจากเชื้อแบคทีเรียทั่วไปคือ การเติมเกลือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ให้ได้ความเข้มข้นในระดับหนึ่งที่เชื้อแบคทีเรียที่ทนความเค็มสามารถเจริญได้ส่วนเชื้อแบคทีเรียทั่วไปไม่สามารถเจริญได้ โดยหากพบโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่ผสมเกลือจึงทราบได้ในเบื้องต้นว่าแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ทนเกลือ แต่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดใดนั้นในกลุ่มแบคทีเรียที่ทนเกลือจะต้องทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Differential

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Differential เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ละชนิดขณะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเติมอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้ติดตามเพื่อบ่งบอกถึงคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหา โดยแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหาปรากฏโคโลนีที่มีสีจำเพาะ หรืออาจทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเปลี่ยนแปลงสีไปตามอินดิเคเตอร์นั้น เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol salt agar (MSA) มีการเติมอินดิเคเตอร์คือ Phenol red ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีสีแดง โดยหากเชื้อแบคทีเรียใดสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA แล้วสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol) ได้ จะทำให้เกิดสภาวะกรดเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้สีของอาหาร MSA เปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีเหลืองตามสภาวะของกรดที่สร้างขึ้น ดังนั้นผู้ทดสอบจึงสามารถอ่านผลได้จากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป (De Visscher และคณะ, 2013)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective/differential

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective/differential นี้ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ โดยเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกให้เชื้อแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น (Selective) และเมื่อเจริญแล้วสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนไปตามกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียดังนั้นจึงทำให้สีของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกัน (Differential) จนสามารถแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียเดียวกันออกจากกันได้ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar เป็นอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกโดยซึ่งมีการเติม Crystal violet ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและทำให้เชื้อแบคทีเรียแกรมลบเช่น แบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ทั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* สามารถเจริญเติบโตได้ (Brenner, 1984) เพราะสามารถทนต่อ Crystal violet ได้ และเมื่อเจริญแล้วมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตสได้ไม่เหมือนกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เติม Neutral red เป็นอินดิเคเตอร์โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ จึงให้สภาวะที่อยู่รอบๆโคโลนีเป็นกรดจึงปรากฏโคโลนีสีแดงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะที่แบคทีเรีย *Salmonella* สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้แต่ไม่ใช้น้ำตาลแลคโตส ดังนั้นโคโลนีที่ได้จึงไม่มีสีแดง

4.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งแบบแข็ง (Agar) และแบบเหลว (Broth) โดยปัจจุบันนี้มีอาหารสำเร็จรูปจำหน่ายทั่วไป การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำได้ง่ายเพียงทำการคำนวณหาปริมาณของอาหารเลี้ยง

เชื้อที่ต้องเติมลงในน้ำแล้วทำการละลายโดยใช้ความร้อน อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดสามารถนำมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลังจากต้มเดือดโดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้ออีก แต่โดยส่วนใหญ่แล้วหลังจากการต้มเพื่อละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมักต้องนำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีขั้นตอนง่ายๆเพียง 2 ขั้นตอนดังนี้

1 การคำนวณปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนแรกต้องทำการคำนวณหาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น หากต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ปริมาณ 300 มิลลิลิตร โดยปริมาณของอาหารสำเร็จรูป NA คือ 23 กรัมสามารถละลายในน้ำบริสุทธิ์ได้ 1 ลิตร ดังนั้นต้องตักอาหารสำเร็จรูป NA ในปริมาณ 6.9 กรัมเพื่อละลายในน้ำให้ได้ปริมาณ 300 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำมาต้มให้เดือดเพื่อละลายของแข็งทั้งหมดในน้ำ

2 การสเตอริไลซ์ (Sterilization)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเตรียมแล้วในขั้นตอนที่ 1 อาจนำไปเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปใช้งานได้เลยหากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทมีสารอาหารสูงและไม่ทนต่อความร้อน และหากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเติมสารที่ไม่ทนต่อความร้อน เช่น สารปฏิชีวนะและยูเรีย ต้องทำการเตรียมสารดังกล่าวแยกจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการนำสารที่เตรียมไว้มารองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอนแล้วจึงนำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการสเตอริไลซ์แล้ว ดังนั้นจึงควรอ่านคำแนะนำในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารสำเร็จรูปนั้นๆให้เข้าใจก่อนลงมือเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่หลังจากต้มเพื่อละลายในน้ำแล้วต้องนำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาทำให้ปลอดเชื้อก่อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ

รายละเอียดของสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถอ่านได้จากภาคผนวก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 ทำการคำนวณปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อจากฉลากที่ติดไว้ข้างขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้ง โดยก่อนใช้งานให้ตรวจสอบวันหมดอายุและเมื่อต้องการใช้งานให้ทำการบันทึกการใช้งานลงในสมุดบันทึกทุกครั้ง จากนั้นจึงมองหาปริมาณต่อกรัมของอาหารสำเร็จรูปที่ต้องละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร (1,000 มิลลิลิตร) แล้วนำมาคำนวณปริมาณของอาหารสำเร็จรูปที่ต้องการเตรียม

2 ทำการชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปตามที่คำนวณได้และเติมน้ำในปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นจึงนำมาต้มให้เดือดเพื่อละลายของแข็งทั้งหมดในน้ำ

3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ละลายทั้งหมดแล้วไปใส่ในขวดรูปชมพู่หรือขวดดูแลน (Duran) ปิดฝาให้เรียบร้อย ก่อนนำไปเข้าหม้อนึ่งความดัน

4 นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้หม้อนึ่งลดความดันและลดอุณหภูมิลงจนสามารถเปิดฝาทิ้งหม้อนึ่งความดันได้ (อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส) จึงนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วออกมานอกหม้อนึ่ง แล้วรอให้เย็นปริมาณ 45-50 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้งาน



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ก=ชั่งอาหาร ข= ต้มอาหารให้เดือด ค= นำเข้าหม้อนึ่งความดัน

เอกสารอ้างอิง

- Bauman, R.W. 2007. Microbiology with diseases by taxonomy. Pearson Benjamin Cummings, pp.831.
- Brenner, D.N. 1984. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 408-420.
- De Visscher, A., Haesebrouck, F., Piepers, S., Vanderhaeghen, W., Supré, K., Leroy, F., Van Coillie, E., De Vlieghe, S. 2013. Assessment of the suitability of mannitol salt agar for growing bovine-associated coagulase-negative Staphylococci and its use under field conditions. *Research in Veterinary Science*, 95(2): 347-351.
- Najjar, V.A., Barrett, R. 1945. The synthesis of B vitamins by intestinal bacteria. *Vitamins & Hormones*, 3: 23-48.
- Shida, T., Komagata, K., Mitsugi, K. 1975. Reduction of lag time in bacterial-growth: Effect of inoculum size and nutrients. *Journal of General and Applied Microbiology*, 21: 75-86.
- Taskila, S., Osmekhina, E., Tuomola, M., Ruuska, J., Neubauer, P. 2011. Modification of buffered peptone water for improved recovery of heat injured *Salmonella typhimurium* in minced meat. *Journal of Food Science*, 76(3): M157-M162.

Vaz-Velho, M., Duarte, G., Gibbs, P. 2001. Comparison of two pre-enrichments broths for recovering *Listeria* spp. from salmon (*Salmo salar*) and salmon-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control*, 12(6): 357-359.

บทปฏิบัติการที่ 2

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับรายงานว่าเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคท้องร่วงมาเป็นเวลาช้านาน โดยสายพันธุ์ที่ได้รับรายงานว่าก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในมนุษย์เป็นลำดับต้นๆได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis* และ *Salmonella typhimurium* (EFSA, 2009) เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถพบได้ในวัตถุดิบที่มาจากสัตว์ โดยเฉพาะจากสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก เช่น ไข่ (Martelli และ Davies, 2012; Miyamoto และคณะ, 1998; Seo และคณะ, 2003) เนื้อไก่ (El-Aziz, 2013; De Buck และคณะ, 2003; Sasai และคณะ, 1997; Schou และคณะ, 2010) อาหารทะเล เช่น กุ้ง (Feldhusen, 2000) ปลา (Heinitz และคณะ, 2000) เชื้อแบคทีเรียนี้ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารและก่อให้เกิดโรคระบบภูมิคุ้มกัน (Rasrinual และคณะ, 1988)

ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae โดย Family นี้มีเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารอยู่หลายชนิดเช่น เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia* เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* และเชื้อแบคทีเรีย *Yersinia* ทั้งนี้แบคทีเรีย *Salmonella* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง (Rod) เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) โดยสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียนี้แบ่งตามความแตกต่างของแฟลกเจลลา (Flagella) และชนิดของคาร์โบไฮเดรตในชั้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) (Coburn และคณะ, 2007) ในปัจจุบันพบสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียนี้อยู่ประมาณ 2,400 สายพันธุ์ตามชนิดของแอนติเจนคือ Somatic O antigens ซึ่งพบในส่วนที่เป็น Lipopolysaccharide (LPS) บนผิวด้านนอกของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้ทนต่อความร้อนและการซึมผ่านของแอลกอฮอล์รวมทั้งสารละลายกรดต่างๆได้ดี นอกจากนั้นยังมี Flagella (H) antigens ซึ่งจัดเป็นโปรตีนพวก Heat-labile และมี Capsular (K) antigen อีกด้วย (Lahiri และคณะ, 2010)

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ในอาหาร

1 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนขั้นต้น (Pre-enrichment) ขั้นตอนนี้นิยมใช้สารละลายบัฟเฟอร์ เช่น Buffered peptone water ซึ่งทำให้เซลล์สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ จากนั้นจึงนำไปหมักต่อในขั้นตอนต่อไป

2 ขั้นตอนการบ่มเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต (Enrichment) โดยทั่วไปแล้วเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* มักมีปริมาณเริ่มต้นน้อยในอาหารโดยเฉพาะอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้ว แต่ในปริมาณเล็กน้อยนี้อาจก่อให้เกิดโรคได้ ดังนั้นก่อนนำมาทำการตรวจหาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบคัดเลือก

จึงต้องทำการบ่มในอาหาร Enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ขั้นตอนการบ่มนี้ช่วยให้เซลล์ที่บาดเจ็บของเชื้อแบคทีเรียแข็งแรงและช่วยในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ (De Boer, 1998) โดยทั่วไปอาหาร Enrichment ที่นำมาใช้บ่มเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* คืออาหารที่มีคุณสมบัติเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ (Anon, 1993) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมเช่น อาหารเหลว Selenite cystine broth (SC) และ อาหารเหลว Tetrathionate broth (TT) (Massey, 1943)

3 ขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรีย (Isolation) สามารถทำได้โดยการขีด (Streak) เชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* ลงในจานอาหารที่ใช้ในการคัดเลือก (Selective media) โดยส่วนใหญ่เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตบนจานอาหารที่ใช้ในการคัดเลือก โคโลนีที่ปรากฏจะบ่งบอกคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียนี้เพื่อให้เห็นความแตกต่างกับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ส่วนมากแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในขั้นตอนนี้มักเติมสารคัดเลือก (Selective agents) เช่น สาร Bile salt สาร Deoxycholate salt สาร Brilliant green และสาร Bismuth sulfite ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและพวกแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่แบคทีเรียในทางเดินอาหารได้ เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส ซูโครส และ สารประกอบซาลิซิน (Salicin) ได้ ดังนั้นจึงไม่สร้างกรดจากแหล่งน้ำตาลดังกล่าว ตรงกันข้ามเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถสร้างด่างเพราะสามารถย่อยกรดอะมิโนได้ นอกจากนั้นยังสามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในขั้นตอนนี้คือ Xylose lysine deoxycholate (XLD) อาหาร Hektoen enteric (HE) agar และ Bismuth sulfite (BS) agar

4 ขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical identification) การทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้คือการทดสอบการเกิด Decarboxylation ของ lysine ในอาหาร LIA (Lysine iron agar) การหมักน้ำตาลกลูโคสในอาหาร TSI (Triple sugar iron agar) นอกจากนั้นแล้วอาหาร TSI ยังสามารถนำมาใช้ในการสังเกตการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ได้ โดยหากเชื้อแบคทีเรียสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้วจะสังเกตเห็นสีดำในหลอดอาหาร TSI ผลบวกของการทดสอบชีวเคมีอื่นๆของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* คือ เชื้อแบคทีเรียนี้ไม่สามารถใช้ยูเรียและไม่สามารถสร้างอินโดล

5 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmatory test) โดยการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (Antigen; Ag) ของเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยกับสารแอนติบอดี (Antibody; Ab) ของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ผลบวกจะพบตะกอนแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยนั้นเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite cystine (SC) broth

Leifson (1939) ได้รายงานผลของการใช้อาหาร SC broth โดยพบว่าการเติมสาร L-Cystine ลงในอาหารเหลวช่วยในขั้นตอนการ Pre-enrichment เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้

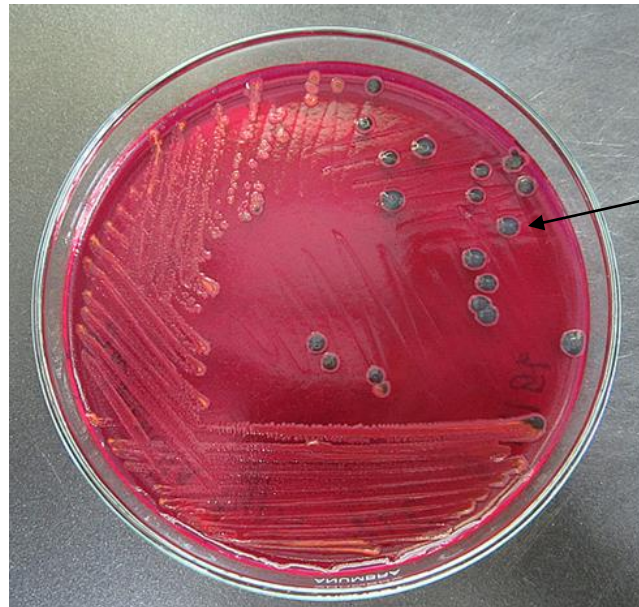
เกิดโรคไทฟอยด์ได้ โดยสารนี้ช่วยลดสารพิษจึงทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ได้ ต่อมาอาหารชนิดนี้จึงได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ตามวิธีการสากลของการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทั้ง AOAC (AOAC, 1995) และ FAD อาหารเลี้ยงเชื้อ SC broth มีส่วนผสมของเกลือโซเดียมเซเลไนต์ (Sodium selenite) ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งยกเว้นแบคทีเรีย *Salmonella*

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate (TT) broth

อาหาร TT broth มีสาร Peptone ที่เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโน คาร์บอนและวิตามินที่ช่วยให้แบคทีเรีย *Salmonella* เจริญได้อย่างสมบูรณ์ อาหารชนิดนี้เติมไอโอดีนเพื่อให้สาร Sodium thiosulfate เปลี่ยนไปเป็นสาร Tetrathionate ซึ่งสาร Tetrathionate เป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการ ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ Tetrathionase ทำให้สลายพิษของ Tetrathionate ได้ ดังนั้น *Salmonella* จึงสามารถเจริญได้ในอาหารชนิดนี้ นอกจากนั้นอาหารชนิดนี้ยังมีส่วนผสมของสาร Bile salt และสาร Brilliant green สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่ไม่ต้องการอีกด้วย (Knox และคณะ, 1942; Jeffries และคณะ, 1959)

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar

อาหารชนิดนี้สามารถใช้คัดเลือก (Selective) และบอกความแตกต่าง (Differential) ของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆได้ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีเกลือโซเดียมดีออกซีโคเลต (Sodium deoxycholate) เป็นสารสำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่พวกแบคทีเรีย Enterics นอกจากนั้นยังมี Ferric ammonium citrate และ Sodium thiosulfate ซึ่งทำให้เกิดโคโลนีที่มีสีดำตรงกลางอันเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สร้างเอนไซม์ Desulphydrase เพื่อเปลี่ยน Thiosulfate ให้กลายเป็นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้วเกิดปฏิกิริยากับ Ferric Ion (ภาพที่ 2.1) นอกจากนี้อาหาร XLD agar ใช้สาร Phenol red เป็น อินดิเคเตอร์ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีหากเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลไซโลส (Xylose) น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครสได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้เพียงชนิดเดียวจึงทำให้ความเป็นกรดไม่มาก ดังนั้น สีของ Phenol red ซึ่งทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์จึงไม่เปลี่ยนสี โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* จึงมีสีแดงล้อมรอบด้วยด่างที่ผลิตจากการปล่อยเอนไซม์ Decarboxylate lysine ไปย่อยกรดอะมิโนในอาหารได้ (Taylor, 1965)

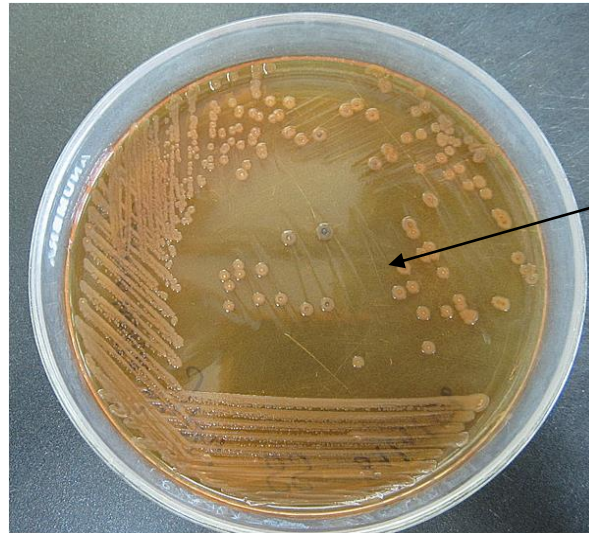


ผลบวกพบโคโลนีสีแดง
ล้อมรอบด้วยต่างตรงกลาง
มีสีดำ

ภาพที่ 2.1 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella Shigella* (SS) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* และ เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* ได้ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar มีสาร Bile salt สาร Brilliant green และสาร Sodium citrate สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก อาหารนี้ยังมีสาร Sodium thiosulphate เป็นส่วนผสมและโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถใช้ Thiosulphate แล้วให้ผลผลิตเป็นสาร Sulphite และแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferric) ที่มีอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้เกิดโคโลนีสีดำตรงกลางของสาร Ferrous sulphide ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Shigella* จะไม่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จึงพบโคโลนีที่ไม่มีสีดำบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar มีอินดิเตอร์คือ Neutral red ซึ่งสามารถเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีแดงหากมีกรดเกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรีย *Salmonella* ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ จึงไม่สร้างกรดให้เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นโคโลนีที่พบบนอาหาร SS agar คือ เกิดโคโลนีที่มีสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนี ดังภาพที่ 2.2



ผลบวกพบ
โคโลนีตรงกลาง
มีสีดำ

ภาพที่ 2.2 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar

5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfite (BS) agar

Wilson และ Blair (1927) ได้รายงานการใช้อาหาร BS agar ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยอาหาร BS agar มีส่วนผสมของสาร Brilliant green ทำหน้าที่เป็น สารคัดเลือก (Selective agent) สำหรับยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก มีสาร Bismuth สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coliforms และแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรีย *Salmonella* สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์มาทำปฏิกิริยากับ Ferrous sulfate (FeSO_4) ทำให้เกิดโคโลนีสีดำถึงเขียวบนจานอาหาร บางครั้งโคโลนีอาจมีสีโลหะวาวดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BS agar
ที่มา: Michigan State University (2013)

6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen enteric (HE) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ HE agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* และ เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* (King และ Metzger, 1968) โดยอาหารชนิดนี้มีสาร Bile salt และกรด Fuchsin ทำหน้าที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนั้นยังมีอินดิเคเตอร์ที่ชี้วัดความเป็นกรดที่เกิดจากการหมักคาร์โบไฮเดรตพวกแลคโตส ซูโครสคือ Bromothymol blue หากเชื้อแบคทีเรียผลิตรกรดจะทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจากสีฟ้าน้ำเงินเป็นสีเหลืองถึงส้มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่สำหรับ *Salmonella* ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลุ่มดังกล่าวเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นจึงไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร แต่จะเกิดโคโลนีที่มีสีดำตรงกลางอันเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ Desulfhydrase เพื่อเปลี่ยนสาร Thiosulfate ให้กลายเป็นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้วเกิดปฏิกิริยากับ Ferric ion นอกจากนั้นโคโลนียังมีสีน้ำเงินเขียวล้อมรอบ ส่วนแบคทีเรีย *Shigella* ไม่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ ดังนั้นโคโลนีจึงไม่มีสีดำ ดังภาพที่ 2.4



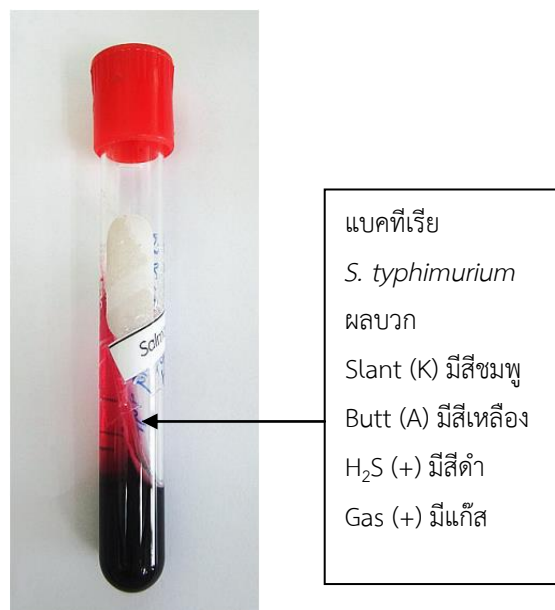
ภาพที่ 2.4 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* และแบคทีเรีย *Shigella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HE agar ที่มา: Thermo Fisher Scientific Inc (2013)

การทดสอบทางชีวเคมี

1 การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส

การทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลแลคโตสในอัตราส่วน 0.1:1.0:1.0 การทดสอบทำโดยการนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการนำมาทดสอบขีดลงที่ผิวหน้าของหลอดอาหารในส่วนที่เรียกว่า Slant จากนั้นจึงทำการแทง

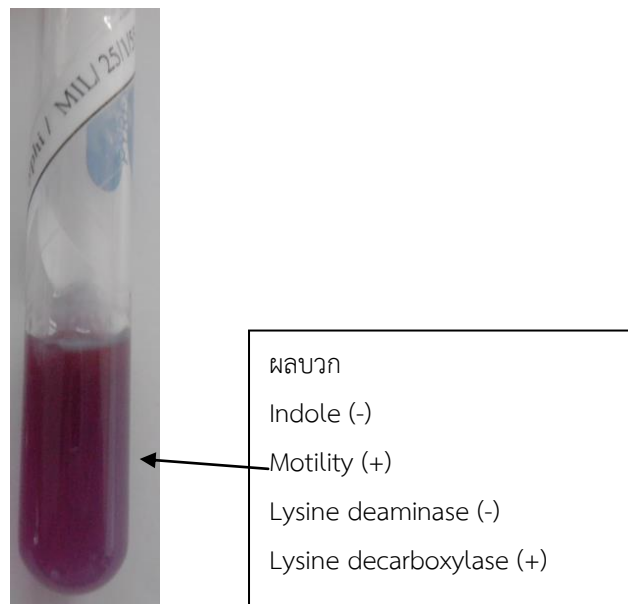
ลงสู่ส่วนล่างของหลอดอาหารเรียกว่าส่วน Butt ผลการทดสอบเกิดขึ้นได้ 3 กรณีคือ กรณีที่ 1 หากเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำตาลกลูโคสได้เท่านั้นจะทำให้ได้ผลทดสอบเป็น (Alkaline/Acid) คือ อาหารจะเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองเฉพาะที่ด้านล่างของหลอด กรณีที่ 2 หากเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครส ได้ทั้ง 3 ชนิดผลทดสอบเป็น (Acid/Acid) คือ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั่วทั้งหลอด และกรณีที่ 3 คือเชื้อแบคทีเรียไม่หมักน้ำตาลทั้งสามชนิดผลการทดสอบเป็น (Alkaline/Alkaline) หรือไม่พบการเปลี่ยนแปลงโดยหลอดอาหารจะไม่เปลี่ยนแปลงสีเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถผลิตกรด (Acid; A) ได้ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำโดยใช้น้ำตาลส่วนที่เป็นกลูโคสเท่านั้นจึงทำให้มีสีเหลืองที่ส่วนล่างของหลอด (Butt) ส่วนด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีสภาพมีออกซิเจน เชื้อแบคทีเรียจะใช้โปรตีนแล้วทำให้เกิดสภาพต่าง (Alkaline: K) ขึ้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงที่ผิวด้านบน (Slant) นอกจากนั้นยังสามารถสังเกตแก๊สที่เกิดขึ้นโดยการผลิตแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ *Salmonella* ทำให้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ ดังนั้นผลการทดสอบที่ได้จากการอ่านผลในอาหาร TSI คือ K (Slant) A (Butt) + (H₂S) + (Gas) สำหรับแบคทีเรีย *E. coli* จะให้กรดในส่วนของทั้ง Slant และ Butt รวมถึงสร้างแก๊สได้ แต่แก๊สนั้นไม่ใช่แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ ดังนั้นผลการทดสอบที่ได้จึงเป็น A (Slant) A(Butt) - (H₂S) + (Gas) ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 การเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* ในหลอดอาหาร TSI

2 การทดสอบการใช้ไลซีน การสร้างสารอินโดล และการดูผลการเคลื่อนที่

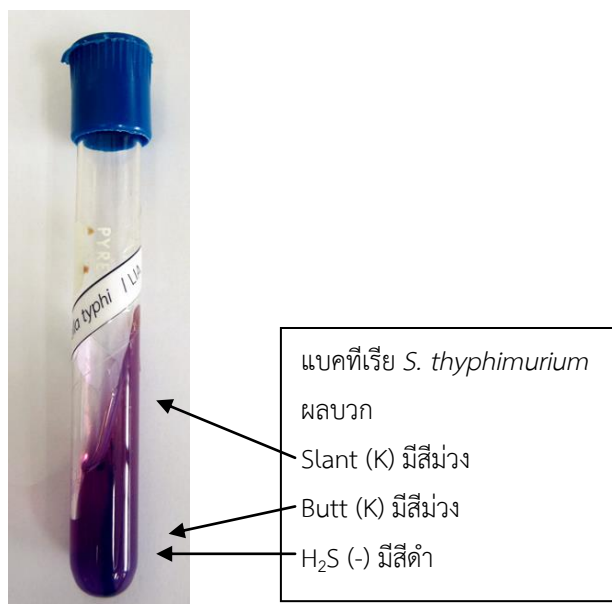
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ได้ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว การสร้างอินโดลและการย่อยไลซีน คือ อาหาร Motility indole lysine medium (MIL medium) อาหารนี้มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนหากเชื้อแบคทีเรียใดสามารถหมักน้ำตาลเด็คซ์โทสได้จะทำให้เกิดกรดในส่วนล่างของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำให้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และหากใช้น้ำตาลกลูโคสหมดไปแล้วจะผลิตเอ็นไซม์ Decarboxylase ซึ่งทำให้เกิดการย่อยไลซีนเป็นกรดอะมิโนในหลอดอาหารจนได้ Amine เมื่อ Amine เพิ่มมากขึ้นเป็นผลให้ความเป็นด่างมีมากขึ้นซึ่งอาจทำให้หลอดอาหารสามารถเปลี่ยนกลับเป็นสีม่วงได้ ซึ่งถ้าหากเชื้อแบคทีเรานั้นไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์ Decarboxylase ได้ หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MIL จะมีสีเหลืองที่ด้านล่างของหลอด และในสถานะที่มีออกซิเจนคือที่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากเชื้อแบคทีเรานั้นสามารถย่อยไลซีนได้จะผลิตเอ็นไซม์ Deaminase ออกมาย่อยไลซีนแล้วสารนั้นจึงไปทำปฏิกิริยากับสาร Ferric ammonium citrate ได้สีแดงน้ำตาลอยู่ส่วนบนของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียสามารถสังเกตจากการเจริญออกนอก รอยแทงทำให้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นทั่วทั้งหลอด และสามารถหยดสารละลาย Kovac ในหลอดอาหาร MIL Medium เพื่อหาสาร Indole ที่แบคทีเรียบางชนิดอาจสร้างขึ้นได้ สำหรับแบคทีเรีย *Salmonella* ที่เลี้ยงในอาหาร MIL Medium จะพบสีม่วงขุ่นทั้งหลอด (ภาพที่ 2.6) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถเคลื่อนที่ได้ มีเอ็นไซม์ Decarboxylase ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนจึงสามารถย่อยไลซีนได้และให้ผลการทดสอบอินโดลเป็นลบ



ภาพที่ 2.6 การเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* ในหลอดอาหาร MIL Medium

3 การทดสอบการย่อยสารไลซีน

อาหาร Lysine iron agar (LIA) เป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* การทดสอบทำโดยการนำเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยมาขีดลงผิวหน้าของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงแทงลงไปอาหาร LIA ส่วนบนของหลอดจะมีออกซิเจนเป็นส่วนของ Slant และส่วนล่างของหลอดคือส่วน Butt ซึ่งเป็นส่วนที่มีออกซิเจนอยู่น้อย อาหาร LIA มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีไลซีนเป็นแหล่งโปรตีน และเมื่อกลูโคสถูกใช้หมดไป เชื้อจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ Lysine decarboxylase ออกมาย่อย ไลซีนแล้วได้ Amine ทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างซึ่งจะทำให้เกิดสีม่วงทั่วทั้งหลอดเพราะมีสาร Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ หากสีของอาหารเป็นสีเหลืองแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียได้สร้างกรดแต่หากอาหารเลี้ยงเชื้อ LIA เป็นสีม่วงแสดงว่าเกิดสภาพด่างขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถสังเกตสีดำตามรอยที่มีการแทงเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหารซึ่งเป็นผลจากแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ผลิตขึ้น (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 การเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* ในหลอดอาหาร LIA

4 การทดสอบการใช้ยูเรีย

การทดสอบการใช้ยูเรียสามารถทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar ซึ่งมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน มีเปปโตนและน้ำตาลเดกซ์โตรสเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื่อนี้ หากเชื้อแบคทีเรียชนิดใดสามารถใช้ยูเรียได้จะมีการผลิตเอนไซม์ Urease ออกมาเพื่อย่อย ยูเรียแล้วให้เกิดแอมโมเนียและเกิดสภาพความเป็นด่างขึ้นในหลอดอาหาร ซึ่งสีของ Phenol red ที่เป็น อินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง สำหรับแบคทีเรีย *Salmonella* จะให้ผลการทดสอบเป็นลบคือไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 2.8)

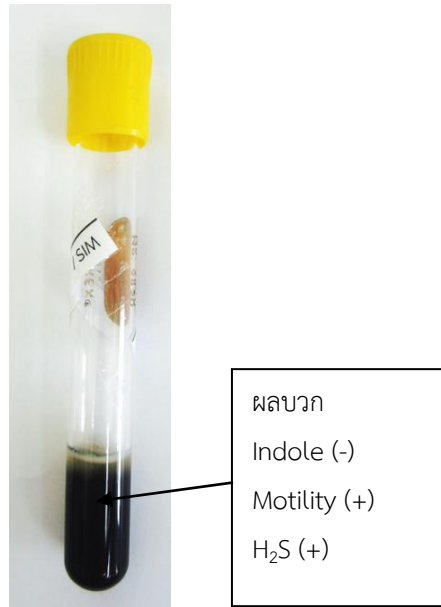


แบคทีเรีย *S. typhimurium*
ผลลบ
หลอดอาหาร Urea agar มีสี
เหลืองเหมือนเดิม

ภาพที่ 2.8 การเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* ในหลอดอาหาร Urea agar

5 การดูผลการเคลื่อนที่ การสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์และการสร้างสารอินโดล

อาหารเลี้ยงเชื้อ SIM medium สามารถใช้ในการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร ความสามารถในการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์และความสามารถย่อยสารทริปโตเฟน ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถใช้แยกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ออกจากแบคทีเรีย *Shigella* ได้ ทั้งนี้แบคทีเรีย *Salmonella* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้โดยสังเกตจากความขุ่นของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆรอยแทง นอกจากนี้แบคทีเรีย *Salmonella* ยังมีคุณสมบัติในการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จากการย่อยสาร Sodium thiosulphate ในหลอดอาหาร จากนั้นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์จึงทำปฏิกิริยากับสาร Ferrous sulphide ทำให้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ไม่สามารถสร้างสารอินโดล (Indole) จากกรด อะมิโนทริปโตเฟนได้ ดังนั้นเมื่อหยดสารละลาย Kovacs ลงไปในหลอดอาหารจึงไม่เกิดวงแหวนสีแดง (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 การเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* ในหลอดอาหาร SIM medium

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

- 1.1 เนื้อไก่สด
- 1.2 ไช้สด
- 1.3 เครื่องในไก่

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Selenite cystine broth (SC)
- 2.2 Tetrathionate broth (TT)
- 2.3 Salmonella Shigella (SS) agar
- 2.4 Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agars
- 2.5 Lysine Iron Agar (LIA)
- 2.6 Triple sugar iron (TSI) agar
- 2.7 Urea agar
- 2.8 Trypticase soy broth (TSB)
- 2.9 Nutrient Agar (NA)

3 สารเคมี

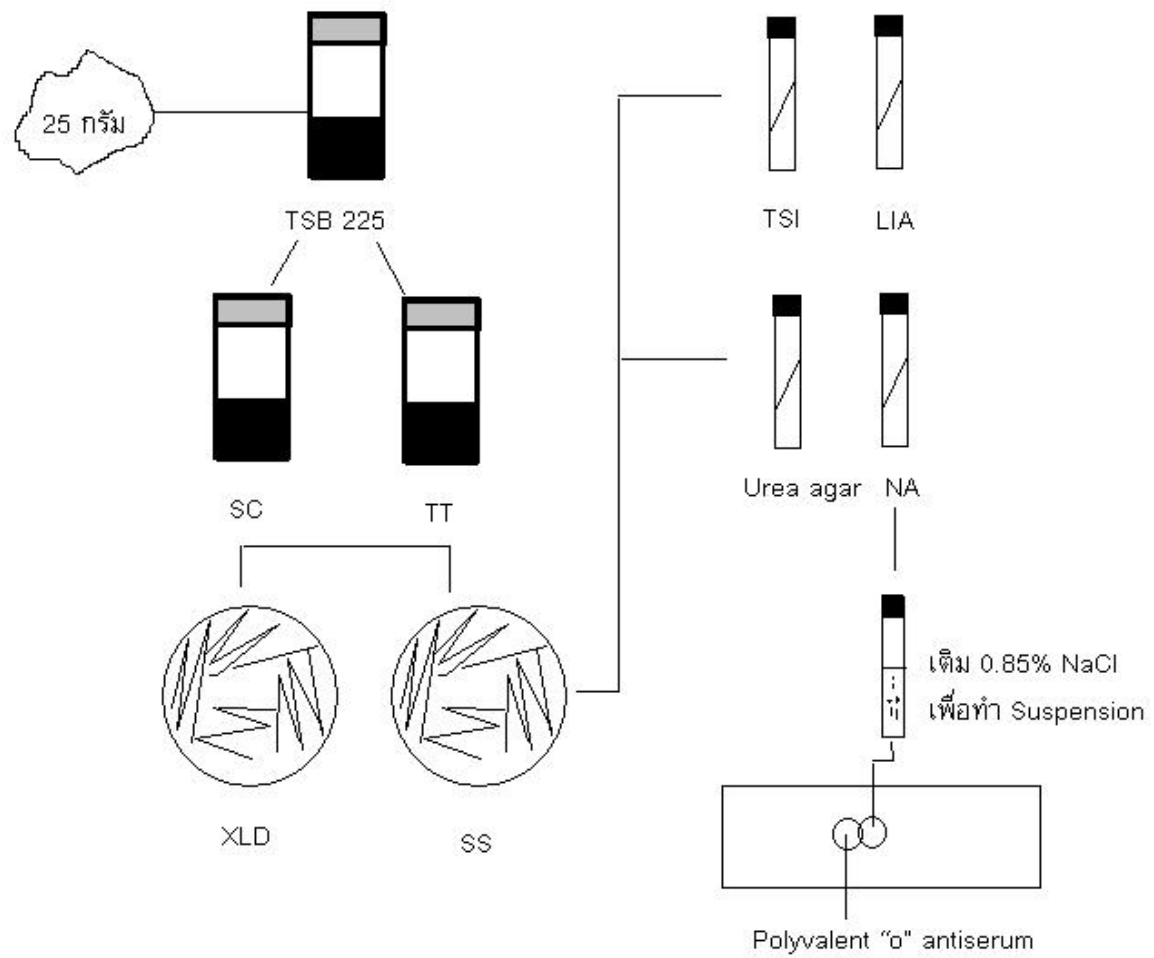
- 3.1 Polyvalent “O” antiserum
- 3.2 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1% Peptone water)
- 3.3 สารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70

4 อุปกรณ์

- 4.1 หม้อนึ่ง
- 4.2 ตู้บ่ม
- 4.3 แผ่นสไลด์
- 4.4 กล้องจุลทรรศน์
- 4.5 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

วิธีการ

- 1.1 ทำการชั่งอาหาร 25 กรัม ละลายใน Trypticase soy broth (TSB) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร บ่ม 18-24 ชั่วโมง
- 1.2 สังเกตความขุ่นของอาหารจากนั้นดูดตัวอย่างอาหารมา 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหาร Tetrathionate broth (TT) และ Selenite cystine broth (SC) อย่างละ 10 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- 1.3 สังเกตการเจริญของเชื้อโดยการดูความขุ่น ใช้ Loop แต่ละส่วนอาหารในข้อ 1.2 แล้วนำมาขีดลงในอาหาร Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar และ Salmonella Shigella (SS) agar บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตผลบวกโดยโคโลนีที่เกิดบนอาหาร XLD จะมีจุดสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยต่าง พื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นสีแดง ส่วนอาหาร SS พื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีเหลืองและมีโคโลนีที่มีจุดสีดำตรงกลาง
- 1.4 นำโคโลนีที่สงสัยมาขีดลงในอาหารดังต่อไปนี้เพื่อทดสอบทางชีวเคมี
 - 1.4.1 อาหาร Triple sugar iron (TSI) agar ให้ทำการขีดเชื้อที่ผิวหน้าและแทง Needle ลงไปในอาหาร จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาอ่านผล ผลบวกของเชื้อ *Salmonella* คือ Slant (K), Butt (a), Gas (±), H₂S (±)
 - 1.4.2 อาหาร Lysine Iron Agar (LIA) ให้ทำการขีดเชื้อที่ผิวหน้าและแทง Needle ลงไปในอาหาร จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาอ่านผล ผลบวกของเชื้อ *Salmonella* คือ Lysine (+), Indole (-) และ Motility (+)
 - 1.4.2 อาหาร Urea Agar ให้ทำการขีดเชื้อที่ผิวหน้า จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาอ่านผล ผลบวกของเชื้อ *Salmonella* คือ อาหารไม่เปลี่ยนสี
 - 1.4.3 อาหาร Nutrient Agar ให้ทำการขีดเชื้อที่ผิวหน้า จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 0.85 %NaCl ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำ Spore Suspension จากนั้นหยด Suspension ลงบนแผ่น สไลด์ 1 หยดแล้วทำการหยด Polyvalent “o” antiserum ลงไป 1 หยดผสมให้เข้ากัน ผลบวกของเชื้อ *Salmonella* คือ เกิดการจับตัวของเซลล์เป็นก้อน (Clump) เรียกว่า agglutination (+)



ภาพที่ 2.10 แผนผังการทำงานโดยรวม

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ผลที่สังเกตเห็น
TSB	
TT	
SC	
XLD	
SS	

ตารางที่ 2.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ผลการทดสอบ			
TSI	Slant	Butt	Gas	H ₂ S
LIA	Lysine	Indole	Motility	
Urea agar	Color			

ตารางที่ 2.3 ภาพลักษณะของเชื้อที่สังเกตเห็นโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์

รูปภาพ	ลักษณะของโคโลนี
- วาดรูปของลักษณะของเชื้อราที่พบ	- บอกลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, Andrews, W. 1995. Microbial methods. In official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Arlington, VA.
- Anon. 1993. Microbiology – general guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International Standard Organisation (ISO), Publ. No. 6579, Geneva.
- Coburn, B., Grassi, G.A., Finlay, B.B. 2007. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85: 112–118.
- De Boer, E. 1998. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 43–53.
- De Buck, J., Immerseel, F.V., Meulemans, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2003. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chicken isthmal glandular secretions. *Veterinary Microbiology*, 93(3): 223–233.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2009. Community summary report, food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 1–128.
- El-Aziz, D.M.A. 2013. Detection of *Salmonella typhimurium* in retail chicken meat and chicken giblets. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9): 678–681.
- Feldhusen, F. 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2: 1651–1660.
- Heinitz, M.L., Ruble, R.D., Wagner, D.E., Tatini, S.R. 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *Journal of Food Protection*, 63(5): 579–592.
- Jeffries, L. 1959. Novobiocin - tetrathionate broth: A medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*, 12: 568.
- King, S., Metzger, W.I. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: Hektoen enteric agar. *Applied Microbiology*, 16:577–578.
- Knox, R., Gell, F.G.H., Pollock, M.R. 1942. Selective media for organisms of the *Salmonella* group. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 54: 469.
- Lahiri, A., Lahiri, A., Iyer, N., Das, P., Chakravortty, D. 2010. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes and Infection*, 12(11): 809–818.
- Leifson, E. 1939. New selenite selective enrichment medium for the isolation of typhoid and paratyphoid bacilli. *American journal of hygiene*, 24:423–432.

- Martelli, F., Davies, R.H. 2012. *Salmonella* serovars isolated from table eggs. *Food Research International*, 45(2): 745-754.
- Massey, K.M. 1943. Notes on tetrathionate broth and Macconkey's agar media in the isolation of *Salmonella Enteritidis* Var. *Dublin* from bovine faeces and milk. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 53:151-156.
- Michigan State University. 2556. Experimental results: experiment 14 - *Salmonella* detection. Retrieved November 30, 2013, from <https://www.msu.edu/course/fsc/441/resulex14>
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., Arakawa, A. 1998. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, 61: 350–353.
- Rasrinual, L., Suthienkul, O., Echeverria, P., Taylor, D., Seriwatana, J., Bangtrakulnonth, A., Lexomboon, U. 1988. Foods as source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39: 97–102.
- Sasai, K., Yoshimura, K., Lillehoj, H.S., Withanage, G.S.K., Fukata, T., Baba, E., Arakawa, A. 1997. Analysis of splenic and thymic lymphocyte subpopulations in chickens infected with *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59(3–4): 359-367.
- Schou, T.W., Labouriau, R., Permin, A., Christensen, J.P., Sørensen, P., Cu, H.P., Nguyen, V.K., Juul-Madsen, H.R. 2010. MHC haplotype and susceptibility to experimental infections (*Salmonella enteritidis*, *Pasteurella multocida* or *Ascaridia galli*) in a commercial and an indigenous chicken breed. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(1–2):52-63.
- Seo, K.H., Holt, P.S., Stone, H.D., Gast, R.K. 2003. Simple and rapid methods for detecting *Salmonella enteritidis* in raw eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2): 139-144.
- Taylor, W.I. 1965. Isolation of *shigellae*: Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. *American Journal of Clinical Pathology*, 44: 471-475.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2013. Thermo Scientific™ remel HE agar (Hektoen enteric agar) facilitates isolation and differentiation of gram-negative enteric microorganisms. Retrieved November 30, 2013, from <http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet>.

Wilson, W.J., Blair, E.M.M'V. 1927. Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B. typhosa* and *B. proteus*. *Journal of Hygiene*, 26: 374–

บทปฏิบัติการที่ 3

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Coliform* *Escherichia coli* และ *Escherichia coli* 0157:H7

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในระบบขับถ่ายของสัตว์เลือดอุ่น เช่น มนุษย์ และยังพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำต่างๆ ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในอาหารจึงแสดงถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหาร เชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มจึงเป็นดัชนีชี้วัดสุขาภิบาลอาหารได้ โดยทั่วไปกลุ่มของแบคทีเรียโคลิฟอร์มสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod) ไม่สร้างสปอร์ (Non-spore-forming) สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วทำให้เกิดกรดและแก๊สภายใน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่เจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิสูงคือที่ 44 ± 0.5 องศาเซลเซียส เรียกว่าฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) ซึ่งแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นหนึ่งในสมาชิกที่สำคัญของฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Dufor, 1977)

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งแยกย่อยออกเป็น 6 Serotypes หลักที่ก่อให้เกิดโรคคือ Enteropathogenic (EPEC) Enterotoxigenic (ETEC) Enteroinvasive (EIEC) Enteroaggregative (EAEC) Diffusely adherent (DAEC) และ Shiga toxin producing (STEC) หรือ Enterohemorrhagic (EHEC) โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถสร้างโคโลนีที่มีลักษณะมันเงาคล้ายโลหะซึ่งเรียกว่า Metallic sheen ได้ในเวลา 24 ชั่วโมง อันเนื่องมาจากเอนไซม์ β -galactosidase ที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตมาเพื่อย่อยน้ำตาลแลคโตสและสารเรืองแสง (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide: MUG) ได้ (APHA, 1998) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญในเกลือน้ำดี (Bile salt) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการคัดเลือกให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้ (Selective agent) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆได้ ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* O157:H7 จัดอยู่ในสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า Shiga toxin สารพิษ Stx1 และสารพิษ Stx2 ได้ (Whittam และคณะ, 1998) ซึ่งสารพิษดังกล่าวทำให้เม็ดเลือดแดงในลำไส้ของมนุษย์แตกออกและเกิดการอักเสบแบบมีเลือดออกได้ ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 จัดอยู่ใน Serotype ของ STEC หรือ EHEC ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Prère และ Fayet, 2005) ซึ่งแบคทีเรีย *E. coli* มีแอนติเจน (Antigen) ที่ก่อให้เกิดโรครอยู่ 3 ส่วนคือส่วนแรกเรียกว่า O-antigen ปัจจุบันพบ O-antigen ประมาณ 167 O-

antigen ซึ่งอยู่ในชั้น lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อแบคทีเรีย ส่วนที่ 2 คือ H-antigen คือ ส่วนที่เป็นแฟลกเจลลา (Flagella) ของเชื้อแบคทีเรีย ปัจจุบันพบประมาณ 53 H-antigen (Hussaini และ Edgar, 1981) ส่วนสุดท้ายคือ K-antigen หรือ Capsular antigens (Nimmich และคณะ, 1980) ทั้งนี้แบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 มี O-antigen ในลำดับที่ 157 ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ก่อโรคที่สำคัญ (Boyer และคณะ, 2011) และมี H-antigen ในลำดับที่ 7 ซึ่งทั้ง Antigen-O และ Antigen-H จัดเป็น Virulence factors ที่ทำให้เกิดโรค ข้อแตกต่างระหว่างการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 และ *E. coli* คือ เชื้อ *E. coli* O157:H7 จะไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (Sorbitol) เมื่อบ่มที่ อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียสจะไม่พบการเจริญเติบโต นอกจากนั้นแล้วแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 จะไม่สร้างเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ดังนั้นจึงไม่สามารถสลายสารเรืองแสง เช่น 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) แล้วเกิดโคโลนีที่มีการเรืองแสงได้

โดยมากแล้วเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 มักทำให้เกิดโรคท้องเสีย อาเจียน (Schimmer และคณะ, 2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วย ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ซึ่งสามารถผลิตสารพิษได้จะทำให้ผู้ป่วยถ่ายเป็นเลือด โดยใน ปี 1996 มีผู้ป่วยเสียชีวิตจำนวน 17 รายจากผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้กว่า 500 ราย (Cowden และคณะ, 2001) และในกรุงวอชิงตันของประเทศสหรัฐอเมริกาในระหว่าง ค.ศ. 1992-1993 พบ ผู้ป่วยได้รับเชื้อ *E. coli* O157:H7 จำนวน 501 ราย จากการบริโภคแฮมเบอร์เกอร์เนื้อและมีผู้ป่วย จำนวน 3 รายได้เสียชีวิต (Bell และคณะ, 1994) ส่วนในประเทศญี่ปุ่นได้รายงานจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ ถึง 7,966 รายงานในปี 1996 และมีผู้ป่วยเสียชีวิต 3 ราย (Michino และคณะ, 1999) อาหารที่มีความเสี่ยงคืออาหารจำพวกผักและผลไม้สดที่ไม่ผ่านการล้างทำความสะอาด เนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ปรุงให้สุก นำนมดิบ นำนมพาสเจอร์ไรซ์ น้ำดื่ม เป็นต้น (Doyle และคณะ, 2001) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ทนอยู่ ได้ในอาหารที่มีสภาพความเป็นกรดเล็กน้อย เช่น มายองเนส น้ำแอปเปิ้ลหมัก และสามารถทนความ เเค็มได้ในระดับหนึ่งซึ่งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้มีชีวิตรอดได้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือ (Blackburn และคณะ, 1997)

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform) ในอาหาร

1 ขั้นตอนการตรวจขั้นแรก (Presumptive test) เป็นขั้นตอนการตรวจเบื้องต้นว่าอาหาร ชนิดนั้นๆปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มหรือไม่ โดยทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล แลคโตสแล้วทำให้เกิดกรดและแก๊สภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Lauryl sulfate tryptose (LST) ซึ่งมี น้ำตาลแลคโตสเป็นส่วนผสมหลัก ในขั้นตอนนี้การเตรียมตัวอย่างอาหาร อย่างน้อยต้องเตรียม ตัวอย่างอาหารให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ แล้วนำไปใส่ในหลอดอาหาร LST ความเข้มข้นละ 3 หรือ 5

หลอด ผลบวกที่ได้คือสังเกตเห็นฟองแก๊สในหลอดดักแก๊ส (Durham tubes) จากนั้นจึงถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดทดลองที่สงสัยมาทำการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

2 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmatory test) เป็นการตรวจยืนยันผลจากหลอดอาหาร LST ที่สงสัยว่าจะมีเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มโดยอาศัยผลบวกจากขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนนี้สามารถถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยจากชั้นแรกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brilliant green lactose bile (BGLB) ซึ่งมีเกลือน้ำดี (Bile salt) ทำหน้าที่เป็นสารคัดเลือก (Selective agent) โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไม่อยู่ในกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งไว้ และอาหารเหลวนี้นยังมีน้ำตาลแลคโตสให้เชื้อแบคทีเรียได้นำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตจนสามารถสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซได้ เมื่อพบผลบวกในหลอดทดลองแล้วจึงนับจำนวนหลอดอาหารเหลวที่มีแก๊สอยู่ในหลอดดักแก๊ส จากนั้นจึงนำไปคำนวณหาปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดในหน่วย $\text{MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ โดยนับผลบวกจากหลอดทดลองแล้วนำไปเทียบกับตารางที่ 3.1 เช่น ผลบวกจากหลอดทดลอง 3 หลอดคือ 3-1-1 แสดงว่าตัวอย่างอาหารนั้นมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มอยู่ $75 \text{ MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ เป็นต้น หรือหากใช้ระบบ 5 หลอด ให้นำไปเทียบกับตารางที่ 3.2 เช่น หากผลบวกจากหลอดทดลอง 5 หลอดคือ 5-1-0 ให้นำผลบวก 5-1-0 ไปเปิดในตารางจะได้ $33 \text{ MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ เป็นต้น สำหรับการตรวจหาเชื้อฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง (44 ± 0.5 องศาเซลเซียส) ซึ่งแบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญที่พบเป็นสมาชิกของฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) ทำโดยใช้อาหาร EC broth โดยผลบวกคือนับจำนวนหลอดทดลองที่ให้ผลบวกโดยมีแก๊สในหลอดดักแก๊สภายหลังการบ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 44 ± 0.5 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปคำนวณหาค่า $\text{MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ หรือ $\text{MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$ เช่นเดียวกับการรายงานปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมด

3 ขั้นตอนการตรวจสมบูรณ์ (Complete test) การนำเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยและให้ผลบวกในขั้นตอนที่ 2 มาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกเช่น อาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) จากนั้นจึงทำการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical identification) การทดสอบทางชีวเคมีเป็นการทดสอบเพื่อตรวจหาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในระหว่างการเจริญเติบโต โดยการทดสอบ IMViC tests อันได้แก่การทดสอบ Indole การทดสอบ Methyl red การทดสอบ Voges-Proskauer test และการทดสอบ Citrate ซึ่งการทดสอบทั้ง 4 การทดสอบนิยมนำมาใช้ในการทดสอบคุณสมบัติเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) โดยผลบวกของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* คือ + + - - ในขณะที่ผลบวกของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter* คือ - - + + ซึ่งทั้ง *E. coli* และ *Enterobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Paruch และ Mæhlum, 2012; Gurtler และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3.1 ตารางค่า MPN·g⁻¹ ของหลอดทดลอง 3 หลอด

จำนวนหลอดที่เกิดผลบวก			MPN·g ⁻¹	จำนวนหลอดที่เกิดผลบวก			MPN·g ⁻¹
0.10	0.01	0.001		0.10	0.01	0.001	
0	0	0	<3.0	2	2	0	21
0	0	1	3.0	2	2	1	28
0	1	0	3.0	2	2	2	35
0	1	1	6.1	2	3	0	29
0	2	0	6.2	2	3	1	36
0	3	0	9.4	3	0	0	23
1	0	0	3.6	3	0	1	38
1	0	1	7.2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7.4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9.2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

ที่มา: APHA (1998)

ตารางที่ 3.2 ตารางค่า MPN·g⁻¹ ของหลอดทดลอง 5 หลอด

จำนวนหลอดที่เกิดผลบวก			MPN·g ⁻¹	จำนวนหลอดที่เกิดผลบวก			MPN·g ⁻¹
0.10	0.01	0.001		0.10	0.01	0.001	
0	0	0	<1.8	3	0	1	11
0	0	1	1.8	3	0	2	13
0	1	0	1.8	3	1	0	11
0	1	1	3.6	3	1	1	14
0	2	0	3.7	3	1	2	17
0	2	1	5.5	3	2	0	14
0	3	0	5.6	3	2	1	17
1	0	0	2	3	2	2	20
1	0	1	4	3	3	0	17
1	0	2	6	3	3	1	21
1	1	0	4	3	3	2	24
1	1	1	6.1	3	4	0	21
1	1	2	8.1	3	4	1	24
1	2	0	6.1	3	5	0	25
1	2	1	8.2	4	0	0	13
1	3	0	8.3	4	0	1	17
1	3	1	10	4	0	2	21
1	4	0	11	4	0	3	25
2	0	0	4.5	4	1	0	17
2	0	1	6.8	4	1	1	21
2	0	2	9.1	4	1	2	26
2	1	0	6.8	4	1	3	31
2	1	1	9.2	4	2	0	22
2	1	2	12	4	2	1	26
2	2	0	9.3	4	2	2	32
2	2	1	12	4	2	3	38
2	2	2	14	4	3	0	27
2	3	0	12	4	3	1	33
2	3	1	14	4	3	2	39
2	4	0	15	4	4	0	34

ที่มา: APHA (1998)

ตารางที่ 3.2 ตารางค่า MPN·g⁻¹ ของหลอดทดลอง 5 หลอด (ต่อ)

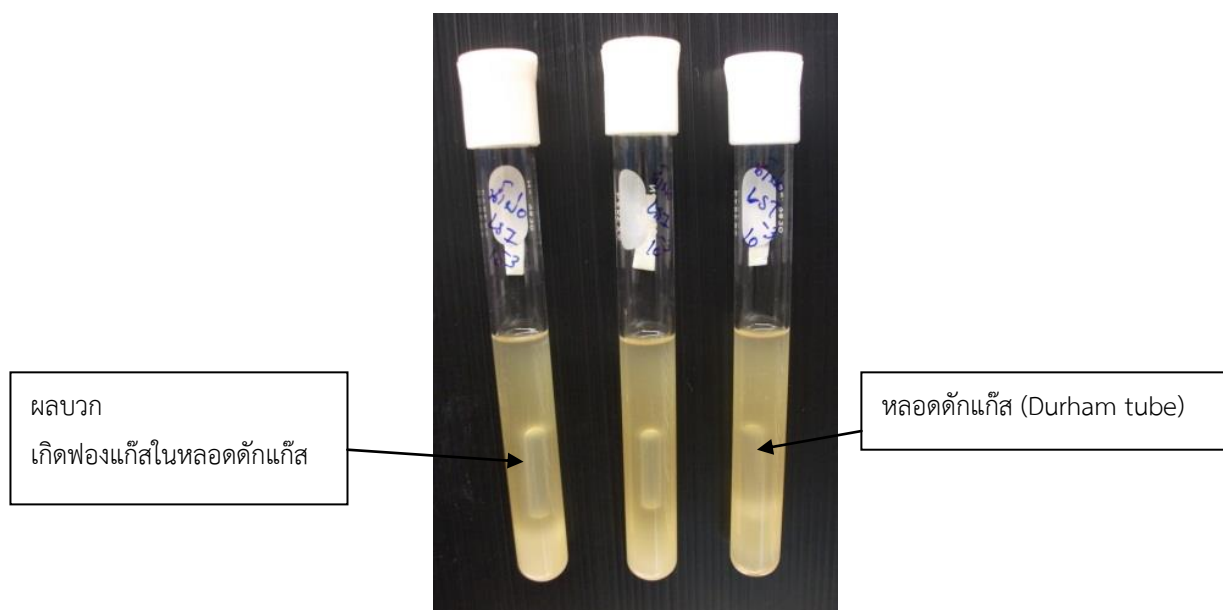
จำนวนหลอดที่เกิดผลบวก			MPN·g ⁻¹	จำนวนหลอดที่เกิดผลบวก			MPN·g ⁻¹
0.10	0.01	0.001		0.10	0.01	0.001	
3	0	0	7.8	4	4	1	40
4	1	1	21	5	2	0	49
4	1	2	26	5	2	1	70
4	1	3	31	5	2	2	94
4	2	0	22	5	2	3	120
4	2	1	26	5	2	4	150
4	2	2	32	5	3	0	79
4	2	3	38	5	3	1	110
4	3	0	27	5	3	2	140
4	3	1	33	5	3	3	180
4	3	2	39	5	3	4	210
4	4	0	34	5	4	0	130
4	4	1	40	5	4	1	170
4	4	2	47	5	4	2	220
4	5	0	41	5	4	3	280
4	5	1	48	5	4	4	350
5	0	0	23	5	4	5	430
5	0	1	31	5	5	0	240
5	0	2	43	5	5	1	350
5	0	3	58	5	5	2	540
5	1	0	33	5	5	3	920
5	1	1	46	5	5	4	1600
5	1	2	63	5	5	5	>1600
5	1	3	84				

ที่มา: APHA (1998)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย Coliform และ *E.coli* ในอาหาร

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate tryptose (LST) broth

อาหารเลี้ยงเชื้อ LST เป็นอาหารที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Coliform ใช้สำหรับในการหาค่า MPN ของ Total coliforms ในอาหาร (Mallman และ Darby, 1941) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (AOAC, 2007) อาหารเลี้ยงเชื้อ LST มีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยส่วนมากแล้วเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Coliform สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้ฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในหลอดดักแก๊ส (Durham tube) ซึ่งผลบวกจะสังเกตเห็นแก๊สได้อย่างชัดเจนในหลอดดักแก๊สที่อยู่ในอาหารเหลว (ภาพที่ 3.1) จากนั้นจึงทำการนับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกแล้วนำไปคำนวณหาค่า MPN แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลในขั้นตอนต่อไป อาหาร LST ยังมีส่วนผสมของสาร Sodium lauryl sulfate ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่ Coliform และมีเกลือ Sodium chloride ที่ช่วยทำให้เกิดสมดุลของเซลล์แบคทีเรีย

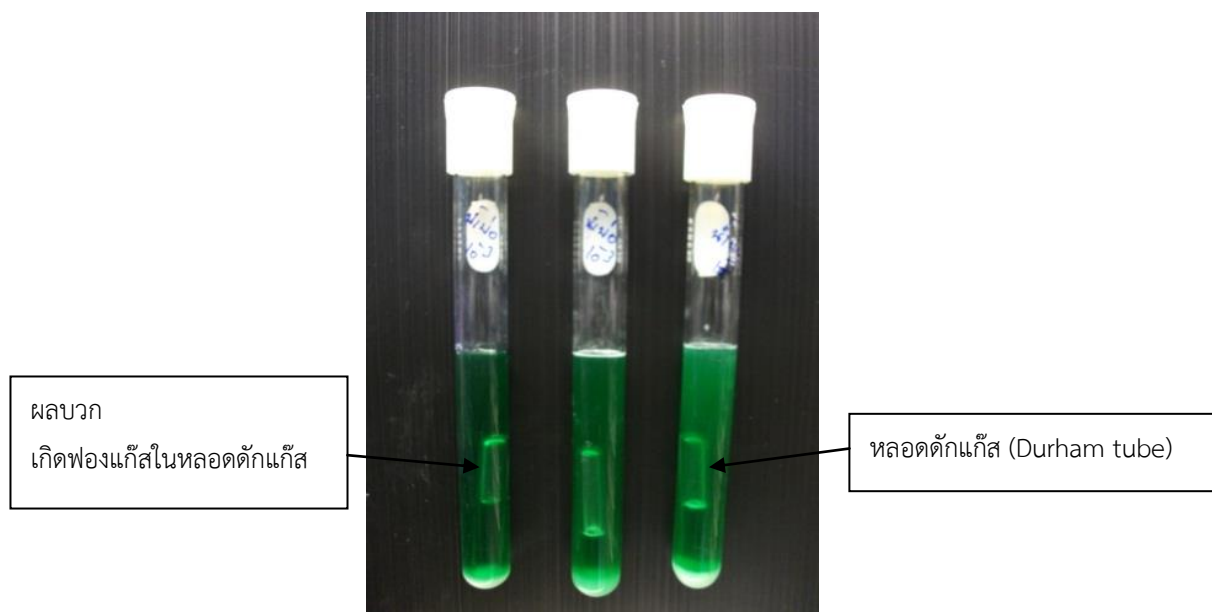


ภาพที่ 3.1 เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coliform ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile (BGLB) broth

อาหารเหลว BGLB broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีสีเขียวที่ใช้ในการยืนยันกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย Coliform (Dunham และ Schoenlein, 1926) ซึ่งสามารถทำการถ่ายอาหารจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ในหลอดที่มีผลบวกมาใส่ในหลอดอาหาร BGLB แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลบวกจะเกิดฟองแก๊สที่สังเกตเห็นได้ในหลอดดักแก๊ส ซึ่งเป็นผลจากการที่เชื้อในกลุ่ม Coliform สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสและทำให้เกิดฟองแก๊ส (ภาพที่ 3.2)

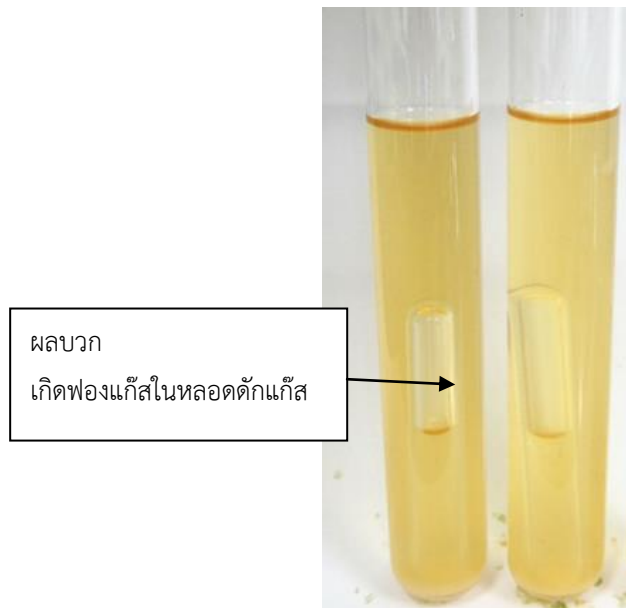
อาหารชนิดนี้มีสาร Oxgall และ Brilliant green สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบพวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่ม Coliform



ภาพที่ 3.2 เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coliform ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB broth

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth

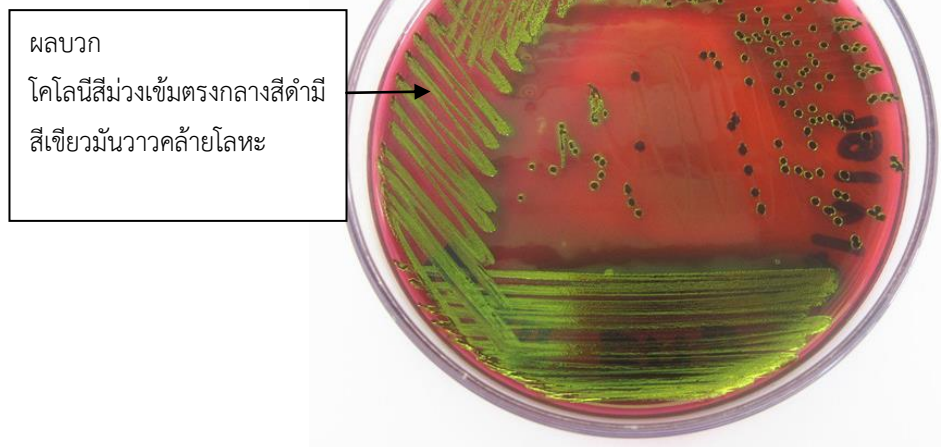
อาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ใช้ในการตรวจเพื่อยืนยันปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เป็น Fecal Coliform ที่สามารถเจริญในอุณหภูมิ 44 ± 0.5 องศาเซลเซียส (Mehlman และคณะ, 1975) แล้วนำผลบวกไปคำนวณหาค่า $\text{MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียในหลอดที่เกิดผลบวกในอาหาร LST นอกจากนั้นแล้วอาหารนี้ยังสามารถยืนยันการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Coliform ได้โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth มีสาร Tryptose หรือสาร Casein enzymic hydrolysate เป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นของเชื้อแบคทีเรีย มีสาร Bile salts สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Bacilli และ Faecal Streptococci มีเกลือ NaCl เพื่อรักษาสมดุล มีสาร Potassium phosphates ควบคุมความเป็นกรดต่าง (pH) ระหว่างการหมักน้ำตาลแลคโตสโดยผลบวกคือพบแก๊สในหลอดดักแก๊ส (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 44 ± 0.5 องศาเซลเซียส

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue (EMB) agar

ในปี ค.ศ. 1918 Levine ได้รายงานการนำอาหาร EMB มาใช้ในการจำแนกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยผลบวกคือพบโคโลนีสีม่วงเข้มตรงกลางมีสีดำ ทั้งนี้อาหาร EMB มีสาร Eosine Y และ Methylene blue ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ แบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้จะมีโคโลนีสีเหลืองคล้ายฟาง พวกที่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ เช่น *Enterobacter* จะทำให้เกิดโคโลนีสีชมพูในงานอาหาร เพื่อให้การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เป็นไปได้อย่างแม่นยำมากขึ้น การเติมสาร 4-methyl-umbelliferyl β -D-glucuronide (MUG) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB สามารถช่วยให้ตรวจหาเอนไซม์ β -glucuronidase ที่มีอยู่ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนสาร MUG ให้กลายเป็นสารเรืองแสง Fluorogen, 4-methyl-umbelliferone ซึ่งจะตรวจพบโคโลนีที่สามารถเรืองแสงได้ภายใต้แสงยูวี (Feng และ Hartman, 1982) นอกจากนั้นโคโลนีที่พบจะมีสีม่วงเข้มและมีสีเขียวมันวาวคล้ายโลหะ (Green metallic sheen) ล้อมรอบดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญในอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB+MUG

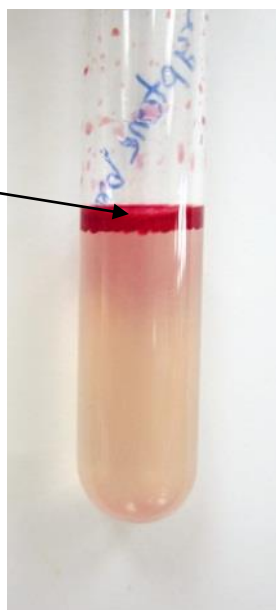
การทดสอบทางชีวเคมี (Biochem Test)

การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* คือการทดสอบ IMViC tests โดย I คือ Indole test ตัวอักษร M คือ Methyl red test ตัวอักษร V คือ Voges-Proskauer test และ C คือ Citrate test ผลบวกของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* คือ + + - - ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1 การทดสอบการสร้างสารอินโดล (Indole)

การทดสอบการสร้างอินโดลสามารถทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร Tryptophan broth ซึ่งมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนอยู่ในอาหาร ทั้งนี้แบคทีเรีย *E. coli* สามารถผลิตเอนไซม์ Tryptophanase ได้จึงสามารถย่อยอะมิโนทริปโตเฟนแล้วเกิดสารอินโดลขึ้นในหลอดทดลองได้ ในขั้นตอนนี้หลอดทดลองยังคงมีสีใส แต่เมื่อต้องการมองเห็นสารอินโดลที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองให้นำสารละลาย Kovacs (2-Methoxy-4-Dimethylaminobenzaldehyde และ 4-N-Pyrrolidylbenzaldehyde) ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรมาหยดในหลอดทดลอง ผลบวกจะเกิดวงแหวนสีแดงขึ้นในหลอด (ภาพที่ 3.5) นอกจากนั้นแล้วอาหารเลี้ยงเชือนี้ยังมีส่วนผสมของ Casein enzymic hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน มีสาร Sodium chloride ในการรักษาสมดุลของ Osmotic ในระหว่างการทดสอบ

ผลบวก
เกิดวงแหวนสีแดงหลังหยด
สารละลาย Kovacs's
reagent



ภาพที่ 3.5 ผลการทดสอบ Indole ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ
Tryptophan broth

2 การทดสอบความเป็นกรดหรือด่างหลังจากการหมักน้ำตาลกลูโคส

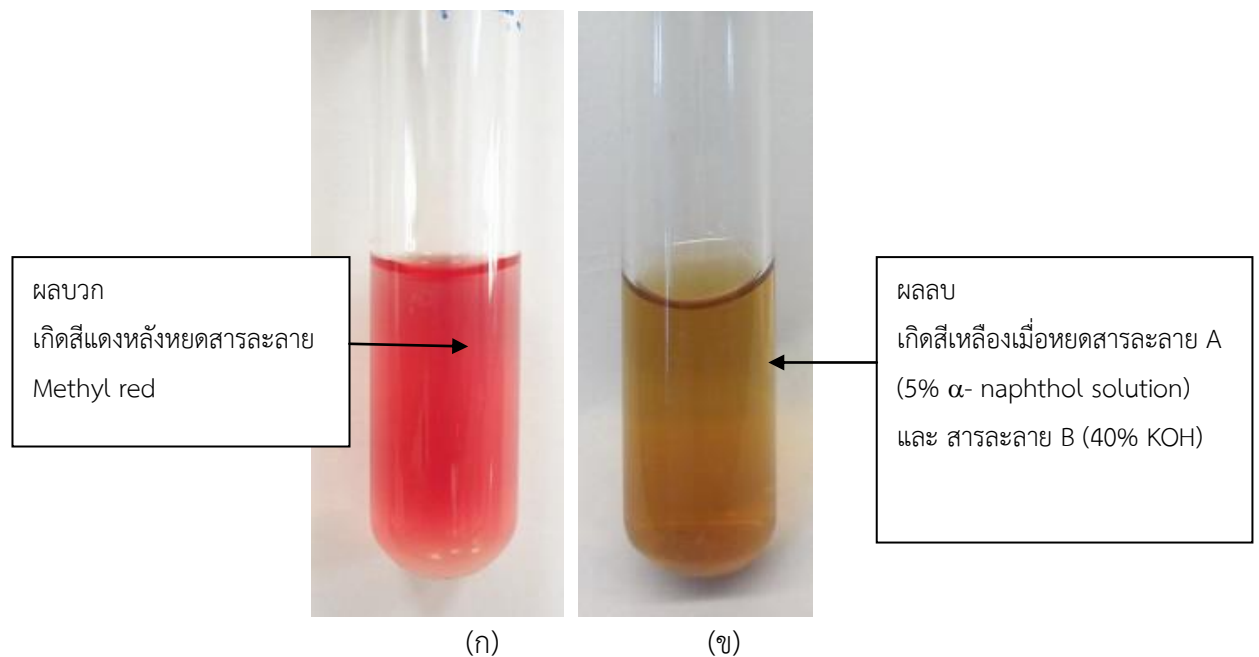
2.1 การทดสอบหาความเป็นกรดโดย Methyl red (MR) test

อาหารที่ใช้ในการทดสอบคือ Methyl red Voges-Proskauer broth ซึ่งในอาหารนี้มี ส่วนผสมของน้ำตาลเดกซ์โตรส (Dextrose) ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถย่อยน้ำตาลเดกซ์โตรส จนได้กรด โดยกรดที่ผลิตขึ้นดังกล่าวเช่น กรดแลคติก กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก (Clark และ Lubs, 1915) ซึ่งมีผลทำให้ความเป็นกรดในหลอดอาหารลดต่ำลง ($\text{pH} < 4.4$) ดังนั้นผลบวกคือเกิดการ สร้างกรดขึ้นมาในหลอดอาหารและเมื่อนำมาหยดสารละลาย Methyl red จึงทำให้เห็นสีแดงใน หลอดอาหารนั้น (ภาพที่ 3.6 ก) โดยหากเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถหมักน้ำตาลได้จะทำให้มีค่าต่างใน หลอดทดสอบมากขึ้น ($\text{pH} > 5.1$) ทำให้พบสีเหลือง (ผลลบ) ในหลอดทดลองหลังจากหยดสารละลาย Methyl red

2.2 การทดสอบความเป็นด่างโดย Voges-Proskauer (VP) test

อาหารที่ใช้ในการทดสอบคืออาหาร Methyl red Voges-Proskauer broth เช่นเดียวกัน กับทดสอบ MR test โดยแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Klebsiella* และ *Enterobacter* สามารถหมักน้ำตาล กลูโคสแล้วทำให้เกิดผลผลิตคือ Acetoin และ 2,3-butanediol หรือ diacetyl ทำให้เกิดสภาวะต่าง ขึ้นในหลอดอาหาร และเมื่อหยดสาร Creatine (สารละลาย A; Solution A) หรือ Naphtol (สารละลาย B; Solution B) ลงในหลอดอาหารจะพบสีแดงหรือสีม่วงเข้มในหลอดอาหาร ทั้งนี้เชื้อ แบคทีเรีย *E. coli* จะให้ผลลบในการทดสอบนี้เพราะสร้างกรด ดังนั้นหลอดอาหารจึงมีสีเหลือง

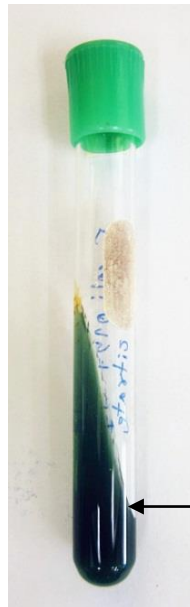
หลังจากหยดสารละลาย (ภาพที่ 3.6 ข) อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มี Buffered peptone เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนให้กับเชื้อแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae



ภาพที่ 3.6 ผลการทดสอบ MR (ก) และ VP (ข) ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

2.3 การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate)

การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถทำการทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหาในอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons citrate agar ซึ่งมีส่วนผสมของซิเตรทอยู่ หากแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทได้ จะผลิตเอนไซม์ Citrate lyase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเอนไซม์ Citrate aldolase หรือเอนไซม์ Citridesmolase ออกมาย่อยซิเตรทให้กลายเป็นสาร Oxaloacetate และสาร Acetate จากนั้นจึงสร้างเอนไซม์ Oxaloacetate decarboxylase ออกมาย่อยสารนี้ให้กลายเป็น Pyruvate และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้หลอดอาหารอยู่ในสภาวะที่เป็นด่างมากขึ้น ($\text{pH} > 7.6$) จนทำให้สีของอินดิเคเตอร์คือ Bromthymol blue เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไม่สามารถใช้ซิเตรทได้ (Pohl และคณะ, 1984) ดังนั้นจึงเกิดผลลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเขียวเหมือนเดิม (ภาพที่ 3.7)



ผลลบ

สีของอาหารเป็นสีเขียวเหมือนเดิม

ภาพที่ 3.7 ผลการทดสอบการใช้ซิเตรทของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons citrate agar

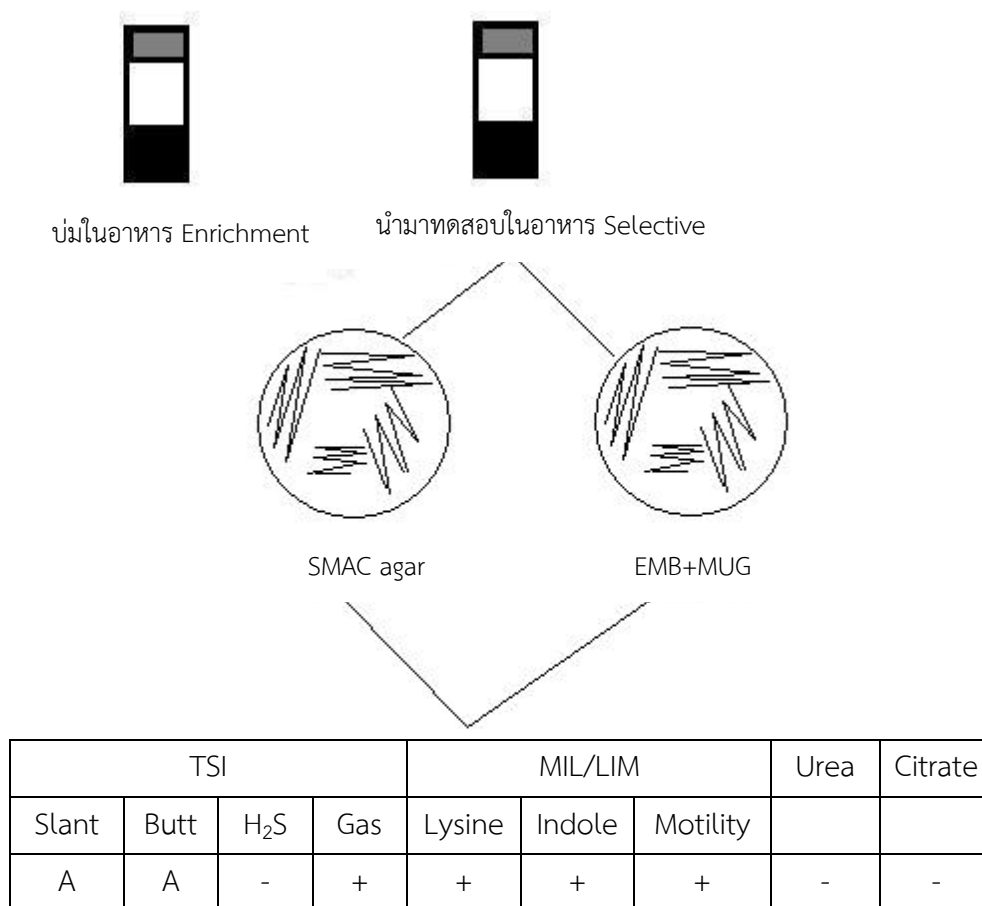
ขั้นตอนในการตรวจหาเชื้อ *E.coli* O157:H7 ในอาหาร

1 ขั้นตอนการบ่มเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต (Enrichment) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 อาจมีปริมาณน้อย ดังนั้นต้องทำการบ่มเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้น ก่อนอาหารที่ใช้ในการบ่มเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้ออาจเติมยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยกำจัดแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่ต้องการ ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้เช่นยา Cefixime ยา Cefsulodin ยา Novobiocin และยา Vancomycin เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อ Enrichment ที่นิยมใช้ตามคำแนะนำของ FDA คือ Enterohemorrhagic *E. coli* enrichment broth (EEB) (Weagant และคณะ, 1995)

2 ขั้นตอน Isolation นิยมใช้อาหาร Sorbitol-MacConkey (SMAC) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Methylumbelliferyl- β -D glucuronide (MUG) เป็นส่วนผสม โดยผลที่ได้ต้องพบโคโลนีสีครีมบนอาหาร SMAC และพบโคโลนีที่ไม่เกิดการเรืองแสงเมื่อบ่มกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MUG

3 ขั้นตอน Confirmation เป็นการยืนยันผลว่าพบเชื้อแบคทีเรียนี้หรือไม่ โดยการหยดสารละลายของเชื้อแบคทีเรียที่สงสัย (Suspension) ใน O157:H7 antiserum โดยหากเกิดผลบวก จะเกิดการจับกลุ่มกันตกตะกอน

ทั้งนี้แผนภาพรวมของการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ในอาหาร ดังภาพที่ 3.8



ภาพที่ 3.8 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ในอาหาร

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol MacConkey (SMAC) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ SMAC agar ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลซอร์บิทอล (Sorbitol) ของแบคทีเรีย Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ซึ่งรวมถึงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ด้วย (FDA, 1995) น้ำตาลซอร์บิทอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมอินดิเคเตอร์คือ Neutral red ซึ่งทำหน้าที่ในการตรวจจับการเปลี่ยนแปลงโดยหากเชื้อแบคทีเรียชนิดใดสามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้จะทำให้เกิดโคโลนีสีแดงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่หากไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้จะเกิดโคโลนีที่ไม่มีสี ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้ จึงเกิดโคโลนีที่ไม่มีสีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (March และ Ratnam, 1986) ดังภาพที่ 3.9 อาหารเลี้ยงเชื่อนี้มีสารที่ช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆคือ Bile salts ผสมกับ Crystal violet และเพื่อช่วยให้แบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 มีการเจริญจนเพิ่มปริมาณมากขึ้น และเพื่อช่วยให้ตรวจผล

การหาเชื้อได้ชัดเจนจึงมีการเติมยา Cefixime potassium tellurite (CT) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย



(ก)

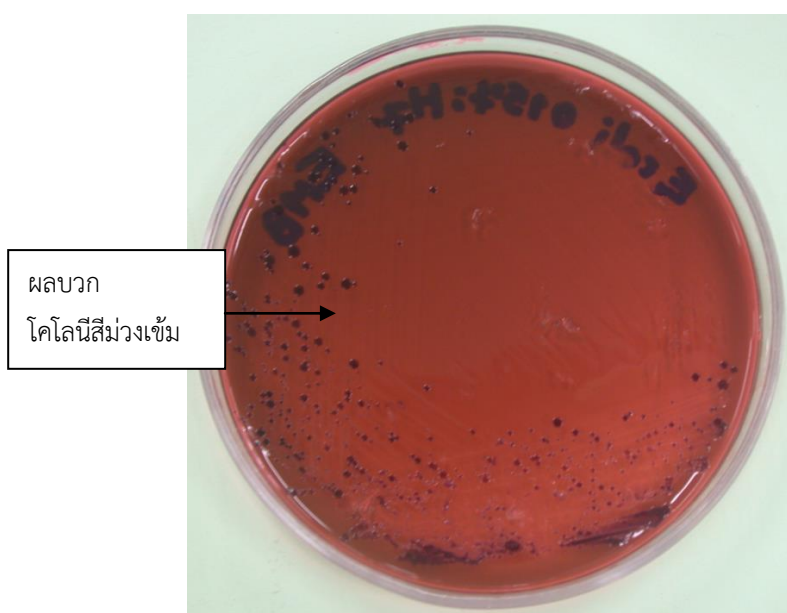


(ข)

ภาพที่ 3.9 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 (ก) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (ข) ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ SMAC agar

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB)+MUG

การเติมสาร 4-methyl-umbelliferyl β -D-glucuronide (MUG) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB สามารถช่วยให้สามารถตรวจหาเอนไซม์ β -glucuronidase ที่มีอยู่ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 จะไม่มีเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนสาร MUG ให้กลายเป็นสารเรืองแสง จึงพบโคโลนีสีม่วงเข้มไม่มีสีเขียวมันวาวคล้ายโลหะล้อมรอบ ดังภาพที่ 3.10



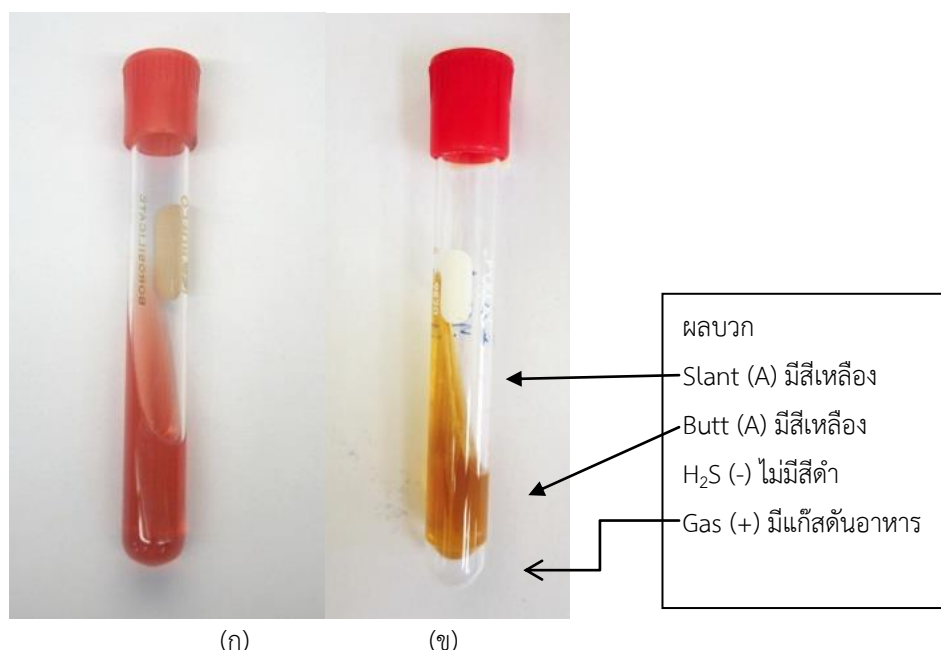
ภาพที่ 3.10 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB+MUG

การทดสอบทางชีวเคมี

1 การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส

การทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครส เป็นส่วนผสมในอัตราส่วน 0.1:1.0:1.0 โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการนำมาทดสอบขีดที่ผิวหน้าของอาหารในส่วนที่เรียกว่า Slant จากนั้นจึงทำการแทงลงสู่ส่วนล่างของหลอดเรียกว่าส่วน Butt หากเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ในสภาพที่มีออกซิเจนจะทำให้เกิดความเป็นกรด (Acid; A) ที่ส่วนของผิวหน้าหรือ Slant โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และหากเชื้อจุลินทรีย์นั้นสามารถใช้ทั้งน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและหรือน้ำตาลซูโครส ในส่วนล่างของหลอดที่มีออกซิเจนอยู่น้อย จะทำให้ส่วน Butt เป็นสีเหลืองจากกรดที่สร้างขึ้น และหากอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมีรอยแตกอันเนื่องมาจากแก๊สที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นจะรายงานผลบวกคือพบแก๊สในหลอดซึ่งทำให้อาหารมีรอยแตก และหากแก๊สนั้นเป็นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide) หลอดอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นจะมีสีดำอยู่ที่ส่วน Butt สำหรับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 จะให้

กรดในส่วนของทั้ง Slant และ Butt รวมถึงสร้างแก๊สได้ แต่แก๊สนั้นไม่ใช่แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ ดังนั้น ผลการทดสอบที่ได้จึงเป็น A (Slant) A (Butt) - (H_2S) + (Gas) ดังภาพที่ 3.11

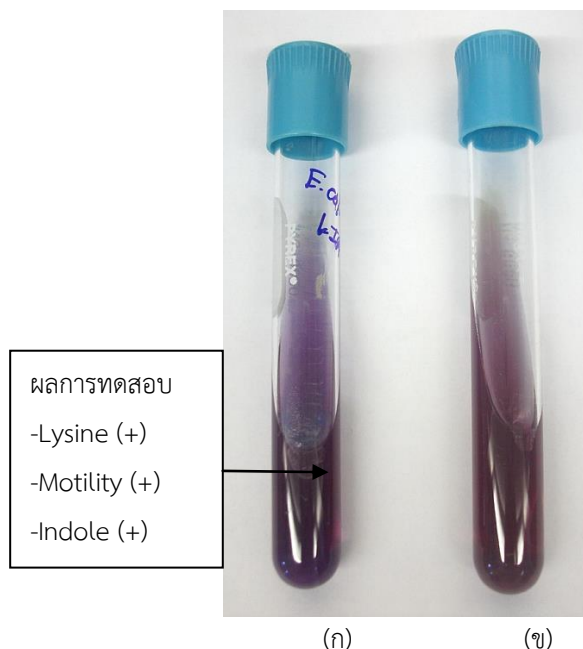


ภาพที่ 3.11 อาหาร TSI (ก) เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ที่เจริญบนหลอดอาหาร TSI (ข)

2 การทดสอบการใช้ไลซีน การสร้างสารอินโดลและการดูผลการเคลื่อนที่

การทดสอบการใช้ไลซีน การสร้างสารอินโดลและการเคลื่อนที่ สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Motility indole lysine medium (MIL medium) อาหารเลี้ยงเชื่อนี้มีสาร Peptic digest of animal tissue สาร Casein enzymic hydrolysate และ สาร Yeast extract supply amino acids เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีน้ำตาลเดกซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอน การทดสอบทำเช่นเดียวกับในอาหาร TSI โดยทำการขีดเชื้อแบคทีเรียลงที่ผิวหน้าของอาหารในส่วนที่เรียกว่า Slant จากนั้นจึงทำการแทงลงสู่ส่วนล่างของหลอดเรียกว่าส่วน Butt โดยอาหารชนิดนี้มักเติมผงวุ้นเล็กน้อยเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสถานะกึ่งแข็งกึ่งเหลวเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ได้ของเชื้อแบคทีเรีย หากเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะพบรอยแทงเป็นเส้นแต่หากเชื้อแบคทีเรียใดสามารถเคลื่อนที่ได้มักจะสังเกตเห็นความขุ่นเกิดขึ้นทั่วทั้งหลอดอาหาร โดยสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนไปตามอินดิเคเตอร์ ซึ่งอาหาร MIL มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ โดยหากเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอ็นไซม์ออกมาย่อยเดกซ์โตรสได้ในระหว่างการเจริญเติบโตในสถานะที่มีออกซิเจนจึงจะทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองตามสถานะของกรดที่เพิ่มมากขึ้น แต่หากเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอ็นไซม์ Lysine decarboxylase เพื่อย่อยกรดอะมิโนไลซีนได้ทั้งในสถานะที่มีออกซิเจน (Slant) และมีออกซิเจนต่ำ (Butt) จะทำให้เกิดสาร Amine ซึ่งทำให้เกิดสถานะต่างในหลอดทดลองจึงทำให้หลอดทดลองมีสีม่วง แต่หากในบริเวณ Slant ซึ่งมีออกซิเจนอยู่มากเชื้อ

แบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์ Lysine decarboxylase ได้มากพอ ซึ่งอาจทำให้เกิดสีเหลืองผสมสีม่วงในบริเวณใกล้ๆ กับส่วนบนของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อย่างไรก็ตามหากเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอ็นไซม์ Lysine deaminase ได้ในสถานะที่มีออกซิเจนจะทำให้ได้ผลผลิตที่สามารถทำปฏิกิริยากับสาร Ferric ammonium citrate ทำให้ได้สีแดงถึงแดงน้ำตาลที่ส่วนบนของหลอดทดลอง ส่วนด้านล่างหลอดยังคงมีสีเหลืองของกรด นอกจากนั้นแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ยังผสมกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) ซึ่งหากเชื้อแบคทีเรียผลิตเอ็นไซม์ Tryptophanase จะสามารถย่อยทริปโตเฟนแล้วเกิดสารอินโดล ขึ้นซึ่งจะปรากฏวงแหวนสีแดงเมื่อหยดสารละลาย Kovacs ลงไป ซึ่งทั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 จะให้ผลการทดสอบเหมือนกันคือไม่สร้างเอ็นไซม์ Lysine deaminase แต่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Lysine decarboxylase จึงทำให้หลอดทดลองมีสีม่วงทั่วทั้งหลอดและเมื่อเติม Kovacs ลงไปจะพบวงแหวนสีแดง (ภาพที่ 3.12)

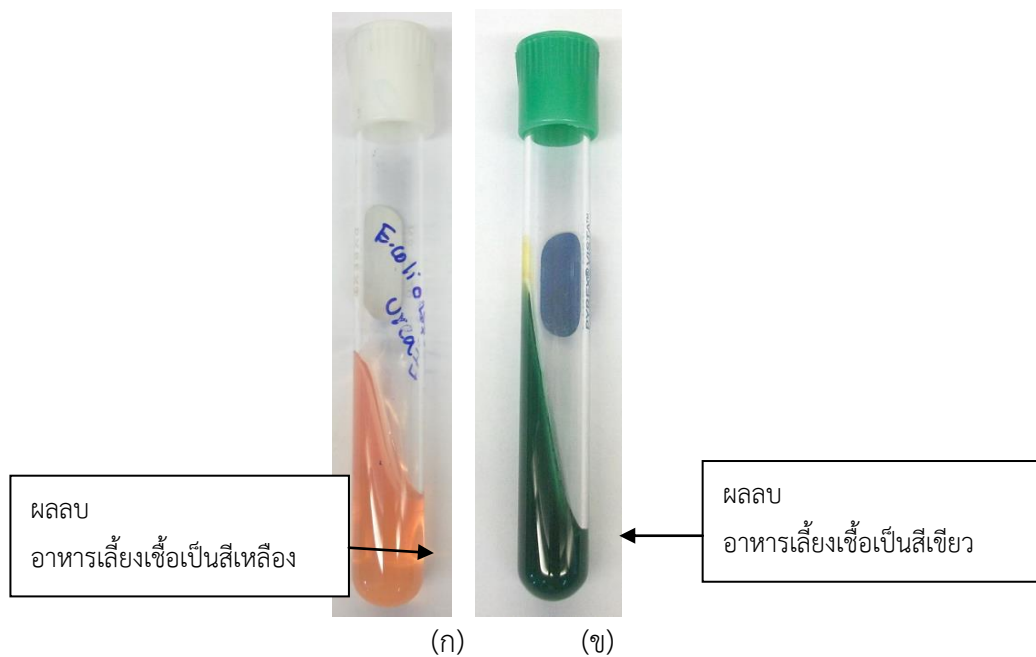


ภาพที่ 3.12 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 (ก) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (ข)
ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MIL medium

3 การทดสอบการใช้ยูเรีย (Urea) และการใช้ซิเตรท (Citrate)

อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบการใช้ยูเรีย คือ Urea agar อาหารนี้มีสาร Peptone และน้ำตาลเดกซ์โตรสซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลายชนิด มี Enzymatic digest of gelatin เป็นแหล่งไนโตรเจนแหล่งคาร์บอนและแหล่งของกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มี Monopotassium phosphate เป็นแหล่งบัฟเฟอร์และมีส่วนผสมของสารยูเรีย ในปริมาณที่มากที่สุดเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่

สำคัญ หากเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบสามารถย่อยยูเรียได้จะได้ผลผลิตคือ แอมโมเนีย (Ammonia) ซึ่งทำให้เกิดด่างในหลอดทดลอง และทำให้หลอดอาหารเปลี่ยนจากสีเหลือง (pH~6.8) เป็นสีแดง (pH~8.1) การเปลี่ยนแปลงนี้เพราะมีสาร Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ สำหรับการทดสอบการใช้ซิเตรทใช้อาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ทดสอบ *E. coli* คือ Simmons citrate agar ซึ่งมีส่วนผสมของซิเตรทอยู่ และหากเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ทั้งนี้ *E. coli* O157:H7 ไม่ย่อยทั้งยูเรียและซิเตรท อาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นสีเหลืองและสีเขียวเหมือนเดิม (ภาพที่ 3.13)



ภาพที่ 3.13 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar (ก) และ Simmons citrate agar (ข)

วิธีการทดลอง
การตรวจหาเชื้อ *Coliform Escherichia coli*

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

1.1 น้ำดื่มจากแหล่งต่างๆ

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST) พร้อมหลอดดักก๊าซ

2.2 Brilliant Green Lactose Bile broth (BGBB) พร้อมหลอดดักก๊าซ

2.3 Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

2.4 Tryptophan Broth

2.5 MR-VP Broth

2.6 Citrate agar slant

3 สารเคมี

3.1 Kovacs's reagent

3.2 Methyl red

3.1 Solution A และ B

3.2 70 %แอลกอฮอล์

3.5 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1% Peptone water)

3 อุปกรณ์

3.1 หม้อนึ่ง

3.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

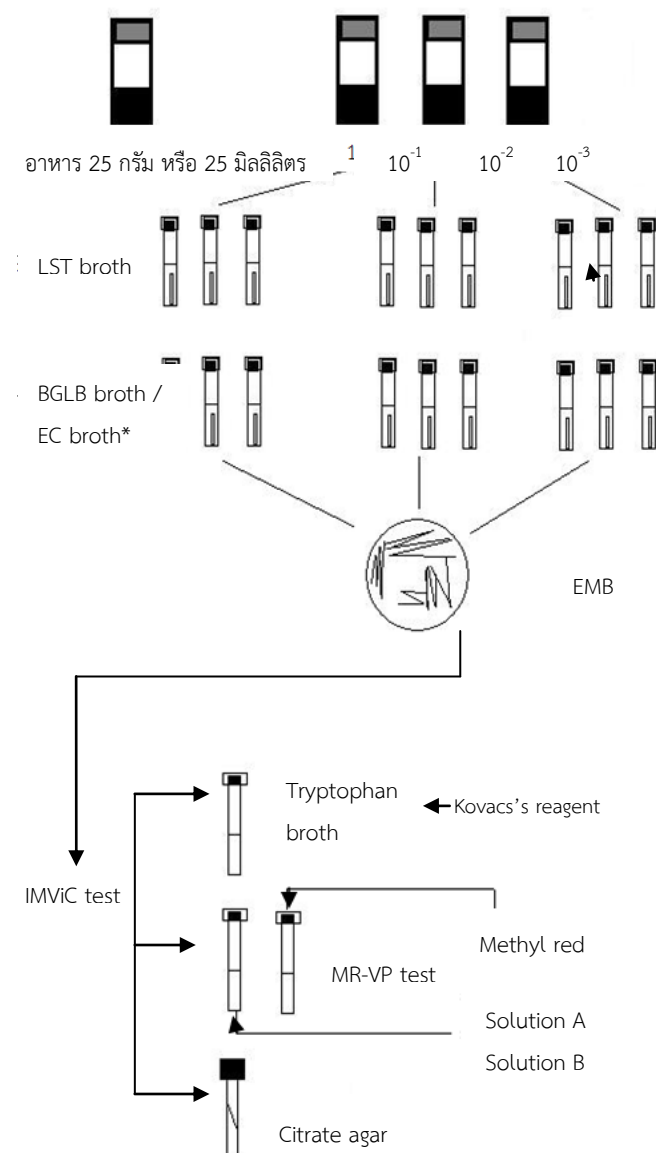
3.3 ตู้บ่ม

3.4 แผ่นสไลด์

3.5 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

- 1.1 ดูดตัวอย่างน้ำมาแหล่งละ 25 มิลลิลิตรละลายในน้ำยาเจือจางปริมาณ 225 มล. (10^{-1})
- 1.2 ตีปนด้วยเครื่องตีปนประมาณ 2 นาที ทำการเจือจางอาหารนั้นให้ได้ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}
- 1.3 ทำการปิเปตตัวอย่างที่ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} มาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดอาหาร LST ที่มีหลอดดักก๊าซที่จัดเตรียมไว้ทั้งหมด 9 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.4 ทำการดูดตัวอย่างจากหลอดอาหาร LST (เฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊สในหลอดดักก๊าซ) จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหาร BGGB ที่มีหลอดดักก๊าซ แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.5 นำ Loop มาจุ่มตัวอย่างจากหลอดอาหาร BGGB (เฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊สในหลอดดักก๊าซ) แล้วนำมาขีดให้เป็นโคโลนีเดี่ยว (Single Colony) บนอาหาร EMB แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลบวกจะสังเกตเห็นโคโลนีสีเขียว น้ำเงินแวววาวคล้ายโลหะ
- 1.6 นำ Loop มาขีดโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร EMB แล้วนำมาใส่ในอาหารดังนี้
 - 1.6.1 นำ loop มาจุ่มลงในอาหาร Tryptophan broth แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้หยดน้ำยา Kovacs's reagent ลงไปในหลอดทดลองผลบวกจะเกิดวงแหวนสีแดงในหลอด
 - 1.6.2 นำ Loop มาขีดลงในอาหาร MR-VP จำนวน 2 หลอดแล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น
 - 1.6.2.1 หลอดที่ 1 หยด Methyl red แล้วบันทึกผล ผลบวกเกิดสีแดง
 - 1.6.2.2 หลอดที่ 2 หยด Solution A และ Solution B แล้วบันทึกผล ผลบวกเกิดสีเหลือง
 - 1.6.3 นำ Loop มาขีดลงในอาหาร Citrate agar slant แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลการเปลี่ยนสีของอาหารผลบวกอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน



ภาพที่ 3.14 ขั้นตอนโดยรวมการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย Coliform และ *Escherichia coli*
 * หมายถึง ใช้สำหรับตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มโดยให้ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 3.3 บันทึกผลการทดลองนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร

อาหาร	หลอดที่/ จานที่	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN/ml
LST	1				
	2				
	3				
BGBB	1				
	2				
	3				
EMB	1				
	2				
	3				
Idole test	1				
	2				
	3				
MR test	1				
	2				
	3				
VP test	1				
	2				
	3				
Citrate test	1				
	2				
	3				

แสดงวิธีการคำนวณ MPN/ml

.....

.....

.....

ตารางที่ 3.4 บันทึกผลการทดลอง

อาหาร	ลักษณะที่สังเกตได้	วาดภาพประกอบ
LST		
BGBB		
EMB		
Idole test		
MR test		
VP test		
Citrate test		

เอกสารอ้างอิง

- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. 2007. Official methods of analysis of AOAC International, Horwitz (ed.), (18th ed.). AOAC International, Gaithersburg, Md.
- APHA, American Public Health Association. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, (20th ed.). Washington, DC.
- Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., Baron, R., Kobayashi, J. 1994. A multistate outbreak of *E. coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *Journal of the American Medical Association*, 272: 1349–1353.
- Blackburn, C., De W., Curtis, L.M., Humpheson, L., Billon, C., McClure, P.J. 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*, 38(1): 31-44.
- Boyer, R.R., Sumner, S.S., Williams, R.C., Kniel, K.E., McKinney, J.M. 2011. Role of O-antigen the *Escherichia coli* O157:H7 cells hydrophobicity, charge and ability to attach to lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3): 228-232.
- Clark, W.M., Lubs, H.A. 1915. The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators. *Journal of Infectious Diseases*, 17:160-173.
- Cowden, J.M., Ahmed, S., Donaghy, M., Riley, A. 2001. Epidemiological investigation of the Central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiology & Infection*, 126: 335–341.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. 2001. Food microbiology, fundamentals and frontiers, (2nd ed.). American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.
- Dufor, A.P. 1977. *Escherichia coli*: the fecal coliform. A.W Hoadley, B.J Dutka (Eds.), Bacterial indicators/health hazards associated with water, ASTM, Philadelphia, pp. 48–58.
- Dunham, H.G., Schoenlein, H.W. 1926. Brilliant green bile media. *Stain Technology*, 1: 129–134.

- FDA, Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4. *Escherichia coli* and the coliform bacteria: Isolation methods for Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), (8th ed.), pp. 4.20.
- Feng, P. C. S., Hartman, P. A. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1320–1329.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., Beuchat, L.R. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104(1): 1-34.
- Hussaini, S.N., Edgar, A.W. 1981. Studies on *Escherichia* vaccines: Development of an agar-gel immunodiffusion method for the identification of antigens in *E. coli* vaccines. *Journal of Biological Standardization*, 9(4): 531-534.
- Levine, M. 1918. Differentiation of *E.coli* and *Aerogenes* on simplified Eosin-Methylene blue agar. *Journal of Infectious Diseases*, 23: 43-47.
- Mallman, W.L., Darby, C.W. 1941. Use of a lauryl sulphate tryptose broth for the detection of coliform organisms. *American Journal of Public Health*, 31: 127–134.
- March, S.B., Ratnam, S. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5): 869-872.
- Mehlman, I.J., Simon, N.T., Sanders, A.C., Fishbein, M., Olson, J.C., Read, R.B. 1975. Methodology for enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of AOAC*, 58: 283–292.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150: 787–796.
- Nimmich, W., Naumann, G., Budde, E., Straube, E. 1980. K Antigen, Colonization Factor Antigen, Dulcitol Fermentation, and Hemolysin Production in *E.coli* Rough Strains Isolated from Urine Specimens. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 247(1): 35-42.

- Paruch, A.M., Mæhlum, T. 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators*, 23: 140-142.
- Pohl, P., Lintermans, P., Vandergheynst, M.C., Van Muylem, K., Schlicker, C., Van Robaeys, G. 1984. Selective citrate–adonitol medium for the isolation of various strains of *Escherichia coli* K99. *Ann Institut Pasteur Microbiol*, 135: 29–33.
- Prère, M-F., Fayet, O. 2005. A new genetic test for the rapid identification of shiga-toxines producing (STEC), enteropathogenic (EPEC) *E. coli* isolates from children. *Pathologie Biologie*, 53(8–9):466-469.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H.M., Lassen, J., Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Kapperud, G., Aavitsland, P. 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infectious Diseases*, 8: 41.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L., Jinneman, K.C. 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Journal of Food Protection*, 58: 7–12.
- Whittam, T.S., McGraw, E.A., Reid, S.D. 1998. Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7: A model for emerging infectious diseases. *Biomedical Research Reports*, 1: 163-183.

บทปฏิบัติการที่ 4

การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างทรงกลม (Coccus) (Lowy, 1998) เมื่อนำไปส่องดูรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียนี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถสังเกตเห็นเชื้อแบคทีเรียนี้มีรูปร่างคล้ายผลองุ่นเกาะกลุ่มกัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.5 ถึง 1.5 ไมโครเมตร *S. aureus* ทนสภาพแห้งแล้งได้จึงสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (Water activity; aw) ประมาณ 0.86 (Scott, 1953) จึงเป็นแบคทีเรียที่มีโอกาสพบได้ในอาหารกึ่งแห้ง (Intermediate moisture food) และอาหารที่มีเกลือ เช่น เครื่องแกง แยม (Miller, 2000) เป็นต้น ปกติแล้วเชื้อแบคทีเรียนี้อาศัยอยู่ในบริเวณจมูก ลำคอ และผิวหนังของมนุษย์ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารอาจเกิดจากอาหารนั้นมีการสัมผัสโดยตรงกับผิวหนังของมนุษย์หรืออาจเป็นเพราะระบบสุขาภิบาลอาหารที่ไม่ดี เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถสร้างสารพิษในอาหารได้ การรับประทานอาหารจึงควรระวังอันตรายจากการปนเปื้อนของสารพิษ (Intoxication) ที่เชื้อแบคทีเรียได้ผลิตไว้ในอาหารแล้ว (Zhang และคณะ, 1998) โดยสารพิษที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทนต่อการแปรรูปได้เช่น ทนต่อการให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ และทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานกว่า 30 นาที เป็นต้น สารพิษที่เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สร้างขึ้นมาในการช่วง Log phase มีชื่อเรียกต่างๆ เช่น สารพิษ Enterotoxin ที่มีชื่อว่า Staphylococcal enterotoxin ซึ่งมี Serotype หลักคือ SEA SEB SEC SED และ SEE โดยสารพิษ SEA และสารพิษ SED เป็นสารพิษหลักที่สามารถก่อโรคท้องร่วงในมนุษย์ รวมถึงเป็นสารพิษที่ทนความร้อน ละลายในน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 28,000 ดาลตันถึง 35,000 ดาลตัน (Balaban และ Rasooly, 2000) และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถผลิต Staphylococcus alpha-toxin (Hocke และคณะ, 2006) ได้อีกด้วย ทั้งตัวเซลล์ (Vegetative cell) และสารพิษของเชื้อแบคทีเรียนี้ทำให้เกิดโรคท้องเสียหรือทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง โดยปริมาณที่ทำให้เกิดโรคได้คือได้รับตัวเชื้อแบคทีเรียน้อยอย่างน้อยที่ $6 \log_{10}\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ หรือ $6 \log_{10}\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ หรือได้รับสารพิษอย่างน้อย 1 ไมโครกรัม เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ใช้เวลาบ่มตัวสั้นจึงทำให้เกิดอาการหลังจากการรับประทานอาหารได้ไม่นานเพียงประมาณ 4-6 ชั่วโมง หรือหากได้รับสารพิษของเชื้อแบคทีเรียจะมีระยะสั้นในการเกิดอาการ อาจเกิดภายหลังจากบริโภคอาหารเพียง 1 ชั่วโมง (Bryan และคณะ, 1997) ผู้ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียอาจเกิดอาการอาเจียน ปวดท้อง แต่อาการอาจดีขึ้นได้เอง อย่างไรก็ตามหากผู้ได้รับเชื้อแบคทีเรียน้อยอยู่ในวัยเด็กและวัยชราให้เฝ้าระวังอันตรายเพราะอาจทำให้มีการถ่ายท้องจนอาจถึงแก่ชีวิตได้ อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บางสายพันธุ์อาจไม่ผลิตสารพิษ สำหรับผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* คือให้ผลการทดสอบคะตาเลส (Catalase) และโคแอกกูเลส (Coagulase) เป็นบวก สามารถสร้างเอ็นไซม์

Thermonuclease เพื่อหมักน้ำตาลแมนนิทอลแม้ในสภาวะที่ไร้อากาศ เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีความสามารถที่จะปรับตัวได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ แม้อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างๆด้วยเช่นกัน ดังนั้นเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้โอกาสที่จะใช้ยาปฏิชีวนะแบบเดิมในการรักษาบางครั้งอาจไม่สามารถใช้ได้ (Vanderhaeghen และคณะ, 2010)

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

1 ขั้นตอนการตรวจขั้นแรก (Presumptive test) เป็นขั้นตอนการตรวจเบื้องต้นว่าอาหารชนิดนั้นๆปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถเจริญในหลอดอาหารที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 10 ได้ ดังนั้นเมื่อบ่มหลอดอาหารที่มีเกลือกับเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสแล้ว จะสังเกตเห็นความขุ่นในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จากนั้นจึงนับจำนวนหลอดที่ขุ่นอาจใช้ระบบ 3 หลอดหรือ 5 หลอดเพื่อนำมาคำนวณหาค่า MPN ได้จากตารางที่ 3.1-3.2 (บทที่ 3) จากนั้นจึงถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากหลอดทดลองที่มีผลบวกมาทำการตรวจสอบต่อในขั้นตอนต่อไป

2 ขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรีย (Isolation) สามารถทำได้โดยการขีด (Streak) เชื้อแบคทีเรียที่มีผลบวกในขั้นตอนแรกและสงสัยว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในจานอาหารที่ใช้ในการคัดเลือก (Selective media) เช่น อาหาร Baird-Parker (BP) agar อาหาร Mannitol salt agar (MSA) หรืออาหาร Toluidine blue DNA (TBD) agar

3 ขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical identification) การทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้คือ การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) การทดสอบหาเอ็นไซม์โคแอกกูเลส การทดสอบการเคลื่อนที่ได้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase (tryptic) soy broth (TSB) ผสม 10% NaCl และ 1% Sodium pyruvate

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นอาหารเหลวที่มีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่างๆไปได้หลายชนิดทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนและเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนได้เล็กน้อย ตลอดจนแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (ASM, 2007) ซึ่ง AOAC (1995) ได้แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมกับเกลือร้อยละ 10 และ Sodium pyruvate ร้อยละ 1 ในการหาค่า Most Probable Number; $\text{MPN}\cdot\text{g}^{-1}$ ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถทนเกลือได้ จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

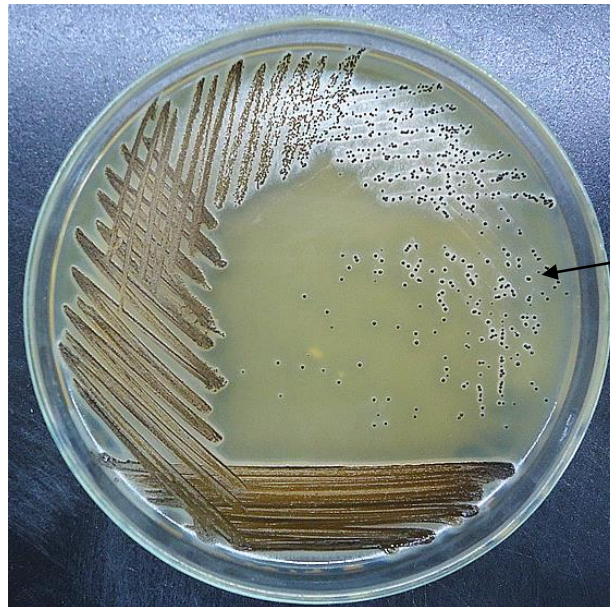
48±2 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1) จากนั้นจึงนำหลอดที่ขุ่นมาหาคำนวนหาค่า MPN จากตารางที่ 3.1 (บทที่ 3)



ภาพที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+10%NaCl+1% Sodium pyruvate ที่บ่มไว้ 48 ชั่วโมง (ก) อาหาร TSB ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย (ข)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker (BP) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ BP agar ถูกรายงานในปี ค.ศ. 1962 โดย Baird-Parker ว่าเป็นอาหารที่ใช้คัดเลือกและบอกความแตกต่างของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ โดยผลบวกสังเกตเห็นโคโลนีสีดำหรือสีเทาล้อมรอบด้วยเคลียโซน (Clear zone) ซึ่งเกิดจากอาหารชนิดนี้มีส่วนผสมของ Lithium chloride และ Potassium tellurite ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการคัดเลือกที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั่วไปได้ และมีสาร Glycine และไข่แดง (Egg yolk) ที่ช่วยให้เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้ และถ้าหากโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อ *S. aureus* เชื้อแบคทีเรียนี้จะทำการรีดิวซ์เกลือ Tellurite ให้กลายเป็น Tellurium ทำให้ได้โคโลนีสีดำ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์ Lecithinase สำหรับย่อย Lecithin รวมถึงผลิตเอนไซม์ Protease เพื่อย่อยโปรตีนทำให้เกิดเคลียโซนรอบๆโคโลนีได้ (ภาพที่ 4.2) ซึ่งถ้าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* จะไม่สามารถย่อยไข่แดงได้จึงเห็นเพียงโคโลนีสีดำไม่มีเคลียโซนล้อมรอบ

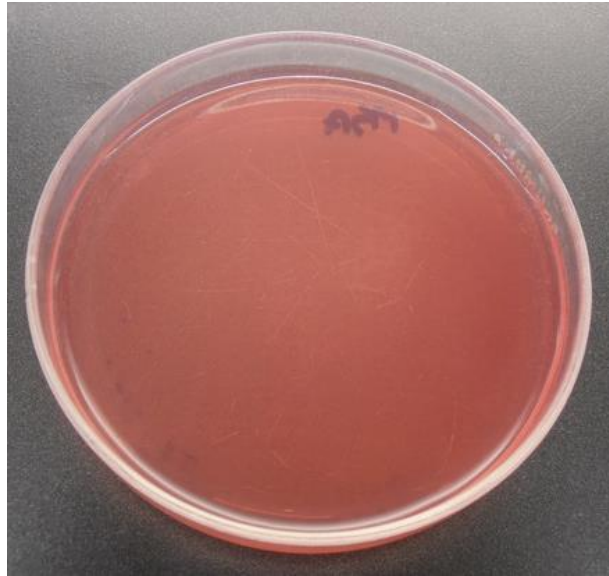


ผลบวก
พบโคโลนีสีดำหรือสีเทา
ล้อมรอบด้วยเคลียโซน

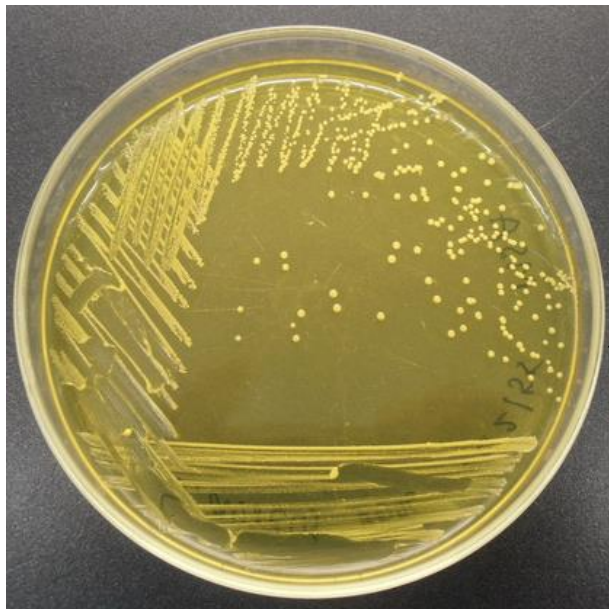
ภาพที่ 4.2 ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BP agar

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt (MSA) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ใช้ในการคัดเลือกและบอกความแตกต่างระหว่างลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* สายพันธุ์ต่างๆกันออกจากกันได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เติมยาปฏิชีวนะเช่น ยา Oxacillin (MSO) หรือ ยา Cefoxitin เพื่อช่วยในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Willey และคณะ, 2005) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่พบการระบาดบ่อยครั้งในโรงพยาบาลและศูนย์สุขภาพต่างๆ (Nagao และคณะ, 2010) เนื่องจากอาหาร MSA มีส่วนผสมของเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึงร้อยละ 7.5 ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ทนเกลือไม่สามารถเจริญได้ สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งทนเกลือได้จะให้ผลบวกคือสังเกตเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองสว่าง เพราะอาหารชนิดนี้มีส่วนผสมของน้ำตาล แมนนิทอล และมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งเมื่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* หมักน้ำตาลนี้จะทำให้เกิดกรดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสีของ Phenol red จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 4.3) โดยในสถานะที่ไร้อากาศเมื่อนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มาบ่มไว้ในโลว์อากาศแล้วโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ได้ยังคงมีสีเหลืองในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ไม่ทำให้อาหารเปลี่ยนสีในสภาพไร้อากาศจึงพบโคโลนีสีแดงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA



(ก)



(ข)

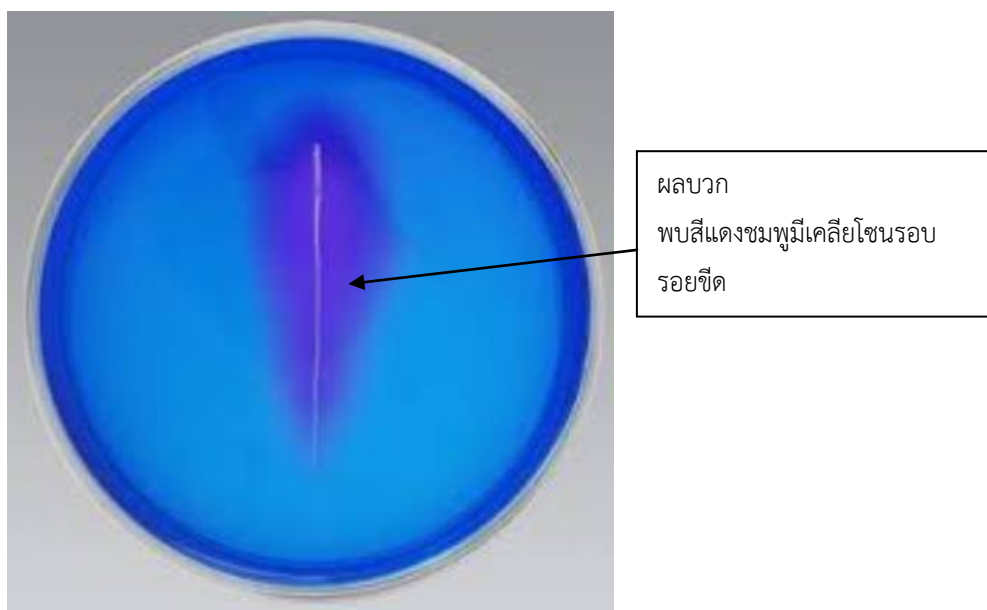
ผลบวกเกิดโคโลนีสี
เหลืองและสีของ
อาหารเลี้ยงเชื้อ
เปลี่ยนจากสีแดง
เป็นสีเหลือง

ภาพที่ 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ MSA (ก) เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนจานอาหาร MSA (ข)

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Toluidine blue DNA (TBD) agar

อาหาร TBD agar เป็นอาหารที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (APHA, 2001) โดยอาหารเลี้ยงเชื่อนี้มีการผสม Deoxyribonuclease (DNA) และ Toluidine ลงไปในอาหาร TBD agar การทดสอบเริ่มโดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยมาเลี้ยงในอาหารเหลวจากนั้นจึงนำมาต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเชื้อแบคทีเรียมาขีดเชื้อลงในจานอาหาร TBD agar หากเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะสามารถสร้างเอนไซม์ Thermostable deoxyribonuclease ซึ่งสามารถย่อย DNA แล้ว

ปรากฏเห็นเป็นเคียวโซนล้อมรอบรอยขีด จากนั้นจึงทำให้สีของ Toluidine เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง (Waller และคณะ, 1985) หรือสีชมพูคล้ายกุหลาบรอบๆรอยขีด (ภาพที่ 4.4)



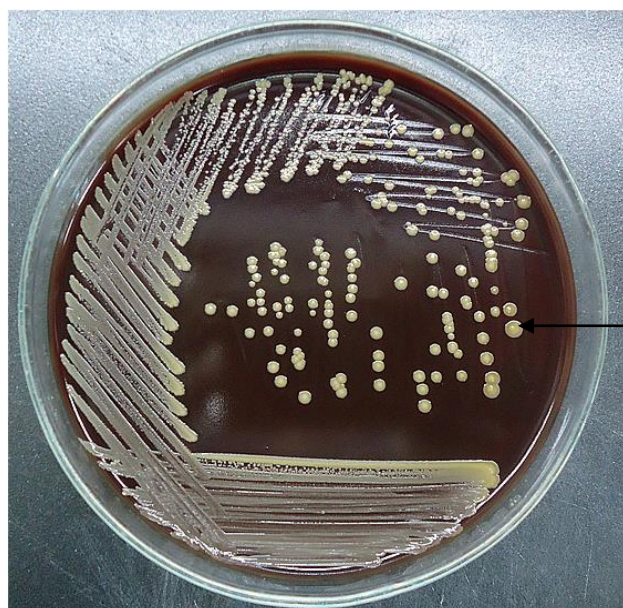
ภาพที่ 4.4 เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TBD agar
ที่มา: Thermo Fisher Scientific Inc (2013)

การทดสอบทางชีวเคมี

1 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolysis)

การทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar (BA) อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar เป็นอาหารที่ต้องเติมเลือดของแกะ กระต่าย หรือม้า ผสมลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนและแหล่งวิตามินเช่น Yeast extract แหล่งคาร์บอนเช่นแป้งข้าวโพด เพื่อให้สารพิษที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นได้ถูกดูดซับและช่วยเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียเจริญบนจานอาหาร BA จะสามารถจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ได้จากคุณสมบัติในการย่อยเลือด (Hemolytic) เมื่อเชื้อแบคทีเรียย่อยแล้วจะมีลักษณะปรากฏของการย่อย 4 ลักษณะคือ 1 เกิดการย่อยแบบ α -hemolysis คือเกิดการรื้อตัว Hemoglobin เป็น Methemoglobin ซึ่งจะมีลักษณะโคโลนีสีเขียวเกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BA แบบที่ 2 เกิดการย่อยแบบ β -hemolysis คือมีการย่อยเม็ดเลือดแดงจนเห็นลักษณะเคียวโซนล้อมรอบโคโลนี แบบที่ 3 เรียกว่า γ -hemolysis จะไม่พบการทำลายเม็ดเลือดแดง และจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และแบบที่ 4 คือ α -hemolysis คือมีโซนเล็กๆ รอบๆบริเวณที่เกิดการย่อย สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มักทำให้เกิดการย่อยแบบ β -hemolysis (Wiseman, 1975) โดยมีโคโลนีสีเหลืองครีมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ล้อมรอบด้วยเคียวโซน (ภาพที่ 4.5) นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานว่าสารพิษที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เช่น β -

toxin และ δ -toxin อาจช่วยเสริมให้เกิด Hemolysis ปรากฏเห็นชัดมากขึ้น (Hebert และ Hancock, 1985)



ผลการเกิด β -hemolysis ของเชื้อ
แบคทีเรีย *S. aureus* บนจานอาหาร BA
-โคโลนีสีเหลืองครีม
-เคลียโซน

ภาพที่ 4.5 การเกิด β -hemolysis ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนจานอาหาร BA

2 การทดสอบการผลิตเอ็นไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase)

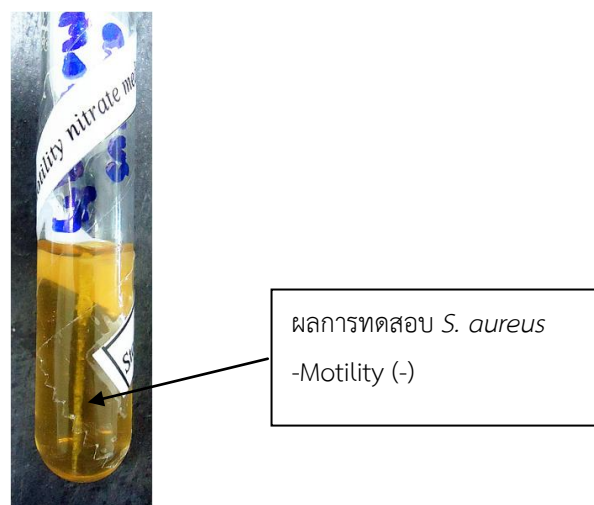
โดยทั่วไปแบคทีเรีย *Staphylococcus* มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์โคแอกกูเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดแข็งตัวของพลาสมา (Normanno และคณะ, 2005) การทดสอบสามารถทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยมาเลี้ยงในอาหาร Brain-Heart infusion (BHI) broth หรือ Agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยสารอาหารและวิตามินเนื่องจากมีส่วนผสมของสมองลูกวัวและหัวใจวัวซึ่งสารอาหารดังกล่าวเหมาะต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการหยดลงใน Coagulase Plasma-EDTA ของเลือดกระต่าย หากเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถสร้างเอ็นไซม์โคแอกกูเลสได้ จะทำให้เกิดการย่อย Plasma fibrinogen แล้วได้ Fibrin ทำให้เกิดการตกตะกอนของพลาสมา (Plasma clot) ดังภาพที่ 4.6 (Sperber และ Tatini, 1975)



ภาพที่ 4.6 เอ็นไซม์โคแอกกูเลสของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทำให้เกิดผลบวก
ของการทดสอบการผลิตเอ็นไซม์โคแอกกูเลส (ก) และผลลบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (ข)
ที่มา: Hardy Diagnostics (2016)

3 การดูผลการเคลื่อนที่

การเคลื่อนที่ได้ของเชื้อแบคทีเรียมักทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเกิดการขุ่นหรือมีการเจริญออกรอยแทงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว แต่ถ้าเชื้อแบคทีเรียนั้นๆไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะมองเห็นผลลบเป็นเส้นรอยแทงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จึงพบเส้นรอยแทงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.7) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ทดสอบการเคลื่อนที่เช่นอาหาร Motility nitrate medium อาหาร Motility test agar



ภาพที่ 4.7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในหลอดอาหาร Motility nitrate medium

วิธีการทดลอง

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

1.1 แอคลรีไส้ครีม

1.2 น้ำพริกเผา

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Baird-Parker Agar

2.2 Brain-Heart Infusion (BHI) Broth

2.3 Coagulase Plasma EDTA

2.4 Mannitol Salt Agar (MSA)

2.5 Tolidine Blue DNA Agar

2.6 Trypticase soy broth+10%NaCl

3 สารเคมี

3.1 70 %แอลกอฮอล์

3.5 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1% Peptone water)

4 อุปกรณ์

4.1 หม้อนึ่ง

4.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

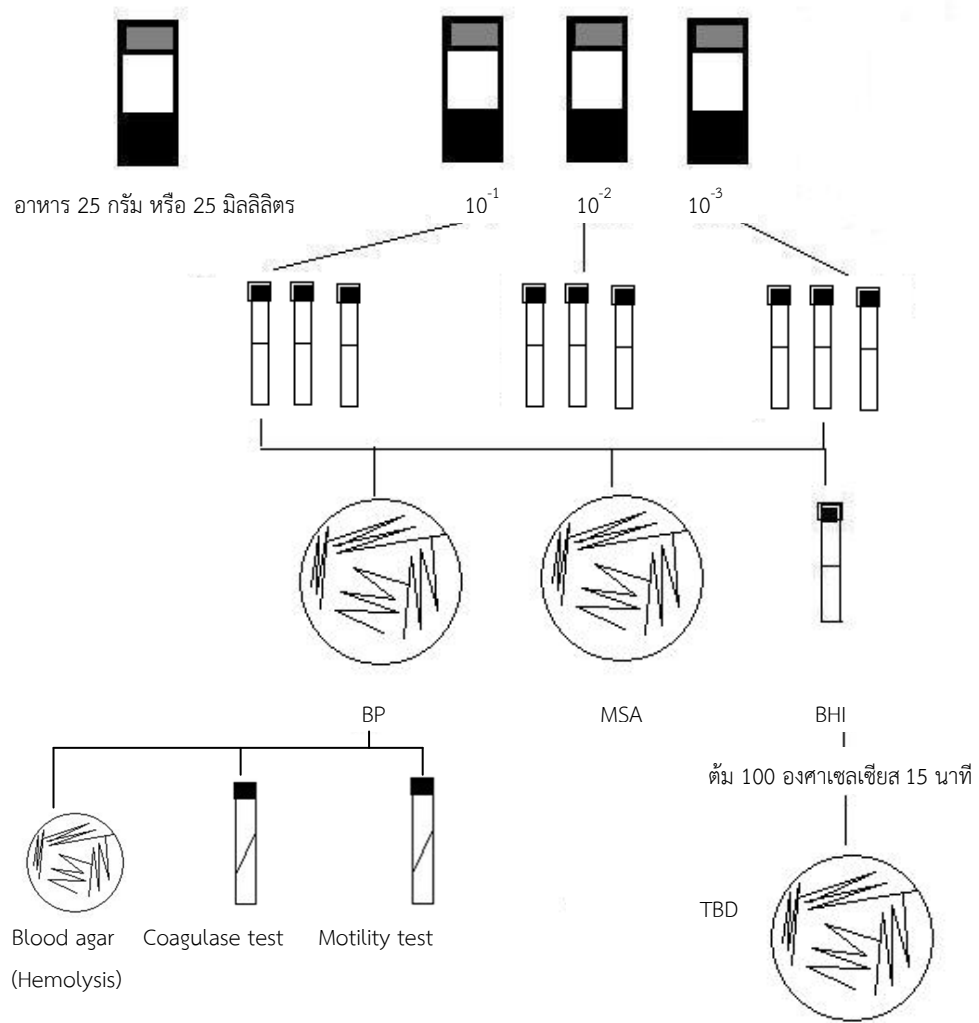
4.3 ตู้บ่ม

4.4 แผ่นสไลด์

4.5 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

- 1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัมโดยนำมาเติมลงในละลายในน้ำยาเจือจางปริมาณ 225 มิลลิลิตร (10^{-1})
- 1.2 ตีปนด้วยเครื่องตีปนประมาณ 3 นาที ทำการเจือจางอาหารนั้นให้ได้ 10^{-2} , 10^{-3}
- 1.3 ทำการปิเปตตัวอย่างอาหารมาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดอาหาร TSB+10%NaCl ที่จัดเตรียมไว้ทั้งหมด 9 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.4 ทำการจุ่ม Loop ลงในหลอดอาหาร TSB+10%NaCl (เฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊สในหลอดดักก๊าซ) แล้วนำมาจุ่มลงบนอาหาร BP MSA และ BHI (broth) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เฉพาะอาหาร MSA ให้บ่มในโถไร้อากาศ (ผลบวกบนอาหาร BP คือเกิดโคโลนีสีดำมี Clear zone ล้อมรอบ และผลบวกบน อาหาร MSA คือสีของอาหาร เปลี่ยนเป็นสีเหลือง
- 1.5 หากเกิดผลบวกตามข้อ 1.4 ให้นำหลอดอาหารเหลว BHI ที่บ่มจากข้อ 4 มาทำการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปชีดลงในอาหาร Toluidine Blue DNA Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ผลบวกอาหาร เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงรอบๆรอยขีด)



ภาพที่ 4.8 ขั้นตอนโดยรวมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 4.1 บันทึกผลการทดลองนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร

อาหาร	หลอดที่/จานที่	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN/ml
TSB	1				
	2				
	3				

ตารางที่ 4.2 บันทึกผลการทดลองลักษณะของโคโลนีที่ตรวจพบ

อาหาร	ลักษณะที่สังเกตได้	วาดภาพประกอบ
BP		
MSA		
BHI		
Toluidine Blue DNA agar		

เอกสารอ้างอิง

- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. 1995. Official methods of analysis sec. 975.55, (16th ed.). AOAC International, Arlington, VA.
- APHA, American Public Health Association. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, F.P. Downes, K. Ito (Eds.), (4th ed.), American Public Health Association, Washington, D.C.
- ASM, American Society for Microbiology. 2007. TSB. Isenberg and Garcia (eds.). Clinical microbiology procedures handbook, (2nd ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Baird-Parker, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, 25; 12-19
- Balaban, N., Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 1–10.
- Bryan, F.L., Guzewich, J.J., Todd, E.C.D. 1997. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. *Journal of Food Protection*, 60: 567–578.
- Hardy Diagnostics 2016. Coagulate test Retrieved May 17, 2016, from <http://www.HardyDiagnostics.com>
- Hebert, G.A., Hancock, G.A. 1985. Synergistic hemolysis exhibited by species of Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 22: 409–415.
- Hocke, A.C., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Schmeck, B., Berger, K., Frisch, E.M., Witzernath, M., Brell, B., Suttorp, N., Hippenstiel, S. 2006. Perturbation of endothelial junction proteins by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochemistry and Cell Biology*, 126: 305–316.
- Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections – reply. *New England Journal of Medicine*, 339: 2026–2027.
- Nagao, M., Inuma, Y., Suzuki, M., Matsushima, A., Takakura, S., Ito, Y., Ichiyama, S. 2010. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 harboring the Panton-Valentine leukocidin genes among Japanese health care workers and hospitalized patients. *American Journal of Infection Control*, 38(9):37-39.

- Normanna, G., Firinu, A., Virgili, S., Mulab, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastellic, L., Mionid, R., Scuotae, S., Bolzonif, G., Di Giannataleg, E., Salinettih, A.P., La Salandrai, G., Bartolij, M., Zucconb, F., Pirinob, T., Siasb, S., Parisii, A., Quagliaa, N.C., Celanoa, G.V. 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98(1): 73-79.
- Qi, Y., Miller, K. J. 2000. Effect of low water activity on *Staphylococcal* enterotoxin A and B biosynthesis. *Journal of Food Protection*, 63: 473-478.
- Scott, W.J. 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Australian journal of biological sciences*, 6: 549-564.
- Sperber, W.H., Tatini, S.R. 1975. Interpretation on the tube coagulase test for the identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, 29; 502-505.
- Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiology and Infection*, 138: 606-625.
- Waller, J.R., Hodel, S.L., Almquist, D.B. 1985. An evaluation of five techniques used to detect deoxyribonuclease production by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 3 (5-6): 303-309.
- Willey, B.M., Mazzulli, T., McGeer, A., Poutanen, S., Skulnick, M. 2005. Evaluation of oxoid mannitol salt agar with cefoxitin for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from surveillance specimens. *American Journal of Infection Control*, 33(5): 184-185.
- Wiseman, G.M. 1975. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriology Review*, 39: 317-344.
- Zhang, S., landolo, J., Stewart, C. 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters*, 168: 227-233.

บทปฏิบัติการที่ 5

การตรวจหาเชื้อ *Clostridium perfringens* ในอาหารกระป๋อง

แบคทีเรีย *Clostridium perfringens* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rod) เจริญในสภาพที่ไร้อากาศ สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียนี้มีรูปร่างกลมและอยู่ค่อนไปทางปลายของเซลล์ เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์จึงเห็นเซลล์ที่มีสปอร์รูปร่างคล้ายกับแบดมินตัน (Ryan และคณะ, 2010) ตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* สามารถเจริญในปริมาณน้ำอิสระ 0.93-0.97 และเจริญได้อย่างจำกัดในสถานะความเป็นกรดต่าง 5-8 เจริญได้ในปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 8 ปริมาณของโซเดียมไนเตรต (NaNO_3) มากกว่า 1,000 ส่วนในล้านส่วน หรือ ปริมาณโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) มากกว่า 400 ส่วนในล้านส่วน (McClane, 1997) ทั้งนี้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* สามารถทนต่อปัจจัยภายนอกต่างๆมากกว่าตัวเซลล์ เช่น ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความร้อน ทนความเย็นแม้ในอุณหภูมิแช่แข็ง ทนต่อสารเคมีและทนต่อความดันได้ (Paredes-Sabja และคณะ, 2007; Li และ McClane, 2006) โดยสปอร์ของแบคทีเรียมี Ribosomes และ Nucleic acids ที่มี Calcium dipicolinic acid (DPA) ที่ช่วยให้ทนต่อการแปรรูปอาหารแม้ใช้ความร้อนสูง ดังนั้นอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้วเก็บรักษาไว้ในสภาพไร้อากาศจึงยังคงมีความเสี่ยงในการพบการเจริญของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* (Murrell และ Warth, 1965; Murrell, 1998) นอกจากนั้นแล้วในระบบการทำความสะอาดพื้นผิวของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารยังพบว่าสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียนี้มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายในน้ำ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวของอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการแปรรูปได้ และอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ที่สุด (Kusumaningrum และคณะ, 2003) และเนื่องจากแบคทีเรีย *C. perfringens* มีความสามารถน้อยในการผลิตกรดอะมิโนจำเป็น ดังนั้นอาหารที่มีโปรตีนสูงที่เป็นแหล่งของกรดอะมิโนจึงมักถูกรายงานว่าปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Johnson และ Gerdling, 1997) ชูปลั้ว ปลาแซลมอน (Hatheway, 1990) แบคทีเรีย *C. perfringens* สามารถสร้างสารพิษได้ 5 ชนิดคือ ชนิด A, B, C, D และ E ซึ่งก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ทั้งนี้สารพิษของ *C. perfringens* ยังแบ่งออกได้เป็น α , β , ϵ , ι ตามยีน *plc*, *cpb*, *etx*, *iap/ibp* ตามลำดับ (Songer, 1996) ดังในตารางที่ 5.1 นอกจากนี้แล้วแหล่งที่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* มากที่สุดคือดิน โดยเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* มีการปนเปื้อนหลังจากการเก็บเกี่ยววัตถุดิบนั้นๆจากดินแล้วนำมาแปรรูปในอาหารจึงทำให้สามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้ว โดยวัตถุดิบที่พบมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* จากดินที่ปลูกคือ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ถั่วเขียว แตงกวา และพริก (Voidarou และคณะ, 2011) เป็นต้น

การเกิดโรคขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารโดยปริมาณที่ก่อให้เกิดโรคได้คือ $>10^6$ เซลล์ต่อกรัมอาหาร ระยะเวลาในการก่อโรคเพียง 8 ถึง 24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหาร (Brown, 2000) ดังนั้นกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture; USDA, 2001) จึงได้อนุญาตให้มีเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* ในเนื้อสัตว์ได้ไม่เกิน 10^4 เซลล์ต่อกรัมอาหาร อย่างไรก็ตามหากได้รับสารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* เพียง 8-10 มิลลิกรัม ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดโรคได้ (Labbe และ Juneja, 2001) ซึ่งเคยมีรายงานผู้ที่เสียชีวิตจากการได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้แล้วในประเทศสหรัฐอเมริกา (Mead และคณะ, 1999)

ตารางที่ 5.1 ชนิดของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens*

Type	α -toxin	β -toxin	ϵ -toxin	I-toxin	Enterotoxin
A	+	-	-	-	+
B	+	+	+	-	+
C	+	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+

ที่มา: Brynestad และ Granum (2002)

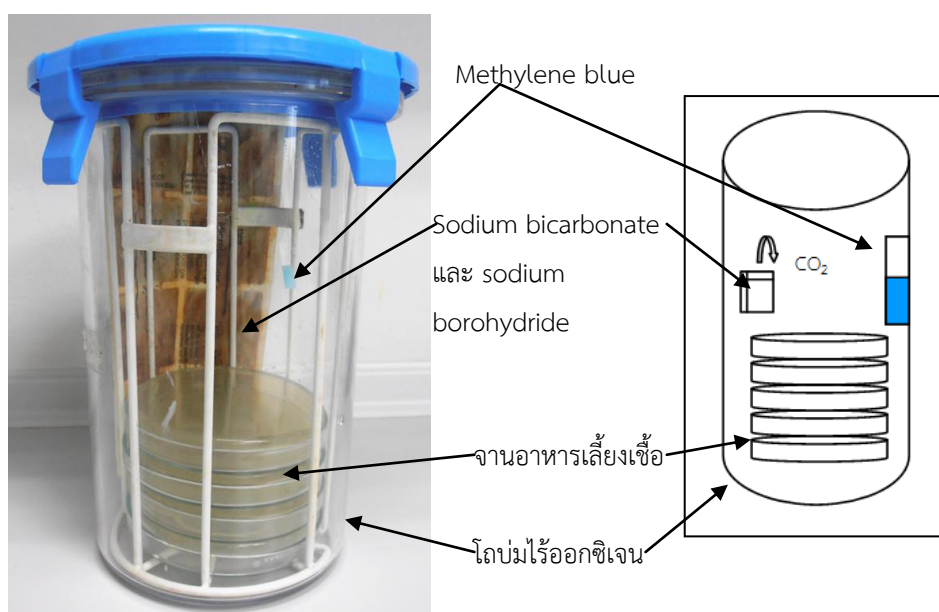
ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* ในอาหาร

1 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation) เป็นขั้นตอนการตรวจเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในอาหารที่นำมาตรวจ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก เช่น Sulfite polymyxin sulfadiazine (SPS) agar อาหารเลี้ยงเชื้อ Shahidi ferguson polymyxin (SFP) agar อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose sulphite cycloserine (TSC) agar และ อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat medium

2 ขั้นตอนการยืนยันผลโดยทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical identification) ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้คือ เชื้อแบคทีเรียนี้ไม่สร้างเอ็นไซม์เอ็นไซม์คะตาเลส เอ็นไซม์ Peroxidase และเอ็นไซม์ Superoxide dismutase ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ (Ryan และคณะ, 2010) สามารถย่อยเจลาติน ใช้ไนเตรทและหมักน้ำตาลแลคโตสได้ (AOAC, 1998) นอกจากนั้นการทดสอบการเคลื่อนที่ รวมถึงการทดสอบการใช้อากาศยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* ได้อีกด้วย

ทั้งนี้แบคทีเรีย *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาพที่ไร้อากาศ ดังนั้นการบ่มเชื้อจุลินทรีย์จึงต้องทำในสภาพที่ไร้อากาศ โดยใช้โถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) โดยนำอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ลงในโถบ่มไร้ออกซิเจน (Sowers และ Watts, 2006) จากนั้นจึงใส่ถุงปรับอากาศ (GasPak) โดยเป็นถุงที่บรรจุสาร Sodium bicarbonate สาร Sodium borohydride อาจมี Citric acid ด้วย ก่อนนำถุงปรับอากาศใส่ในโถบ่มไร้ออกซิเจนให้เติมน้ำใส่ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงทำการปิดฝาให้สนิท เมื่อปิดฝาสนิทแล้วภายในโถบ่มไร้ออกซิเจนจะค่อยๆมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนเข้ามาแทนที่แก๊สออกซิเจน การสังเกตว่าด้านในโถบ่มมีปริมาณออกซิเจนลดน้อยลงเรื่อยๆจนกระทั่งหมดไปให้สังเกตจากแผ่นอินดิเคเตอร์คือแผ่น Methylene blue ซึ่งแผ่นอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนจากสีฟ้าที่มีแก๊สออกซิเจนเป็นสีขาวที่ปราศจากแก๊สออกซิเจน (ภาพที่ 5.1) นอกจากนี้แล้วในปัจจุบันยังมีระบบการบ่มเชื้อแบบที่ไม่ต้องการให้มีออกซิเจนในรูปแบบต่างๆให้เลือกใช้เช่น การเลือกใช้การบ่มในรูปถุง Pouch (Becton, Dickinson and Company, 2013) หรืออาจใช้กล่องพลาสติกปิดสนิท (BioMérieux, 2013) ดังภาพที่ 5.2



ภาพที่ 5.1 โถไร้อากาศ (Anaerobic jar)



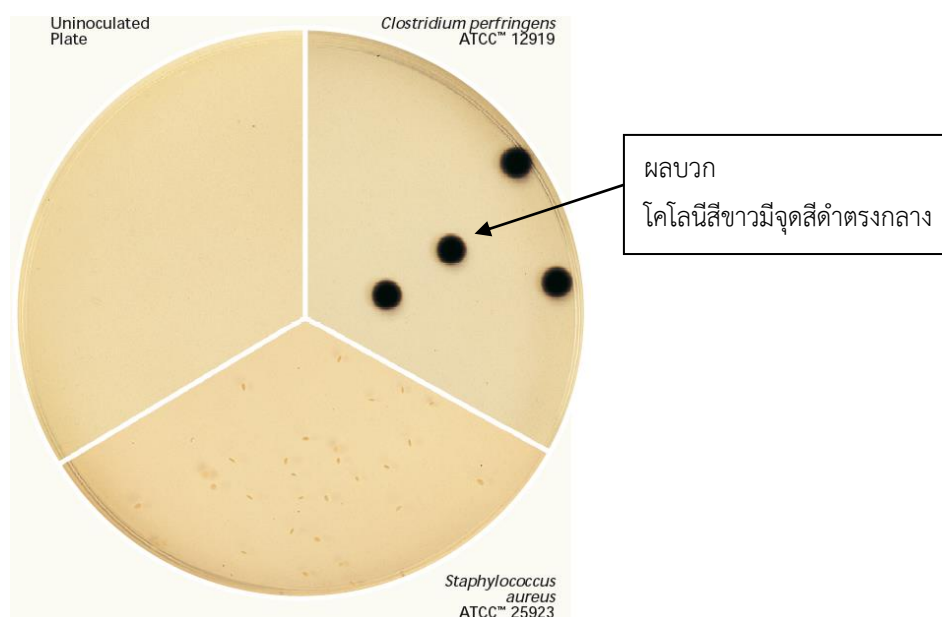
ภาพที่ 5.2 ถุง BD GasPak™ EZ pouch และ กล่อง BioMérieux anaeropack system

ที่มา: Becton, Dickinson Company (2013) และ BioMérieux (2013)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens*

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Sulfite polymyxin sulfadiazine (SPS) agar

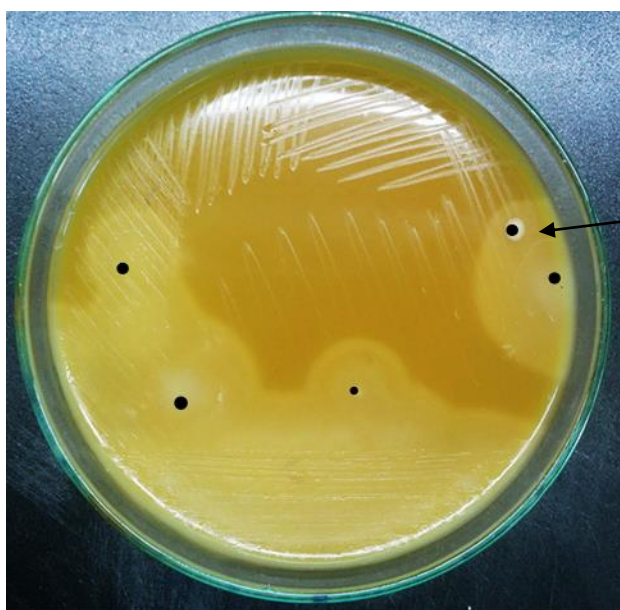
อาหารเลี้ยงเชื้อ SPS agar มีเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามินและเกลือแร่ และมี Yeast extract เป็นแหล่งวิตามินบี อาหารชนิดนี้มี Polymyxin B และ Sulfadiazine เป็นสารที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่ต้องการ ผลบวกจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SPS agar คือ พบโคโลนีสีขาวมีจุดสีดำตรงกลางที่เกิดจากความสามารถในการรีดิวซ์สาร Sulfite ให้เป็นสาร Sulfide แล้วสาร Sulfide นี้ สามารถทำปฏิกิริยากับเหล็กที่อยู่ในรูป Ferric citrate เกิดจุดสีดำของ Iron sulfide บนจานอาหาร (ภาพที่ 5.3)



ภาพที่ 5.3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SPS agar
ที่มา: Becton, Dickinson and Company (2013)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Shahidi ferguson polymyxin (SFP) agar

Shahidi และ Ferguson (1971) ได้รายงานการใช้อาหาร SFP agar สำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* ออกจากแบคทีเรียอื่นๆในสภาวะที่ไร้อากาศ อาหารชนิดนี้มีส่วนผสมของไข่แดง (Egg yolk) เพื่อให้ Lecithin ในไข่แดงทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Lecithinase ที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างขึ้น ทำให้เกิดตะกอนขุ่นขาวอย่างเห็นได้ชัดรอบๆโคโลนี นอกจากนี้ยังมี Sodium bisulphite และ Ferric ammonium citrate ที่ตรวจจับ Sulphite ที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างขึ้นและทำให้โคโลนีของแบคทีเรียมีจุดสีดำตรงกลาง (ภาพที่ 5.4) สำหรับสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นๆคือ ยา Kanamycin และ ยา Polymyxin B ซึ่งยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้ยังช่วยทำให้แบคทีเรีย *C. perfringens* ฟื้นตัวได้ดี



ผลบวก
โคโลนีสีตะกอนขุนขาว
มีจุดสีดำตรงกลาง

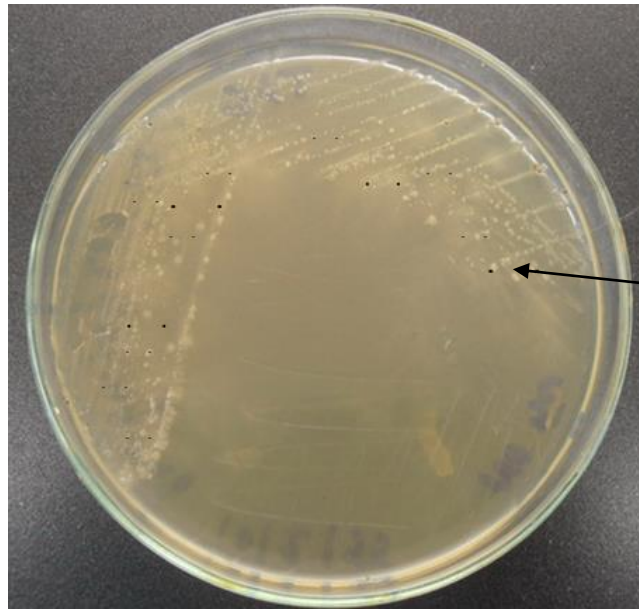
ภาพที่ 5.4 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SFP agar

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose sulphite cycloserine (TSC) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSC ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย *C. perfringens* ในสภาวะที่ไร้อากาศ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้สามารถใช้ในการฟื้นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดี องค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC agar คือ สาร Tryptose สาร Peptone สาร Yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน ซัลเฟอร์ และวิตามินบีให้แก่เชื้อแบคทีเรีย มีสาร Sodium metabisulphite และ Ferric ammonium citrate ซึ่งใช้ในการตรวจจับการรีดิวซ์ Sulphite ทำให้เกิดสีดำบนโคโลนี มียาปฏิชีวนะ D-Cycloserine ยา Kanamycin และยา Polymyxin B ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ มี Egg yolk สำหรับตรวจจับเอนไซม์ Lecithinase (ภาพที่ 5.5)

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat medium

อาหาร Cooked meat medium เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobes) เพื่อตรวจหาความสามารถในการย่อยโปรตีนเพราะอาหารชนิดนี้มี Beef heart เป็นแหล่งโปรตีน แหล่งของกรดอะมิโน และมีสาร Glutathione ซึ่งช่วยทำให้แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนเจริญได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน หากแบคทีเรียชนิดใดสามารถเจริญได้ในอาหารชนิดนี้ในสภาวะที่ไร้อากาศหลอดอาหาร Cooked meat medium จะเกิดความขุ่นขึ้น (ภาพที่ 5.6) แบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจสร้างฟองแก๊ส อาจสร้างสีดำในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการย่อยโปรตีนแล้ว



ผลบวก
โคโลนีสีตะกอนขุนขาว
มีจุดสีดำตรงกลาง

ภาพที่ 5.5 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SFP agar



ผลบวก
อาหารเลี้ยงเชื้อขุน

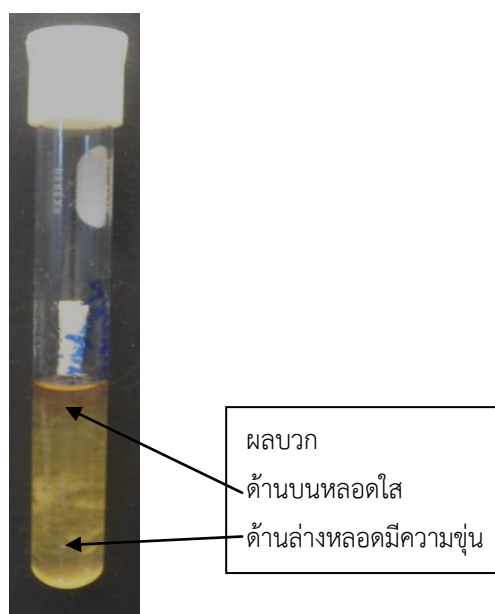
ภาพที่ 5.6 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat medium

ที่มา: Becton, Dickinson and Company (2013)

การทดสอบทางชีวเคมี

1 การทดสอบความสามารถในการใช้อากาศ

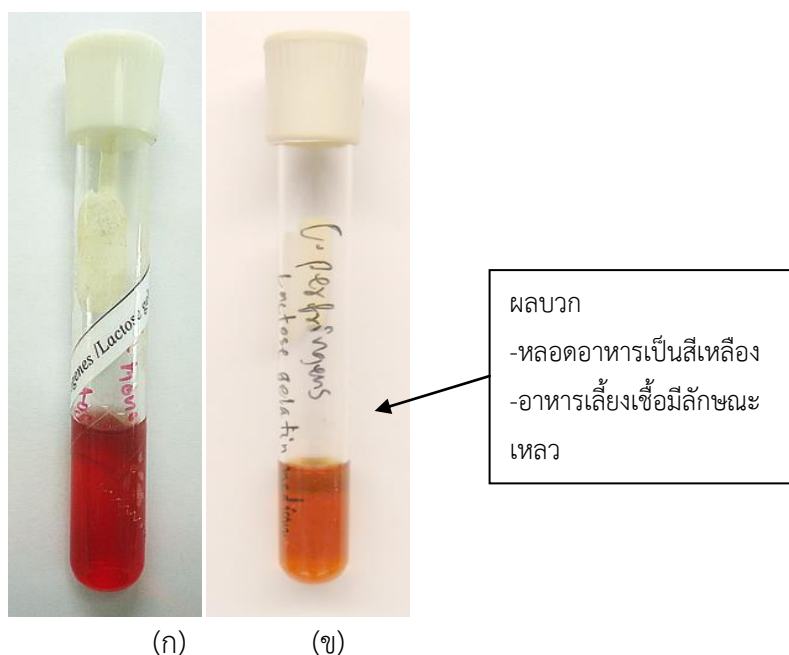
การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสามารถจำแนกได้ตามความสามารถในการใช้อากาศโดยแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (Obligate aerobes) จะเจริญได้เฉพาะด้านบนสุดของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีออกซิเจน สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) จะสามารถเจริญได้ทั่วทั้งหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่สำหรับแบคทีเรีย *C. perfringens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (Anaerobes) จะพบการเจริญได้เฉพาะบริเวณด้านล่างของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 5.7) ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการใช้อากาศคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycollate broth (AOAC, 1995) อาหารชนิดนี้มี Casein enzymic hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจน มีสาร Yeast extract เป็นแหล่งวิตามิน และเพื่อเป็นการลดออกซิเจนในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนใช้ในการทดสอบ สาร Thioglycollate และ L-Cystine จะถูกเติมลงในอาหารเพื่อทำหน้าที่ลดออกซิเจน โดยหมู่ Sulfhydryl (SH) ของสารจะทำหน้าที่ในการป้องกันสารพิษของ Peroxide ที่อาจถูกสร้างขึ้นและเป็นพิษต่อเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบได้อีกด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มี Resazurin เป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งหากมีออกซิเจนในหลอดทดลองอาจทำให้สีของอาหาร Thioglycollate broth ก่อนการทดลองมีสีชมพูซึ่งทำให้ผู้ทดลองสามารถทำการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อไล่แก๊สออกซิเจนออกจากหลอดทดลองก่อนทำการทดลอง



ภาพที่ 5.7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* ในอาหาร Thioglycollate broth

2 การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin) และการหมักน้ำตาลแลคโตส

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคือ Gelatin lactose medium ซึ่งเจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยคอลลาเจน (Collagen) ซึ่งพบได้ทั่วไปในผิวหนัง กระดูก ซึ่งหากแบคทีเรียใดมีคุณสมบัติในการย่อย เจลาตินได้คือ มีการผลิตเอนไซม์ Gelatinase จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งเปลี่ยนเป็นอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวได้ สำหรับความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโตสแล้วทำให้เกิดกรดขึ้นในหลอดทดลองในสภาวะที่ไร้อากาศจะพบอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองเพราะมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ และหากแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสามารถสร้างแก๊สได้จะพบฟองแก๊สในหลอดอาหารด้วย สำหรับแบคทีเรีย *Clostridium* จะให้ผลบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีลักษณะเหลวอันเนื่องจากการย่อยเจลาติน (ภาพที่ 5.8)

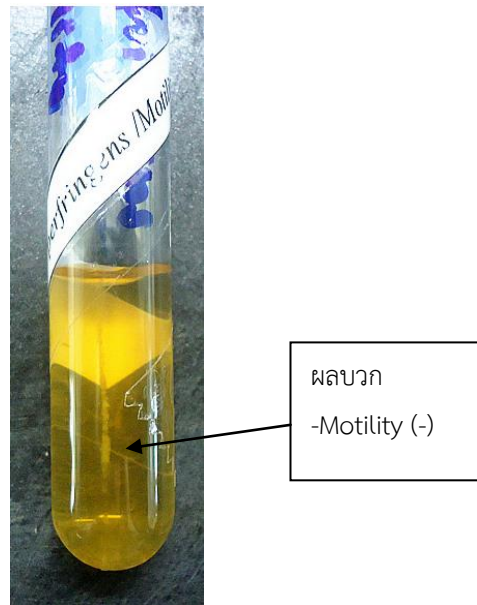


ภาพที่ 5.8 อาหาร Gelatin lactose medium ในชุดควบคุม (ก) และหลอดที่มีเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* (ข)

3 การดูผลการเคลื่อนที่และความสามารถในการใช้ในเตรท (Nitrate)

การทดสอบการเคลื่อนที่และการใช้ในเตรทของแบคทีเรีย *Clostridium* สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility nitrate medium (FDA, 1998; ISO, 2004) การทดสอบสามารถนำโคโลนีที่สงสัยมาแทงลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่ไร้อากาศจนครบ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสแล้วจึงนำหยดสารละลาย Nitrate A และ Nitrate B หากเชื้อแบคทีเรานั้นสามารถย่อย Nitrate ได้จะพบสีแดงในหลอดอาหาร ส่วนการทดสอบการเคลื่อนที่ได้ให้สังเกตว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญออกนอกรอยแทงได้หรือไม่ สำหรับแบคทีเรีย *C. perfringens* พบว่าสามารถใช้ในเตรทได้จึงเกิดผลบวกคือพบสีแดงภายหลังจากหยดสารละลาย และไม่มีสามารถ

เคลื่อนที่ได้ในอาหาร Motility nitrate medium จึงพบเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ภายในเส้นรอยขีดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 5.9)



ภาพที่ 5.9 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens* ในอาหาร Motility nitrate medium

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1 อาหารกระป๋อง

- 1.1 ตัวอย่างอาหารกระป๋อง เช่น ปลากระป๋อง เต้าเจี้ยว เนื้อกระป๋อง

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar (SPS)
- 2.2 Shihidi Fregusan Polymyxin (SFP)
- 2.3 Thioglycollate media
- 2.4 Bacto cooked meat medium
- 2.5 Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC agar)
- 2.7 Motility nitrate medium
- 2.8 Lactose gelatin medium

3 สารเคมี

- 3.1 α -naphthylamine solution
- 3.2 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1 % peptone water)
- 3.3 70 %แอลกอฮอล์

4 อุปกรณ์

- 4.1 หม้อนึ่ง
- 4.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป
- 4.3 ตู้บ่ม
- 4.4 แผ่นสไลด์
- 4.5 กล้องจุลทรรศน์
- 4.6 ถังน้ำแข็ง

วิธีการทดลอง

1.1 วิธีการเปิดฝากระป๋อง

- 1.1.1 ล้างมือให้สะอาด สวมถุงมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการเปิดฝากระป๋อง ด้วยสารละลายคลอรีน (ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม) จากนั้นจึงทำการเช็ดโต๊ะให้แห้ง ล้างกระป๋องด้วยสบู่หรือน้ำยาล้างทำความสะอาด แล้วล้างออกให้สะอาด เช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาด
- 1.1.2 ทำการเช็ดถุงแอลกอฮอล์อีกครั้งที่บริเวณมือและพื้นโต๊ะ
- 1.1.3 นำอาหารกระป๋องไปลงไฟเฉพาะตรงตะเข็บกระป๋องแล้วทำการเปิดกระป๋องให้ได้ขนาดประมาณ 4 เซนติเมตร จากนั้นทำการดูดตัวอย่างอาหาร 25 กรัมหรือใช้ช้อนสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตักอาหารให้ได้ 25 กรัม นำอาหารใส่ถุงปั่นอาหาร

1.2 นำตัวอย่างอาหารมา 25 มิลลิลิตรละลายน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 225 มล (10^{-1})

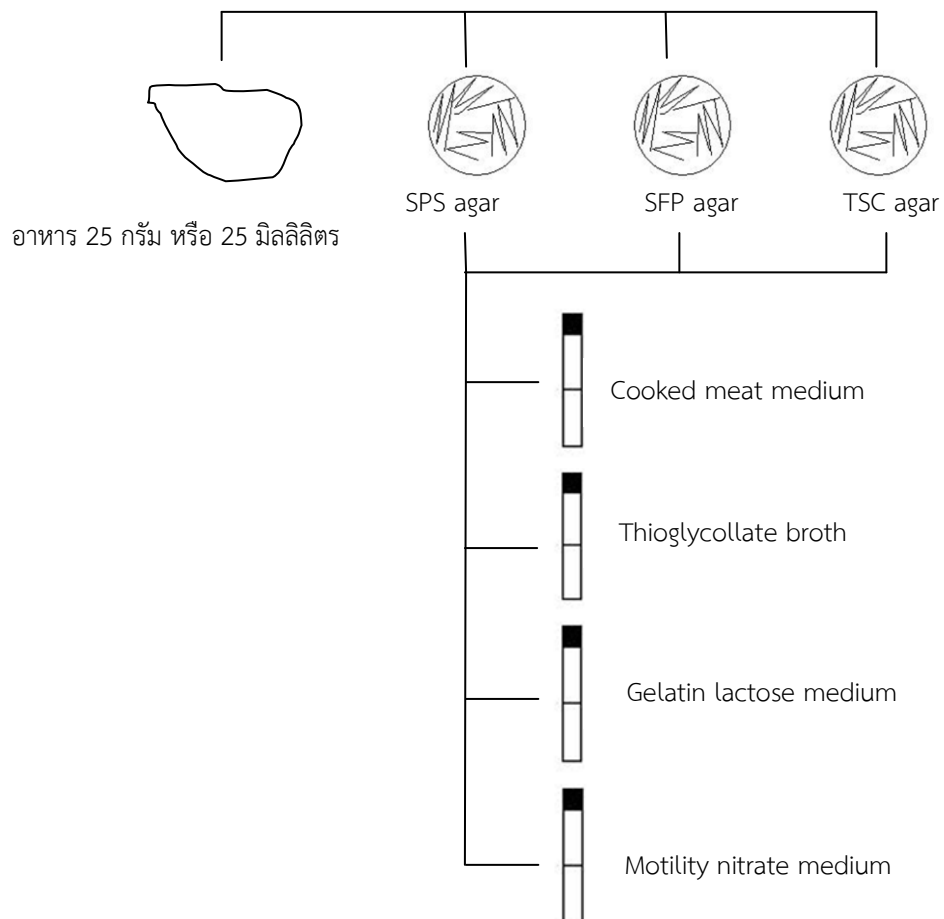
1.3 ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นประมาณ 2 นาที ทำการเจือจางอาหารนั้นให้ได้ 10^{-2} , 10^{-3}

1.4 ดูดตัวอย่างอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ระดับละ 1 มิลลิลิตร ไปใส่ในจานอาหาร แล้วเทวุ้นอาหาร SPS, SFP และ TSC ลงไป ทำการเขย่าแล้วทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเทอาหารที่บ่มผิวหน้า (สร้างสภาวะไร้อากาศ) หรือบ่มด้วยไธไร้อากาศ จากนั้นจึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลบวกคือ โคโลนีบนอาหาร SPS เห็นเป็นโคโลนีสีขาวมีจุดน้ำตาลหรือดำตรงกลาง, โคโลนีบนอาหาร SFP คือมีตะกอนขุ่นขาวรอบๆโคโลนี และ ผลบวกของโคโลนีบนอาหาร TSC คือมีสีดำตรงกลางและรอบนอกขุ่นขาว

1.5 ทำการขีดเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีที่สงสัย (ผลบวกจากข้อ 1.4) มาแทงลงไปในอาหาร Motility nitrate medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตรอยแตกที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียในหลอดอาหาร และการเปลี่ยนสีของ Nitrate เป็น Nitrite หลังจากเติม α -naphthylamine solution ลงไป (ผลบวกคือเชื้อแบคทีเรียไม่เคลื่อนที่ และเกิดสีแดงอมชมพูหลังเติม α -naphthylamine solution)

1.6 ทำการขีดเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีที่สงสัย (ผลบวกจากข้อ 1.4) มาแทงลงไปในอาหาร Lactose gelatin medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเนื่องจากความเป็นกรดและการเกิดฟองก๊าซ จากนั้นนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งประมาณ 30 นาที ผลบวกคือ Gelatin จะไม่สลายและไม่จับตัวเป็นก้อนแข็ง

1.7 ทำการจุ่มเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีที่สงสัย (ผลบวกจากข้อ 1.4) ลงในอาหาร Thioglycollate broth ที่ผ่านการต้มไต่อากาศแล้ว นำไปบ่ม 24 ชั่วโมงแล้วสังเกต ความขุ่นของอาหาร



ภาพที่ 5.10 ขั้นตอนโดยรวมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens*

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 5.2 บันทึกผลการทดลอง

อาหาร	ลักษณะที่สังเกตได้	วาดภาพประกอบ
SPS		
SFP		
TSC		
Motility nitrate medium		
Lactose gelatin medium		
Thioglycollate broth		

เอกสารอ้างอิง

- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. 1995. P. Cunniff (Ed.), (16th ed.) AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International, Arlington, VA.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. Rhodehamel, J., Harmon, S.M. 1998. *Clostridium perfringens*, Rhodehamel, R.W. Bennett (Ed.), FDA bacteriological manual, (8th ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD (1998), pp. 16.01–16.06
- Becton, Dickinson Company, SPS agar Difco™ & BBL™ manual, (2nd ed.). Retrieved November 28, 2013, from http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL.
- Becton, Dickinson Company. 2013. GasPak™ EZ pouch systems. Retrieved November 27, 2013, from <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=11220>.
- Becton, Dickinson Company. 2013. Cooked meat medium. Retrieved November 27, 2013, from https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/226730.pdf.
- BioMérieux. 2013. BioMérieux anaeropack system - anaeropack anaerobic sachets, Retrieved November 27, 2013, from <http://www.berktree.com/pml-microbiologicals-anaeropack-system-anaeropack-anaerobic-sachets-model-s3000-pack-of-20.html>.
- Brown, K.L. 2000. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56: 158–171.
- Brynstad, S., Granum, P.E. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3): 195-202.
- FDA, Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological analytical manual, (8th ed.) Revision A. AOAC International. Gaithersburg. MD. USA.
- Hatheway, C.L. 1990. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, 3: 68–98.
- ISO, International Organization for Standardization. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* colony count technique. ISO 7937 Standard.
- Johnson, S., Gerding, D. 1997. Enterotoxemic infections. J. Rood, B.A. McClane, J.G. Songer, R.W. Titball (Eds.). *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*, Academic Press, London, pp. 117–140.

- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 227–236.
- Labbe, R.G., Juneja, V.K. 2001. *Clostridium perfringens*, H. Riemann, F.L. Bryan (Eds.), Foodborne infections and intoxications, Academic Press, NY.
- Li, J., McClane, B.A. 2006. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7620–7625.
- McClane, B.A. 1997. *Clostridium perfringens*, M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.), Food microbiology: fundamentals and frontiers, ASM Press, Washington, DC, pp. 305–326.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCraig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 607–625.
- Murrell, W.G. 1988. Bacterial spores-nature's ultimate survival package, W.G. Murrell, I.R. Kennedy (Eds.), Microbiology in action, John Wiley & Sons, Inc, New York, pp. 311–346
- Murrell, W.G., Warth, A.D. 1965. Composition and heat resistance of bacterial spores. L.L. Campbell, H.O. Halvorson (Eds.), Spores III, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 1–24
- Paredes-Sabja, D., Gonzalez, M., Sarker, M.R., Torres, J.A. 2007. Combined effects of hydrostatic pressure, temperature and pH on the inactivation of spores of *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium sporogenes* in buffer solutions. *Journal of Food Science*, 72: M202–M206.
- Rockville, MD. 2002. U. S. Pharmacopeia 2002, USP 25/NF 20, Asian Edition, The United States Pharmacopeial Convention Inc.
- Ryan, K., Ray, C.G., Ahmad, N., Drew, W.L., Plorde, J. 2010. Sherris medical microbiology (5th ed.). The McGraw-Hill Companies, Columbus.
- Shahidi S. A., Ferguson A. R. 1971. A new quantitative and confirmatory medium for *Clostridium perfringens* in food. *Applied Microbiology*, 21:500.
- Songer, J.G. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 216–234.

- Sowers, K.R., Watts, J.E. 2006. 33 The Study of strictly anaerobic microorganisms. *Methods in Microbiology*, 35:757-782.
- USDA, United States Department of Agriculture. 2001. Food safety and inspection service (FSIS). Performance standards for the production of certain meat and poultry products. Federal Register, 66, p. 39
- Voidarou, C., Bezirtzoglou, E., Alexopoulos, A., Plessas, S., Stefanis, C., Papadopoulos, I., Vavias, S., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I. 2011. Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe*, 17(6): 320-324.

บทปฏิบัติการที่ 6

การตรวจหาเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์นม

น้ำนมประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆมากมาย ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์จึงสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในนมและผลิตภัณฑ์จากนมที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ น้ำนมสดที่เพิ่งปั๊มออกมาจากเต้านมของแม่วัวมีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 5×10^3 ถึง 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อจุลินทรีย์อาจมาจากการปนเปื้อนภายนอกเต้านมของแม่วัว ภาชนะบรรจุ สิ่งแวดล้อมและมนุษย์ เชื้อจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในน้ำนมดิบ เช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* และ Coliforms เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วผลิตภัณฑ์จากนมที่เก็บรักษาไว้ในความเย็นยังอาจพบเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* อีกด้วย ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น แกรมบวก สามารถสร้างสปอร์ได้ มี Flagella สามารถเคลื่อนที่ได้ดีในอุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า (Dons และคณะ, 1992) และยังสามารถเคลื่อนที่ได้แม้ในอุณหภูมิเย็นประมาณ 3 องศาเซลเซียส (Mattila และคณะ, 2001) แต่ถ้ามมีการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะเคลื่อนที่ช้ามาก เชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญที่สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ (Rocourt และ Cossart, 1997; Ryser, 2011; González และคณะ, 2013) เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ในค่าพีเอช (pH) กว้างๆตั้งแต่ 4.6-9.5 และสามารถเจริญในค่าปริมาณน้ำอิสระ (Water activity; aw) ประมาณ 0.92 (Buchanan และคณะ, 2004) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือที่ 30-37 องศาเซลเซียส แต่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 1 ถึง 45 องศาเซลเซียส จึงสามารถพบเชื้อแบคทีเรียนี้ในตู้แช่เย็น (Farber, 2000; Neetoo และคณะ, 2010) และยังพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทั่วไปอีกหลายผลิตภัณฑ์ เช่น ปลาเซลมอน (Farber, 1991) เนื้อไก่ (Goh และคณะ, 2014) แม้ว่าแบคทีเรีย *Listeria* สามารถถูกทำลายหรือลดปริมาณลงในระหว่างกระบวนการแปรรูป เช่น การให้ความร้อน (Cygnarowicz-Provost และคณะ, 1994) การล้างด้วยน้ำอเล็กโตรไลต์ (Fabrizio และ Cutter, 2005) การใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร (Mereghetti และคณะ, 2000) แต่แบคทีเรีย *Listeria* สามารถปนเปื้อนกลับสู่อาหารได้อีกครั้งเมื่อเกิดการปนเปื้อนระหว่างผลิตภัณฑ์อาหารกับสิ่งแวดล้อม เช่นการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *Listeria* จากเขียงหรือพื้นผิวสัมผัสในอุตสาหกรรมอาหาร (Goh และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ในสิ่งแวดล้อมรอบๆสายการผลิตอีกด้วย

เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Listeria* จัดอยู่ใน Subbranch ของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Brochotrix* ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย *Listeria* แบ่งเป็น 6 สายพันธุ์ตาม Phenotype คือ *L. monocytogenes*, *L.*

ivanovii, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (McLauchlin และ Rees, 2009) ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ทำได้จากทดสอบคุณสมบัติตามหลักชีวเคมีดังตารางที่ 6.1 ทั้งนี้สายพันธุ์ที่ถูกรายงานว่าทำให้เกิดโรคในมนุษย์บ่อยครั้งคือเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* (Liu, 2006) ดังนั้นในประเทศสหรัฐอเมริกาจึงได้มีการกำหนดมาตรฐานอาหารไว้ว่าในอาหารพร้อมรับประทานอนุญาตให้มีเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ไม่เกิน 100 CFUต่อกรัมอาหาร (USFDA, 2008; EFSA, 2007) อย่างไรก็ตามสำหรับกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรปได้กำหนดไว้ว่าในอาหารที่พร้อมรับประทาน (Ready to eat food) ไม่อนุญาตให้มีเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* (European Commission, 1999) หากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เข้าสู่ร่างกายแล้วมักใช้เวลาในการฟักตัวหลายสัปดาห์ หากมารดาที่ตั้งครรภ์รับเชื้อแบคทีเรียนี้เข้าไปจะส่งผลกระทบต่อทารกในครรภ์ได้ โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้เกิดการติดเชื้อภายในมดลูกของหญิงมีครรภ์และส่งผลต่อการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและโลหิตเป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (Lamont และ Postlethwaite, 1986) รวมถึงหากเด็กแรกเกิดได้รับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้เป็นอันตรายมากต่อทั้งสมองและระบบโลหิต (Bortolussi และ Schlech, 1995) อาการของโรคอาจมีตั้งแต่เป็นไข้ ท้องเดิน หรือหากได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้ในปริมาณมากอาจได้รับอันตรายถึงแก่ชีวิต โดยในปี 2010 พบผู้ป่วยเสียชีวิตในประเทศนอร์เวย์จำนวน 3 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 15 รายที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียจากการบริโภคแผ่นชีสที่ผลิตมาจากนมพลาสเจอร์ไรซ์ที่มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ปนเปื้อนประมาณ $6.6 \log_{10} \text{cuf} \cdot \text{g}^{-1}$ (Johnsen และคณะ, 2010) ในปี 2000 ที่ประเทศอิตาลีมีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* จำนวนกว่า 2,189 ราย จากการบริโภคสลัดผักและข้าวโพดที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ปริมาณ $10^6 \text{ cell} \cdot \text{g}^{-1}$ ซึ่งผู้ป่วยจำนวน 1,566 รายมีอาการท้องร่วงร่วมกับมีไข้และอีกกว่า 292 รายต้องพักรักษาตัวอยู่ที่โรงพยาบาล (Aureli และคณะ, 2000)

ตารางที่ 6.1 ผลของการทดสอบทางด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Listeria* ทั้ง 6 สายพันธุ์

สายพันธุ์	Xylose	Rhamnose	Mannitol	β -Hemolysis
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	v	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+
<i>L. welshimeri</i>	+	v	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-

v= variable biotypes, greater than 10% of strains for this trait

ที่มา: (USFDA, 2008)

Listeria ทุกสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ Catalase และบางสายพันธุ์มีเอนไซม์ Oxidase และสามารถย่อย Esculin ได้ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมีขนาดของโคโลนีประมาณ 0.2 ถึง 0.8 มิลลิเมตร หลังจากที่ย้อม 24 ชั่วโมง และมีพื้นสีเทาเรียบ ถ้ามีการปรับกล้องที่ 135° จะสามารถเห็นแสงสีเขียวจากโคโลนีได้ เชื้อนี้สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยและในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar สามารถปรากฏเห็นการเกิด β -hemolysis เป็นโซนเล็กๆบนจานอาหารนี้ด้วย

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ในอาหาร

1 ขั้นตอนการบ่มเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต (Enrichment) โดยขั้นตอนนี้มีการบ่มอยู่ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่าการบ่มเพิ่มจำนวนขั้นต้น (Pre-enrichment) โดยใช้อาหาร UVM broth และขั้นตอนการบ่มเพื่อเพิ่มเชื้อแบคทีเรีย (Enrichment) โดยใช้อาหาร Fraser broth หรือ BLEB ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ *Listeria* ที่อาจปนเปื้อนมากับอาหารที่นำมาทำการสุ่มตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์หรือเรียกว่า Enrichment media เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีปริมาณอยู่น้อยมากในอาหารจึงต้องมีขั้นตอนนี้เพื่อให้เชื้อมีความสมบูรณ์ หรือซ่อมแซมส่วนที่บาดเจ็บก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Beaufort, 2011) เมื่อเชื้อแบคทีเรียสมบูรณ์แล้วจึงทำการถ่ายเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารที่มีความจำเพาะมากขึ้น

2 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation) ส่วนมากแล้วใช้อาหาร Oxford หรือ Modified Oxford (MOX) และอาหาร PALCAM อาหารทั้งสองชนิดนี้มีสารจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* นี้ และมีส่วนผสมของเกลือลิเทียมคลอไรด์ (LiCl) สารปฏิชีวนะ Polymyxin ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ไม่ต้องการได้

3 ขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical identification) ใช้การทดสอบทางชีวเคมีในการแยกชนิดของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ออกจากเชื้อแบคทีเรีย *Listeria* อื่นๆ เช่น การผลิตกรดจากน้ำตาล Rhamnose แต่ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาล Xylose และน้ำตาล Mannitol

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Listeria* enrichment medium base (UVM broth)

อาหาร UVM broth (ภาพที่ 6.1) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* โดยนิยมนำมาใช้เป็นอาหาร Pre-enrichment (Capell และคณะ, 1995) สำหรับเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เคยผ่านการให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหารจนทำให้เซลล์บาดเจ็บ (Bailey, 1990) อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีส่วนผสมของ Nalidixic acid ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆได้ ทำให้เซลล์ของเชื้อได้รับการรักษา และถึงแม้ว่าอาหารเหล่านี้มี Esculin อยู่แต่มีเกลือ Ferric อยู่ด้วยจึงทำให้อาหารไม่เปลี่ยนสีเป็นสีดำ หลังจากผ่านการบ่มด้วย

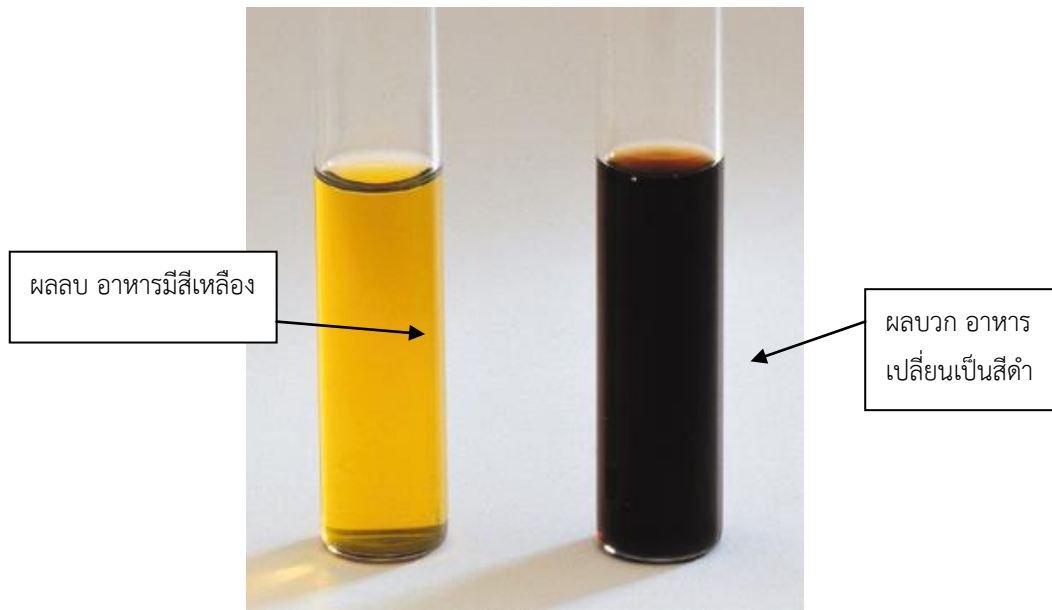
อาหาร Pre-enrichment แล้วจึงนำไปบ่มต่อในอาหาร Enrichment เช่น Fraser broth ก่อนจะนำเชื้อแบคทีเรียไปทำการตรวจยืนยันในขั้นตอนต่อไป



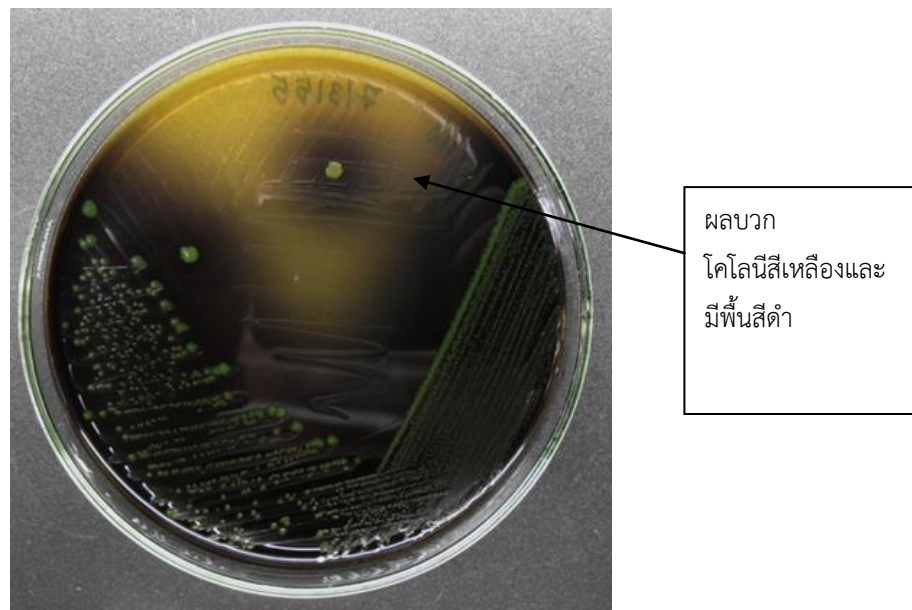
ภาพที่ 6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ UVM broth

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth

อาหาร Fraser broth ใช้ในการ Enrichment เชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* โดยหลังจากที่มีการบ่มไว้ในอาหาร UVM แล้วสามารถนำมาบ่มเพื่อเพิ่มจำนวนต่อในอาหาร Fraser broth ได้อีก อาหารนี้มีส่วนผสมของสาร Acriflavine สาร Nalidixic acid และสารละลายเกล็ด ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterococci แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงมีสารละลายเกล็ดที่ใช้ในการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่ทนเกล็ดให้เจริญได้ นอกจากนั้นแล้วอาหารนี้ยังมีสาร Esculin เป็นส่วนผสมที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Listeria* สามารถสร้างเอนไซม์ β -D-glucosidase สำหรับย่อย Esculin ให้กลายเป็นสาร Esculetin แล้วสารนี้สามารถทำปฏิกิริยากับเหล็ก ซึ่งมาจากสาร Ferric ammonium citrate ในอาหารเหลวทำให้เกิดสีดำคล้ำขึ้นในอาหารเหลว (ภาพที่ 6.2 ก) และถ้าหากผลลบบอาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth จะมีสีเหลือง และถ้าหากนำอาหารนี้มาเติมผงวุ้น ผลบวกที่ได้บนจานอาหาร Fraser agar คือ ได้โคโลนีสีเหลืองซึ่งมีพื้นอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีดำ (ภาพที่ 6.2 ข)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 6.2 เชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่เลี้ยงในอาหาร Fraser broth (ก) และอาหาร Fraser agar

ที่มา: ภาพ ก (Biokar Diagnostics, 2013)

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered *Listeria* enrichment broth base (BLEB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ BLEB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จัดอยู่ในประเภท Enrichment โดยอาหารนี้อุดมด้วยแหล่งไนโตรเจน วิตามินและเกลือแร่เนื่องจากมีส่วนผสมของ Enzymatic digest of casein สาร Enzymatic digest of soybean meal และ Yeast extract มีน้ำตาลเดกซ์โทรสเป็นแหล่งคาร์บอน มีเกลือและมีบัฟเฟอร์จากสาร Monopotassium phosphate สาร Dipotassium phosphate และสาร Disodium phosphate มีสาร Nalidixic acid สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีสาร Acriflavine สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และมีสาร Cycloheximide สำหรับยับยั้งเชื้อรา ผลบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความขุ่น (ภาพที่ 6.3)

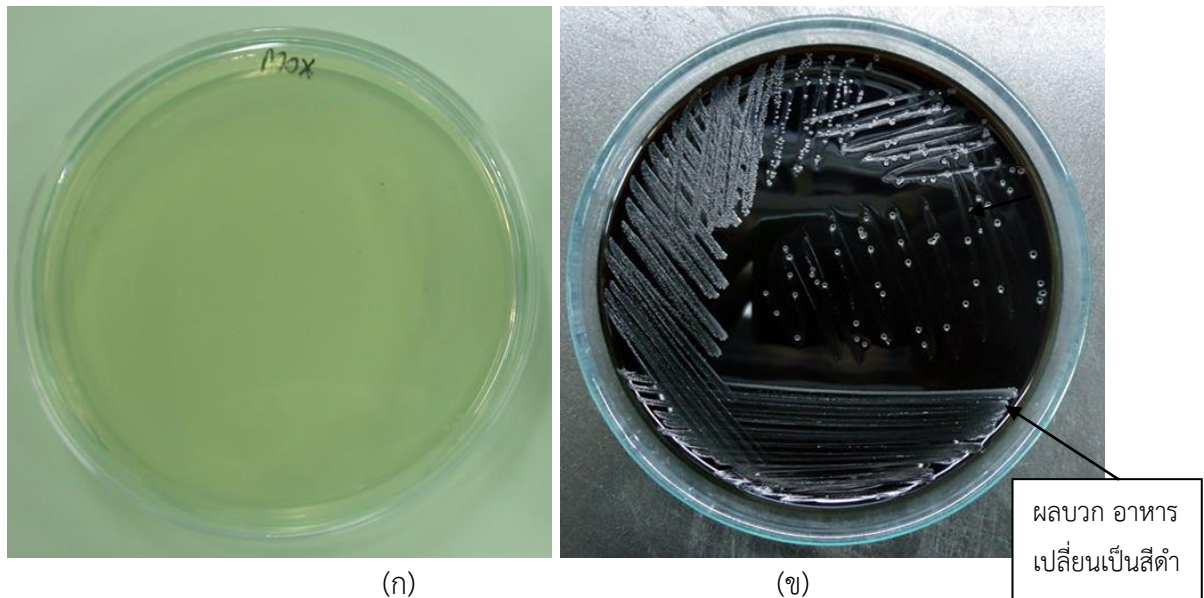


ภาพที่ 6.3 อาหาร Buffered *Listeria* enrichment broth base (BLEB)

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified oxford (MOX) agar

อาหาร MOX agar เป็นอาหารคัดเลือกและบอกความแตกต่าง (Selective-differential agar) โดยมีการเติม Antimicrobial agent ซึ่งเรียกว่า Oxford *Listeria* supplement อันประกอบไปด้วยสาร Acriflavin สาร Cefotetan สาร Colistin sulfate สาร Cycloheximide และสาร Phosphomycin หากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified oxford *Listeria* (USFDA, 1995) ให้ลดการเติมสาร Colistin sulfate ลงจาก 20 มิลลิกรัมเป็น 10 มิลลิกรัมและเพิ่มสาร Moxalactam ลงไป 20 มิลลิกรัม อาหารเลี้ยงเชื้อ MOX agar มีสาร Enzymatic digest of casein สาร Enzymatic digest of animal tissue และสาร Yeast enriched peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน กรดอะมิโนและวิตามิน มีสาร Ferric ammonium citrate ที่ตรวจจับการย่อย Esculin ทำให้เกิดสาร 6,7-dihydroxycoumarin แล้วทำปฏิกิริยากับเหล็กทำให้พื้นของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจาก

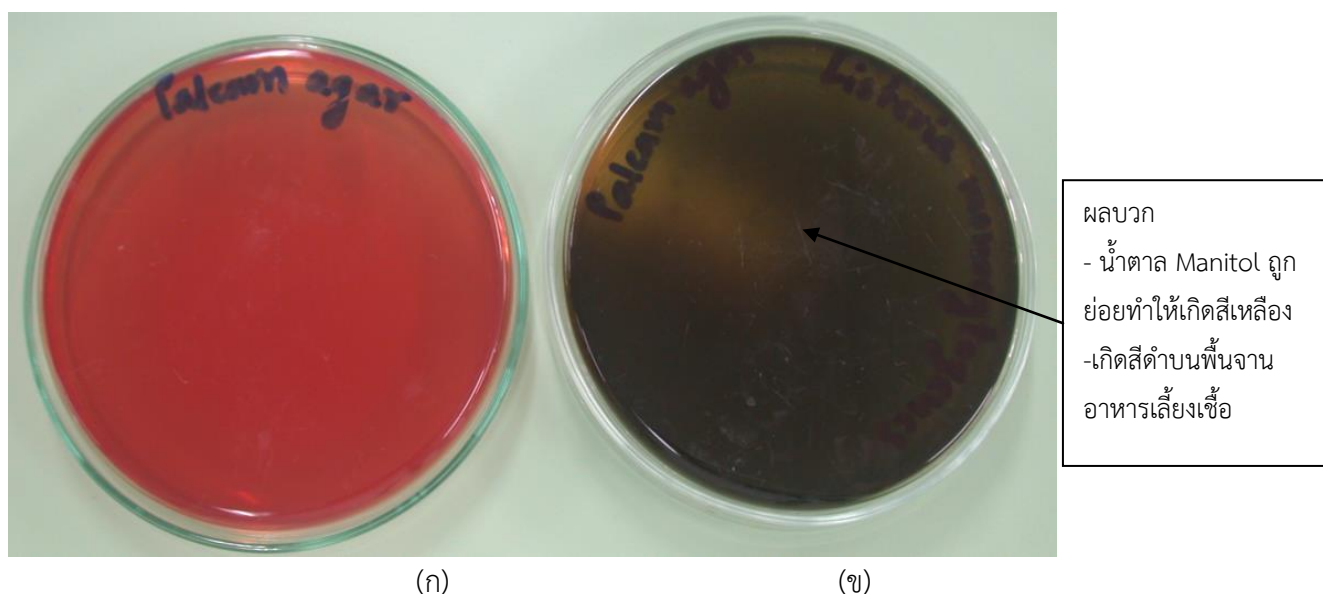
สีเหลืองเป็นสีดำ อาหารชนิดนี้มีเกลือ Lithium chloride สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci และมีสาร Moxalactam ซึ่งเชื้อ *Listeria* สามารถเจริญได้และทำให้เกิดสีดำบนจานอาหารจากการทำปฏิกิริยาเคมีเช่นเดียวกันกับการเกิดสีดำใน Fraser broth โดยผลบวกจะพบโคโลนีสีน้ำตาลถึงดำบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 6.4)



ภาพที่ 6.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ MOX agar (ก) การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MOX agar

5 อาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM agar

อาหารชนิดนี้มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MOX agar ซึ่ง PALCAM agar มีสาร Lithium chloride สาร Polymyxin B sulfate สาร Acriflavine และสาร Ceftazidime ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่กลุ่ม *Listeria* ได้ และนอกจากนั้นยังมีส่วนผสมของ Mannitol-phenol red ซึ่งเมื่อเชื้อแบคทีเรีย *Listeria* หมักน้ำตาลแมนนิทอลแล้วจะทำให้เกิดกรดขึ้นจากนั้นจึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีแดงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีสีดำอันเกิดจากการย่อยสาร Esculin ทำให้เกิดสาร 6,7-dihydroxycoumarin แล้วทำปฏิกิริยากับเหล็กทำให้พื้นของจานอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีดำ (ภาพที่ 6.5)



ภาพที่ 6.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM agar (ก) การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM agar (ข)

การทดสอบทางชีวเคมี

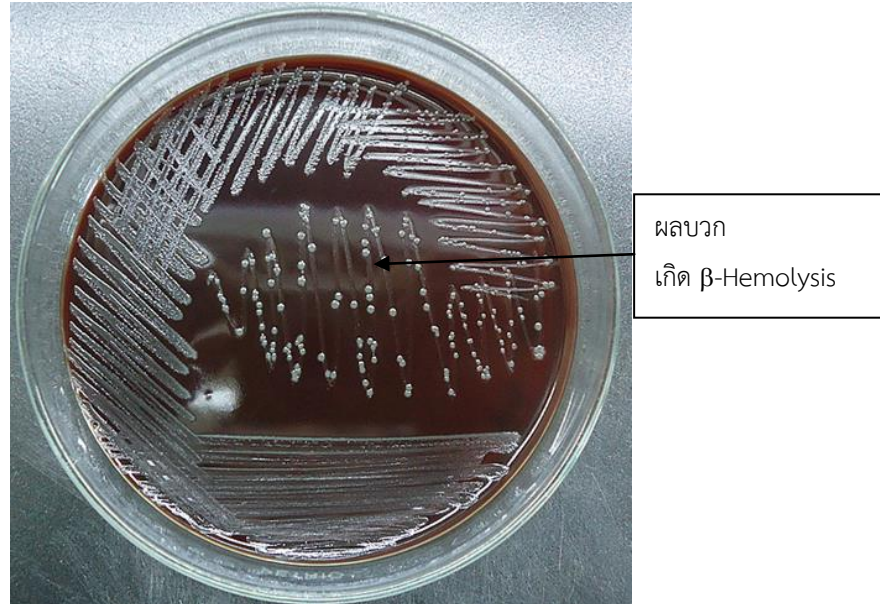
1 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง

การทดสอบลักษณะของการย่อยเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ทำโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Typtic soy blood agar อาหารชนิดนี้ผสม Enzymatic digest of casein, type H และ Enzymatic digest of soybean meal เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอนและวิตามินที่จำเป็นในการเจริญเติบโต และมีสาร Peptones ที่ช่วยให้สังเกตเห็นการเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดงได้ดีขึ้น ทั้งนี้แบคทีเรีย *L. monocytogenes* มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ β -Hemolysis คือมองเห็นเคลือบรอบๆ โคลน (ภาพที่ 6.6)

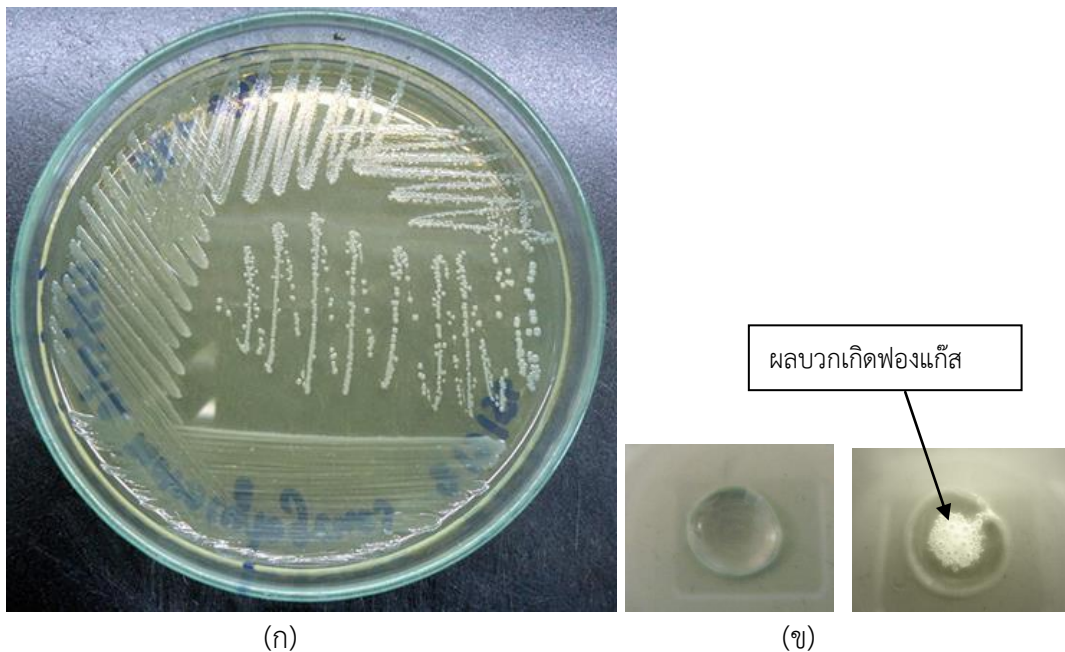
2 การทดสอบหาเอนไซม์คะตาเลส (Catalase)

การทดสอบหาเอนไซม์คะตาเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายอนุพันธ์ของออกซิเจนเช่น H_2O_2 ที่เซลล์อาจได้รับมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ หากแบคทีเรียชนิดใดมีเอนไซม์คะตาเลสจะสามารถใช้เอนไซม์นี้เปลี่ยนจากอนุพันธ์ที่เป็นพิษของแก๊สออกซิเจนแล้วสลายอนุพันธ์ที่เป็นพิษนั้นเพื่อให้ได้แก๊สออกซิเจนและน้ำจึงทำให้แบคทีเรียนั้นมีชีวิตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน การทดสอบทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยในอาหาร Tryptic soy agar with yeast extract (TSAYE) โดยทำการเติม Yeast extract ลงในอาหาร TSA ร้อยละ 2 เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้วจะเห็นโคโลนีสีเทาบนจานอาหาร (ภาพที่ 6.7 ก) จากนั้นจึงนำเอาสารละลายโคโลนีไปหยดบนสไลด์แล้วเติม

สารละลาย H_2O_2 ลงไป ผลบวกจะเกิดฟองแก๊สขึ้น (ภาพที่ 6.7ข) ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ข้อควรระวังในการทดสอบนี้คือไม่ควรเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารที่มีเลือดเป็นส่วนผสมเนื่องจากในเลือดมีเอ็นไซม์คะตาเลสอยู่



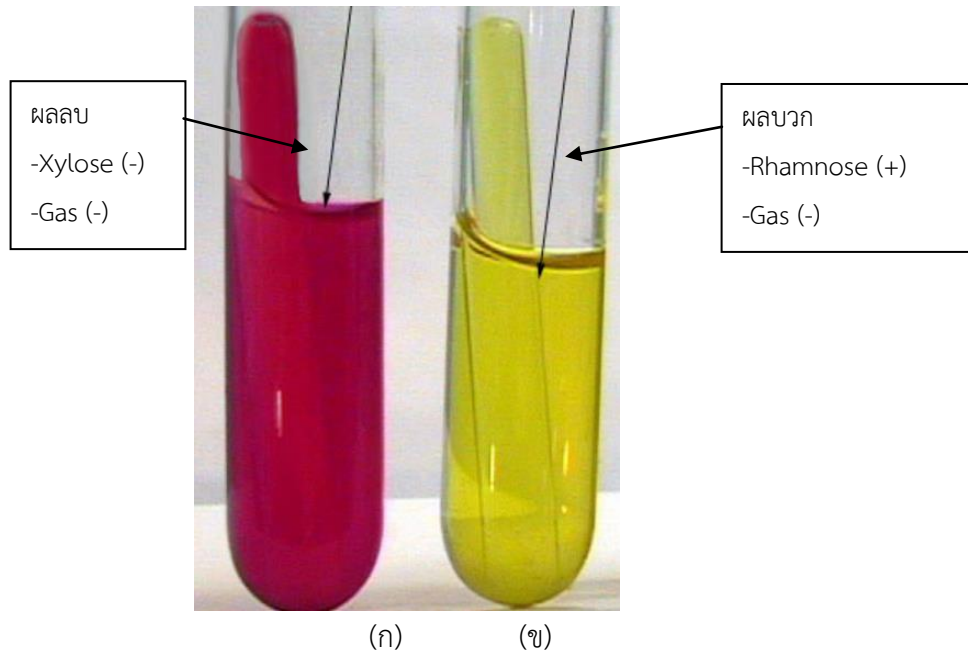
ภาพที่ 6.6 การเกิด β -Hemolysis ของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* บนจานอาหาร Typtic soy blood agar



ภาพที่ 6.7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* บนอาหาร TSA YE (ก) และตัวอย่างผลบวกของการทดสอบหาเอ็นไซม์คะตาเลส (ข)

3 การทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose)

การทดสอบทำโดยใช้อาหาร Carbohydrate broth ที่มีหลอดดักแก๊ส (Durham tubes) ซึ่งหลอดอาหารหลอดที่ 1 มีส่วนผสมของน้ำตาลไซโลสและหลอดที่ 2 มีส่วนผสมของน้ำตาลแรมโนส ผลการทดสอบ *L. monocytogenes* จะไม่ใช้น้ำตาลไซโลส โดยหลอดอาหารยังคงมีสีแดงของ Phenol Red ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ และสามารถใช้น้ำตาลแรมโนสได้โดยหลอดอาหารจะมีกรดเพิ่มมากขึ้นแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองโดยไม่สร้างแก๊ส (ภาพที่ 6.8)



ภาพที่ 6.8 ผลของการไม่ใช้น้ำตาลไซโลส (ก) และการใช้น้ำตาลแรมโนส (ข) ของเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

1.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser Broth

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ UVM1 Broth

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Oxford (MOX) agar

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM Agar Medium

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar with Blood (TSA-blood)

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar with Yeast Extract

3 สารเคมี

3.1 น้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 225 มิลลิลิตร (0.1% peptone water)

3.2 น้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 9 มิลลิลิตร (0.1 % peptone water)

3.3 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (6% Hydrogen peroxide)

3.4 70 %แอลกอฮอล์

4 อุปกรณ์

4.1 หม้อนึ่ง

4.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

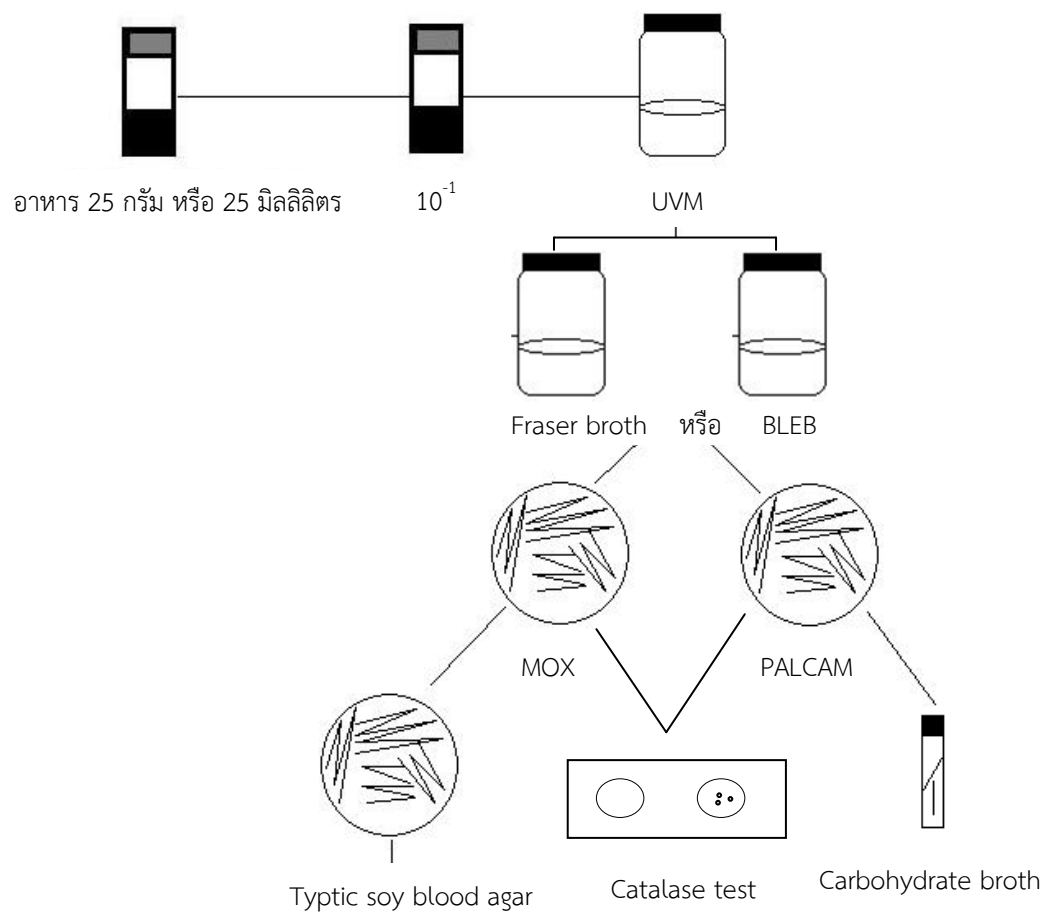
4.3 ตู้อบ

4.4 แผ่นสไลด์

4.5 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

- 1.1 ชั่งอาหาร 25 กรัมใส่ในขวดอาหาร UVM1 Broth 225 มิลลิลิตรแล้วเทใส่ในถุงอาหาร แล้วนำไปตีปั่นอาหาร 2 นาที ทำการบ่มตัวอย่างอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.2 ดูดตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร Fraser Broth ทำการบ่มอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.3 ขีดเชื้อแบคทีเรียจากอาหารที่บ่มไว้ใส่ในอาหาร MOX และ PALCAM ทำการบ่ม 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง (ผลบวกจะมีสีดำเป็นโซนล้อมรอบบนอาหาร MOX และมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเทาและสีเหลืองตามลำดับในอาหาร PALCAM)
- 1.4 ทำการขีดเชื้อที่เป็นผลบวกจากข้อ 1.3 ใส่ลงในอาหาร TSAYE ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบดังนี้
 - 1.4.1 ทดสอบ catalase test โดยการขีดโคโลนีที่สงสัยบนอาหาร TSAYE มาใส่บนแผ่นสไลด์แล้วเติม 6% hydrogen peroxide ลงไป (ถ้าหากเกิดฟอง แสดงว่ามีผลบวก)
- 1.5 ทำการเขี่ยเชื้อที่เป็นผลบวกจากข้อ 1.3 แล้วแทงลงในอาหาร TSA-blood ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สังเกต clear zone และสี ของอาหาร รอบๆรอยที่แทงลงไป)



ภาพที่ 6.9 ขั้นตอนโดยรวมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 6.2 บันทึกผลการทดลอง

อาหาร	ลักษณะที่สังเกตได้	วาดภาพประกอบ
UVM1		
Fraser broth		
MOX		
PALCAM		
TSA-blood		
TSAYE		
Catalase test		

เอกสารอ้างอิง

- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*, 342: 1236-1241.
- Bailey, J. S., Fletcher, D. L., Cox, N.A. 1990. Efficacy of enrichment media for recovery of heat injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 53: 473-477.
- Beaufort, A. 2011. The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. *Food Control*, 22(9): 1498-1502.
- Biokar Diagnostics. 2013. Half-Fraser broth. Retrieved December 4, 2013 from http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/B65A7945AE2BC87AC12574C6002FD7BD.
- Bortolussi, R., Schlech, W.F. 1995. Listeriosis, J.S. Remington, J.O. Klein (Eds.), Infectious diseases of the fetus and newborn infant (4th ed.), Saunders, Philadelphia (1995), pp. 1055–1073.
- Buchanan, R., Lindqvist, R., Ross, T., Smith, M., Todd, E., Whiting, R. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological risk assessment Series 4, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (Italy).
- Capell, C.J., Kirby, R.M., Moss, M.O. 1995. A method and medium for the electrical detection of *Listeria* spp. from food. *International Journal of Food Microbiology*, 25(2): 169-177.
- Cygnarowicz-Provost, M., Whiting, R.C., Craig, J.C. 1994. Steam surface pasteurization of beef frankfurters. *Journal of Food Science*, 59: 1–5.
- Dons, L., Rasmussen, O.F., Olsen, J.E. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 6: 2919–2929.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2007. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *The EFSA Journal*, 599: 1–42.

- European Commission. 1999. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. Health & consumers protection. directorate-general, Directorate B-scientific health opinions. Unit B3-management of scientific committees II, September 23th.
- Fabrizio, K.A., Cutter, C.N. 2005. Application of electrolyzed oxidizing water to reduce *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Meat Science*, 71: 327–333.
- Farber J. 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. *Journal of Food Protection*, 54: 924–934
- Farber, J.M. 2000. Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *International Journal of Food Microbiology*, 62(3): 247–251.
- Goh, S.G., Leili, A-H., Kuan, C.H., Loo, Y.Y., Lye, Y.L., Chang, W.S., Soopna, P. Najwa, M.S., Tang, J.Y.H., Yaya, R., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., Son, R. 2014. Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. *Food Control*, 37: 51-55.
- González, D., Vitas, A.I., Diez-Leturia, M., García-Jalón, I. 2013. *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. *Food Microbiology*, 36(2): 374-378.
- Johnsen, B.O., Lingaas, E., Torfoss, D., Strøm, E.H., Nordøy, I. 2010. A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. *Journal of Infection*, 61(6): 465-470.
- Lamont, R.J., Postlethwaite, R. 1986. Carriage of *Listeria monocytogenes* and related species in pregnant and non-pregnant women in Aberdeen, Scotland. *Journal of Infection*, 13(2): 187-193.
- Liu, D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 645–659.
- Mattila, M., Lindström, M., Somervuo, P., Markkula, A., Korkeala, H. 2011. Role of flhA and motA in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 148(3): 177-183.
- McLauchlin, J., Rees, C.E.D. 2009. Genus *Listeria* pirie 1940a, 383^{AL} Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes, (2nd edn.), Springer, New York.

- Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., Audurier, A. 2000. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5083–5086.
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H. 2010. Bioactive alginate coatings to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon slices and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3): 326-331.
- Rocourt, J., Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*, M. Doyle, L. Beauchat, T. Montville (Eds.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers, Editor American Society for Microbiology, pp. 337–352.
- Ryser, E.T. 2011. Pathogens in milk: *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd Ed.), pp. 81-86.
- Todd, E.C.D., Notermans, S. 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22: 1484–1490.
- USFDA, United States Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological analytical manual, (8th ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD.
- USFDA, United States Food and Drug Administration. 2008. *Listeria monocytogenes* Sec. 555.320 Guidance for FDA staff, Retrieved December, 2008, from <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm>.

บทปฏิบัติการที่ 7

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ใน
อาหารทะเล

105

แบคทีเรียนี้อาจสูงถึง $1,000 \text{ MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ โดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อน (Cook และคณะ, 2002) นอกจากนั้นยังพบรายงานการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียนี้ในกุ้ง (Boonyawantang และคณะ, 2012; Zarei และคณะ, 2012) และอาหารทะเลอื่นๆ (Potasman และ Odeh, 2002; Su และ Liu, 2007; Abd-Elghany และ Sallam, 2013) การระบาดของเชื้อแบคทีเรียนี้ถูกรายงานอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ครั้งแรกที่พบการระบาดคือในปี ค.ศ. 1950 ในประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีผู้ป่วยได้รับเชื้อแบคทีเรียจำนวน 272 รายและเสียชีวิต 20 ราย (Broberg และคณะ, 2011) และในปี ค.ศ. 1998 พบผู้ป่วยประมาณ 12,318 ราย จากการรายงานกว่า 839 ครั้งในประเทศญี่ปุ่น (Hara-Kudo และคณะ, 2012) นอกจากนั้นแล้วในประเทศชิลีมีรายงานผู้ป่วยโรคท้องร่วงจากการบริโภคอาหารทะเลเกือบ 900 รายในช่วงฤดูร้อนปีค.ศ. 2006 (Fuenzalida และคณะ, 2007) สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในปี 1999 เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารทะเลที่ได้จากชายฝั่งทะเลภาคใต้ ซึ่งต่อมาพบว่า Serotype หลักของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคคือ O1:K25 O1:K41 O4:K12 และ O3:K6 (Laohaprertthisan และคณะ, 2003) ซึ่งอาการของผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้คือมีอาการท้องร่วง ปวดศีรษะ อาเจียน คลื่นไส้ มีไข้ต่ำซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากบริโภคอาหารทะเล 4-96 ชั่วโมง (Joseph และคณะ, 1982)

Serotype ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หากแบ่งตามส่วนก่อโรคได้ของเชื้อแบคทีเรีย (Antigen) นั้นคือส่วนที่เป็น Somatic (O) และ Capsular (K) ซึ่งพบ 13 O-serogroups และ 71 K-serogroups (Hara-Kudo และ DePaola, 2012) ซึ่ง Serotypes หลักๆ ที่ก่อให้เกิดโรคคือ O3:K6 และ O4: K68 (Jones และคณะ, 2012) โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบจะมีองค์ประกอบของ Lipid A ส่วนของ Core oligosaccharide (Core OS) และส่วน O-side chain (O-antigen) ซึ่งมีหน่วยของ Oligosaccharide เชื่อมต่อกันอยู่ใน Outer membrane (Wang และ Reeves, 1998) แต่สำหรับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีมวลโมเลกุลต่ำจึงมีส่วนของ O-side อยู่น้อย (Hashii และคณะ, 2003) ดังนั้นส่วนของ O-serotype ที่ก่อโรจึงอยู่ที่ Core OS (Iguchi และคณะ, 1995)

ความรุนแรงในการก่อเชื้อโรค (Virulence factors) ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ดังภาพที่ 7.1 แบคทีเรียนี้มี Flagellum เส้นเดียว เรียกว่า Single flagellum เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวจะสามารถเคลื่อนที่ได้ (McCarter, 1999) เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีโปรตีน Multivalent adhesion molecule (MAM7) ที่สามารถยึดเกาะกับ Fibronectin และ Phosphatidic acid ของเซลล์ที่ต้องการบุกรุก (Host cells) ได้ (Krachler และคณะ, 2011) นอกจากนั้นแล้วแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สามารถสร้าง Siderophores คือ Vibrioferrin, Ferrichrome และ Aerobactin ที่สามารถจับกับธาตุเหล็ก (Fe) ในสิ่งแวดล้อมได้ ทำให้เซลล์ที่ต้องการบุกรุกดูดซึมเข้าไปเพราะต้องการธาตุเหล็ก ซึ่งการแลกเปลี่ยน

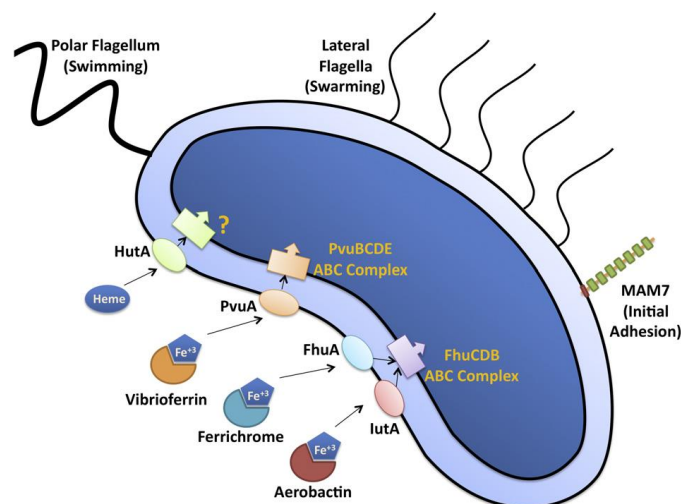
ไอออนจะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับความแตกต่างของ Membrane receptors ของเซลล์ที่ถูกบุกรุก และ Outer membrane ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (Kustusch และคณะ, 2011)

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร

1 ขั้นตอนการบ่มเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต (Enrichment) อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water (APW) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมนำมาบ่มในขั้นตอน Enrichment เพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* พื้ตัวก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Oliver, 2003) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีสภาพเป็นด่าง

2 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation) ตามมาตรฐานอาหารสากล (ISO 8914, 1990; USDA, 2004) นิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ซึ่งอาหารนี้ได้ถูกระบุในมาตรฐานการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

3 ขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical identification) ได้แก่ การทดสอบการใช้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส การทดสอบการเคลื่อนที่ การสร้างอินโดลและการย่อยไลซีน การตรวจหาเอ็นไซม์ Oxidase การทดสอบการเจริญในเกลือ การทดสอบความสามารถในการย่อยกรดอะมิโน Ornithine เป็นต้น ทั้งนี้การทดสอบทางชีวเคมี อาหารที่ใช้ในการทดสอบจะต้องเติมเกลือร้อยละ 2-3 ลงในอาหารที่ใช้ในการทดสอบด้วย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบเค็ม (Halophilic bacteria)



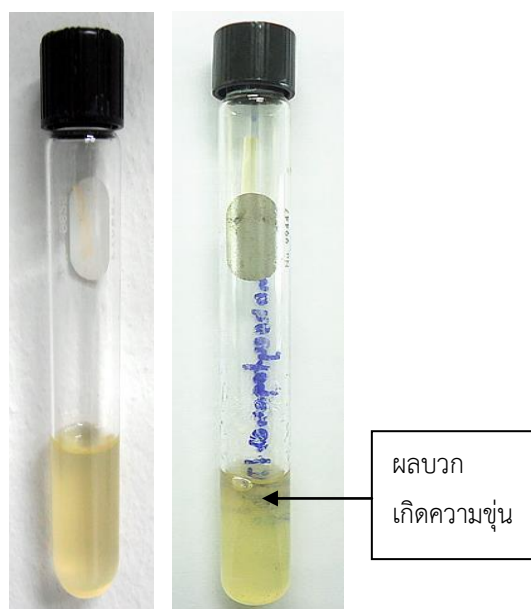
ภาพที่ 7.1 ความรุนแรงในการก่อเชื้อโรค (Virulence factors) ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

ที่มา: Broberg และคณะ (2011)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water (APW)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water (APW) เป็นอาหาร Pre-enrichment ของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็น *Vibrio* (AOAC, 1995; APHA, 2001) ก่อนนำไปศึกษารูปร่าง (Morphology) การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical) และการตรวจหา Serological properties โดยในขั้นตอนนี้สามารถนำอาหารทะเลที่ต้องการตรวจมาบ่มในอาหารนี้เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส อาหารชนิดนี้มี Peptic digest of animal tissue เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอนและสารอาหารที่สำคัญ นอกจากนั้นแล้วการเติมเกลือสูงถึง 30 กรัมต่อลิตรยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ผลบวกคืออาหารมีความขุ่นภายหลังการบ่ม (ภาพที่ 7.2)

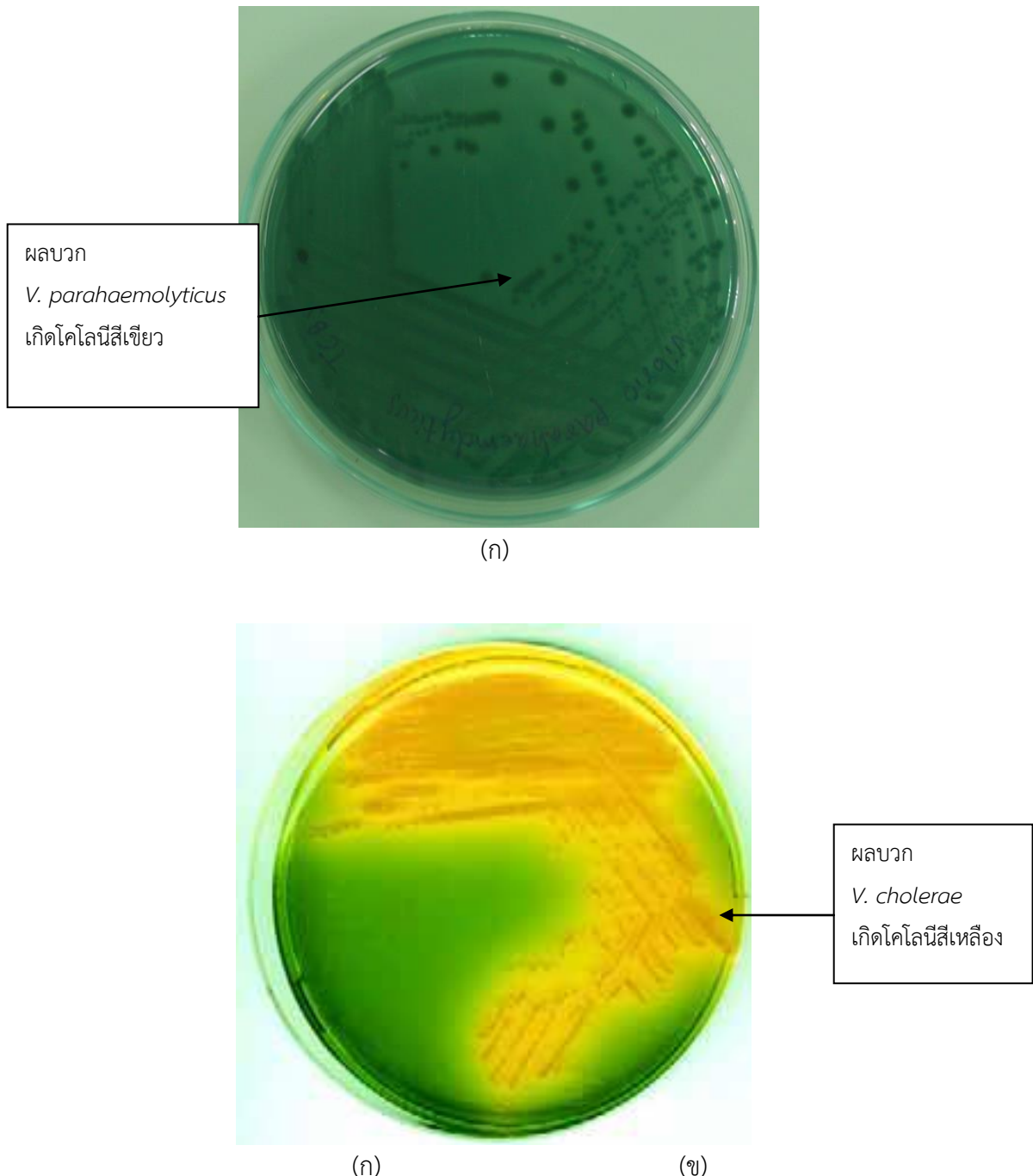


ภาพที่ 7.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water (APW)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar

เมื่อทำการบ่มอาหารทะเลใน APW broth แล้วจึงนำมาทำการขีดลงในจานอาหาร TCBS agar เพื่อตรวจสอบว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หรือไม่ อาหาร TCBS agar มีส่วนผสมของ Proteose peptone สาร Yeast extract เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน มีวิตามิน บีรวมและสารอาหารที่จำเป็นอื่นๆในการเจริญเติบโต มี Oxgall และ Sodium citrate ช่วยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coliforms มีสาร Sodium thiosulphate เป็นแหล่งซัลเฟอร์ เพื่อใช้ในการตรวจจับแบคทีเรียที่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีน้ำตาลซูโครสสำหรับให้เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ได้ทำการหมักโดยหากเกิดกรดขึ้นจากการหมักจะพบสีของ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลืองอันเนื่องจากมี Bromothymol blue ทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้จึงเห็นโคโลนีเป็นสีน้ำเงินเขียวเหมือนเดิม ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้จึงพบโคโลนีสีเหลืองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 7.3)

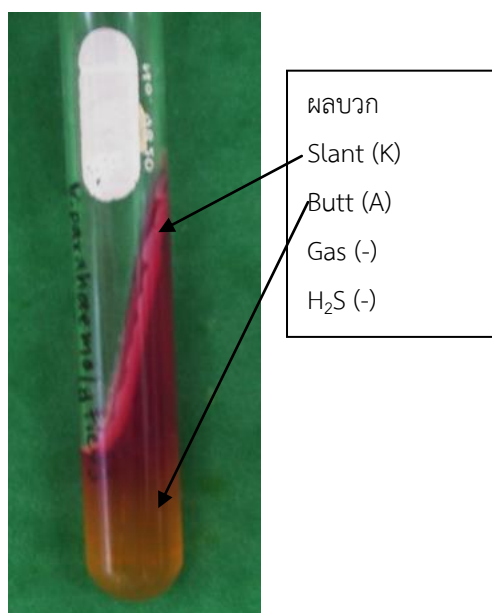


ภาพที่ 7.3 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (ก) และเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* (ข) ที่เลี้ยงในอาหาร TCBS ที่มา: ภาพ ข (Merck Millipore, 2013)

การทดสอบทางชีวเคมี

1 การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส

การทดสอบทำในอาหาร Triple sugar iron (TSI) agar ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนผสมหลักที่สำคัญ (Ausmaucos Pharma, 2013) เพื่อให้ทราบได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบสามารถใช้น้ำตาลแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดหรือต่างซึ่งถ้าได้กรด (Acid; A) อาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีเหลืองและหากเป็นด่าง (Alkaline; K) จะเป็นสีชมพู และมีสาร Ferrous sulfate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI สำหรับตรวจจับแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นซึ่งทำให้มีสีดำในหลอดอาหาร การทดสอบทำโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ส่วนบนของผิวอาหารเลี้ยงเชื้อให้สัมผัสกับออกซิเจน (Slant) จากนั้นจึงทำการแทงเชื้อแบคทีเรียลงในส่วนล่างของหลอดอาหารในสถานะที่มีออกซิเจนต่ำ (Butt) การตรวจผลการทดลองจึงตรวจที่ส่วนบน (Slant) ส่วนล่างของหลอดอาหาร (Butt) ตรวจการเกิดแก๊สคืออาหารเลี้ยงเชื้อแยกออกจากกัน (Gas) และตรวจการสร้าง H_2S ผลการทดสอบของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* คือ Slant (K) Butt (A) Gas (-) H_2S (-) ดังภาพที่ 7.4

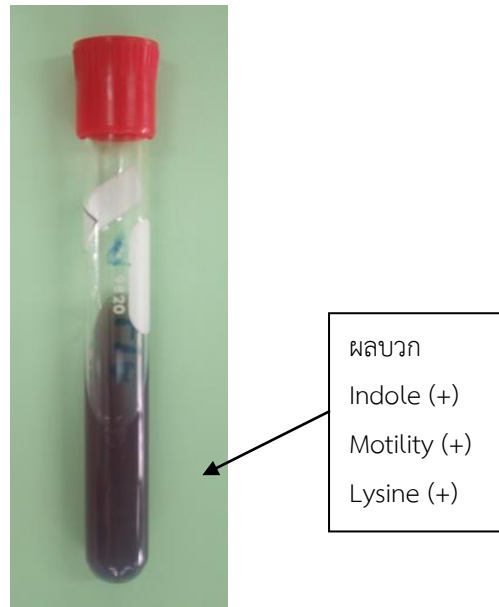


ภาพที่ 7.4 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSI

2 การทดสอบการใช้ไลซีน การสร้างสารอินโดลและการดูผลการเคลื่อนที่

อาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถนำมาทดสอบได้คือ Lysine indole motility (LIM) agar อาหารเลี้ยงเชื่อนี้มี L-Lysine hydrochloride มีสาร Peptone สาร Tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งหากเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยไลซีนได้แล้วให้สถานะต่างจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื่อนั้นเป็นสีม่วงเหมือนเดิม เพราะอาหารเลี้ยงเชื่อนี้มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ แต่หากเชื้อแบคทีเรียสร้างกรด

อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลือง ส่วนการทดสอบการสร้างอินโดลทำโดยการหยดสารละลาย Kovac ลงในหลอดอาหาร ผลบวกคือเกิดวงแหวนสีแดงที่ด้านบนของหลอดอาหาร สำหรับการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียหากแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่ได้จะทำให้อาหารพุ่งออกนอกรอยแท่ง (Stab) สำหรับผลบวกของ *V. parahaemolyticus* คือ Lysine (+) Indole (+) Motility (+) ภาพที่ 7.5



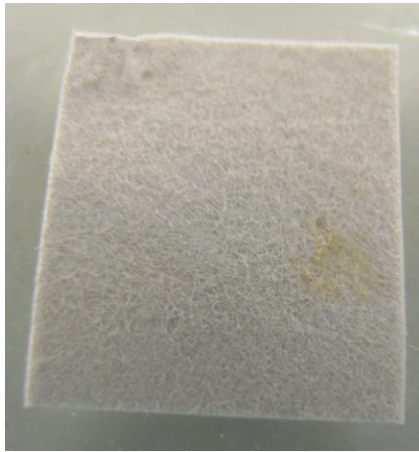
ภาพที่ 7.5 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร Lysine indole motility (LIM) agar

3 การตรวจหาเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase)

การตรวจหาเอนไซม์ Cytochrome oxidase ซึ่งปกติแล้วแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้เอนไซม์นี้ในการรับส่งอิเล็กตรอน การทดสอบทำโดยการเติมน้ำยาที่มีส่วนผสมของสารละลาย Dimethyl-p-phenylenediamine และสาร α -naphthol ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย (Suspensions) ซึ่งผลบวกจะพบสีน้ำเงินภายใน 15 วินาที (ภาพที่ 7.6)

4 การทดสอบการเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ความสามารถในการทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆได้ การทดสอบทำโดยใช้อาหาร Nutrient broth+1%NaCl หากเป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* จะสามารถเจริญแล้วทำให้อาหารเหลวนั้นมีความขุ่นได้ แต่ถ้าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* อาหารนั้นจะยังคงใส (ภาพที่ 7.7)

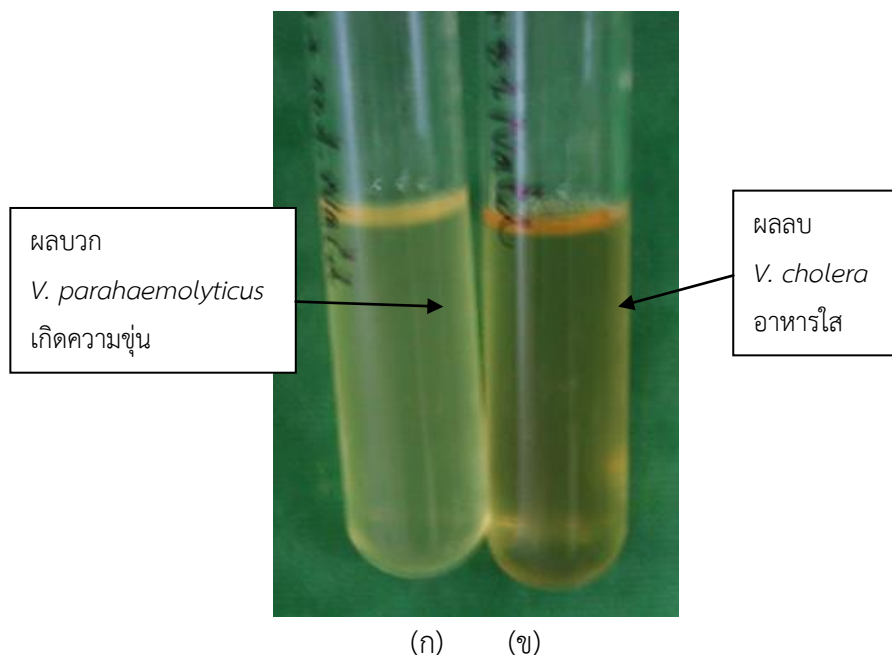


(ก)



(ข)

ภาพที่ 7.6 กระดาษกรองชุดควบคุม (ก) และการเกิดสีน้ำเงินจากการทดสอบ Oxidase test ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (ข)



(ก)

(ข)

ภาพที่ 7.7 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (ก) และเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* (ข) ที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth+1%NaCl

5 การทดสอบความสามารถในการย่อยกรดอะมิโน Ornithine

การทดสอบนี้สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Ornithine decarboxylase (OD) agar โดยหากเชื้อแบคทีเรียต้องการใช้กรดอะมิโน Ornithine เชื้อแบคทีเรียจะหลั่งเอนไซม์ Decarboxylase ออกมาเพื่อตัดพันธะ Carboxyl ของกรด อะมิโนให้ได้ Amine หรือ Diamine และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งกรดอะมิโน L-Ornithine มีหมู่ Carboxyl อยู่ นอกจากนี้อาหารนี้ยังมี Yeast

extract เป็นแหล่งไนโตรเจน มีกลูโคสเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียใช้ในการหมักในระยะแรกๆ เพื่อสร้างกรด ขึ้นมาโดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลืองเพราะมี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ โดยสภาวะกรดนี้จะเหมาะสมให้เอนไซม์ Decarboxylase ได้ทำงาน แล้วเชื้อแบคทีเรียจึงสามารถสร้างต่างออกมาในรูปของ Amine หรือ Diamine และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อกลับมาเป็นสีม่วงเช่นเดิม ทั้งนี้แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีความสามารถในการย่อยกรดอะมิโน Ornithine ได้ ผลบวกจึงเกิดสีม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 7.8)



ภาพที่ 7.8 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร Ornithine decarboxylase (OD) agar

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

1.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเล

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water (APW)
- 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar
- 2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar
- 2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine indole motility (LIM) agar
- 2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth+1%NaCl
- 2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Ornithine decarboxylase (OD) agar

3 สารเคมี

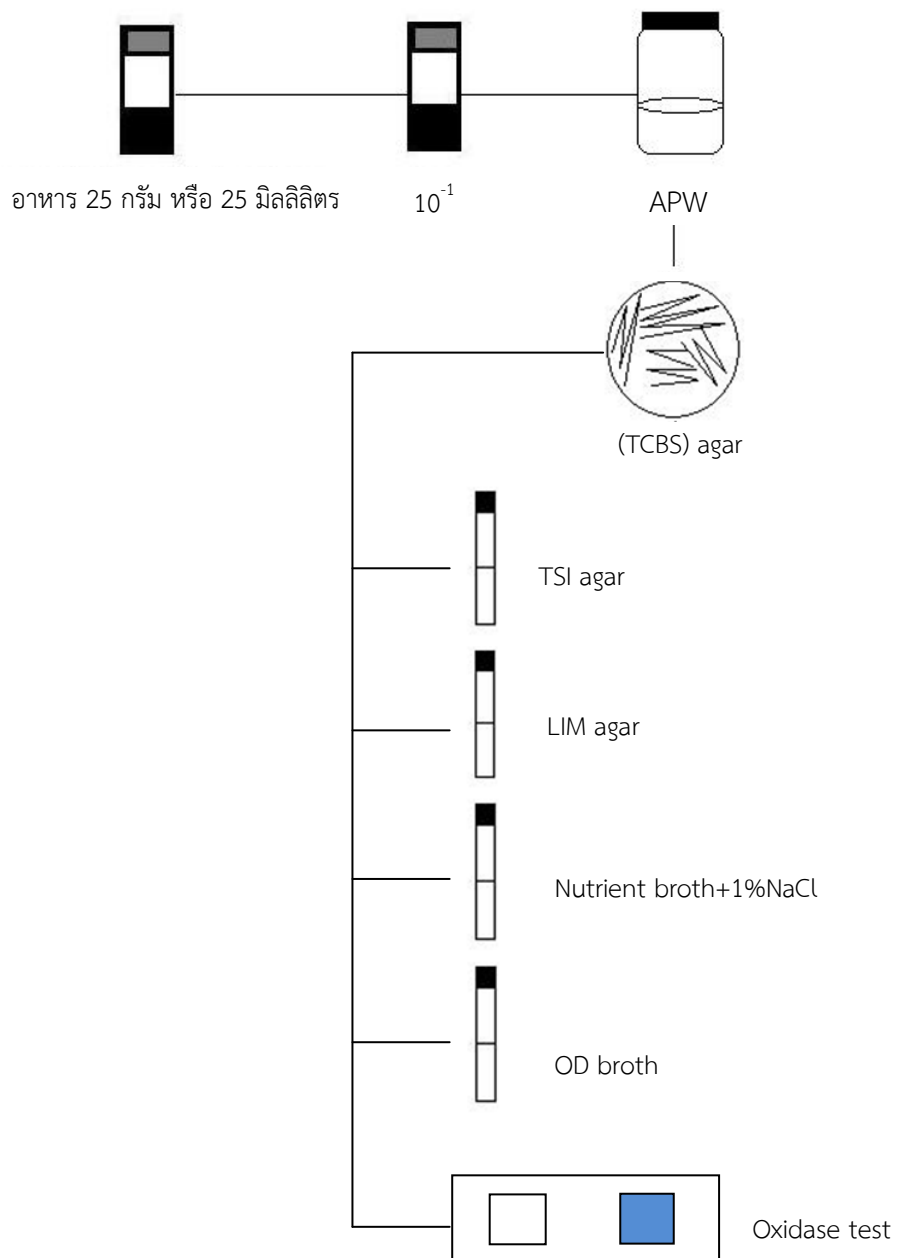
- 3.1 น้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 225 มิลลิลิตร (0.1% peptone water)
- 3.2 น้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 9 มิลลิลิตร (0.1 % peptone water)
- 3.3 สารละลาย Dimethyl-p-phenylenediamine และสาร α -naphthol
- 3.4 สารละลาย α -naphthol
- 3.5 70 %แอลกอฮอล์

4 อุปกรณ์

- 4.1 หม้อนึ่ง
- 4.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป
- 4.3 ตู้บ่ม
- 4.4 แผ่นสไลด์
- 4.5 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

- 1.1 ชั่งอาหาร 25 กรัมใส่ในขวดอาหาร Alkaline peptone water (APW) 225 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ในถุงอาหารแล้วนำไปตีปั่นอาหาร 2 นาที ทำการบ่มตัวอย่างอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.2 ขีดเชื้อจากอาหารที่บ่มไว้ใส่ในอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ทำการบ่ม 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (ผลบวกคือพบโคโลนีเป็นสีน้ำเงินเขียว)
- 1.3 ทำการขีดเชื้อที่เป็นผลบวกจากข้อ 1.2 ใส่ลงในอาหาร TSI อาหาร LIM และอาหาร Nutrient broth+1%NaCl ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบดังนี้
 - 1.3.1 ทำการเขี่ยเชื้อที่เป็นผลบวกจากข้อ 1.2 แล้วนำมาทดสอบออกซิเดส (Oxidase) โดยการเติมน้ำยาที่มีส่วนผสมของสารละลาย Dimethyl-p-phenylenediamine และสาร α -naphthol ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย (Suspensions) ซึ่งผลบวกจะพบสีน้ำเงินภายใน 15 วินาที
- 1.4 ทำการขีดเชื้อที่เป็นผลบวกจากข้อ 1.2 ใส่ลงในอาหาร OD agar ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลบวกจึงเกิดสีม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 7.9 ขั้นตอนโดยรวมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 7.1 บันทึกผลการทดลอง

อาหาร	ลักษณะที่สังเกตได้	วาดภาพประกอบ
Alkaline peptone water (APW)		
Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar		
Triple sugar iron (TSI) agar		
Lysine indole motility (LIM) agar		
Nutrient broth+1%NaCl		
Ornithine decarboxylase (OD) agar		
Oxidase test		

เอกสารอ้างอิง

- Abd-Elghany, S.M., Sallam, K.I. 2013. Occurrence and molecular identification of *Vibrio parahaemolyticus* in retail shellfish in Mansoura, Egypt. *Food Control*, 33(2): 399-405.
- Andrews, L., Jahncke, M., Mallikarjunan, K. 2003. Low dose gamma irradiation to reduce pathogenic *Vibrios* in live oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12: 71-82.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. 1995. *Vibrio cholerae* in oysters: Elevated temperature enrichment method. AOAC Official Method 988.20, AOAC International, Gaithersburg, MD
- APHA, American Public Health Association. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, F.P. Downes, K. Ito (Eds.), (4th ed.), American Public Health Association, Washington, D.C.
- Ausmaucos Pharma. 2013. Triple Sugar Iron (TSI) fermentation. Retrieved December 4, 2013 from <http://www.cellmaterials.com/Cell-Biology/Triple-sugar-agar>.
- Beuchat, I.R. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* public health significance. *Food Technology*, 36: 80-83.
- Boonyawantang, A., Mahakarnchanakul, W., Rachtanapun, C., Boonsupthip, W. 2012. Behavior of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in prawn in response to temperature in laboratory and factory. *Food Control*, 26(2): 479-485.
- Broberg, C.A., Calder, T.J., Orth, K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 13 (12-13): 992-1001.
- Chen, Y., Liu, X., Yan, J., Li, X., Mei, L., Ma, Q., Ma, Y. 2010. Foodborn pathogens in retail oysters in South China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23: 32-36.
- Cook, D.W., O'Leary, P., Hunsucker, J.C., Sloan, E.M., Bowers, J.C., Blodgett, R.J., DePaola, A. 2002. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. *Journal of Food Protection*, 65: 79-87.
- Fuenzalida, L., Armijo, L., Zabala, B., Hernández, C., Rioseco, M.L., Riquelme, C., Espejo, R.T. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3): 270-275.

- Hamamoto, A., Mori, M., Takahashi, A., Nakano, M., Wakikawa, N., Akutagawa, M., Ikehara, T., Nakaya, Y., Kinouchi, Y. 2007. New water disinfection system using UVA light-emitting diodes. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2291–2298.
- Hara-Kudo, Y., DePaola, A. 2012. Detection of pathogenic *Vibrios*, Y.C. Su (Ed.), *Pathogenic Vibrios and Food Safety*, Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 179–210.
- Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. 2012. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1): 95–101.
- Hashii, N., Isshiki, Y., Iguchi, T., Kondo, S. 2003. Structural analysis of the carbohydrate backbone of *Vibrio parahaemolyticus* O₂ lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338: 1063–1071.
- Iguchi, T., Kondo, S., Hisatsune, K. 1995. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 130: 287–292.
- ISO, International Organization for Standardization 8914. 1990. Microbiology. General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*.
- Jones, J.L., Ludeke, C.H., Bowers, J.C., Garrett, N., Fischer, M., Parsons, M.B., Bopp, C.A., Depaola, A. 2012. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 2343–2352.
- Joseph, S.W., Colwell, R.R., Kaper, J.B. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios*. *Critical Reviews in Microbiology*, 10: 77–124.
- Kaysner, C.A., De Paola, A. 2000. Outbreaks of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains. *Journal of Shellfish Research*, 19:657.
- Krachler, A.M., Ham, H., Orth, K. 2011. The outer membrane adhesion factor MAM7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- Kustus, R.J., Kuehl, C.J., Crosa, J.H. 2011. Power plays: iron transport and energy transduction in pathogenic vibrios. *Biometals*, 24: 559–566.
- Laohaprertthisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C., Nishibuchi, M. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiology and Infection*, 130: 1–12.
- Liu, C., Lu, J., Su, Y.C. 2009. Effects of flash freezing, followed by frozen storage, on reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific raw oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Food Protection*, 72: 174–177.
- McCarter, L. 1999. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1: 51–57.
- McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A., Napolilli, N.P., Allison, C.G., Murray, S.L., Thompson, E.C., Bird, M.M., Middaugh, J.P. 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine*, 353: 1463–1470.
- Merck Millipore. 2013. Alkaline Peptone Water. Retrieved December 5, 2013 from <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/43856dat.Par.0001.File.tmp/43856dat.pdf>.
- Oliver, J.D. 2003. Chapter 17 Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. *Progress in Industrial Microbiology*, 37: 249–269.
- Parveen, S., Hettiarachchi, K.A., Bowers, J.C., Jones, J.L., Tamplin, M.L., McKay, R., Beatty, W., Brohawn, K., DaSilva, L.V., DePaola, A. 2008. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2): 354–361.
- Potasman, I., Paz, A., Odeh, M. 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 921–928.
- Rippey, S.R. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 419–425.
- Su, Y., Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24: 549–558.

- USFDA, U.S. Food and Drug Administration. 2004. Bacteriological analytical manual online Chapter 9, Retrieved December 4, 2013 from <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>.
- Wang, D., Zhang, D., Chen, W., Yu, S., Shi, X. 2010. Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1): 76-80.
- Wang, L., Reeves, P.R. 1998. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infection and Immunity*, 66: 3545–3551.
- Ye, M., Huang, Y., Chen, H. 2012. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters by high-hydrostatic pressure and mild heat. *Food Microbiology*, 32(1): 179-184.
- Ye, M., Huang, Y., Gurtler, J.B., Niemira, B.A., Sites, J.E., Chen, H. 2013. Effects of pre- or post-processing storage conditions on high-hydrostatic pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3): 146-152.
- Yu, W-T., Jong, K-J., Lin, Y-R., Tsai, S-e., Tey, Y.H., Wong, H-C. 2006. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3): 185-192.
- Zarei, M., Borujeni, M.P., Jamnejad, A., Khezzadeh, M. 2012. Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25(1): 107-109.

บทปฏิบัติการที่ 8

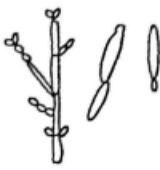
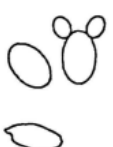
การตรวจหาเชื้อยีสต์และราในอาหาร

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงซึ่งเซลล์ของเชื้อราจัดอยู่ในพวกยูคาริโอต เชื้อราสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ให้กลายเป็นอาหารได้ (Eukaryotic heterotrophic organisms) นอกจากนั้นเชื้อรายังมีรูปร่างคล้ายกับกิ่งไม้ที่ไม่มีราก (Thallus) ที่มีลักษณะต่าง ๆ กันอีกด้วย ทั้งนี้เชื้อรามีทั้งชนิดที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์ ซึ่งสปอร์และลักษณะโครงสร้างของเชื้อราสามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อราได้ (Nwakanma, 2017) เมื่อเปรียบเทียบขนาดของเชื้อรากับเชื้อแบคทีเรียพบว่าเชื้อรามีเซลล์ขนาดใหญ่กว่าและมีโครงสร้างที่สมบูรณ์มากกว่า นอกจากนั้นเชื้อราโดยส่วนใหญ่ยังต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและอัตราการเจริญมักช้ากว่าแบคทีเรีย (Taniwaki และคณะ, 2001) การเจริญเติบโตของเชื้อรานั้นเกิดจากการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา (Mycelium) ส่วนเชื้อยีสต์มักมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิต่ำจนถึงปานกลางและสามารถทนต่อแรงดันรวมทั้งกรดต่างๆได้ดี

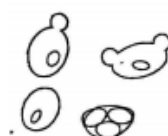
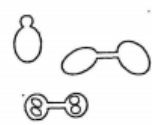
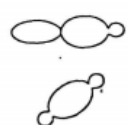
เชื้อยีสต์และราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

การจัดจำแนกชนิดของยีสต์และราที่สำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสียสามารถจัดได้โดยการจำแนกไมซีเลียม ชนิดของราที่สามารถสร้างสปอร์แบบมีเพศ และไม่มีเพศ ดังตารางที่ 8.1

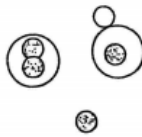
ตารางที่ 8.1 เชื้อยีสต์และราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Genus	Identification Characteristics	Microscopic Morphology	Important Properties Related to Food Spoilage
Deuteromycota			
<i>Candida</i>	Cells are spheroidal, cylindrical, ovoid, or elongate Pseudomycelium formation		Common yeasts in fresh ground beef and poultry <i>C. krusei</i> : preservatives resistant, form film on pickle, olives, sauces <i>C. parapsilosis</i> : spoil cheese, margarine, dairy and fruit products
<i>Cryptococcus</i>	Multilateral budding Nonfermenter of sugars		Found on strawberries, other fruit, marine fish, shrimp, fresh ground beef

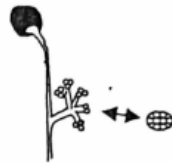
ตารางที่ 8.1 เชื้อยีสต์และราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (ต่อ)

Genus	Identification Characteristics	Microscopic Morphology	Important Properties Related to Food Spoilage
<i>Rhodotorula</i>	Multilateral budding Nonfermenter of sugars Orange or salmon pink color pigmentation Often mucoid colonies		Found on fresh poultry, shrimp, fish, beef Some grow on surface of butter <i>R. mucilaginosa</i> : spoil dairy products, occasional spoilage of fresh fruits
<i>Brettanomyces</i>	Multilateral budding Formation of ogival cells (pointed at one end, rounded at the other)		Spoil beer, soft drink, wine, pickles <i>B. intermedius</i> : prevalent species, grow at pH as low as 1.8 <i>B. bruxellensis</i> : off odors in beer, cider, soft drinks
<i>Saccharomyces</i>	Multilateral budding Spherical spore Does not ferment lactose White or cream colonies Typical yeast odor		<i>S. cerevisiae</i> : ubiquitous contaminant, sometimes fermentative spoilage of soft drinks, some strains preservative resistant
<i>Zygosaccharomyces</i>	Multilateral budding “Drum-bell”-shaped asci One to four ascospores per ascus Bean-shaped ascospores Strong fermenter of sugars		<i>Z. bailii</i> : highly resistant to preservatives, xerophile, capable of growth at $a_w=0.8$, at pH 1.8, heat-resistant ascospores, spoil tomato sauce, mayonnaise salad dressing, soft drinks, fruit juices etc. <i>Z. rouxii</i> : grow at $a_w=0.62$
<i>Haseniaspora</i>	Bipolar budding Lemon-shapes (apiculate) cell Two to four ascospores per ascus		Found on figs, tomatoes, citrus fruits, strawberries Grow in fruit juices

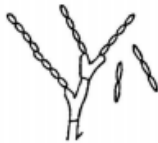
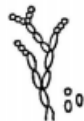
ตารางที่ 8.1 เชื้อยีสต์และราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Genus	Identification Characteristics	Microscopic Morphology	Important Properties Related to Food Spoilage
<i>Debaryomyces</i>	Multilateral budding Spherical or oval ascospore Pseudomycelium		Prevalent yeasts in dairy products Forms slime on wieners Grow in brine, cheeses <i>D. hansenii</i> : high salt tolerance, grow at aw=0.65, spoil yogurt, orange juice concentrate
<i>Kluyveromyces</i>	Multilateral budding Spherical spores Vigorous fermenter of sugars		Prevalent yeast in dairy products <i>K. marxianus</i> : cheese spoilage
<i>Pichia</i>	Multilateral budding Four ascospores per ascus Pseudomycelium Arthrospores		Found on fresh fish, shrimp Grows in olive brine <i>P. membranaefaciens</i> : preservative resistant, film formation on olives, pickles, sauces
Zygomycota			
<i>Mucor</i>	Nonseptate hyphae Cottony colony Smooth, nonstriated sporangiospore Produce no rhizoids		Grow on refrigerated meat, cause defect called "whiskers" Black spot on frozen mutton Very common on bread
<i>Rhizopus</i>	Nonseptate hyphae Stolons, rhizoids Umbrella-shaped columellae Large sporangiospore with striated wall Dark sporangia containing dark to pale spores		Bread mold Watery soft rot of fruits Black spot on beef, bacon, frozen mutton

ตารางที่ 8.1 เชื้อยีสต์และราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Genus	Identification Characteristics	Microscopic Morphology	Important Properties Related to Food Spoilage
<i>Thamnidium</i>	Nonseptate hyphae Sporangia on highly branched structure Clusters of smaller sacs (sporangioles) presents as well as sporangia (often on the same stipe)		Whiskers on beef
Ascomycota			
<i>Neosartorya</i>	White, cottony, fluffy colony White cleistothecia Colorless ascospores Gray, green conidia		Heat-resistant ascospores Spoil canned bottled fruit juice Not Xerophilic
<i>Byssochlamys</i>	Cottony colony B. fulva: tannish yellow to olive green colonies B. nivea: white to cream colonies Absence of ascocarp, asci in open clusters		Heat-resistant ascospores Spoil canned bottled fruit juice
<i>Eurotium</i>	Bright yellow cleistothecia Pale yellow, oblate (may have ridges) ascospores Gray, green conidia		Xerophilic Spoilage in grape jam and jelly
Deuteromycota			
<i>Aspergillus</i>	Black, brownish black, purple brown conidiophore Yellow to green conidia Dark sclerotia		<i>A. niger</i> : black rot on fruits and vegetables Yellow, green to black on large number of foods
<i>Penicillium</i>	<i>P. digitarum</i> : yellow green conidia <i>P. italicum</i> and <i>P. expansum</i> : blue-green conidia <i>P. camemberti</i> : grey conidia		Blue/green rots of citrus fruits Soft rots of apple, pear, peaches

ตารางที่ 8.1 เชื้อยีสต์และราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Genus	Identification Characteristics	Microscopic Morphology	Important Properties Related to Food Spoilage
<i>Geotrichum</i>	Arthroconidia formation White colonies Colorless conidia		Machinery mold Soft rot of citrus fruits, peaches Common in dairy products Some have strong odors Red bread mold Brown rot of stone fruits
<i>Monilia</i>	Pink, gray, or tan conidia		Red bread mold Brown rot of stone fruits
<i>Trichothecium</i>	Long conidiophore, simple hyphae Ellipsoidal to pyriform conidia Conidia with a single lateral septum		Pink mold grows on fruits Common in grains including barley, wheat, and maize
<i>Alternaria</i>	Large, brown conidia Club-shaped conidia		Brown to black rot in apple, figs, citrus fruits Found on red meats Field fungus: grows on barley and wheat
<i>Cladosporium</i>	Thick, velvety colony Green, olive green, dark-blue, black or brown colony Some lemon-shaped conidia Variously branched		Black spot on meat, beef Some spoil butter, margarine Field fungus: grows on barley and wheat
<i>Fusarium</i>	Cottony, pink, red, purple, brown colonies Sickle-shaped conidia Extensive mycelium Colorless conidia		Soft rot of figs Brown rot of citrus fruits, pineapples Field fungus: grows on barley and wheat Bacon, refrigerated meat spoilage, pickle softening

ที่มา: Pitt และ hocking (1997)

จากตารางที่ 8.1 สามารถแบ่งการเสื่อมเสียของอาหารโดยเชื้อราดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ Xerophilic fungi ซึ่งสามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระ (aw) ต่ำกว่า 0.85 และมักพบอยู่ในอาหารกึ่งแห้ง กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่ทนความร้อน (Heat-resistant fungi) โดยสามารถเจริญได้หลังจากอาหารนั้นผ่านการฆ่าพาสเจอร์ไรซ์และการอบ กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ต้านทานต่อสารถนอมอาหาร (Preservative-resistant fungi) ซึ่งสามารถเจริญในอาหารที่ผ่านการเติมสาร Sorbates สาร Benzoates ในเครื่องดื่มต่างๆได้ กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่สามารถเจริญในออกซิเจนต่ำได้ (Anaerobic fungi) ซึ่งสามารถพบในอาหารที่เก็บรักษาไว้ในสุญญากาศหรืออาหารที่ใช้วิธีการดัดแปลงสภาพอากาศในการเก็บรักษา กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่ทนต่อความเย็น (Psychrophilic และ Psychrotolerant fungi) ซึ่งสามารถพบในตู้เย็น อาหารและเครื่องดื่ม (Rico-Munoz และคณะ, 2018) เชื้อยีสต์และรา มักปนเปื้อนโดยตรงในอาหาร อุปกรณ์ทำอาหาร หรือในกระบวนการแปรรูปอาหาร รวมถึงสภาวะการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากมีเชื้อยีสต์และราที่หลากหลายที่สามารถทำให้อาหารนั้นๆเกิดการเน่าเสียได้ นอกจากนั้นเชื้อยีสต์และราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษ และหากมีการปะปนของสารพิษลงในอาหารแล้ว อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ แต่ถึงอย่างไรก็ตามยีสต์และราหลายๆชนิดอาจก่อให้เกิดประโยชน์ให้แก่อุตสาหกรรมอาหาร โดยสามารถนำมาทำการหมักอาหารจนทำให้เกิดกลิ่นรสของอาหารที่น่ารับประทาน และใช้ในการผลิตสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น การนำไปใช้หมักไวน์ การผลิตเบียร์ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว นมเปรี้ยว เนยแข็ง เป็นต้น (Simova และคณะ, 2002; Spinnler และ Gripon, 2004)

หากตรวจพบเชื้อยีสต์และราในอาหารในปริมาณที่มากนั้นอาจหมายถึงว่าสถานที่ผลิตอาหารชนิดนั้นๆมีสุขาภิบาลอาหารที่ไม่ดี หรือการแปรรูปนั้นใช้อุณหภูมิในการทำลายเชื้อยีสต์และราในอาหารไม่เพียงพอ รวมทั้งบอกถึงการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต การจัดเก็บวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ปปรุงสำเร็จ เนื่องจากวัตถุดิบบางอย่างเช่น แป้ง ข้าวโพด อาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อยีสต์และรารวมทั้งสารพิษ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค อาจต้องมีการตรวจหาปริมาณของสารพิษของยีสต์และราในอาหาร นอกจากนั้นแล้วเชื้อยีสต์และรายังสามารถเจริญได้ดีในอาหารกึ่งแห้งที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (Water activity, aw) ระหว่าง 0.65-0.90 และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ต่ำ การทำให้ค่าปริมาณน้ำอิสระในอาหารลดต่ำลงมักทำโดยการเติมเกลือหรือน้ำตาลลงในอาหารนั้นๆ จากคุณสมบัติของเชื้อยีสต์และราดังกล่าวข้างต้นจึงสามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระและมีความเป็นกรดต่ำหลายชนิดมาใช้ในการวิเคราะห์หาเชื้อยีสต์และราในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และ เช่น

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ใช้สำหรับการแยก การนับ และการเลี้ยงเชื้อยีสต์และราให้เจริญเติบโต ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารอยู่ระหว่าง 3.5-5.4

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาเชื้อยีสต์และราให้เจริญรวมทั้งการเลี้ยงเชื้อยีสต์และราให้เจริญ

3 อาหาร Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) เหมาะสำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์และราในกลุ่ม Osmophilic และ Xerophilic

4 อาหาร Osmophilic Agar ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับเชื้อยีสต์และราในกลุ่ม Osmophilic และ Osmotolerant

5 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Petrifilms การใช้วิธีการนี้เป็นวิธีการเฉพาะที่สามารถตรวจนับเชื้อยีสต์และราในอาหาร โดยแผ่น Petrifilms สำหรับตรวจหาเชื้อราและยีสต์นั้นมีการผสมสารปฏิชีวนะ เช่น Chlortetracycline และ Chloramphenicol เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังมี indicator คือ Bromo-Chloro-Indolylphosphate ทำให้ยีสต์มีโคโลนีสีน้ำเงินเขียว ซึ่งโคโลนีนี้มีขนาดเล็กและอาจเหมือนกับโคโลนีของแบคทีเรียที่ใช้อากาศในการเจริญเติบโต แต่โคโลนีของเชื้อราจะมีขนาดใหญ่ มีขนฟู และมีสีน้ำเงิน หรือ เชื้อราบางชนิดจะสร้างสีดำ เหลือง ฯลฯ ในแผ่น Petrifilms



ภาพที่ 8.1 การเจริญของเชื้อยีสต์และราในอาหารสำเร็จรูป 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plates
ที่มา: 3M (2017)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

1.1 น้ำผลไม้ (น้ำอ้อย, น้ำส้ม)

1.2 ปลา กุ้งแห้ง (ปลาเค็ม)

1.3 ผลไม้ กุ้งแห้ง (กล้วยตาก)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหาร Acidified Potato Dextrose Agar

เตรียมด้วยการเติมกรด 10% Tartaric acid ใส่ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้พีเอชประมาณ 3.5 (เติมกรด Tartaric ประมาณ 1.85 มล.ต่อ 1000 มล.ของอาหาร PDA)

2.2 อาหาร Antibiotic Plate Count Agar

เตรียมสารปฏิชีวนะคือ Chlortetracycline 500 มิลลิกรัม และ Chloramphenicol 500 มิลลิกรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตรของเอทานอล นำมากรองแล้วเก็บใส่ตู้เย็นหากไม่ใช้ทันที เมื่อเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะแล้วให้ดูดสารละลายนั้นมา 2 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ปริมาณ 100 มล. ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส

2.3 อาหาร Malt extract yeast Extract glucose agar (MY 40G) มีส่วนผสมดังนี้

Glucose	18.0	กรัม
---------	------	------

Malt Extract	12.0	กรัม
--------------	------	------

Yeast Extract	2.7	กรัม
---------------	-----	------

Agar	15.0	กรัม
------	------	------

น้ำกลั่น	12.0	ลิตร
----------	------	------

Chloramphenicol	0.1	กรัม
-----------------	-----	------

ให้ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น glycerol ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. ต้มให้เดือดเพื่อให้ agar ละลาย แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วเติม Glycerol ให้เข้มข้นเป็น 18% w/w แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3 สารเคมี

3.3 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1%Peptone water)

3.4 70%แอลกอฮอล์

4 อุปกรณ์

4.1 หม้อนึ่งความดัน

4.2 ตู้บ่ม

4.3 แผ่นสไลด์

4.4 กล้องจุลทรรศน์

4.5 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

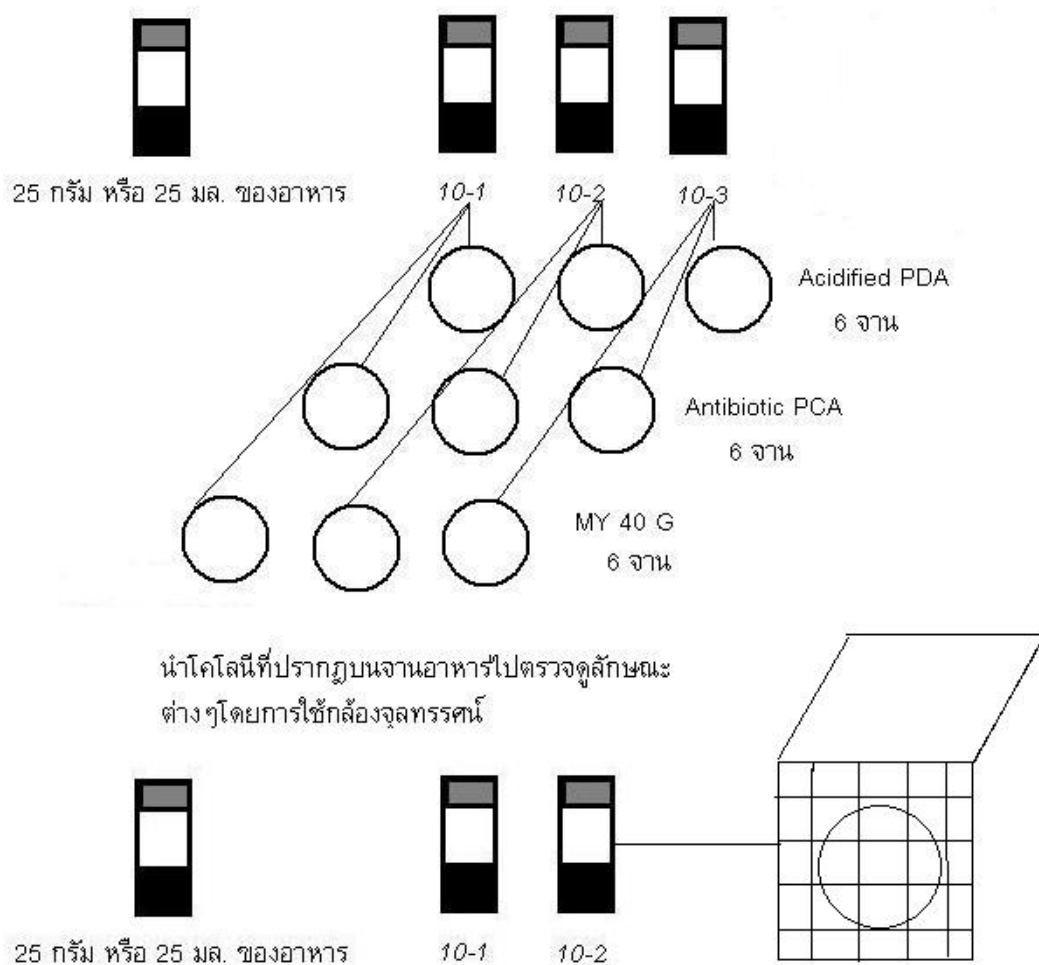
วิธีการ

1 การตรวจหาเชื้อราและยีสต์ในอาหารโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

- 1.1 นำอาหารตัวอย่างมาชั่งหรือตวงให้ได้ปริมาณ 25 มิลลิลิตร หรือ 25 กรัม แล้วนำไปเติมในน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร (10^{-1}) จากนั้นจึงใช้เครื่องตีปั่นอาหาร (Stomacher) ผสมสารละลายและอาหารให้เข้ากัน
- 1.2 นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-3}
- 1.3 ดูดสารละลายที่ 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} มาอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และราที่เตรียมไว้ 3 ชนิดคือ Acidified PDA Antibiotic PCA และ MY 40 G
- 1.4 ทำการ Spread plated แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำการบันทึกผลการทดลอง
- 1.5 นำเชื้อยีสต์และราที่เจริญบนจานอาหารไปป้ายใส่ในแผ่นสไลด์แล้วใช้กล้องจุลทรรศน์ในการส่องดูรูปร่างและลักษณะของเชื้อราที่แยกได้

2 การตรวจหาเชื้อยีสต์และราโดยใช้ Yeast and Mold Petrifilms

- 2.1 ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ 1.2 ที่ความเข้มข้น 10^{-2} มา 1 มล.แล้วนำไปใส่ในแผ่นอาหาร Yeast & Mold Petrifilms
- 2.2 ทำการไล่อากาศออกจากแผ่นและกระจายตัวอย่างลงบนแผ่น Petrifilms โดยการวางวัตถุแบนเรียบไว้บนแผ่น Petrifilms
- 2.3 รอประมาณ 1 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว
- 2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 8.2 ขั้นตอนการทำงานโดยรวมในการตรวจหาเชื้อยีสต์และราในอาหาร

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 8.2 บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่ออาหารชนิดที่ 1 ที่ทำการวิเคราะห์คือ.....

วิธีการ	จานที่	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	CFU/ml (g)
Acidified PDA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
Antibiotic PCA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
MY 40 G	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
Petrifilms	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				

แสดงวิธีการคำนวณ CFU/ml (g)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ชื่ออาหารชนิดที่ 2 ที่ทำการวิเคราะห์คือ.....

วิธีการ	จานที่	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	CFU/ml (g)
Acidified PDA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
Antibiotic PCA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
MY 40 G	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
Petrifilms	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				

แสดงวิธีการคำนวณ CFU/ml (g)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ตารางที่ 8.3 บันทึกผลการทดลอง

รูปภาพ	ลักษณะของโคโลนี
- วาดรูปของลักษณะของเชื้อยีสต์และราที่พบ	- บอกลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- 3M Inc. 2017. 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plates. Retrieved November 4, 2017 from https://www.3m.com/3M/en_US/company-us/all-3m-products/~RYESTMD-3M-Petrifilm-Rapid-Yeast-and-Mold-Count-Plates/?N=5002385+3293784879&rt=rud
- Nwakanma, C., Unachukwu, M. 2017. Chapter 6 – Molds. Editor(s): Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo, Milena Sinigaglia. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. The Microbiological Quality of Food, Woodhead Publishing, 133-148.
- Pitt, J.I. Hocking, A.D. 1997. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional, London. 512 p.
- Rico-Munoz, E., Samson, R.A., Houbaken, J. 2018. Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. Food Microbiology, (in press)
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, E., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28(1): 1-6.
- Spinnler, H.-E., Gripon, J.-C. 2004. Surface mould-ripened cheeses. Editor(s): Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, Timothy P. Guinee. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 2:157-174.
- Taniwaki, M.H., Da Silva, N., Banhe, A.A., Iamanaka, B.T. 2001. Comparison of culture media, SimPlate and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *Journal of Food Protection*, 64:1592-1596.

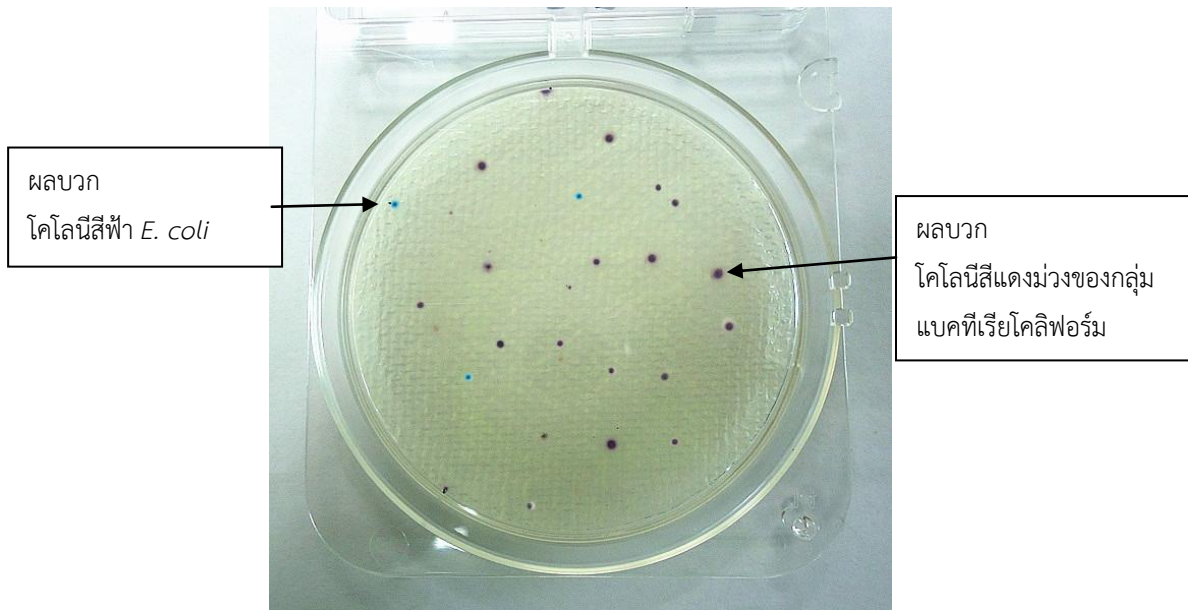
บทปฏิบัติการที่ 9

การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแบบรวดเร็วโดยใช้แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูป

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในอาหารนอกจากใช้วิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional method) แล้วยังสามารถใช้วิธีการแบบรวดเร็ว (Rapid method) ซึ่งการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์แบบรวดเร็วนี้สามารถทำได้โดยใช้แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูปซึ่งมีให้เลือกหลายหลาก การใช้แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูปนั้นนอกจากทำให้สามารถนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วแล้วบางแผ่นฟิล์มอาหารยังสามารถบอกถึงชนิดของเชื้อแบคทีเรียอีกด้วยและยังสามารถตรวจทราบผลในเวลาเร็วกว่าวิธีการแบบดั้งเดิมและบางแผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูปอาจใช้เวลาในการตรวจผลน้อยกว่า 24 ชั่วโมง

1 แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูปสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform) และแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบรวดเร็ว

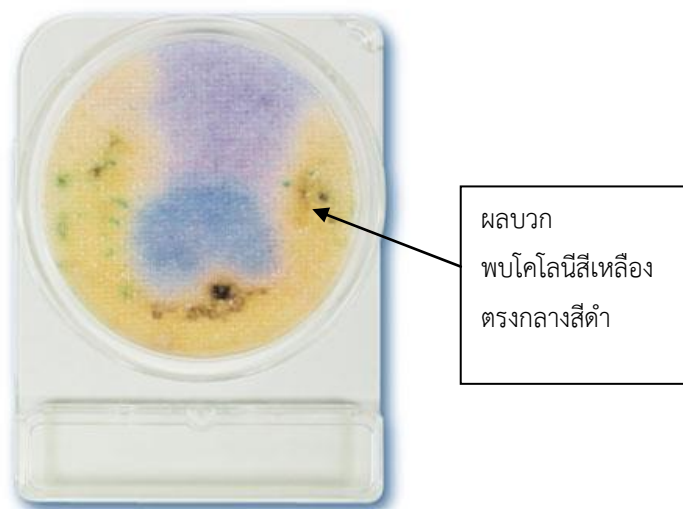
เนื่องจากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มและแบคทีเรีย *E. coli* ใช้เวลานานหลายวัน ดังนั้นการพัฒนานวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแบบรวดเร็วจึงมีขึ้น ปัจจุบันมีอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบเจลแข็งซึ่งสามารถคืนรูปได้หลังจากเติมน้ำลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อจานอาหารแห้ง หลักการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแบบรวดเร็วอาศัยการจำเพาะระหว่างปฏิกิริยาเฉพาะของเชื้อแบคทีเรียและอินดิเคเตอร์จำเพาะที่สามารถตรวจจับการเจริญเฉพาะนั้นได้ แผ่นจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry สามารถใช้ในการหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มในอาหารทะเลได้ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง (Hosokawa และ Kodaka, 2010) โดย Compact dry เติมสาร 5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Magenta-GAL) สำหรับตรวจจับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเติม 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-GLUC) สำหรับตรวจจับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ผลบวกจะพบโคโลนีสีแดงของโคลิฟอร์มและพบโคโลนีสีขาวฟ้าหรือสีฟ้าสำหรับแบคทีเรีย *E. coli* (ภาพที่ 9.1) โดยแผ่นฟิล์มจานอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปนี้ได้ถูกยอมรับโดย AOAC และวิธีการนี้ได้รับการยอมรับว่าสามารถตรวจหากกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มและเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้รวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง (APHA, 1998)



ภาพที่ 9.1 ลักษณะโคโลนีสีฟ้าของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และโคโลนีสีชมพูของเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มบนแผ่นฟิล์มจานอาหาร Compact dry ภายหลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2 แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูปสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* แบบรวดเร็ว

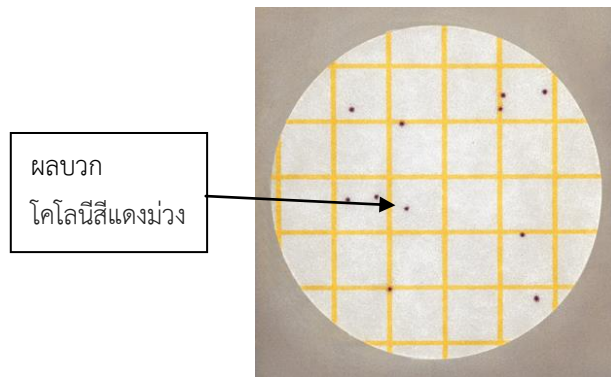
การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* แบบรวดเร็วสามารถใช้แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูป Compact dry เช่นเดียวกับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แต่แผ่นอาหารสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* มีสาร Chromogenic substrate ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย *Salmonella* ซึ่งหากเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เจริญเติบโตจะสร้างสภาวะเป็นด่างจากการสร้างเอ็นไซม์ Lysine decarboxylase ทำให้เกิดโคโลนีสีเหลือง นอกจากนั้นแล้วอาจเกิดโคโลนีสีฟ้าหรือสีเขียวดำที่จากการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแบคทีเรีย *Salmonella* บางสายพันธุ์ (ภาพที่ 9.2) การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถทำต่อจากขั้นตอนการบ่มเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Enrichment โดยนำอาหาร Enrichment ที่บ่มครบเวลาแล้วมาเติมลงในแผ่นจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry



ภาพที่ 9.2 เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* บนแผ่นฟิล์มจานอาหาร Compact dry
ที่มา: HyServe GmbH & Co. KG. (2013)

3 แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูปสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* แบบรวดเร็ว

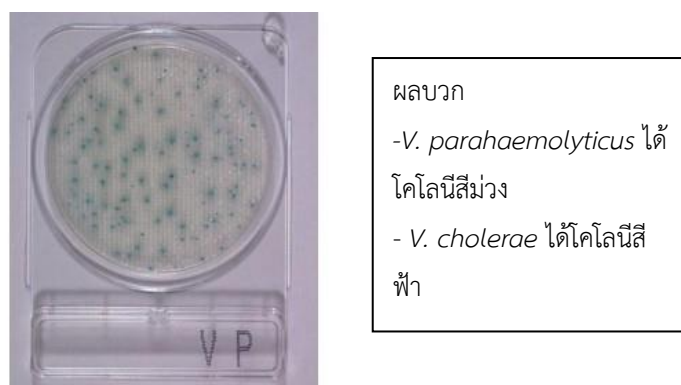
แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป 3MTM PetrifilmTM staph express count plate สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ต้องตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เพื่อเป็นการประกันคุณภาพก่อนจำหน่าย เช่น ปลาแชลมอนรมควัน แฮม เนื้อไก่ ลาซานญาแซ่แข็ง คัสตาร์ด นำนมดิบ โยเกิร์ต ชีส และไอศกรีม แผ่นอาหารสำเร็จรูปนี้มีอาหารแข็งอยู่ด้านในซึ่งจะคืนตัวเหมือนได้รับน้ำ โดยอาหารที่อยู่ในแผ่นมีสารเรืองแสงที่พัฒนามาจากอาหาร Baird parker (BP) medium ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* การทดสอบทำโดยนำอาหารที่ต้องการตรวจสอบมาเจือจางแล้วถ่ายของเหลวมาเพียง 1 มิลลิลิตรเติมลงในแผ่นอาหารสำเร็จรูปนี้ เมื่ออาหารได้รับน้ำจึงสร้างเจลขึ้นมาและเมื่อนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส จะพบผลบวกคือมีโคโลนีสีแดงม่วงซึ่งยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 9.3) จากนั้นจึงทำการนับจำนวนโคโลนีเพื่อรายงานผล



ภาพที่ 9.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในแผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป 3M™ Petrifilm™ staph express count plate
ที่มา: Horter และ Lindberg (2013)

4 แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูปสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* แบบรวดเร็ว

แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry “Nissui” VP นี้มีลักษณะเหมือนกับแผ่นจานอาหารที่สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆข้างต้นซึ่งให้ผลการทดสอบเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ภายในเวลาเพียง 18-24 ชั่วโมง (Nissui Pharmaceutical, 2013) ผลบวกพบโคโลนีสีเขียว (ภาพที่ 9.4) ซึ่งแผ่นจานอาหารนี้มีสารจำเพาะคือ Chromogenic enzyme substrate ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* นอกจากนั้นยังมีสาร Peptone เกลือโซเดียมคลอไรด์ สาร Bile salts สาร Antibiotics และมี Polysaccharide gum เพื่อจะได้เกิดเจลได้เมื่อได้รับน้ำ (Kodaka และคณะ, 2009)



ภาพที่ 9.4 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในแผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry “Nissui” VP
ที่มา: Aqua-Terra Lab Ltd (2013)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1 อาหารที่นำมาวิเคราะห์

- 1.1 น้ํานม
- 1.2 อาหารทะเล
- 1.3 ไข่ไก่
- 1.4 พริกแกง

2 แผ่นฟิล์มอาหารสำเร็จรูป

- 2.1 แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry *Escherichia coli* & Coliform
- 2.2 แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry *Salmonella*
- 2.3 แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป 3MTM PetrifilmTM staph express count plate
- 2.4 แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry “Nissui” VP

3 สารเคมี

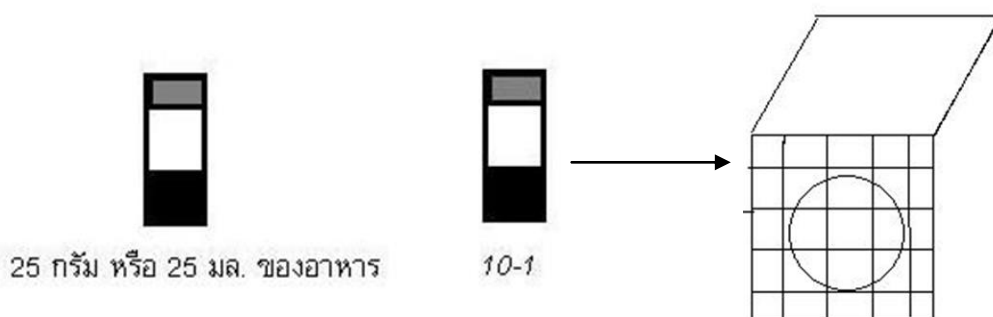
- 3.5 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1%Peptone water)
- 3.6 70%แอลกอฮอล์

4 อุปกรณ์

- 4.1 หม้อนึ่งความดัน
- 4.2 ตู้บ่ม
- 4.3 แผ่นสไลด์
- 4.4 กล้องจุลทรรศน์
- 4.5 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

วิธีการ

- 1 การตรวจหาเชื้อราและยีสต์ในอาหารโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ
 - 1.1 นำอาหารตัวอย่างมาชั่งหรือตวงให้ได้ปริมาณ 25 มิลลิลิตร หรือ 25 กรัม แล้วนำไปเติมในน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร (10^{-1}) จากนั้นจึงใช้เครื่องตีปั่นอาหาร (Stomacher) ผสมสารละลายและอาหารให้เข้ากัน
 - 1.2 ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ 1.1 ที่ความเข้มข้น 10^{-1} มา 1 มล.แล้วนำไปใส่ในแต่ละแผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry *Escherichia coli* & Coliform แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry *Salmonella* แผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป 3MTM PetrifilmTM staph express count plate และแผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูป Compact dry “Nissui” VP
 - 1.3 ทำการปิดไล่อากาศออกจากแผ่นฟิล์มจานอาหารสำเร็จรูปและหากเป็นแผ่นฟิล์ม 3MTM PetrifilmTM staph express count plate ให้ทำการกระจายตัวอย่างอาหารลงบนแผ่น Petrifilms โดยการการวางวัตถุแบบเรียบไว้บนแผ่น Petrifilms
 - 1.4 รอประมาณ 1 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว
 - 1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 9.5 แผนผังการทำงานโดยรวม

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 9.1 บันทึกผลการทดลอง

วิธีการ	จานที่	นับได้ (โคโลนี)	CFU/ml (g)
Compact dry <i>Escherichia coli</i> & Coliform	1		
	2		
	ผลรวม		
	ค่าเฉลี่ย		
Compact dry <i>Salmonella</i>	1		
	2		
	ผลรวม		
	ค่าเฉลี่ย		
3M TM Petrifilm TM staph express count plate	1		
	2		
	ผลรวม		
	ค่าเฉลี่ย		
Compact dry “Nissui” VP	1		
	2		
	ผลรวม		
	ค่าเฉลี่ย		

แสดงวิธีการคำนวณ CFU/ml (g)

.....

.....

.....

ตารางที่ 9.2 บันทึกผลการทดลอง

รูปภาพ	ลักษณะของโคโลนี
- วาดรูปของลักษณะของโคโลนีที่ได้	- บอกลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนแผ่นฟิล์มอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

เอกสารอ้างอิง

- APHA, American Public Health Association. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, (20th ed.), American Public Health Association, Washington, D.C.
- Aqua-Terra Lab Ltd. 2013. Compact dry “Nissui” VP. Retrieved December 1, 2013 from <http://www.aquaterra.hu/comapct-dry-gyorsteszt/657-compact-dry-vp.html>.
- Horter, B., Lindberg, K. 2003. 3MTM PetrifilmTM staph express count plate for the rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods-collaborative study. Retrieved December 4, 2013 from http://www.3m.com/intl/kr/microbiology/regu_info/4.pdf
- Kodaka, H., Teramura, H., Mizuochi, S., Saito, M., Matsuoka, H. 2009. Evaluation of the compact dry VP method for screening raw seafood for total *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 72(1): 169-173.
- Hosokawa, S., Kodaka, H. 2010. Efficacy of compact dry EC for Coliform detection in seafood. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 27(2): 80-85.
- HyServe GmbH & Co. KG. 2013. Compact dry SL. Retrieved December 6, 2013 from <http://www.hyserve.com>.

บทปฏิบัติการที่ 10

การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมสำหรับสุขาภิบาลอาหารและการล้างมือ

การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนกับผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการผลิตได้ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ปนเปื้อนเข้าไปในอาหารแล้วอาจก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นจนทำให้ก่อโรคในมนุษย์ได้ (Simões และคณะ, 2010) เชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในการผลิตอาหารเช่นพบในมิด เชียง พื้นผิวของอุปกรณ์ตัดแต่ง โต๊ะ ไม่ว่าจะเป็นพื้นผิวสแตนเลส แก้วและพลาสติกทั้งหลาย (Chia และคณะ, 2009; Duffy และคณะ, 2009) ดังนั้นการสุ่มตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมรอบๆสายการผลิตจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น เช่น ตรวจพื้น อุปกรณ์ครัว ประตู ตู้เย็นและชั้นเก็บวัตถุดิบ ผลที่ได้จากการตรวจอาจช่วยทำให้เกิดความมั่นใจต่อผลิตภัณฑ์อาหารและรวมไปถึงการวางแผนในการล้างทำความสะอาดระหว่างวันเพื่อลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเพราะทราบถึงจุดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการผลิตเพื่อวางแผนในการผลิตและกำจัดเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนนั่นๆต่อไป รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อการทำ Hazard analysis และ Critical control points (HACCP) อีกด้วย (Amoa-Awua และคณะ, 2007) การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมมักทำได้โดยการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน หรือหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้ก่อโรค เช่น *Salmonella* spp., (Chia และคณะ, 2009) *Escherichia coli* Duffy และคณะ, 2009) ซึ่งเชื้อเหล่านี้อาจปนเปื้อนมาจากฟาร์มการผลิตหรือวัตถุดิบในระหว่างการผลิตขนส่ง จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมควรมีไม่เกิน 10^2 CFU/พื้นที่

วิธีการสุ่มตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

1 Surface sampling เป็นการสุ่มตรวจเชื้อโดยการสุ่มตรวจที่บริเวณพื้นผิว (Wester, 2018) ไม่ว่าจะเป็นแท็งก์น้ำ, พื้นโต๊ะ, ห้องเก็บของ เป็นต้น ถึงแม้ว่าพื้นผิวเหล่านี้อาจไม่สัมผัสกับอาหารโดยตรงแต่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ วิธีการนี้มี 2 วิธีคือ

1.1 Swab method เป็นการใช้น้ำยาป้ายไม้แล้วนำไป swab บนพื้นผิวที่ต้องการ

1.2 Sponge method เป็นการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยฟองน้ำที่ใช้มีขนาดประมาณ 5 x5 เซนติเมตรโดยฟองน้ำจะทำให้เปียกโดย 10 มล.ของ rinse solution การตรวจผลต้องตรวจทันทีหลังจากสุ่มตัวอย่าง

1.3 Replicate organism direct agar contact (RODAC) method เป็นการนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการสุ่มตัวอย่างโดยการคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

ยังพื้นผิวที่ต้องการ แล้วนำจานอาหารไปบ่ม วิธีการนี้เหมาะสำหรับการทดสอบพื้นผิวที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วระดับหนึ่งแต่ต้องการตรวจสอบให้แน่ใจว่าพื้นผิวตรงบริเวณนั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

2 Air sampling เชื้อจุลินทรีย์ในอากาศอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารที่ทำการผลิตได้ การปลิวของวัตถุติดและการสเปรย์อาหาร อาจส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศในระหว่างกระบวนการผลิตได้ วิธีการตรวจสอบคุณภาพของอากาศอย่างง่ายคือการเปิดฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ในบริเวณที่ต้องการตรวจสอบสภาพอากาศแล้วจึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มแล้วนำมานับปริมาณโคโลนีที่เกิดขึ้น หรืออาจใช้วิธีการเก็บตัวอย่างอากาศผ่านเครื่องกรองอากาศที่มีแผ่นเมมเบรนแล้วจึงนำเอาเมมเบรนที่กรองอากาศได้มาทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ (Liu และคณะ, 2018)

การล้างมือ

การล้างมือเป็นปัจจัยสำคัญในการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในสายการผลิต ดังนั้นการล้างมือโดยการใช้สบู่ฆ่าเชื้อจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การล้างมือที่ถูกวิธีแสดงดังภาพที่ 10.1 ปกติแล้วผิวหนังของเรามีเชื้อ Aerobic bacterial ประมาณ 10^6 CFU/cm² โดยเชื้อจุลินทรีย์ในมือแบ่งเป็น 2 พวกด้วยกันคือ

1 พวก Transient flora เป็นพวกที่ชอบอาศัยอยู่บนผิวของมนุษย์ สามารถล้างออกได้ง่ายโดยการล้างมือ โดยเชื้อกลุ่มนี้สามารถปนเปื้อนได้จากการสัมผัสโดยเฉพาะพื้นผิวที่ไม่สะอาด จากนั้นอาจมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆหากไม่มีการล้างมือให้สะอาด

2 พวก Resident flora เป็นกลุ่มที่อาศัยอยู่ลึกตามชั้นของผิวหนัง ทำให้ยากในการล้างออกด้วยสบู่ธรรมดา เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เช่น *Staphylococcus aureus* และพวก gram-negative bacilli, Yeast

น้ำยาทำความสะอาดที่ใช้สำหรับการล้างมือ

1 สบู่ (soap) สามารถล้างพวก Transient flora ออกจากมือได้ แต่ไม่สามารถล้างพวกแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ สบู่ที่ไม่มีส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้ออาจเป็นแหล่งในการขยายการปนเปื้อนของเชื้อ Gram-negative bacilli ได้

2 แอลกอฮอล์ (alcohol) น้ำยาล้างมือที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ระหว่าง 60 ถึง 95 % จะมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ในช่วงนี้จะไม่ทำลายโปรตีนของมือ

3 คลอโรเอ็กซ์ซิดีน (Chlorhexidine) เป็นสารที่ละลายในน้ำ สามารถกำจัดพวก Gram-positive bacteria ได้ดีและยังเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้อีกด้วย

4 กลุ่มไอโอดีน (Iodine and Iodophors) สารกลุ่มนี้จะไปทำลายผนังเซลล์ของ เชื้อจุลินทรีย์ สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียพวก Gram-positive, Gram-negative, Spore-forming bacteria รวมทั้งไวรัสได้ดี นอกจากนั้นแล้วยังมีน้ำยาล้างมือที่มาจากส่วนผสมอื่นๆอีก เช่น Triclosan, Quaternary Ammonium Compounds ที่สามารถนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนมือ



ภาพที่ 10.1 วิธีล้างมือที่ดี 7 ขั้นตอน

ที่มา สำนักสื่อสารและตอบโต้ความเสี่ยง กรมอนามัย (2547)

อุปกรณ์และวิธีการ
ตอนที่ 1 การตรวจเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิว

1 ตัวอย่าง

1.1 พื้นที่ต้องการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์

2 เชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อ *Pseudomonas* sp. (สำหรับเปรียบเทียบผลบวก)

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* isolation agar (PIA)

4 สารเคมี

4.1 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1 % peptone water)

4.2 70 %แอลกอฮอล์

5 อุปกรณ์

5.1 หม้อนึ่ง

5.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

5.3 ตูบ่ม

5.4 แผ่นสไลด์

5.5 กล้องจุลทรรศน์

5.6 ไม้พินสำลี ใน 0.85 % น้ำเกลือปริมาณหลอดละ 5 มล.

วิธีการทดลอง

1.1 กำหนดพื้นที่ที่จะทำการ Swab เช่น ลูกบิดประตู พื้นโต๊ะ อุปกรณ์ ตู้เย็น ฝ่ามือ

1.2 นำไม้พินสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาลนไฟเพื่อเปิดปากหลอด

1.3 นำไม้พินสำลีมา Swab บนพื้นผิวที่เลือกไว้โดยพื้นที่ทำการ swab ประมาณความกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร หากเป็นอุปกรณ์ให้ทำการ Swab อุปกรณ์ 1 ใน 5 ส่วนของอุปกรณ์นั้นๆ

- 1.4 เอาไม้พันสำลีไปจุ่มในหลอดน้ำเกลือแล้วทำการเขย่าหลอดเล็กน้อยจากนั้นจึงทำการ Swab ซ้ำ ตรงพื้นที่ใกล้เคียง (ห้าม Swab ที่เดิม) เมื่อเสร็จแล้วให้หักไม้ก้านที่ถูกมือจับ แล้วนำเอาสำลีเข้าไปในหลอดโดยทำการฉีกไฟแล้วปิดหลอด(หากไม่สามารถวิเคราะห์ทันทีให้เก็บเข้าตู้เย็นไว้)
- 1.5 ทำการปั่นตัวอย่างโดยการหมุนหลอดไปมาด้วยมือแล้วทำการเจือจางตัวอย่างจนได้ 10^{-5} โดยใช้ 0.1 % peptone water
- 1.6 ตูตตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรจากทุกๆความเข้มข้นแล้วไปใส่ในจานอาหาร Plate count agar (PCA) และ Potato dextrose agar (PDA) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas isolation agar (PIA) ทำการ spread ให้ทั่ว
- 1.7 ทำการ ชีตเชื้อ *Pseudomonas* sp. เพื่อทำตัวอย่างควบคุม (Control)
- 1.8 บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงสำหรับอาหาร PIA สำหรับอาหาร PDA ให้บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ผลบวกของ *Pseudomonas* sp. จะมีการเรืองแสงบนจานอาหาร PIA)

ตอนที่ 2 การตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

1 ตัวอย่าง

- 1.1 อากาศบริเวณที่ต้องการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์

2 เชื้อจุลินทรีย์

- 2.1 เชื้อ *Pseudomonas* sp. (สำหรับเปรียบเทียบผลบวก)

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)
- 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)
- 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas isolation agar (PIA)

4 สารเคมี

- 4.1 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1 % peptone water)
- 4.2 70 %แอลกอฮอล์

5 อุปกรณ์

- 5.1 หม้อนึ่ง
- 5.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป

- 5.3 ตู้บ่ม
- 5.4 แผ่นสไลด์
- 5.5 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

- 1.1 กำหนดพื้นที่ที่จะทำการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ
- 1.2 เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA, PDA และ PIA ทิ้งไว้ 10 นาที
- 1.3 ทำการขีดเชื้อ *Pseudomonas* sp. เพื่อทำตัวอย่างควบคุม (Control) (PIA)
- 1.4 บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงสำหรับอาหาร PIA สำหรับอาหาร PDA ให้บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ผลบวกของ *Pseudomonas* sp. จะมีการเรืองแสงบนจานอาหาร PIA)

ตอนที่ 3 การตรวจเชื้อจุลินทรีย์บนมือ

- 1 ตัวอย่าง
 - 1.1 พื้นที่ผิวบริเวณมือ
- 2 เชื้อจุลินทรีย์
 - 2.1 เชื้อ *Pseudomonas* sp. (สำหรับเปรียบเทียบผลบวก)
- 3 อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)
 - 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)
 - 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* isolation agar (PIA)
- 4 สารเคมี
 - 4.1 น้ำยาสำหรับเจือจาง (0.1 % peptone water)
 - 4.2 70 %แอลกอฮอล์
- 5 อุปกรณ์
 - 5.1 หม้อน้ำ
 - 5.2 ไมโครปิเปตต์พร้อมทิป
 - 5.3 ตู้บ่ม

5.4 แผ่นสไลด์

5.5 กล้องจุลทรรศน์

5.6 ไม้พินสำลี ใน 0.85 % น้ำเกลือปริมาณหลอดละ 5 มล.

วิธีการทดลอง

1.1 นำไม้พินสำลี Swab บนมือโดย swab ให้ทั่วทั้งด้านหน้ามือและหลังมือ

1.2 เอาไม้พินสำลีไปจุ่มในหลอดน้ำเกลือแล้ว ทำการเขย่าหลอดเล็กน้อยจากนั้นจึงทำการ Swab ซ้ำ

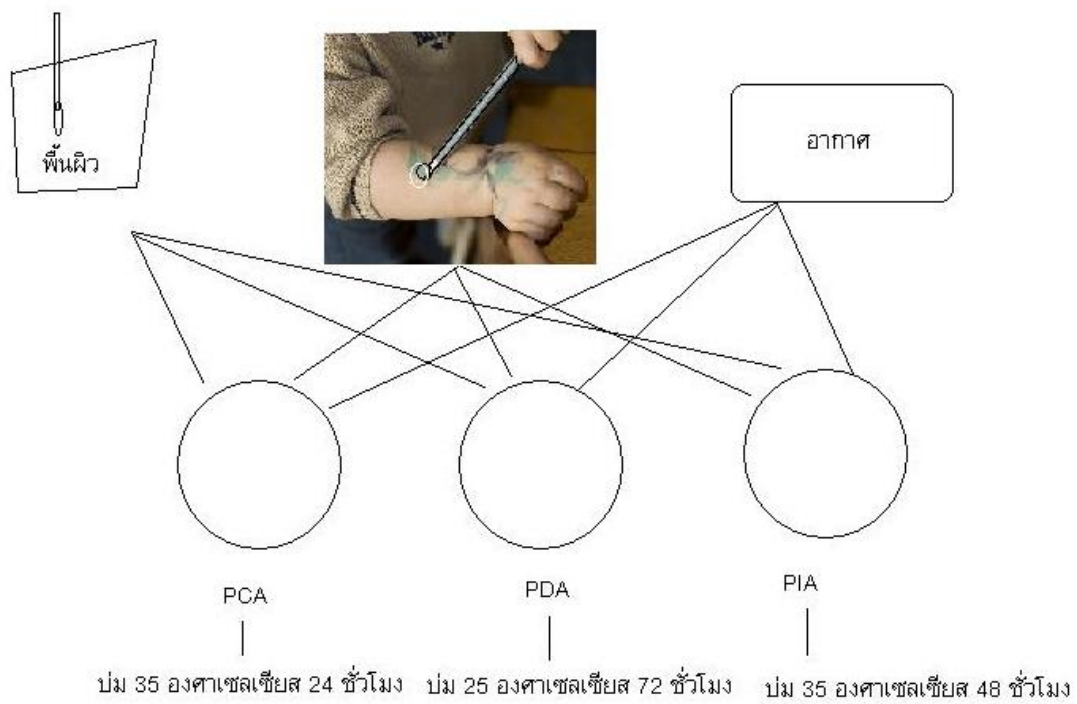
1.3 ทำการล้างมือตามในภาพที่ 10.1 จากนั้นจึงนำไม้พินสำลีมา swab มือตามวิธีการเดิมใน ข้อ 1.1 (ตอนที่ 3)

1.4 ทำการปั่นตัวอย่างโดยการหมุนหลอดไปมาด้วยมือแล้วทำการเจือจางตัวอย่างจนได้ 10^{-5} โดยใช้ น้ำยาเจือจาง

1.5 ดูดตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรจากทุกๆความเข้มข้นแล้วไปใส่ในจานอาหาร Plate count agar (PCA) และ Potato dextrose agar (PDA) และอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* isolation agar (PIA)

1.6 ทำการขีดเชื้อ *Pseudomonas* sp. เพื่อทำตัวอย่างควบคุม (Control)

1.7 บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงสำหรับอาหาร PIA สำหรับอาหาร PDA ให้บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ผลบวกของ *Pseudomonas* sp. จะมีการเรืองแสงบนจานอาหาร PIA)



ภาพที่ 10.2 แผนผังโดยรวมในการทำงาน

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล.....รหัสประจำตัว.....กลุ่มที่.....

ตารางที่ 10.1 บันทึกผลการทดลองตอนที่ 1

วิธีการ	จานที่	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	CFU/ml (g)
PCA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
PDA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
	ลักษณะที่สังเกตได้			วาดภาพประกอบ	
PIA					

ตารางที่ 10.2 บันทึกผลการทดลองตอนที่ 2

วิธีการ	จานที่	1	2	3	CFU/10นาที่
PCA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
PDA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
	ลักษณะที่สังเกตได้			วาดภาพประกอบ	
PIA					

ตารางที่ 10.3 บันทึกผลการทดลองตอนที่ 3

วิธีการ	จานที่	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	CFU/ml (g)
PCA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
PDA	1				
	2				
	ผลรวม				
	ค่าเฉลี่ย				
	ลักษณะที่สังเกตได้			วาทภาพประกอบ	
PIA					

เอกสารอ้างอิง

- สำนักสื่อสารและตอบโต้ความเสี่ยง กรมอนามัย (2547) สำนักสารนิเทศ กรมอนามัย สำนักงาน
 ปลัดกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ.2553 ค้นหาเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม 2560
http://pr.moph.go.th/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=68410
- Amoa-Awua, W.K., Ngunjiri, P., Anlobe, J., Kpodo, K., Halm, M., Hayford, A.E., Jakobsen, M. 2007. The effect of applying GMP and HACCP to traditional food processing at a semi-commercial kenkey production plant in Ghana. *Food Control*, 18(11): 1449-1457.
- Chia, T.W.R., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A., Fegan, N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8):853-859.
- Duffy, L.L., O'Callaghan, D., McAuley, C.M., Fegan, N., Craven, H.M. 2009. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Australian dairy powder factory environments. *International Dairy Journal*, 19 (3): 178-179.

- Liu, H., Zhang, X., Zhang, H., Yao, X., Zhou, M., Wang, J., He, Z., Zhang, H., Lou, L., Mao, W., Zheng, P., Hu, B. 2018. Effect of air pollution on the total bacteria and pathogenic bacteria in different sizes of particulate matter. *Environmental Pollution*, 233:483-493.
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4): 573-583.
- Wester, P.A. 2018. Chapter 5 - Sanitation Preventive Controls and Sanitation Basics. Editor(s): Patricia A. Wester, Hazard Analysis and Risk Based Preventative Controls, Academic Press, 85-106.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline Peptone Water (APW)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptic digest of animal tissue	ปริมาณ	20.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	30.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ BBL CHROMagar *Salmonella*

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Chromopeptone	ปริมาณ	22.0 กรัม
Chromogenic mix	ปริมาณ	0.34 กรัม
Inhibitory agents	ปริมาณ	0.02 กรัม
Agar	ปริมาณ	15.0 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Agar (BP Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone from casein	ปริมาณ	10.0	กรัม
Meat extract	ปริมาณ	5.0	กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	1.0	กรัม
Sodium pyruvate	ปริมาณ	10.0	กรัม
Glycine	ปริมาณ	12.0	กรัม
Lithium chloride	ปริมาณ	5.0	กรัม
Agar	ปริมาณ	15.0	กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 58 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วผสมไข่แดงลงไป 50 มิลลิลิตร และหากจำเป็นจะต้องการเติมยา Sulfamethazine ให้ใช้ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar Base (BA Base)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of casein	ปริมาณ	15.0 กรัม
Enzymatic digest of animal tissue	ปริมาณ	4.0 กรัม

Yeast extract	ปริมาณ	2.0 กรัม
Corn starch	ปริมาณ	1.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Agar	ปริมาณ	14.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 42 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที การเตรียม 5-10 % Blood agar โดยการเติม Defibrinated blood ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain-Heart Infusion Broth (BHI Broth)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Brain heart infusion	ปริมาณ	17.5 กรัม
Enzymatic digest of gelatin	ปริมาณ	10.0 กรัม
Dextrose	ปริมาณ	2.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Disodium phosphate	ปริมาณ	2.5 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนพร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอเพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Bile Broth 2% (BGBB)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	ปริมาณ	10.0 กรัม
Oxgall	ปริมาณ	20.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ	10.0 กรัม
Brilliant Green	ปริมาณ	13.3 มิลลิกรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปต้มให้อาหารละลายแล้วจึงนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB Broth)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of casein	ปริมาณ	17.0 กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	ปริมาณ	3.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	6.0 กรัม

Dextrose	ปริมาณ	2.5 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Monopotassium phosphate	ปริมาณ	1.35 กรัม
Dipotassium phosphate	ปริมาณ	2.5 กรัม
Disodium phosphate	ปริมาณ	9.6 กรัม
Acriflavine HCl	ปริมาณ	4.5 มิลลิกรัม
Nalidixic acid	ปริมาณ	18 มิลลิกรัม
Cycloheximide	ปริมาณ	22.5 มิลลิกรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 47 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำมาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลาย 10% Sodium pyruvate ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 11.1 มิลลิลิตร หลังจากการบ่มเชื้อแบคทีเรียแล้ว 4 ชั่วโมงในอาหาร BLEB Broth ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียสแล้ว จึงเติม Buffered *Listeria* Enrichment Supplement ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตรต่ออาหาร BLEB Broth ปริมาณ 225 มิลลิลิตร หรืออาจเติมสารละลาย 0.5% Acriflavine ปริมาณ 0.455 มิลลิลิตร รวมถึงสาร 0.5% Nalidixic acid ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตรและสาร 1% Cycloheximide ที่ละลายใน 40% Ethanol ในปริมาณ 1.15 มิลลิลิตร ลงในอาหาร ELEB Broth ปริมาณ 225 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked Meat Medium

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef heart	ปริมาณ	98.0 กรัม
Proteose peptone	ปริมาณ	20.0 กรัม
Dextrose	ปริมาณ	2.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 12.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมจนอาหารละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ EC Broth

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Casein digest (pancreatic)	ปริมาณ	20.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	ปริมาณ	4.0 กรัม
Potassium phosphate	ปริมาณ	1.5 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Bile salts	ปริมาณ	1.5 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 37 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมสารละลายลงในหลอดทดลองปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง พร้อมใส่หลอดดักก๊าซคว่ำลง ปิดฝาหลอดทดลอง แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	ปริมาณ	10.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ	10.0 กรัม
Dipotassium monohydrogen phosphate	ปริมาณ	2.0 กรัม
Methylene blue	ปริมาณ	0.065 กรัม
Eosine Y	ปริมาณ	0.4 กรัม
Agar	ปริมาณ	15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 37.5 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้อุ่นจนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเขย่าเพื่อให้เกิดการออกซิไดซ์ของ Methylene blue และเพื่อให้ตกตะกอน

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 Agar (*E. coli* O157:H7 Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone from casein	ปริมาณ	20.0 กรัม
Meat extract	ปริมาณ	2.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	1.0 กรัม
Sorbitol	ปริมาณ	10.0 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	ปริมาณ	0.5 กรัม
4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide	ปริมาณ	0.1 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Bromothymol blue	ปริมาณ	0.025 กรัม
Sodium thiosulfate	ปริมาณ	2.0 กรัม
Sodiumdeoxycholate	ปริมาณ	1.12 กรัม
Agar	ปริมาณ	13.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser Broth

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Meat extract	ปริมาณ	5.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	5.0 กรัม
Casein enzymic hydrolysate	ปริมาณ	5.0 กรัม
Peptic digest of animal tissue	ปริมาณ	5.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	20.0 กรัม
Disodium phosphate	ปริมาณ	12.0 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	ปริมาณ	1.35 กรัม
Esculin	ปริมาณ	1.0 กรัม
Lithium chloride	ปริมาณ	3.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 57.35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้อุณหภูมิเย็นลงที่ 45-50 องศาเซลเซียส และเติมสาร Nalidixic acid ปริมาณ 10.0 มิลลิกรัม และสาร Acriflavine hydrochloride ปริมาณ 12.5 มิลลิกรัม รวมถึงสาร Ferric ammonium citrate ปริมาณ 250 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Lactose Medium

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Gelatin	ปริมาณ	120.0	กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	10.0	กรัม
Tryptose	ปริมาณ	15.0	กรัม
Phenol red	ปริมาณ	0.05	กรัม
Lactose	ปริมาณ	10.0	กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 155 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมและนำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ควรมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส อาหารจะมีลักษณะสีแดงเข้ม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen Enteric Agar (HE Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of animal tissue	ปริมาณ	16.5 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	3.0 กรัม
Bile salts mixture	ปริมาณ	4.5 กรัม
Lactose	ปริมาณ	12.0 กรัม
Sucrose	ปริมาณ	12.0 กรัม

Salicin	ปริมาณ 2.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium thiosulfate	ปริมาณ 5.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	ปริมาณ 1.5 กรัม
Bromthymol blue	ปริมาณ 0.065 กรัม
Acid fuchsin	ปริมาณ 0.1 กรัม
Agar	ปริมาณ 13.5 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเดือดเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับการกวนอย่างสม่ำเสมอ โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Sulfate Broth (LST)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptose	ปริมาณ 20.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ 5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	ปริมาณ 2.75 กรัม
Monopotassium phosphate	ปริมาณ 2.75 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium lauryl sulfate	ปริมาณ 0.1 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 35.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปอุ่นเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Listeria* Enrichment Medium (UVM Medium)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Casein enzymic hydrolysate	ปริมาณ 5.0 กรัม
Proteose peptone	ปริมาณ 5.0 กรัม
Beef extract	ปริมาณ 5.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 20.0 กรัม
Monopotassium dihydrogen phosphate	ปริมาณ 1.35 กรัม
Disodium hydrogen phosphate	ปริมาณ 12.0 กรัม
Esculin	ปริมาณ 1.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 27.17 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้อุณหภูมิเย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส และเติมสาร Acriflavin hydrochloride ปริมาณ 6-12.5 มิลลิกรัม และสาร Nalidixic acid ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine Indole Motility Medium (LIM Medium)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	ปริมาณ	10.0 กรัม
Tryptone	ปริมาณ	10.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	3.0 กรัม
L-Lysine hydrochloride	ปริมาณ	10.0 กรัม
Glucose	ปริมาณ	1.0 กรัม
Ammonium iron (III) citrate	ปริมาณ	0.5 กรัม
Bromocresol purple	ปริมาณ	0.02 กรัม
Agar	ปริมาณ	2.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 36.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine Iron Agar (LIA Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Gelatin peptone	ปริมาณ	5.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	3.0 กรัม
Dextrose	ปริมาณ	1.0 กรัม
Lysine	ปริมาณ	10.0 กรัม
Ammonium ferric citrate	ปริมาณ	0.5 กรัม
Sodium thiosulfate	ปริมาณ	0.04 กรัม
Bromocresol purple	ปริมาณ	0.02 กรัม
Agar	ปริมาณ	15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 34.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเดือดโดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar (MSA agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of casein ปริมาณ 5.0 กรัม

Enzymatic digest of animal tissue ปริมาณ 5.0 กรัม

Beef extract ปริมาณ 1.0 กรัม

D-Mannitol ปริมาณ 10.0 กรัม

Sodium chloride ปริมาณ 75.0 กรัม

Phenol red ปริมาณ 0.025 กรัม

Agar ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 111 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Methyl Red Voges Proskauer Broth

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Buffered peptone ปริมาณ 7.0 กรัม

Dextrose ปริมาณ 5.0 กรัม

Dipotassium phosphate ปริมาณ 5.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 17 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility-Indole-Lysine Medium (MIL Medium)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptic digest of animal tissue ปริมาณ 10.0 กรัม

Casein enzymic hydrolysate ปริมาณ 10.0 กรัม

Yeast extract ปริมาณ 3.0 กรัม

L-Lysine hydrochloride ปริมาณ 10.0 กรัม

Dextrose ปริมาณ 1.0 กรัม

Ferric ammonium citrate ปริมาณ 0.5 กรัม

Bromocresol purple ปริมาณ 0.02 กรัม

Agar ปริมาณ 2.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 36.52 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นเทอาหารเหลวลงในหลอดทดลองปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility Nitrate Medium

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Meat extract	ปริมาณ 3.0 กรัม
Peptone	ปริมาณ 5.0 กรัม
Potassium nitrate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Bi-Sodium phosphate	ปริมาณ 2.5 กรัม
Galactose	ปริมาณ 5.0 กรัม
Agar	ปริมาณ 5.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 21.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผสมกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility Test Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of gelatin	ปริมาณ 10.0 กรัม
Beef extract	ปริมาณ 3.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Agar	ปริมาณ 4.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptic digest of animal tissue	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Beef extract	ปริมาณ 1.5 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ 1.5 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 13 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Oxford *Listeria* Agar (MOX Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Columbia blood agar base ปริมาณ 39.0 กรัม

Esculin ปริมาณ 1.0 กรัม

Ferric ammonium citrate ปริมาณ 0.5 กรัม

Lithium chloride ปริมาณ 15.0 กรัม

Agar ปริมาณ 2.0 กรัม

Oxford *Listeria* supplement

Acriflavin ปริมาณ 5.0 มิลลิกรัม

Cefotetan ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม

Colistin sulfate ปริมาณ 20.0 มิลลิกรัม

Cycloheximide ปริมาณ 400.0 มิลลิกรัม

Phosphomycin ปริมาณ 10.0 มิลลิกรัม

หรือ

Modified Oxford *Listeria* supplement

Colistin Sulfate ปริมาณ 10.0 มิลลิกรัม

Moxalactam ปริมาณ 20.0 มิลลิกรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหารเลี้ยงเชื้อ 57.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทำให้อุณหภูมิเย็นลงที่ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติม Oxford *Listeria* supplement หรือ Modified Oxford *Listeria* supplement

อาหารเลี้ยงเชื้อ Ornithine Decarboxylase Broth

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

L-Ornithine monohydrochloride ปริมาณ 5.0 กรัม

Yeast extract ปริมาณ 3.0 กรัม

Glucose ปริมาณ 1.0 กรัม

Bromo cresol purple ปริมาณ 0.015 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 9.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อให้เย็นแล้วเติม Mineral oil 2-3 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	ปริมาณ	23.0 กรัม
Starch	ปริมาณ	1.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	3.0 กรัม
Mannitol	ปริมาณ	10.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	ปริมาณ	0.5 กรัม
Esculin	ปริมาณ	0.8 กรัม
Dextrose	ปริมาณ	0.5 กรัม
Lithium chloride	ปริมาณ	15.0 กรัม
Phenol red	ปริมาณ	0.08 กรัม
Agar	ปริมาณ	13.0 กรัม
PALCAM Supplement	ในน้ำ 5 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตร	
Polymixin B	ปริมาณ	5.0 มิลลิกรัม
Acriflavin	ปริมาณ	2.5 มิลลิกรัม
Ceftazidime	ปริมาณ	10.0 มิลลิกรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อุณหภูมิเย็นลงที่ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติม PALCAM Supplement

อาหารเลี้ยงเชื้อ RAPID'E. coli O157:H7 Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enrichment mixture	ปริมาณ	58 กรัม
Selective agents	ปริมาณ	6.25 กรัม
Chromogenic mixture	ปริมาณ	0.75 กรัม
Agar	ปริมาณ	15 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella Shigella Agar (SS Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef extract	ปริมาณ	5.0 กรัม
Peptic digest of animal tissue	ปริมาณ	5.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ	10.0 กรัม
Bile salts mixture	ปริมาณ	8.5 กรัม
Sodium citrate	ปริมาณ	10.0 กรัม
Sodium thiosulphate	ปริมาณ	8.5 กรัม

Ferric citrate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Brilliant green	ปริมาณ 0.00033 กรัม
Neutral red	ปริมาณ 0.025 กรัม
Agar	ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 63.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มและกวนอาหารอย่างสม่ำเสมอจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อหรือการให้ความร้อนที่สูงเกินไป ซึ่งการให้ความร้อนที่สูงเกินไปอาจไปทำลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นสารคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการได้ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมจนเข้ากันและเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth (SC Broth)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of casein	ปริมาณ 2.5 กรัม
Enzymatic digest of animal tissue	ปริมาณ 2.5 กรัม
Lactose	ปริมาณ 4.0 กรัม
Sodium phosphate	ปริมาณ 10.0 กรัม
Sodium selenite	ปริมาณ 4.0 กรัม
L-Cystine	ปริมาณ 0.01 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มเดือดแล้วใช้ได้โดยไม่ต้องนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Shahidi-Ferguson Perfringens (SFP Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptose	ปริมาณ 15.0 กรัม
Papaic digest of soyabean meal	ปริมาณ 5.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium bisulphate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Agar	ปริมาณ 20.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 475 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมไข่แดง 25 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ SIM Medium

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef extract	ปริมาณ 3.0 กรัม
Peptic digest of animal tissue	ปริมาณ 30.0 กรัม
Peptonized iron	ปริมาณ 0.2 กรัม
Sodium thiosulphate	ปริมาณ 0.025 กรัม
Agar	ปริมาณ 3.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 36.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเข้ากันแล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ammonium dihydrogen Phosphate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Dipotassium phosphate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium citrate	ปริมาณ 2.0 กรัม
Magnesium sulfate	ปริมาณ 0.2 กรัม
Bromothymol blue	ปริมาณ 0.08 กรัม
Agar	ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 24.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปต้มเป็นเวลา 1 นาที ให้อาหารละลายแล้วจึงนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol-MacConkey Agar (SMAC Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	ปริมาณ 20.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Bile salts	ปริมาณ 1.5 กรัม
Sorbitol	ปริมาณ 10.0 กรัม
Crystal violet	ปริมาณ 0.001 กรัม
Neutral red	ปริมาณ 0.03 กรัม
Agar-agar	ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 51.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptone	ปริมาณ	15.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ	10.0 กรัม
Ferric citrate	ปริมาณ	0.5 กรัม
Sodium sulfite	ปริมาณ	0.5 กรัม
Sodium thioglycollate	ปริมาณ	0.1 กรัม
Polysorbate 80	ปริมาณ	0.05 กรัม
Sulfadiazine	ปริมาณ	0.12 กรัม
Polymyxin B sulfate	ปริมาณ	0.01 กรัม
Agar	ปริมาณ	15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 41 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการผสมและนำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate Broth (TT Broth)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Mixed peptone	ปริมาณ	5.0 กรัม
Bile salts	ปริมาณ	1.0 กรัม
Calcium carbonate	ปริมาณ	10.0 กรัม
Sodium thiosulfate	ปริมาณ	30.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 46 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปต้มเดือดให้อาหารละลายเข้ากัน โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายไอโอ-ไดด์ 20 มิลลิลิตร (ใช้โพแทสเซียมไอโอไดด์ 5 กรัม และ ไอโอดีน 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร) และเติมสารละลาย Brilliant green ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำการผสมและเติมใส่ภาชนะบรรจุเพื่อให้สารที่ยังไม่ละลาย ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ควรเตรียมในวันที่ทำการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycollate Broth

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Casein enzymic hydrolysate ปริมาณ 15.0 กรัม

Yeast extract ปริมาณ 5.0 กรัม

Dextrose ปริมาณ 5.5 กรัม

Sodium chloride ปริมาณ 2.5 กรัม

L-Cystine ปริมาณ 0.5 กรัม

Sodium thioglycollate ปริมาณ 0.5 กรัม

Resazurin ปริมาณ 0.001 กรัม

Agar ปริมาณ 0.75 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 29.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หากยังไม่ได้ใช้ทดสอบทันทีให้ทำอาหารให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำไปเก็บไว้ที่มืดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Proteose peptone ปริมาณ 10.0 กรัม

Yeast extract ปริมาณ 5.0 กรัม

Sodium thiosulphate ปริมาณ 10.0 กรัม

Sodium citrate ปริมาณ 10.0 กรัม

Oxgall ปริมาณ 8.0 กรัม

Sucrose ปริมาณ 20.0 กรัม

Sodium chloride ปริมาณ 10.0 กรัม

Ferric citrate ปริมาณ 1.0 กรัม

Bromo thymol blue ปริมาณ 0.04 กรัม

Thymol blue ปริมาณ 0.04 กรัม

Agar ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 89.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Toluidine Blue DNA Agar (TBD Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Deoxyribonucleic acid (DNA) ปริมาณ 0.3 กรัม

Calcium chloride ปริมาณ 0.0055 กรัม

Sodium chloride	ปริมาณ	10.0 กรัม
Toluidine blue	ปริมาณ	0.083 กรัม
Tris (hydroxymethyl) amino methane	ปริมาณ	6.1 กรัม
Agar	ปริมาณ	10.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 26.48 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 หรือ 2 นาที เพื่อให้
อาหารละลายเข้ากัน นำไปใช้ได้เลยโดยไม่ต้องนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of casein	ปริมาณ	5.0 กรัม
Enzymatic digest of animal tissue	ปริมาณ	5.0 กรัม
Yeast enriched peptone	ปริมาณ	10.0 กรัม
Dextrose	ปริมาณ	1.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ	10.0 กรัม
Sucrose	ปริมาณ	10.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	ปริมาณ	0.2 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Sodium thiosulfate	ปริมาณ	0.3 กรัม
Phenol red	ปริมาณ	0.025 กรัม
Agar	ปริมาณ	13.5 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการให้ความร้อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้น
นำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Blood Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of casein, type H	ปริมาณ	15.0 กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	ปริมาณ	5.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ	5.0 กรัม
Agar	ปริมาณ	15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนโดยการต้มเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่าง
สม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที
และเติม Defibrinated blood ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-10 ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB Broth)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Pancreatic digest of casein	ปริมาณ 17.0 กรัม
Papaic digest of soybean	ปริมาณ 3.0 กรัม
Dextrose	ปริมาณ 2.5 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	ปริมาณ 2.5 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan Broth (Tryptophan Medium)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Casein enzymic hydrolysate	ปริมาณ 10.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
DL-Tryptophan	ปริมาณ 1.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารละลายเข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายลงในหลอดทดลองปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดโดยใช้จุกสำลีหรือฝาพลาสติก แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptose	ปริมาณ 15.0 กรัม
Soya peptone	ปริมาณ 5.0 กรัม
Yeast extract	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium metabisulfite	ปริมาณ 1.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	ปริมาณ 1.0 กรัม
Agar	ปริมาณ 18.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 45 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้ความร้อน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารคัดเลือก Cycloserine ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมไข่แดงปริมาณ 80 มิลลิลิตรต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Enzymatic digest of gelatin	ปริมาณ 1.0 กรัม
Dextrose	ปริมาณ 1.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Monopotassium phosphate	ปริมาณ 2.0 กรัม
Urea	ปริมาณ 20.0 กรัม
Phenol red	ปริมาณ 0.012 กรัม
Agar	ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 29 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำการละลายอาหารให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นตักผงวุ้น 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ความร้อนเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอเพื่อให้วุ้นละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำวุ้นมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar Base ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract	ปริมาณ 3.0 กรัม
Lactose	ปริมาณ 7.5 กรัม
Sucrose	ปริมาณ 7.5 กรัม
Xylose	ปริมาณ 3.5 กรัม
L-Lysine hydrochloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Sodium chloride	ปริมาณ 5.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	ปริมาณ 0.8 กรัม
Sodium thiosulfate	ปริมาณ 6.8 กรัม
Sodium deoxycholate	ปริมาณ 2.5 กรัม
Phenol red	ปริมาณ 0.08 กรัม
Agar	ปริมาณ 15.0 กรัม

วิธีการเตรียมอาหาร

ตักอาหาร 56.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้ความร้อนเป็นเวลา 1 นาที พร้อมกับกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้อาหารเข้ากัน โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันอีกครั้งและเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว