รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การบูรณาการภาพรวมของชุดการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออก

(Innovation of rapid *Salmonella* identification to assure high quality with the emphasis on world-class quality for export)

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802142
สัญญาเลขที่ 154/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การบูรณาการภาพรวมของชุดการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออก

(Innovation of rapid *Salmonella* identification to assure high quality with the emphasis on world-class quality for export)

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 154/2559

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การบูรณาการภาพรวมของชุดการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออก (ภาษาอังกฤษ) Innovation of rapid *Salmonella* identification to assure high quality with the emphasis on world-class quality for export รหัสโครงการ 2559A10802142 สัญญาเลขที่ 154/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,078,000 บาท (หนึ่งล้านเจ็ดหมื่นแปดพันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2558 – วันที่ 30 กันยายน 2559) โดยเนื่องจากเกิดการแพร่ระบาดของ *Salmonella* ในหลายแห่งและมีการปนเปื้อนที่มากับวัตถุดิบในการผลิตอาหารส่งผลกระทบทำให้ผู้บริโภคเกิดการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อ ท้องร่วงอย่างรุนแรง อาการโลหิตเป็นพิษ ผลิตภัณฑ์ของโรงงานอุตสาหกรรมถูกตีกลับ สูญเสียรายได้มูลค่ามหาศาล ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารอย่างรวดเร็วและแม่นยำก่อนอาหารจะถูกส่งไปยังผู้บริโภคเป็นวิธีการป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด แต่เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ในปัจจุบันมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้นเริ่มต้น 10^4 - 10^6 CFU/ml จึงจะให้ผลบวก มีการนำเทคโนโลยีชั้นสูง เช่น เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่เคยมีรายงานมาจะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้นและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากชุดทดสอบนี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. โดยบูรณาการภาพรวมการวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ตั้งแต่ในขั้นตอนแรกของการเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่างให้สูงขึ้นด้วยการศึกษาความเข้มข้นของอาหารเหลวไม่จำเพาะ (Tryptic Soy Broth) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน จากการพล็อตกราฟกับแบบจำลองการเจริญเติบโตพบว่าที่ความเข้มข้นของอาหารสูตรปกติเพียงพอในการให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดโดยที่ไม่จำเป็นเพิ่มความเข้มข้นให้สูงไปจากนี้ นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษากรรมวิธีการเตรียมสารสกัดไก่ที่ให้อาหารเหลวไม่จำเพาะมีคุณภาพสูง โดยสามารถเพิ่มจำนวน *Salmonella* spp. ได้อย่างรวดเร็วด้วยการเตรียมไก่สกัดที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา

60 นาที โดยที่เงื่อนไขการเตรียมดังกล่าวถูกนำไปพัฒนาสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะที่ประยุกต์ใช้วัตถุดิบทางการเกษตรราคาถูกที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงโดยสามารถหาซื้อได้ในประเทศไทย สำหรับเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลา อีกทั้งเป็นแนวทางการเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศไทยให้สูงขึ้น ลดการนำเข้าอาหารจากต่างประเทศ หลังจากได้เงื่อนไขสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะที่มีประสิทธิภาพแล้ว มีการพัฒนาสูตรอาหารบ่งชี้ชนิดใหม่ เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้น โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟต์ของซัลโมเนลลาร่วมกับการตรวจสอบปฏิกริยาด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารบ่งชี้จำเพาะด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ เพื่อใช้ในการคัดเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการเปรียบเทียบปริมาณการเกิดปฏิกริยาของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ สำหรับความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการบ่งชี้ปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนและการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ คือ 550 (ใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์) และ 650 (ใช้เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท เป็นอินดิเคเตอร์) นาโนเมตร ตามลำดับ โดยในงานวิจัยนี้ดำเนินการตรวจนับปริมาณเชื้อ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวไม่จำเพาะร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้นในระดับไมโครสเกลที่ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ 96-microwell plate เป็นการลดปริมาณการใช้อาหารแต่ยังคงให้ผลสอดคล้องกับวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ทำให้สามารถวิธีเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาก่อนส่งจำหน่าย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ทีละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอการตรวจวิเคราะห์หา *Salmonella* รูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กร่วมกับอาหารบ่งชี้เบื้องต้น การปรับปรุงสภาวะการเจริญที่เหมาะสมแก่ *Salmonella* ในอาหารตัวอย่าง โดยทำการเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรทั่วไป คือ Tryptic Soy Broth หรือ TSB ที่ระดับความเข้มข้น 5 – 0.125 เท่า เพื่อทดสอบปริมาณความต้องการสารอาหารของ *Salmonella* จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารอาหารจากแหล่งอื่น เพื่อนำมาทดแทนปริมาณสารอาหารในกลุ่มโปรตีนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรทั่วไปที่ได้จากนม และถั่วเหลือง โดยแหล่งโปรตีนที่ใช้ ได้แก่ หมู ปลา เห็ด กรดอะมิโน อาหารทะเลและผลิตภัณฑ์จากไข่ ซึ่งถูกเตรียมเพื่อนำมาแทนที่แหล่งไนโตรเจนจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป ทั้งนี้วิเคราะห์ลักษณะการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหลวโดยอาศัยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Sigmoid model เพื่อใช้วิเคราะห์ลักษณะการเจริญของ *Salmonella* ในอาหารแต่ละสูตร จากการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ *Salmonella* สามารถเจริญได้มากที่สุดอยู่ในช่วง 0.125 ถึง 2 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปกติ หากเพิ่มระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 3 เท่าขึ้นไป จะส่งผลให้ *Salmonella* มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากแรงดันออสโมติก โดยค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อที่สูงที่สุดจากการทดลองคือ 2.346 ที่ระดับความเข้มข้น 2 เท่า นอกจากนี้เมื่อทำการเตรียมสารอาหารจากแหล่งอื่นเพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างทดลองทั้งหมดพบว่า เนื้อไก่ที่ผ่านกระบวนการเตรียมที่อุณหภูมิ 121°C และใช้ระยะเวลานาน 60 นาที จะให้ปริมาณกรดอะมิโนที่เหมาะสมแก่ *Salmonella* ได้มากที่สุด ทั้งนี้จากตัวอย่างทดลองทั้งหมดพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างที่ได้รับสารอาหารประเภทเนื้อไก่ ปลา และเนื้อหมู มีค่าใกล้เคียงกับค่าการเจริญเติบโตของเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรทั่วไป โดยสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น 7 log-scale ได้ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมงจึงสามารถกล่าวได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงนี้ สามารถเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ได้เทียบเคียงกับอาหารสูตรทั่วไป อีกทั้งยังเป็นแหล่งอาหารที่สามารถจัดหาได้ง่าย และมีราคาถูกด้วย โดยในงานวิจัยได้นำเสนอเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้นร่วมกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในระดับไมโครสเกล เพื่อเป็นอีกวิธีการหนึ่งสำหรับการตรวจการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้น โดยในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งจำเพาะในถาดอาหารแบบ 96 หลุม พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดีกับผลที่ได้จากวิธีการมาตรฐาน (ISO method) สำหรับนับจำนวนซัลโมเนลลาบริสุทธิ์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ R^2 = 0.9939, $P < 0.0001$ และสำหรับการพัฒนาสูตรอาหารบ่งชี้ชนิดใหม่นั้น ได้อาศัยหลักการของปฏิกริยาดี

คาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟต์ของซัลโมเนลลา โดยซัลโมเนลลาแต่ละซีโรวาร์สามารถเกิดปฏิกริยาออร์นิทีนและไลซีน ดีคาร์บอกซีเลชั่น และสามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟต์ได้จากสารตั้งต้นไทโอซัลเฟต ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นทำปฏิกริยากับอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม จะสามารถสร้างสารบ่งชี้ปฏิกริยาทั้งสองในซัลโมเนลลาได้ และยังสามารถจำแนกซัลโมเนลลาออกจากแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยาทั้งสองได้ นอกจากนี้ยังได้นำการตรวจสอบคุณสมบัติด้านแสงมาประยุกต์ใช้เพื่อวัดค่าทางสเปรคโตรโฟโตรเมตรีในอาหารบ่งชี้ เพื่อใช้ในการคัดเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการเปรียบเทียบปริมาณการเกิดปฏิกริยาของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ สำหรับความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการบ่งชี้ปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนและการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ คือ 550 (ใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์) และ 650 (ใช้เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท เป็นอินดิเคเตอร์) นาโนเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ซาลโมเนลล่า/ อัตราการเจริญจำเพาะ/ สภาวะจำกัด/ อาหารปรับปรุงสูตร/ ดีคาร์บอกซีเลชั่นและกรดอะมิโน, การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์, อาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้น, การตรวจซัลโมเนลลา, ไมโครเพลทแบบ 96 หลุม

Abstract

This research was conducted to improve the nutrients and growth conditions during the liquid pre-enrichment step to detect *Salmonella* spp. in food samples. The concentration (ranging from 5 – fold to 0.125-fold strength) of the conventional Tryptic Soy Broth (TSB) was varied to investigate the overall nutrient requirement of *Salmonella*. Different sources of alternative supplements were used to replace the conventional nitrogen source derived from milk and soy beans. Local protein sources (i.e., chicken, pork, fish, mushrooms, amino acid, sea food, and egg) were processed and prepared to replace the original TSB recipe. The amino acid cocktail was prepared from these local sources to enhance *Salmonella* enrichment medium. Growth profiles of *Salmonella* grown on these media were monitored and growth kinetic information was extracted from a mathematical model; sigmoid model was chosen to capture the sigmoidal batch growth nature of *Salmonella* in the pre-enrichment step. The growth kinetics of *Salmonella* revealed that the optimal growth occurred when the concentration of TSB was in the range between 0.125-fold and 2-fold strength. At concentrations of TSB higher than 3-fold, the growth of *Salmonella* was deteriorated, perhaps as a result of osmotic stress. The maximum value of the specific growth rate was 2.346 h^{-1} at the 2-fold strength treatment. Using chicken meat as a protein sources, there existed the best preparation process to prepare medium for *Salmonella* growth. High temperature and long processing time helped extract essential amino acid cocktails that suited the growth of *Salmonella*. The high pressure cooking treatment at 121°C for 60 minutes returned the best growth characteristics. Among different alternative sources to substitute the conventional TSB, several options (e.g., chicken, fish and pork) were able to grow *Salmonella* at the comparable growth as the TSB, up to 7 log-scale multiplication was achieved within 8 h. There were potential alternatives to replace TSB for the *Salmonella* pre-enrichment step and these alternative sources can be easily acquired locally and inexpensively. This research aimed to propose the protocol for rapid screening of *Salmonella* spp. in food and food environment samples for routine monitoring in food industry. The rapid and microscale assay using new presumptive indicator enrichment and subsequent miniaturized agar plating was proposed as an alternative protocol for *Salmonella* detection. The proposed miniaturized agar plating in a 96-well plate shows a good correlation with the standard ISO technique for the enumeration of pure *Salmonella* cultures (R^2 =

0.9939, P ＜ 0.0001) Moreover the new indicator broths based on amino acid decarboxylation and hydrogen sulfide production were developed. Depending on their serovars, *Salmonella* can decarboxylate ornithine and lysine as well as produce hydrogen sulfide from thiosulfate substrate, to react with an appropriate indicator showing signals for presence of *Salmonella.* Collectively, the broth formulations with different amino acid with/without selective inhibitors and thiosulfate substrates not only identified decarboxylase- and thiosulfate reductase – positive bacteria, but further distinguished between decarboxylase- and thiosulfate reductase – positive salmonella and non-salmonellae. The optical properties of each indicator broth enriched with *Salmonella* spp. and non-salmonellae were measured spectrophotometrically to optimize the most sensitive and selective media. The optimal wavelength for each indicator giving the highest absorbance or optical density differences between positive and negative broths were 550 (phenol red) and 650 (ferric ammonium citrate) nm for AADC and H_2S production, respectively.

Keywords: *Salmonella* detection/ alternative media/ growth kinetic/micro-scale method/96 micro-well/amino acid decarboxylation/hydrogen sulfide production/presumptive broth

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	IV
สารบัญเรื่อง	VIII
สารบัญตาราง	IX
สารบัญรูป	X
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	10
3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย	32
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	44
5 สรุปผลการทดลอง	88
เอกสารอ้างอิง	90
ผลผลิต (output)	98
ประวัติคณะผู้วิจัย	99
ภาคผนวก-ผลงานตีพิมพ์	100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	อาหารที่พบว่าสามารถเป็นสาเหตุการเกิดโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี 1973-1978	20
2.2	แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการกระตุ้นและคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*	22
2.3	ปฏิกริยาชีวเคมีของ Salmonella	26
2.4	การทดสอบยืนยันเชื้อ Salmonella	27
2.5	วิธีรวดเร็วสำหรับการตรวจหา Salmonella ที่ได้รับการับรองโดย AOAC	29
4.1	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella*	53
4.2	ผลของแบบจำลอง Sigmoidal ในการพล็อตกราฟข้อมูลการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.	55
4.3	ผลของความเข้มข้นของ TSB ต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.	59
4.4	ผลของอุณหภูมิและเวลาในการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะจากวัตถุดิบไก่ (ไก่สกัด) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.	62
4.5	ผลของทางเลือก media อื่นๆ ต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.	67

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	พบการระบาดของเชื้อโรคซาลโมเนลลาเนื่องจากการบริโภคข้าวมันไก่ โดยพบผู้ป่วยรวม 6 ครั้ง ระบาดครั้งละ 400-500 คน โดยเฉพาะในช่วงนี้ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนมาก ขึ้นดังนั้นการรับประทานข้าวมันไก่ควรกินที่ปรุงเสร็จภายในไม่เกิน 4 ชั่วโมง ข้าว ไก่ ต้องร้อน รวมทั้งเลือดต้องต้มให้สุก	2
1.2	นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ โรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนบริโภค โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากผลการตรวจไข่ต้ม รวมทั้งสารคัดหลั่ง ทั้งอุจจาระและเลือดนั้นพบการปนเปื้อนของ "ซัลโมเนลลา"	3
2.1	แฟลกเจลลา (flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (ก) และลักษณะของเชื้อ *Salmonella* เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข)	11
2.2	แผนภาพแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella แบบดั้งเดิม	21
2.3	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella*ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งต่างกัน	25
2.4	แสดงลักษณะของเชื้อ Salmonella ในขั้นตอนทางชีวเคมี	27
3.1	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ *Salmonella*	35
3.2	ขั้นตอนการทำ dilution ของเชื้อ *Salmonella*	35
3.3	วัตถุดิบอาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นอาหารทางเลือกอื่นแทน TSB เพื่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella*	37
3.4	แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA	39
3.5	แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA	39
4.1	เปรียบเทียบโคโลนีที่ได้จากที่เวลาต่างกัน แถวบนเป็นการสังเกตด้วยสายตาและแถวล่างเป็นการใช้กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง	45
4.2	จำนวนโคโลนีของ *Salmonella* ในรูปแบบ log CFU/ml ที่นับโดยการใช้เทคนิค 2 วิธี (SPT และ MDPT) ที่เวลาในการบ่มต่างๆ กัน ในแต่ละการนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM แท่งกราฟที่มี * หรือ # บ่งบอกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในวิธีการเดียวกัน; แท่ง	46

รูปที่ **หน้า**

กราฟที่มี * ไม่มีความแตกต่างจากแท่งกราฟที่มีเครื่องหมาย # (Duncan's multiple range tests, p> 0.05); แท่งกราฟที่มี a เป็นปริมาณโคโลนีที่ได้จากเทคนิค MDPT ที่เวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญน้อยกว่าที่เวลาถัดไป

4.3 กราฟปริมาณเชื้อของ *S.*Typhi ที่นับได้จากเทคนิค SPT (แกน X) และเทคนิค MDPT (แกน Y) สำหรับเทคนิคทั้งคู่ใช้ pure culture ของ *S.*Typhi ที่ปริมาณจาก 0 ถึง 8 log CFU/ml (n = 90) ปริมาณเชื้อดังกล่าวถูก inoculated บนอาหาร TSA และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (SPT) และ 12 ชั่วโมง สำหรับ (MDPT) เส้นแนวโน้มกราฟที่ได้โดยสมการสัมพันธ์ 48

4.4 กราฟแสดง 4 ช่วงของ Sigmoid หรือกราฟ S – shaped 49

4.5 ปฏิกริยาระหว่างมวลสารและความเข้มข้นของสับเสตรท 50

4.6 กราฟการเจริญเติบโต 51

4.7 การนับปริมาณเชื้อ *Salmonella* บน microwell plate หลังจากทำการบ่มใน TSB ที่สูตรปกติ 1X ที่เวลาต่างๆ กัน (2 – 6 ชั่วโมง) 52

4.8 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Salmonell* spp. ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C จากการพล็อตด้วยการใช้แบบจำลองชนิดต่าง ๆ (Sigmoid, Logistic, Welbull) 54

4.9 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Salmonell* spp. ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C จากการพล็อตด้วยการใช้แบบจำลองชนิดต่าง ๆ (Gompertz, Hill, Chapman) 54

4.10 การ varied ความเข้มของอาหาร TSB เพื่อการเจริญเติบโตของ Salmonella ใน 96 – microplate **55**

4.11 เปรียบเทียบ kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ที่สูตรความเข้มข้นอาหารปกติ (1X) และที่การความเข้มข้นอื่นๆ ที่มากกว่า (e.g. 5X, 4X, 3X และ 2X) 56

4.12 เปรียบเทียบ kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ระหว่างสูตรความเข้มข้นอาหารปกติ (1X) และที่การความเข้มข้นอื่นๆ ที่น้อยกว่า (e.g. 0.5X, 0.25X, 0.125X และ 0.86% NaCl) 58

4.13 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญเติบโตของ *Salmonella spp.* ที่สภาวะการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะจากวัตถุดิบไก่ด้วยวิธีการแบบต่างๆ (i.e., 121°C 15 นาที, 121°C 60 นาที) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 61

4.14 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญเติบโตของ *Salmonella spp.* ที่สภาวะการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะจากวัตถุดิบไก่ด้วยวิธีการแบบต่างๆ (i.e., 121°C 60 นาที, 95°C 60 นาที) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 61

รูปที่ **หน้า**

4.15 ทางเลือก media ที่เป็นแหล่งของไนโตรเจน 63

4.16 กราฟเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร media ต่างชนิด (i.e., TSB, ไก่, หมู, เห็ด, 1% egg yolk, 1% egg white) ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C 64

4.17 กราฟเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร media ต่างชนิด (i.e., TSB, ปลาน้ำจืด, ปลาน้ำแข็ง, กุ้งน้ำจืด, กุ้งน้ำเค็ม, ปลาหมึก, หอยแมลงภู่) ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C 64

4.18 กราฟเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร media ต่างชนิด (i.e., TSB, 1% MSG, 0.5% MSG และน้ำเกลือ) ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C 65

4.19 ค่าการดูดกลืนแสงของ mLDB ที่มีการเติม bromocresol purple, bromothymol blue, and phenol red ที่มีการปรับ pH จาก 4.5 ถึง 9 สำหรับกราฟที่มาจาก 3 อินดิเคเตอร์มีปรากฏ 2 peaks ที่ 430 และ 550 nm ที่อาหารเหลวที่มี pH น้อยจะปรากฏค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{430} สูง ที่อาหารเหลวที่มี pH สูงมากจะปรากฏค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{550} สูง ความเบี่ยงเบนจากค่าความเป็นกลางไปเป็นกรด เนื่องจากเกิดการ fermentation ของกลูโคสสะท้อนให้เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อ การเพิ่ม pH จาก pH 7 เป็นผลจากการผลิตเอมีนเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส กราฟด้านขวาเป็นกราฟค่าความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ broth ที่แต่ละ pH จาก 4.5 ถึง 9 ลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 7 อินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดค่อนข้างที่จะแสดงค่าพีคที่สูงสุดของค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ทั้งคู่ของ 430 นาโนเมตรและ 550 นาโนเมตร 70

4.20 ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปเทียบกับเวลาที่ wavelength 550 nm ของอาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนา mLDB-PR (a), mODB-PR (b), and mADB-PR (C) ซึ่ง inoculated ด้วยเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ (7 log CFU/ml) โดยในแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 ซ้ำตัวอย่าง ±SEM ค่าการดูดกลืนแสงมีการตกลงช่วงแรกสะท้อนให้เห็นการลดลงของ pH เนื่องจากการ fermentation ของกลูโคส การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ pH เป็นผลเนื่องจากกรดอะมิโนจากปฏิกริยา decaboxylation โดย acid-activated ของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสจากแบคทีเรีย ตัวอย่างที่เป็น positive ของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นแสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 สูงกว่าอาหารเหลวที่ไม่ได้มีการ inoculation ของเชื้อ (ตัวอย่าง control สัญลักษณ์ X) 73

4.21 แสดงรูปภาพ microwell ของอาหาร modified broth media ที่เวลาการบ่มต่างๆ หลังจากการ inoculation ของเชื้อแบคทีเรียที่ 7 log CFU/ml ที่สภาวะ control เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการ 75

รูปที่ **หน้า**

inoculation ของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของสีสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงในรูป 4.20

4.22 กราฟค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรที่ได้รับจากอาหารดัดแปลง mLDB-PR (a), mODB-PR (b) และ mADB-PR (c) โดยอาหารดังกล่าว inoculated ด้วยเชื้อ non-salmonellae ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml ในแต่ละจุดของกราฟเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±SEM ที่วัดจากตัวอย่าง ค่าการเปลี่ยนแปลงของกราฟที่สูงขึ้นไปจาก control ของที่ wavelength 550 เป็นกราฟของแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกริยา 77

4.23 แสดงเปรียบเทียบเชื้อ *Salmonella* 7 ซีโรวาร์ที่สามารถเกิด thiosulfate-reductase และ 11 เชื้อแข่งขันในการใช้การเพาะเชื้อขนาดเล็ก (TFXL) ในการนำเสนอการเกิด H_2S production หลังจาก 24 ชั่วโมง เพื่อการบ่งบอกการปนเปื้อนของ *Salmonella* 81

4.24 แสดง profile ค่าการดูดกลืนแสงที่ wavelength ต่างๆ ของปฏิกริยาการเกิด H_2S production ที่ inoculation ด้วยเชื้อ *S.* Enteritidis ซึ่งสามารถเกิดปฏิกริยาได้อย่างดีมาก (H_2S^{++}) สำหรับการตรวจสอบผลกระทบของความขุ่นในอาหารเหลวที่มีสับเสตรทที่ทำให้เกิดตะกอนสีดำและปราศจากสับเสตรทที่ทำให้เกิดตะกอนสีดำ 83

4.25 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกริยา H_2S กับเชื้อแข่งขันที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยาได้ในอาหารเหลว TFXL 84

4.26 ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของ *S.* Anatum (A), *S.* Enteritidis (B), *S.* Rissen (C), *S.* Typhimurium (D), *S.* Weltevreden (E), *S.* Paratyphi B (F) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เป็น control (ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ) และ H_2S^- ที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* แต่ทำให้เกิดความขุ่น (*E. coli* และ *E. aerogenes*) ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างของ broth ที่มี *Salmonella* แสดงให้เห็นอย่างไม่สำคัญที่ค่าสูงในช่วงของ 405 – 650 nm แต่ให้ค่าสูงสุดที่ 650 nm ของ 6 เชื้อ *Salmonella* 86

4.27 กราฟค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาที่ได้มีการหักผลของความขุ่นที่ wavelength 650 nm ของเชื้อ *Salmonella* กับที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* 87

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

แบคทีเรียซัลโมเนลลา (*Samonella*) จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ แบคทีเรียซัลโมเนลลา (*Samonella*) จัดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากอาหารสู่คนที่มีความสำคัญเป็นลำดับต้น ๆ สามารถก่อโรคติดเชื้อทั้งในระบบทางเดินอาหารและกระแสเลือด ปัจจุบันเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขมูลฐานทั้งในประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนาเป็นอย่างมาก นอกจากนี้เชื้อ *Salmonella* ยังมีความสำคัญในด้านเศรษฐกิจอุตสาหกรรมอาหารส่งออกของประเทศไทย ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก ตามสถิติการส่งออกในรอบสี่ปี (2551 - 2554) ที่ผ่านมาปรากฏว่าอุตสาหกรรมอาหารส่งออกสินค้าประมงทำรายได้เข้าประเทศในปีหนึ่งคิดเป็นมูลค่า 80,654.03, 134,667.82, 135,610.94, 71,724.26 ล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2012) เมื่อพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารย่อมทำให้ประเทศที่รับสินค้าปฏิเสธสินค้า ก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจการส่งออกได้ มีรายงานจากประเทศนอร์เวย์ระหว่างปี ค.ศ. 1982 – 1986 มีผู้ป่วย 186 ราย (อัตราป่วย 4.50 คนต่อประชากร 100,000 คน) ร้อยละ 61.8 ของผู้ป่วยนั้นติดเชื้อภายหลังจากเดินทางกลับจากต่างประเทศ ในปี ค.ศ. 1987 ประเทศนอร์เวย์และฟินแลนด์ เกิดการระบาดของ *S.* typhimurium สาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อในช็อกโกเลต (Kapperud และคณะ, 1990) ในปี ค.ศ. 1992 Torensma และคณะได้ทำการศึกษาและค้นคว้า พบว่าจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ปริมาณน้อยกว่า 10 เซลล์ในช็อกโกแลต 100 กรัม สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคได้ จากการศึกษาของเกรียงศักดิ์ สายธนู และอรุณ บ่างตระกูลนนท์ ในปี 2541 ได้ประมาณจำนวนผู้ป่วย Salmonellosis จากโรคอุจจาระร่วง โรคอาหารเป็นพิษ โรคบิด โรคไข้แอนเทซิสและโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งพบว่าเมื่อปี 2550 – 2555 มีจำนวนถึง 45,192 – 632,684 ราย หรือคิดเป็น 76-1,057 รายต่อประชากรหนึ่งแสนคน

จากรายงานข่าวล่าสุดของการติดเชื้อ *Salmonella* ปี 2557 ในประเทศไทยที่จังหวัดเชียงใหม่ มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในข้าวมันไก่ โดยพบผู้ป่วยจากการรับประทานข้าวมันไก่รวม 6 ครั้ง ระบาดครั้งละ 400-500 คน ทั้งหมดมีอาการติดเชื้อโรคซัลโมเนลลา ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อไก่และเลือดไก่บูดเน่าได้ง่าย โดยเฉพาะในช่วงนี้ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนมากขึ้น การรับประทานข้าวมันไก่ที่มีการติดเชื้อ

ดังกล่าวเมื่อร่างกายรับเชื้อ เชื้อโรคจะมุ่งเข้าสู่เซลล์น้ำเหลืองของลำไส้เล็ก และจะเจริญแบ่งตัวที่นั่น แต่ยังไม่มีอาการ เพราะเป็นระยะฟักตัว หลังจากนั้นเชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือดกระจายสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกาย และเริ่มแสดงอาการหลังบริโภคประมาณ 6-48 ชั่วโมง มีอาการอยู่ในระหว่าง 1-5 วัน นอกจากนี้ยังมีเหตุการณ์ในทำนองเดียวกันเกิดขึ้นโดยพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในไข่ต้มที่นำมาให้นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ ทำให้เด็กนักเรียนโรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานอาหารไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากการได้รับเชื้อ **"ซัลโมเนลลา"**

รูปที่ 1.1 พบการระบาดของเชื้อโรคซาลโมเนลลาเนื่องจากการบริโภคข้าวมันไก่ โดยพบผู้ป่วยรวม 6 ครั้ง ระบาดครั้งละ 400-500 คน โดยเฉพาะในช่วงนี้ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนมากขึ้นดังนั้น การรับประทานข้าวมันไก่ควรกินที่ปรุงเสร็จภายในไม่เกิน 4 ชั่วโมง ข้าว ไก่ ต้องร้อน รวมทั้งเลือดต้องต้มให้สุก

รูปที่ 1.2 นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ โรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนบริโภค โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากผลการตรวจไข่ต้ม รวมทั้งสารคัดหลั่ง ทั้งอุจจาระและเลือดนั้นพบการปนเปื้อนของ "ซัลโมเนลลา"

นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ โรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนบริโภค โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากผลการตรวจไข่ต้ม รวมทั้งสารคัดหลั่ง ทั้งอุจจาระและเลือดนั้นพบการปนเปื้อนของ "ซัลโมเนลลา"

จากการแพร่ระบาดของ *Salmonella* ที่เกิดขึ้นในหลายแห่งทำให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารประเภทนี้มีอยู่ทั่วไป การปนเปื้อนที่มากับวัตถุดิบในการผลิตอาหารเป็นปัจจัยหลักในการแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้ โรงงานอุตสาหกรรมอาหารขนาดใหญ่และโรงงานส่งออกอาหารและผลิตสินค้าแปรรูปเกษตรขนาดกลาง-เล็กในประเทศไทยจึงมีโอกาส**ประสบปัญหาการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในโรงงานอาหารส่งออก เช่น โรงเชือดไก่ หรือแปรรูปเนื้อไก่ส่งออก รวมถึงโรงงานผลิตอาหารพร้อมรับประทานแช่แข็งส่งออก (Frozen ready-to-eat manufacturers) ด้วยกันทั้งนั้น** ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญมาก

ในการตรวจสอบและป้องกันปัญหาดังกล่าวก็คือ **การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารอย่างรวดเร็วและแม่นยำก่อนอาหารจะถูกส่งไปยังผู้บริโภคเป็นวิธีการป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามในการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจสอบซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารให้มีประสิทธิภาพสูงสุด** ซึ่งในปัจจุบันจะมีวิธีทดสอบที่รวดเร็ว (rapid test) สำหรับแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในอาหารหลายวิธี อย่างไรก็ตามแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^4 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก นอกจากนี้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่เคยมีรายงานมาจะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน **ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้นและมีค่าใช้จ่ายสูง** เนื่องจากชุดทดสอบนี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง เช่น Singlepath® SALMONELLA (MERCK, Germany) โดย 1 ชุด สามารถวิเคราะห์ได้ 20 ตัวอย่าง ราคาประมาณ 10,000 บาท (ตัวอย่างละ 500) เป็นต้น ซึ่งชุดตรวจสอบ 1 ชุด จะสามารถตรวจสอบเชื้อได้ชนิดเดียว หากต้องการตรวจสอบเชื้อชนิดอื่นจะต้องซื้อชุดตรวจสอบสำหรับเชื้อนั้น ๆ ใหม่ ในขณะที่**วิธีการตรวจสอบซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารที่อาศัยหลักการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture-based method) จัดว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและได้รับการรับรองจากหน่วยงานอาหารสากลต่างๆ อาทิเช่น องค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International standard organization, ISO) คู่มือการวิเคราะห์แบคทีเรีย (Bacteriological Analytical Manual, BAM) และเอโอเอซี (the Association of Official Analytical Chemists, AOAC) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ยังมีข้อเสียคือใช้เวลาในการอ่านผลเบื้องต้นนานถึง 3 วัน ทำให้ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจสอบอาหารที่มีอายุการเก็บรักษาสั้น (Mcpherson et al., 1991) หรืออาหารที่ต้องการทราบผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว**

ดังนั้นการพัฒนาใช้วิธีการอื่นที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องและแม่นยำ รวมทั้งมีความไวใกล้เคียง เท่ากับหรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ทั้งนี้เมื่อพิจารณา**ขั้นตอนในการวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาประกอบไปด้วย การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ จากนั้นในขั้นตอนที่สอง นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะซึ่งมีสารยับยั้งหรือลดจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลา แต่ในขณะเดียวกันก็เพิ่มจำนวนซัลโมเนลลา และในขั้นตอนที่สามคือ นำไปคัดแยกบนอาหารแข็งจำเพาะ โดยโคโลนีของซัล**

โมเนลลาจะให้สีจำเพาะแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น จาก protocol วิธีการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าขั้นตอนที่มีความสำคัญในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในอาหาร คือ ขั้นตอนที่ 1 และ 2 โดยขั้นตอนที่ 1 ซึ่งเป็นการเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะ (Pre-enrichment or non-selective enrichment) เพื่อเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาทั้งที่ได้รับบาดเจ็บและไม่บาดเจ็บ เนื่องจากในธรรมชาติสามารถพบซัลโมเนลลาปนเปื้อนอยู่ในปริมาณน้อยมาก อีกทั้งอาจเกิดการบาดเจ็บจากการผ่านกระบวนการการผลิต ดังนั้นขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะจะสามารถเพิ่มโอกาสในการตรวจพบในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจะทำให้ลดความผิดพลาดจากการอ่านผลการวิเคราะห์เป็นผลลบทั้งๆ ที่มีการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอยู่ (False-negative results) ซึ่งจะเกิดผลเสียเป็นอย่างมาก (Baylis et al., 2000) ในปัจจุบันอาหารเหลวไม่จำเพาะมาตรฐานสำหรับเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาที่ได้รับการรับรองจากหน่วยงานอาหารสากลต่างๆ มีหลากหลายชนิด เช่น อาหาร Nutrient broth (NB), Lactose broth (LB), Trypticase soy broth (TSB), Buffered peptone water (BPW) เป็นต้น ซึ่งเลือกใช้ตามชนิดของตัวอย่างอาหารและสายพันธุ์ซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อน อาหาร BPW เป็นอาหารที่ได้รับการแนะนำว่าดีที่สุดและมีการใช้งานในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลามากที่สุด เนื่องจากอาหารดังกล่าวมีระบบของบัฟเฟอร์ ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปดังกล่าวทั้งหมดจากต่างประเทศทั้งสิ้น เนื่องจากไม่มีการผลิตใช้ในประเทศ ซึ่งการนำเข้าอาหารดังกล่าวทำให้ต้นทุนในการผลิตโดยรวมสูงขึ้น อีกทั้งเทคนิคในการเลี้ยงในปัจจุบันก็จำเป็นต้องใช้ปริมาณอาหารสูง จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่าง ส่งผลให้เกิดโอกาสในการวิเคราะห์ผิดพลาดสูงตามไปด้วย ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นแหล่งเกษตรกรรมและมีวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของไนโตรเจนในปริมาณสูงหลากหลายชนิด อาทิ เห็ด กากถั่วเหลือง เนื้อไก่ เนื้อหมู เป็นต้น ดังนั้นจึงมีโอกาสและความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบโปรตีนราคาถูกแต่มีปริมาณไนโตรเจนสูงเพียงพอต่อการเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาเพื่อทดแทนการนำเข้าอาหารสำเร็จรูปจากต่างประเทศ นอกจากนี้ ยังเป็นแนวทางในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูปเพื่อการส่งออกในลำดับต่อไปอีกด้วย ซึ่งนับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบทางการเกษตร ทำให้เพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรให้ความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นอีกด้วย ในขณะที่**ขั้นตอนที่สอง โดยปัจจุบันอาหารเหลวจำเพาะในขั้นตอนนี้นั้น มีประสิทธิภาพและความแม่นยำแตกต่างกันและมีข้อจำกัดในการคัดเลือกซัลโมเนลลาบางซีโรวาร์ (Serovars) อาทิเช่น อาหารอาร์วีเอส (RVS) หรืออาหารในกลุ่มเดียวกัน อาหารเอ็มเคทีทีเอ็น (MKTTn) หรืออาหารในกลุ่มเดียวกัน ไม่เหมาะสำหรับการคัดเลือกซัลโมเนลลา ไทฟี (*S.* Typhi) ในขณะที่ อาหารเอสซี (SC) ไม่เหมาะสำหรับการคัดเลือกซัลโมเนลลาในหลายซีโรวาร์ แต่เหมาะสำหรับการคัดเลือกซัลโมเนลลา**

แกลลินาลั่ม (S. Gallinarum) และซัลโมเนลลา ไทฟี (*S.* Typhi) ดังนั้นมาตรฐานต่างๆจึงแนะนำให้ใช้อาหารอย่างน้อยสองชนิดร่วมกัน ตามชนิดตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนและชนิดซีโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่สงสัย แม้ว่าจะใช้อาหารร่วมกันดังกล่าวแต่การอ่านผลการทดสอบยังคงต้องนำไปคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะและใช้เวลาอ่านผลเป็นเวลาเพิ่มเติมอีก 1 วันและแม้ว่าจะมีความพยายามปรับปรุงสูตรอาหารให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานการระบาดของซัลโมเนลลาจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนซัลโมเนลลาเกิดขึ้นในหลายๆประเทศทั่วโลก ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าด้วยข้อจำกัดที่เกิดขึ้นในวิธีการวิเคราะห์จะส่งผลกระทบกับความแม่นยำและความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ซึ่งอาจส่งผลกระทบให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการระบาดของการติดเชื้อและส่งผลกระทบภาพรวมของเศรษฐกิจที่มีการตีกลับของสินค้าเนื่องจากมีการตรวจพบเชื้อที่ปลายทางของผลิตภัณฑ์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อบูรณาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. โดยการประยุกต์ใช้วัตถุดิบทางการเกษตรราคาถูกที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง สำหรับเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลา นอกจากนี้ยังพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพโดยอาศัยปฏิริยาทางชีวเคมีของซัลลาโมเนลลา เช่น ปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนร่วมกับการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแข่งขัน เพื่อเพิ่มความจำเพาะของอาหารต่อการตรวจสอบและบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยพีเอชอินดิเคเตอร์ การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้โดยประยุกต์ใช้อุปกรณ์ 96-microwell plate เพื่อการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหาร โดยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) สามารถวัดตัวอย่างได้ครั้งละ 96 ตัวอย่าง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการบูรณาการปัจจัยภาพรวมที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ เพื่อพัฒนาชุดอาหารเหลวจำเพาะที่สามารถบ่งชี้การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ รวมทั้งมีประสิทธิภาพใกล้เคียง เท่ากับหรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน (conventional method) หรือวิธีการที่รวดเร็วซึ่งอาศัยหลักการอื่น นับเป็นวิธีการที่จะปฏิรูปการวิเคราะห์ *Salmonella* ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคได้เป็นอย่างดี ความสำเร็จที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Frozen ready-to-eat products) โรงเชือดไก่ (Chicken Slaughter house) และโรงงานไก่แปรรูป (Chicken Further Factory) ทำให้สามารถวิธีเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาก่อนส่งจำหน่าย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ทีละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน สุดท้ายคือความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มศักยภาพในการประกันความปลอดภัยของอาหารส่งออก

โดยทางคณะผู้วิจัยมีความร่วมมือทางวิชาการกับโรงงานอุตสากรรมอาหารแปรรูปแช่แข็งเพื่อการส่งออก อาทิเช่น บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด, บริษัท ศิริมานิต จำกัด เป็นต้น ทางบริษัทฯมีความต้องการใช้วิธีการวิเคราะห์และสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในด้านต่างๆ ข้างต้นมาประยุกต์ใช้ในระบบการควบคุมและประกันคุณภาพของทางโรงงาน ทำให้สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลล่าในตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปแช่แข็งส่งออกของทางบริษัท ซึ่งทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าแนวทางการวิจัยดังกล่าวจะสามารถแก้ไขปัญหาและตอบโจทย์ให้กับอุตสาหกรรมในทุกๆด้าน และที่สำคัญที่สุด คือการประยุกต์ใช้วิธีการนี้จะเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเชิงป้องกัน (Preventive measures) แทนการแก้ไขปัญหา (Corrective approach) ที่ปลายเหตุดังพบเห็นได้ในสื่อทั่วไปเมื่อเกิดการแพร่ระบาดที่บานปลายแล้ว

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะสำหรับเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง

1.2.2 เพื่อศึกษาและนำเสนอวิธีการใหม่ในการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารแข็งไม่จำเพาะโดยอาศัยหลักการลดขนาดการวิเคราะห์ ที่ให้ผลการนับเทียบเท่ากับวิธีการมาตรฐาน สำหรับใช้ในการติดตามการเจริญของซัลโมเนลลาในขั้นตอนการพัฒนาสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะ

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเหลวไม่จำเพาะมาตรฐานสำหรับเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลา

1.2.4 พัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ *Salmonella* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment) ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีไมโครเพลทรีดเดอร์ มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่มีจำนวนมากและรวดเร็ว

1.2.5 ปรับชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในปริมาณมากโดยการประยุกต์ใช้ 96 well microplate และให้ผลวิเคราะห์ภายในเวลา 24 ชั่วโมงโดยให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำเทียบเท่าวิธีการมาตรฐาน

1.2.6 เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* สำหรับอุตสาหกรรมของไทยทำให้สามารถลดการนำเข้าชุดวิเคราะห์เชื้อสำเร็จรูปและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น

1.2.7 พัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์และตรวจนับการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออก

ผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลาในอาหารเหลวไม่จำเพาะมาตรฐานชนิดต่างๆ

1.3.2 ศึกษาการทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนำเข้าด้วยวัสดุเหลือใช้ ราคาถูก โดยมุ่งเน้นให้สามารถเร่งการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา ที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนำเข้ามาตรฐาน

1.3.3 ศึกษาหาชนิดของพีเอชอินดิเคเตอร์และความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สามารถจำแนกความแตกต่างของสีที่เปลี่ยนแปลงไปตามการปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลและการใช้กรดอะมิโนและสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงสีกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้องค์ความรู้ใหม่ในการปฏิรูปการวิเคราะห์ซัลโมเนลลาโดยพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนด้วยการทดแทนด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรที่หาได้ในประเทศไทยร่วมกับเทคนิคการประยุกต์ใช้ สเปกโตรโฟโตเมตรีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสจากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจำเพาะ และเป็นพื้นฐานความรู้ในการพัฒนาสร้างนวัตกรรมชุดตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น

1.4.2 เพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแนวทางในการต่อยอดไปสู่การแปรรูปผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น

1.4.3 ได้ระบบการตรวจวิเคราะห์และสูตรอาหารสำหรับซัลโมเนลลา ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาที่มีประสิทธิภาพ มีระยะเวลาในการรอผลวิเคราะห์สั้น แม่นยำ ทำให้อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องมีความมั่นใจในการส่งสินค้าสู่ผู้บริโภค

1.4.4 สร้างเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ระดับจุลภาคทำให้สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้ปริมาณมากและมีความถี่เพิ่มขึ้น

1.4.5 เพิ่มโอกาสในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาได้อย่างแม่นยำและถูกต้อง เนื่องจากเป็นการ

วิจัยบูรณาการภาพรวมปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อดังกล่าว สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากซ้ำ สร้างความมั่นใจให้กับผลการวิเคราะห์ ลดความผิดพลาดที่เกิดจากการวิเคราะห์ การตีกลับของสินค้าเป็นศูนย์

1.4.6 เทคนิควิธีการตรวจวิเคราะห์ ผู้ประกอบการและลูกค้าให้การยอมรับเทียบเท่าได้กับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน

1.4.7 โรงงานอุตสาหกรรมทั้งขนาดกลางและขนาดเล็ก สามารถนำนวัตกรรมไปประยุกต์ใช้ได้จริงเพื่อทดแทนเทคโนโลยีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งราคาค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูงเนื่องจากต้องนำเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อจากต่างประเทศ

1.4.8 ได้วิธีการที่มีการพัฒนาให้ได้มาตรฐาน เป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

2.1 จุลชีววิทยาของซัลโมเนลลา
2.2 ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลล่าแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิสัยการเจริญเติบโต
2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของซัลโมเนลลา (*Salmonella*)
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา
2.5 การปนเปื้อนจากซัลโมเนลลาและการป้องกัน
2.6 วิธีการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.
2.7 วิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* spp.
2.8 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับซัลโมเนลลา

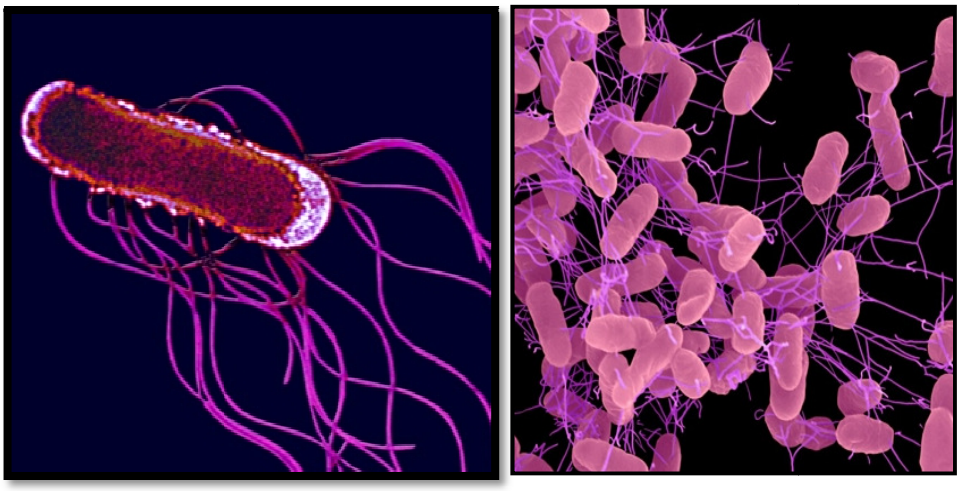
ในบรรดาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดในคนนั้นซาลโมเนลล่าเป็นแบคทีเรียที่มีการวิวัฒนาขนานไปกับวิวัฒนาของมนุษย์แต่เดิมแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสัตว์และก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีเพียงไม่กี่ชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์โดยตรงและอาศัยอยู่ในคนแต่ปัจจุบันนี้ซาลโมเนลล่าจากสัตว์หลายชนิดทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและอาศัยเป็นพาหะอยู่ในคนได้เป็นเวลานานทั้งนี้เพราะซาลโมเนลล่าสามารถปรับตัวได้ดีทำให้สามารถอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นเรื่องของเทคโนโลยีใหม่ๆเช่นการผลิตอาหารกระป๋องอาหารแช่แข็งหรือขบวนการต่างๆในการเตรียมอาหารสำเร็จรูปทั้งอาหารที่ยังไม่สุกและอาหารที่สุกแล้วซึ่งในปัจจุบันเกิดขึ้นมากมายเพื่อสนองความต้องการของประชาชนที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยเป็นครัวอาหารโลกจำเป็นอย่างยิ่งต้องควบคุมป้องกันพร้อมทั้งหาทางหยุดยั้งซัลโมเนลลามิให้แพร่กระจายไปในอาหารสิ่งแวดล้อมต่างๆเพิ่มขึ้นดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาจึงเป็นสิ่งที่ทางโรงงานอุตสาหกรรมอาหารไม่สามารถที่จะหลีกเลี่ยงได้

2.1 จุลชีววิทยาของซัลโมเนลลา

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ที่พบได้ทุกหนทุกแห่งและทั่วโลกโดยเข้ามามีบทบาทไม่เฉพาะแต่ในคนและสัตว์เลี้ยงของคนเท่านั้นหากยังพบได้ในสัตว์ทั่วๆไปเช่น

สัตว์เลื้อยคลานนกและแมลงต่างๆ เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นไม่สร้างสปอร์ (รูปที่ 2.1) อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E.coli*

Salmonella เดิมเรียกว่า paratyphoid bacteria เป็นจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ พบได้ทั่วไปในแต่ละปีถือว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นกับประชากรต่างๆ ทั่วโลก แม้ว่ามีผู้วิจัยหลายท่านได้กล่าวถึงนิเวศวิทยา สรีระวิทยา ระบาดวิทยา และวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับการแยกและการตรวจพิสูจน์ *Salmonella* ที่ได้มีการตีพิมพ์ไปแล้วจำนวนมาก แต่วิวัฒนาการของ *Salmonella* ทำให้จำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้ทันสมัยอยู่เสมอเพื่อนำมาซึ่งความรู้ใหม่ๆ เกี่ยวกับ *Salmonella* และผลเสียหายของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* ที่มีความสัมพันธ์กับอาหาร



(ก) (ข)

รูปที่ 2.1 แฟลกเจลลา (flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (ก)
และลักษณะของเชื้อ*Salmonella*เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข)

ประวัติของเชื้อซัลโมเนลล่าเดิมเรียกว่า paratyphoid bacteria ส่วนชื่อสกุลได้เปลี่ยนไปโดยตั้งให้เป็นเกียรติ D.E.Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกันซึ่งได้ร่วมกับ Theobald Smith ที่ได้ทำการแยกเชื้อนี้จากสุกรที่ป่วยโรคอหิวาต์เชื้อที่แยกได้นี้ต่อมาเรียกว่า *Salmonella* Choleraesuis ใน ค.ศ.1885 และในปี ค.ศ.1888 Gartner แยกเชื้อได้จากม้ามผู้ป่วยที่ตายด้วยโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศเยอรมันคือ *Salmonella* Enteritidis ปี ค.ศ. 1892 Loffler แยก *Salmonella* Typhimurium ได้จากหนูขาวที่มีอาการโรคคล้ายไทฟอยด์จนกระทั่ง Schottmiille สามารถแยกถึงความแตกต่างระหว่าง *Salmonella* Paratyphi A และ *Salmonella* Paratyphi B

ได้ในปี 1990 การค้นพบ *Salmonella* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสัตว์ที่ป่วยด้วยโรคต่างๆ มีมากขึ้นทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เหล่านี้จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1926 Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมกันจัดทำหนังสือ Kauffmann – White Schema ขึ้นเพื่อเป็นเอกสารสำคัญแยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* (Ewing, 1986)

ในยุคต้นของศษตวรรษที่ 19 นักพยาธิวิทยาคลินิคในฝรั่งเศส ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของการเป็นแผลในลำไส้ของมนุษย์กับการเป็นโรคติดต่อเป็นครั้งแรก ซึ่งโรคที่ถูกตรวจพบได้แก่ ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ต่อมาได้มีการแยกและอธิบายลักษณะของ typhoid bacillus โดยชาวยุโรป พบว่า เชื้อนี้เป็นต้นเหตุของไข้ไทฟอยด์ และต่อมาได้พิสูจน์ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพาราไทฟอยด์ (paratyphoid organisms) (D' Aoust, 1989; Le Minor,1981) คศ. 1885 D.E. Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกัน ร่วมกับ Theobald Smit ได้แยก *Bacillus cholera – sius* ในปัจจุบันได้แก่ *Salmonella enteric* ซีโรวาร์ *Choleraesuis* จากสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์ (Le Minor, 1981) ค.ศ. 1888 Gartner แยกเชื้อ *S.* Enteritidis จากม้ามของผู้ป่วยที่ตายด้วยโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศเยอรมัน ค.ศ. 1892 Loffler แยกเชื้อ Typhimurium ได้จากโรคที่คล้ายไทฟอยด์ในหนูขาว ต่อมาการพัฒนาด้านความรู้เกี่ยวกับเชื้อนี้มีมากจนกระทั่ง Schottmiller สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *S.* Paratyphi A และ *S.* Paratyphi B ได้ในปี ค.ศ. 1900 (อรุณ บ่างตระกูลนนาท์และคณะ, 2540)

การค้นพบ *Salmonella* สายพันธุ์ใหม่มีมากขึ้น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เหล่านี้ White (1926) เป็นคนแรกที่เสนอ antigenic scheme สำหรับการแบ่งประเภทของ *Salmonella* และต่อมา Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมมือกับอนุกรรมการจัดทำหนังสือ Kauffmann-White Schema ขึ้นในปี ค.ศ. 1955 เพื่อใช้แยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* ซึ่งมีการรวบรวม *Salmonella* ไว้มากกว่า 2,400 ซีโรวาร์ (Popoff et al., 2000) การตั้งชื่อ *Salmonella* ได้กำหนดเป็นมาตรฐานตามข้อตกลงระหว่างชาติ โดยเห็นพ้องต้องกันใช้ชื่อนี้ และเริ่มใช้ชื่อนี้ทั่วไปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1955 เป็นต้นมา (อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2540)

2.1.1 สัณฐานวิทยา

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7 – 1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0 – 5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anarobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) และบางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟต์ เช่น *S.* Gallinarum อุณหภูมิที่เจริญได้ 37 – 45 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เจริญได้ในช่วงความเป็น กรด – ด่าง 4.5 – 9.0 ความชื้น (A_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ประมาณ 0.93 – 0.99 ภายใต้อุณหภูมิและอาหารที่เหมาะสม *Salmonella* ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 นาที หรือที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลาย *Salmonella* เพียงแต่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น

2.1.2 การเรียกชื่อ

การเขียนหรือพิมพ์ชื่อซีโรวาร์เปลี่ยนจากการใช้ตัวอักษรเล็กและตัวพิมพ์เอียงเป็นอักษรใหญ่ เช่น *Salmonella typhimurium* เปลี่ยนเป็น *Salmonella* Typhimurium นอกจากนี้ในบางซีโรวาร์ มี Phage เข้าไปแทนที่ทำให้ antigen เปลี่ยนไปซึ่งระบบเดิมจะเปลี่ยนชื่อเป็นซีโรวาร์ใหม่ แต่ละระบบใหม่จะไม่มีการเปลี่ยนชื่อซีโรวาร์ เช่น *Salmonella* ซึ่งมี O antigen 3,10 เมื่อมี phage E15 และ phage E34 เข้าแทรกจะทำให้ factor O:15 หรือ O:15, 34 เข้าแทนที่ factor O:10 ซึ่งเดิม *Salmonella* O:3, 15 จะจัดอยู่ใน group E_2 และ *Salmonella* O:3, 15, 34 จะจัดอยู่ใน group E_3 แต่ในปัจุบันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ O:3, 10 (groupE_1) เท่านั้น แต่ให้เขียน factor O:15 และ O:15, 34 อยู่ในวงเล็บ เช่น

ระบบเดิม S. Anatum3, 10:e, h:1,6 (มี O Antigen group E_1)

S. Newington3, 15:e, h:1,6 (มี O Antigen group E_2)

S. Minneapolis3, 15, 34:e, h:1,6 (มี O Antigen group E_3)

ระบบใหม่ จัด *Salmonella* O group E2 และ E3 รวมกับ group O:3, 10(E_1)

โดยให้เขียน factor O:15 และ factor O:15, 34 อยู่ในวงเล็บ

ดังนั้น *S.* Anatum, *S.* Newington และ *S.* Minneapolis จึงมีชื่อเดียวกัน

คือ *S.* Anatum 3,10(15)(15,34):eh:1,6 (อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2540)

2.1.3 การจัดแบ่งประเภท

จีนัส *Salmonella* จัดอยู่ใน family Enterobactericeae ภายในจีนัสเดียวกันตามรายงานของ WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur ประเทศฝรั่งเศส รายงาน

เรื่อง Antigenic formulas of the Salmonella serovars 1987 ได้จัดอนุกรมวิธานของ genus Salmonella และสรุปว่า Salmonella มีเพียง 1 species และแบ่งออกเป็น 7subspecies คือ I, II, IIIa , IIIb, IV, V และ VI มีรายละเอียดดังนี้

Subspecies I	Salmonella enterica subspecies enterica
Subspecies II	Salmonella enterica subspecies salamae
Subspecies IIIa	Salmonella enterica subspecies arizonae
Subspecies IIIb	Salmonella enterica subspecies diarizanae
Subspecies IV	Salmonella enteric subspecies bongori
Subspecies VI	Salmonella enterica subspecies indica

จำนวนซีโรวาร์ ของ *Salmonella* แต่ละ subspecies (1987) มีดังนี้

Subspecies I	จำนวน 1,299	ซีโรวาร์
Subspecies II	จำนวน 445	ซีโรวาร์
Subspecies IIIa	จำนวน 91	ซีโรวาร์
Subspecies IIIb	จำนวน 296	ซีโรวาร์
Subspecies IV	จำนวน 59	ซีโรวาร์
Subspecies V	จำนวน 14	ซีโรวาร์
Subspecies VI	จำนวน 9	ซีโรวาร์
รวม	2,213	ซีโรวาร์

Subspecies I เป็น *Salmonella* ที่พบในคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งพบมากที่สุดจำนวน 1,299 ซีโรวาร์ สำหรับ subspecies II - VI เป็น *Salmonella* มาจากสัตว์เลือดเย็นและสิ่งแวดล้อม ประมาณ 914 ซีโรวาร์ ต่อมา World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella (Institut Pasteur, ประเทศฝรั่งเศส) ได้จัด Taxonomy of genus *Salmonella* ใหม่สรุปว่า *Salmonella* มี 2 สปีชีส์ สปีชีส์ที่ 1 ได้แก่ *S. enterica* แบ่งออกเป็น 6 subspecies 2,480 ซีโรวาร์สปีชีส์ที่ 2 ได้แก่ *S. bongori* มี 21 ซีโรวาร์ มีรายละเอียดดังนี้ (Popoff, 2001)

S.enterica subsp. enterica(I)	จำนวน 1,478	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.salamae (II)	จำนวน 498	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.arizonae (IIIa)	จำนวน 94	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.diarizonae (IIIb)	จำนวน 327	ซีโรวาร์

S.enterica subsp.houtenae (IV)	จำนวน 71	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.indica (V)	จำนวน 12	ซีโรวาร์
S. bongori	จำนวน 21	ซีโรวาร์
รวม	2,501	ซีโรวาร์

2.1.4 ลักษณะทางซีรั่มวิทยา

ลักษณะของแอนติเจนที่สำคัญของ *Salmonella* ใช้เป็นคุณสมบัติในการทดสอบทางซีรั่มวิทยา มี 3 ชนิด ดังนี้

1. โอ แอนติเจน หรือ โซมาติก แอนติเจน (O or somatic antigen) เป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซล์ ประกอบด้วยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์โปรตีนและฟอสโฟลิปิด มีคุณสมบัติคือ สามารถทนความร้อนที่ 100°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ทนต่อกรดเจือจาง ปฏิกริยาของโอ แอนติเจนกับแอนติซีรั่มจำเพาะ จะมีลักษณเป็น granular โอ แอนติเจนของ *Salmonella* ถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ตามแบบของ Kauffiman White Schema
2. เอช หรือแฟลกเจลลา แอนติเจน (H or flagella antigen) เป็นส่วนประกอบของสารประเภทโปรตีน มีคุณสมบัติ ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนอุณหภูมิ 60°C แอลกอฮอล์และกรด ปฏิกริยาของเอช แอนติเจนกับแอนติซีรั่มที่จำเพาะ จะมีลักษณะเป็น floccular เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากจะมี H แอนติเจน 2 เฟส ได้แก่ เฟส 1 เรียกว่า เฟสจำเพาะ (specific phase) และเฟส 2 เรียกว่า เฟสไม่จำเพาะ (non specific phase) เพราะอาจตรวจไม่พบได้
3. วีโอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นแอนติเจนที่คลุมอยู่รอบนอกโอ แอนติเจน คุณสมบัติของวีโอ แอนติเจน คือถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน กรด หรือฟีนอล โดยปกติเชื้อ *Salmonella* ที่มีวีโอ แอนติเจน จะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มีวีโอ แอนติเจน เชื้อ *Salmonella* ที่มีวีโอ แอนติเจนได้แก่ *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C และ *S.* Dublin

2.1.5 การทำให้เกิดโรค

Salmonella สามารถก่อให้เกิดโรคได้ดีในผู้ที่มีความต้านทานต่ำ หรือได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเป็นจำนวนมาก สาเหตุทั่วไปของการติดเชื้อ เกิดจากการับประทานอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการหรือ ไม่มีอาการของโรคปรากฏอาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* จำแนกออกเป็น 3 แบบคือ

2.1.5.1 Enteric fevers ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของ ไข้ไทฟอยด์ ได้แก่ *S.* Typhi เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไข้พาราไปฟอยด์ได้แก่ *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B, *S.* Paratyphi C ไข้

ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์จะเกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น สาเหตุที่สำคัญ ในการติดเชื้อคือได้รับเชื้อปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่มเชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ไปตามทางเดินอาหาร ต่อมน้ำเหลือง และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ผู้ป่วยที่มีอาการเฉียบเพลัน สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกระแสโลหิต เชื้อสามารถเข้าไปยังอวัยวะต่างๆ ได้รวมทั้งไต ไขกระดูก ลำไส้ ถุงน้ำดี เชื้อถูกขับออกมากับอุจจาระ และอาจพบได้ในปัสสาวะ เชื้อทำให้มีอาการอักเสบของ lymphoid tissue ต่างๆ บางครั้งทำให้เยื่อหุ้มกระดูกปอดมีการอักเสบได้ ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 10-14 วัน ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 10^6 CFU (Fall, 2000) ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อย ตามตัว เซื่องซึม เบื่ออาหาร มีอาการท้องอืดหรือท้องผูก ม้ามโต ต่อมาอาจมีอาการอุจจาระร่วง อาจมีเลือดปนกับอุจจาระด้วย ถ้ามีการทำลายของเยื่อบุลำไส้เป็นจำนวนมากอาจทำให้เกิดลำไส้ทะลุได้ ระยะของ ไข้ Enteric fevers นานประมาณ 3 – 4 สัปดาห์ โรคพาราไทฟอยด์มีอาการของโรคคล้ายไทฟอยด์แต่จะรุนแรงน้อยกว่า จะก่อให้เกิดอาการ อุจจาระร่วงภายหลังรับประทานอาหารประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง

2.1.5.2 Septicemia เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรงสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการของโรคอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้สูงเป็นระยะๆ ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม อาจทำให้เกิดอาการปวดบวมเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อบุลิ้นหัวใจอักเสบ เชื้อที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S.* Choleraesuis

2.1.5.3 Gastroenteritis หรือ Enteritis เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากจะทำให้เกิดอาการแบบนี้โดยเชื้อปนเปื้อนเข้าไปกับอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ นมและผลิตภัณฑ์นม หรือสิ่งอื่นๆ ผู้ป่วยเมื่อรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปเชื้อจะแทรกเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อบุลำไส้ใหญ่ และลำไส้เล็กส่วนกลาง ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 6 – 48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 10^8 CFU (Fall, 2000) ผู้ป่วยจะมีอาการ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีไข้เล็กน้อย

2.1.6 ระบาดวิทยา

การปนเปื้อนในอาหารเป็นวิธีการหลักของการส่งผ่าน non – typhoidal *Salmonella* เพราะว่า Salmonellosis เป็นโรคของสัตว์ที่ติดต่อมาถึงคนได้และมีสัตว์ที่เป็นพาหะจำนวนมาก สัตว์ที่เป็นพาหะมากที่สุดได้แก่ ไก่ หมูและวัว นอกจากนี้สัตว์เลี้ยงและสัตว์อื่นๆ ทั่วๆ ไปก็เป็นพาหะของเชื้อนี้ เพราะว่า *Salmonella* สามารถอยู่รอดได้ในเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ยังไม่ผ่านความร้อน ผลิตภัณฑ์จากสัตว์จึงเป็นพาหะหลักของการส่งผ่าน *Salmonella* (Giannelia, 2000)

2.2 ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลล่าแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิสัยการเจริญเติบโต

ซัลโมเนลล่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นไม่สร้างสปอร์อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E.coli* สมาชิกในสกุลนี้เจริญเติบโตในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแซ่รอบตัว (peritrichous flagella) และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคน

2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

ซัลโมเนลลาอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น นกสัตว์เลื้อยคลานสัตว์เลี้ยงคนและบางทีก็พบในแมลงแม้ว่าแหล่งกำเนิดของเชื้อคือลำไส้ของสัตว์แต่บ่อยครั้งที่พบเชื้อซัลโมเนลล่าตามร่างกายส่วนอื่นๆของสัตว์ด้วย (Jay, 1996) เนื่องจากสัตว์จะปล่อยเชื้อซัลโมเนลล่าผ่านทางอุจจาระซึ่งจะแพร่ผ่านแมลงและสัตว์อื่นๆ ขยายวงกว้างออกไปด้วยเหตุนี้เชื้อซัลโมเนลล่าอาจพบในน้ำโดยเฉพาะในน้ำสกปรกและในอาหารที่มีแมลงวันตอมเมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารและน้ำที่มีเชื้อนี้เข้าไปบางครั้งจะแสดงอาการป่วยออกมาแต่บางครั้งก็กลายเป็นพาหนะ (carrier) คือไม่แสดงอาการป่วยทั้งๆที่มีเชื้อซัลโมเนลล่าอยู่ในร่างกายมนุษย์ผู้นั้นอาจกลายเป็นพาหะของเชื้อต่อไปมนุษย์และสัตว์ขับเชื้อซัลโมเนลล่าออกจากทางเดินอาหารทางอุจจาระ อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะได้ทำการสำรวจอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารที่ปฏิบัติงานในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งพบอัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าสูงสุดร้อยละ 15.38 อัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าสูงสุดในฤดูร้อนและต่ำสุดในฤดูฝน (อรุณบ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2545) เชื้อซัลโมเนลล่าในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์สามารถแพร่กระจายไปในดินน้ำและสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้หลายทางซึ่งจะเป็นอันตรายอย่างยิ่งถ้านำสัตว์ที่มีเชื้อซัลโมเนลล่ามาใช้เป็นอาหารทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ

สถานการณ์ปัจจุบันในประเทศไทยที่ยังขาดการบริการทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรค Salmonellosis ได้ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว สวนทางกับการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์และอาหารสำเร็จรูปที่เห็นความสำคัญของการควบคุมคุณภาพด้านจุลลินทรีย์มากน้อยต่างกันตลอดจนการเคลื่อนตัวของประชากรเข้าสู่เมืองใหญ่ๆ และการเกิดธุรกิจการจำหน่ายอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งปรากฏให้เห็นอยู่โดยทั่วไปเหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรจะคาดคะเนได้ว่าหากยังไม่สามารถลดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเครื่องอุปโภคของคนแล้วการติดเชื้อจาก *Salmonella* จะมีแต่การเพิ่มขึ้นให้เป็นอุสรรคต่อความหวังในการนำสาธารณสุขที่ดีมาให้แก่ประชากรชาวไทย (พนิดาชัยเนตร, 2531)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา

2.4.1 อุณหภูมิ

ซัลโมเนลล่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแม้ว่าจะมีรายงานว่าเชื้อซัลโมเนลล่าในบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1991) ก็ตามสำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้คือ 49.5 องศาเซลเซียส (ICMSF, 1996) ด้วยเหตุนี้การปฏิบัติอย่างถูกต้องเพื่อเก็บรักษาอาหารร้อนหรืออุ่นอาหารเพื่อให้ปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลล่าตามที่ USDA/FSIS แนะนำจึงใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเกณฑ์ (แม้ว่าในทฤษฎีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจะสามารถทำลายเชื้อซัลโมเนลล่าได้แล้วก็ตาม)

2.4.2 pH

ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างกับการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่า พบว่าค่า pH ต่ำสุดที่ซัลโมเนลลาชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้อยู่ที่ pH 3.8 และ pH สูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วง pH ที่เชื้อซัลโมเนลล่าส่วนมากเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของซัลโมเนลล่าแต่ละสปีชีส์ด้วย จากการทดลองของชุงและก๊อฟเฟิร์ท (Chung and Goepfert,1970) พบว่ากรดที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อซัลโมเนลล่ากล่าวคือในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับ pH เชื้อซัลโมเนลล่าปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าการใช้กรดน้ำส้มหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อซัลโมเนลล่าไวต่อกรดน้ำส้มมากกว่ากรดเกลือและกรดซิตริก

2.4.3 วอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w)

มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่ากล่าวคือเชื้อซัลโมเนลล่าเจริญได้ในช่วงที่มี a_w แคบมากคือค่า a_w ต่ำสุดอยู่ที่ 0.94 ส่วนค่า a_w สูงสุดอยู่ในช่วง 0.99 – 1.00 ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่าเช่นมีอาหารเหมาะสมมี a_w เหมาะสมมีอุณหภูมิเหมาะสมเชื้อซัลโมเนลล่าสามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าปกติฉะนั้นปัจจัยร่วม (Combined effects) จึงมีความสำคัญในแง่ของการประยุกต์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลล่ามากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว

2.5 การปนเปื้อนจากซัลโมเนลลาและการป้องกัน

2.5.1 ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์อันเนื่องมาจากการระบาดของโรค Salmonellosis

การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์อาหารถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสังคมในเชิงเศรษฐศาสตร์และระบบสุขภาพของมนุษย์ในกรุงเทพมหานคร มีผลงานวิจัยเกี่ยวกับการ

ตรวจหาซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้า พบว่ามีซัลโมเนลลาจำนวน 30 ตัวอย่างจากทั้งหมด 40 ตัวอย่าง (75%) ฉะนั้นเพื่อความปลอดภัยควรบริโภคแหนมฉายรังสี

การตรวจพบซัลโมเนลลาปนเปื้อนในผักสด ทำให้ต่างประเทศระงับและสั่งห้ามนำเข้าสินค้าผักสดของประเทศไทย ช่วงปลายเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 ประเทศไทยได้รับแจ้งจากประเทศนอร์เวย์ห้ามนำเข้าสินค้าผักสดจากไทยเป็นการชั่วคราวจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สะระแหน่ ต้นหอมผักชีฝรั่ง ผักชี โหระพา ใบจันทร์หอม ผักคะแยง และใบกระเพราเนื่องจากตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาและอีโคไลปนเปื้อน ต่อมาเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 ประเทศเดนมาร์กได้ตรวจพบจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ในใบกระเพรา โหระพาและผักชีที่นำเข้าจากประเทศไทยและตามมาด้วยประเทศสวีเดนก็ตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในผักดังกล่าวเช่นกัน

ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการประเมินถึงผลกระทบค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เกิดจากอาหารเป็นพิษสูงกว่า 35 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี รวมไปถึงการสูญเสียประสิทธิภาพในการทำงาน (WHO, 2010) Economic Research Service (ERS) under United States Departmentof Agriculture (USDA) รายงานถึงจำนวนการแพร่ระบาดของโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียเป็นจำนวนเงินถึง 2,646,750,437 ดอลลาร์สหรัฐ (Frenzen, 2009) และในปี 2008 พบการระบาดของโรค salmonellosis ทำให้มีผู้ป่วยกว่า 52,826 รายและเกิดการสูญเสียเป็นมูลค่า 2.6 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ (Anon, 2009) ซึ่งการระบาดของโรค salmonellosis อันเนื่องมาจากเชื้อ *Salmonella*แสดงให้เห็นถึงระบบสุขลักษณะการผลิตและการสุขาภิบาลที่ไม่มีประสิทธิภาพซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella*

2.5.2 การควบคุมและการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella*

ต้นกำเนิดของโรค salmonellosis เกิดจาการปนเปื้อนของเชื้อ*Salmonella* ในวัตถุดิบจำพวกไข่ ไก่ วัว ที่มีการปนเปื้อนข้ามมายังผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อาหารที่พบว่าสามารถเป็นสาเหตุการเกิดโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี 1973-1978

ชนิดของอาหาร	จำนวนการระบาด (ครั้ง)
เนื้อวัว	77
เนื้อไก่	30
เนื้อไก่งวง	36
เนื้อหมู	25
ไข่	16
ผลิตภัณฑ์นม	50
ปลาและหอย	8
ขนมอบ	12
ผักและผลไม้	9
เครื่องดื่ม	4
อาหารจีน	2
อาหารแมกซิกัน	10
อาหารอื่นๆ	191

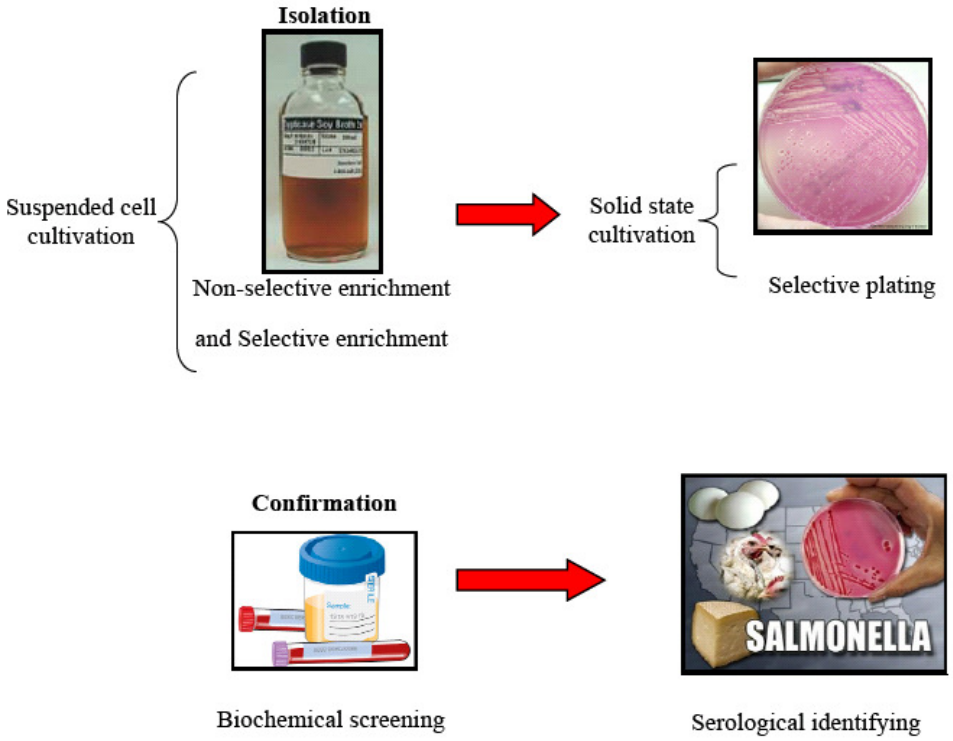
ที่มา: Ray (1996)

การระบาดของโรคนี้เกิดจากการรับประทานอาหารต่างๆ ที่อาจจะได้รับการปนเปื้อนของเชื้อโดยตรงหรือโดยอ้อมจากอุจจาระของสัตว์และมนุษย์ โดยการรับประทานอาหารดิบ หรือปรุงสุกไม่เพียงพอหรือเป็นอาหารที่ได้รับการปนเปื้อนซ้ำภายหลังการปรุงสุกด้วยความร้อน การปนเปื้อนแบบข้ามไปมา การปรุงอาหารภายในบ้านและร้านอาหาร ก็เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดโรคนี้ ในส่วนของการพบเชื้อในผลิตภัณฑ์ประเภทผักซึ่งเชื้อจะปนเปื้อนผ่านทางน้ำที่ไม่สะอาดมาใช้ในการรดผักหรือปุ๋ยต่างๆที่ใส่บำรุงพืชผักให้งอกงามหรือการล้างผักด้วยน้ำสกปรก

2.6 วิธีการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.

การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* เริ่มต้นจะทำให้ *Salmonella* แข็งแรงและเพิ่มจำนวน เนื่องจาก *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหารมีการบาดเจ็บหรืออ่อนแอเนื่องจากกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออาจมีปริมาณเชื้อน้อย แต่เป็นเชื้อที่ยังมีชีวิต และมีในปริมาณน้อย เมื่อเชื้อปนเปื้อนในอาหารและเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภคซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นและก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้ การ

มีเชื้อปนเปื้อนในอาหารน้อย รวมทั้งการใช้อาหารไม่เหมาะสมในการตรวจจะทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งจะทำให้เป็นการรายงานผลที่ผิดพลาดว่าอาหารชนิดนั้นปลอดภัยต่อผู้บริโภค



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella แบบดั้งเดิม

ที่มา: Andrews and Hammack (1998)

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella*แบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Andrews and Hammack, 1998; McLandsborough, 2005)

1. Pre-enrichment:ขั้นกระตุ้นให้เชื้อที่บาดเจ็บแข็งแรงและเพิ่มจำนวน(24 ชั่วโมง)
2. Selective enrichment: ขั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด(48 ชั่วโมง)
3. Selective plating: ขั้นแยกเชื้อบนวุ้นอาหารเลือกเฉพาะชนิด (48 ชั่วโมง)
4. Biochemical test: การทดสอบทางชีวเคมี (24 ชั่วโมง)
5. Serological test: การทดสอบทางซีโรวิทยา

ขั้นที่ 1) Pre-enrichment: ขั้นกระตุ้นให้เชื้อบาดเจ็บแข็งแรง

Pre-enrichment เป็นขั้นตอนเริ่มต้น ซึ่งตัวอย่างอาหารถูก enrichment ใน non-selective medium ในการส่งเสริมเซลล์ *Salmonella* ที่ได้รับบาดเจ็บให้กลับสมบูรณ์ดังเดิม อีกทั้งยังเสถียรต่อสภาวะทางกายภาพและยอมให้มีการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* และจุลินทรีย์อื่นๆ Pre – enrichment broth มีหลายชนิดได้แก่ buffer peptone water, nutrient of lactose broths (ICMSF,1978), lactose broth, tryptone soya broth, nutrient broth ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับมาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิง ดังตารางที่ 2.2 ถูกใช้เป็น Pre – enrichment broth สำหรับตัวอย่างอาหารเกือบทั้งหมด ถึงแม้จะมีตัวอย่างอาหารบางชนิดที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะมากกว่า แต่ดูเหมือนว่าเวลาและอุณหภูมิมีความสำคัญมากกว่าการเลือกชนิดของ Pre – enrichment broth ระยะเวลาในการบ่มของ Pre – enrichment ทั่วไปๆคือ 16 – 20 ชั่วโมง (D'Aoust et al., 1992) Pre – enrichment broth ควรที่จะทำให้ Salmonella เจริญได้อย่างน้อย 10^5 CFU/ml เพื่อให้อยู่รอดจากความเป็นพิษของ selective enrichment media (Chen et al., 1993)

ตารางที่ 2.2 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการกระตุ้นและคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*

Medium	**Commodity**	**Standard Organization**
Bufferd Peptone Water (BPW)	General purpose	ISO, IDF
BPW + Casein	Chocolate	ISO, APHA, AOAC/FDA
Lactose Broth (LB)	Eggs, frog legs	APHA, AOAC/FDA
LB + tergitol 7 or Triton X-100	Coconut, meat	APHA, AOAC/FDA
Skim milk + brilliant green	Cacao, chocolate, candy	AOAC/FDA
Tryptone Soya Broth (TSB)	Spices, dried yeast	AOAC/FDA
TSB + 0.5% potassium sulphate	Onion, garlic powder etc.	AOAC/FDA
Water + brilliant green	Milk powder	AOAC/FDA

ISO = International Organization for Standardization; IDF = International Daily Federation; APHA = American Public Health Association; AOAC = American Association of Analytical Chemists; FDA = Food and Drug Agency

ขั้นที่ 2) Selective enrichment: ขั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด

จุดมุ่งหมายของ Selective enrichment เป็นการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* และในเวลาเดียวกัน เป็นการลดจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ Salmonella ใน ISO Standard 6579 ทั้ง Rappaport-Vassiliadis (RV broth) และ Selenite cystine (SC) broth ถูกใช้เป็น enrichment ของ *Salmonella* การเพิ่มปริมาณของ Selenite cystine (SC) broth

ไม่มีผลให้เกิดการพบ *Salmonella* เพิ่มขึ้น (O'Donoghue and Winn, 1993) และในทางปฏิบัติเมื่อมีการใช้ enrichment medium เพียงตัวเดียวจะมีการเลือกใช้ RV broth หรือการดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อยู่เป็นประจำ เหตุที่ไม่นิยมเลือกใช้ Selenite cystine (SC) broth เพราะว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงมาก และมีการพัฒนา Selective enrichment broth ขึ้นมาใหม่ชนิดหนึ่งให้ชื่อว่า KIMAN พบว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่าและให้ผลดีกว่า SC broth สำหรับการแยกเชื้อ *Salmonella* จากผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก (Blivet et al., 1997) RV medium มีคุณสมบัติเหนือกว่า Selective enrichment media อื่นๆ (Allen et al., 1991; Maijala et al., 1992; June et al., 1996) Fries and Steinhof (1997) พบว่า จำนวนที่น้อยมากของ *S.* Enteritidis ซึ่งมีปนอยู่กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีจำนวนมาก สามารถตรวจพบโดย RV enrichment อย่างไรก็ตาม ก็มีรายงานว่าในการตรวจหา *Salmonella* ในเนื้อสัตว์ปีก tetrathionate brilliant green bile broth มีคุณสมบัติสูงกว่า RV broth (De Boer, 1998)

Waltman et al., (1993) แสดงถึงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม enrichment cultures คือ 24 ชั่วโมง D'Aoust et al., (1995) พบว่าการระงับการวิเคราะห์ *Salmonella* โดยการแช่เย็นของ pre-enrichment และ enrichment culture ในช่วงวันหยุด ไม่มีผลต่อการลดลงของการพบ *Salmonella* มีการศึกษายืนยันพบว่า motility enrichment บน Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium มีผลมากต่อการแยก *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น (O'Donoghue et al., 1992; O'Donoghue and Winn, 1993; Pless et al., 1993; Oggel et al., 1995; Bolderdijk and Milas, 1996; Afflu and Gyles, 1997; Schalch and Eisgruber, 1997) การตรวจพบ *Salmonella* โดยใช้ MSRV medium ทำได้ง่าย มีราคาถูกและทั้งผลบวกและผลลบทราบผลภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งง่ายกว่า Standard ISO method ของ buffered peptone water มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของ *Salmonella* เพิ่มขึ้นและส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของเส้นผ่านศูนย์กลางบน semi – solid enrichmenr media ปรากฏการณ์นี้เป็นผลในการทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้นลง

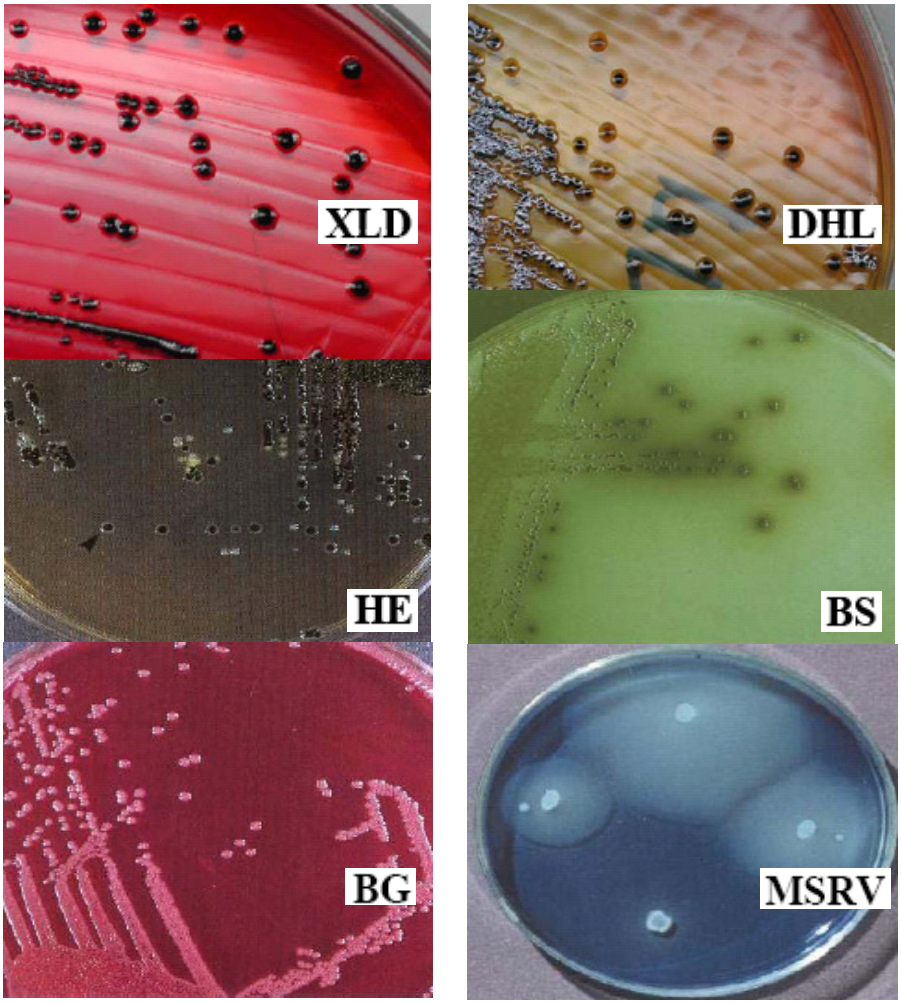
หลังจากกระตุ้นให้เชื้อซัลโมเนลล่า (ที่อาจมีในอาหาร) แข็งแรงขึ้นแล้วจึงนำมาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (เลือกเฉพาะเชื้อซัลโมเนลล่า) ตัวอย่างเช่นสี (dyes), tetrathionate, selenite อุณหภูมิระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อจะต้องเหมาะสมกับเชื้อซัลโมเนลล่าซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อซัลโมเนลล่าเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และปรากฏโคโลนีขึ้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบน selective differential plating media หรือนำไปจำแนกเชื้อโดยใช้เทคนิคอื่นตามปกติใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อประมาณ 16-24 ชั่วโมงอุณหภูมิที่ใช้บ่มเพาะเชื้อซัลโมเนลล่าโดยทั่วไปอยู่ที่ 35-40°C แต่บ่อยครั้งพบว่าการบ่มเพาะเชื้อที่

41-43°C มีโอกาสให้ได้เชื้อซัลโมเนลล่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไวต่ออุณหภูมิไม่เจริญรบกวนเชื้อซัลโมเนลล่า ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเลือกเฉพาะชนิดที่นิยมใช้ (Selective broth media) เช่น Tetrathionate ที่เติม Brilliant Green, Selenite Cystein, Gram Nagative (GN) broth และ Magnesium Chloride – malachite Green ของ Rappaport – Vassiliadis (Vassiliadis, 1983) ในทางปฏิบัติแนะนำให้ใช้ selective broth media มากกว่าชนิดหนึ่งและอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อมากกว่าหนึ่งสภาวะเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ การรายงานผลจะรายงานว่าตรวจพบ/ไม่พบในปริมาณตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจ

ขั้นที่ 3) Selective plating: ขั้นแยกเชื้อบนวุ้นอาหารเลือกเฉพาะชนิด

อาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ Bile salts, Deoxycholate, Brilliant Green, Bismuth Sulfide และสารปฏิชีวนะ อาหารเหล่านี้จำแนกเชื้อซัลโมเนลล่าโดยอาศัยลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนวุ้นอาหารสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ pH indicators ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออันเป็นผลจากความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลแลคโตสหรือซูโครสผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) นอกจากนี้ยังอาจตอบสนองต่อความสามารถของเชื้อที่จะสร้างก๊าซไข่เน่า (H_2S) หรือความสามารถในการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) ออกจากกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เป็นต้นวุ้นอาหาร (Plating media) ที่นิยมใช้ได้แก่ Brilliant Green ที่เติม/หรือไม่เติม sulphadiazine หรือ sulphapyridine, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar, Bismuth Sulfide (BS) Agar, Hektoen Enteric (HE) Agar, MacConkey, Deoxycholate Citrate (DC) Agar และ *Salmonella-Shigella* (SS) Agar ในการใช้วุ้นอาหารที่เลือกเฉพาะชนิดเพื่อแยกเชื้อซัลโมเนลลา แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดเช่นกัน

การ plating บน selective media เป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นและยอมให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะเป็น *Salmonella* ซึ่ง selective media มีหลายชนิด bismuth sulfite (Bis), brilliant green (BGA), Xylose lysine deoxycholate (XLD) และ hektoen enteric agar (Hek) นอกจากนี้การประเมินค่าของ plating media และ การพัฒนาอาหารเลี้งเชื้อชนิดใหม่สำหรับแยก *Salmonella* มีการพัฒนามาตลอด พบว่ายังไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไหนที่เหมาะสมที่สุด



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella*ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งต่างกัน

ขั้นที่ 4) Biochemical test: การทดสอบทางชีวเคมี

การกลั่นกรองเบื้องต้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่จำกัดชนิดของเชื้อเช่น Triple Sugar Iron Agar (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), Gilliesmedium I และ II หรือ TSI, Urea Agar เป็นต้น สำหรับการจำแนกเชื้อในขั้นต่อมาอาศัยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งตามปกติจะใช้เวลาหลายวันในการทดสอบขั้นแรกโดยทั่วไปทำการทดสอบ lysine, urease และ Indole ก่อนจากนั้นจึงทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีอีก 14 อย่างเพื่อจำแนกสมาชิกในตระกูล Enterobacteriaceae ในระดับ genus (ในทางการค้ามีอุปกรณ์ test kits สำหรับจำแนกเชื้อจำพวก Enterobacteriaceae ในชื่อการค้าต่างๆกัน เช่น Micro ID, Minitek, API20E, Entero-tube II และ Vitek เป็นต้น)

การทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนก *Salmonella* ได้พอสังเขป และถึงแม้ว่าจะแยกได้ *Salmonella* ที่มีลักษณะชีวเคมีใดก็ตาม ก็มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบ agglutimation กับ antisera ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2.3 ปฏิกริยาชีวเคมีของ Salmonella

Test or substrate	**Result**		**Salmonella species reaction**[a]
	Positive	**Negative**	
1. Glucose (TSI)	yellow butt	red butt	+
2. Lysine decarboxylase (LIA)	purple butt	yellow butt	+
3. H_2S (TSI and LIA)	blackening	no blackening	+
4. Urease	purple-red color	no color change	-
5. Lysine decarboxylase broth	purple color	yellow color	+
6. Phenol red ducitol broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	+[b]
7. KCN broth	growth	no growth	-
8. Malonate broth	blue color	no color change	-
9. Indole test	violet color atsurface	yellow color at surface	-
10. Polyvalent flagellar test	agglutination	no agglutination	+
11. Polyvalent somatic test	agglutination	no agglutination	+
12. Phenol red lactose broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	-[c]
13. Phenol red sucrose broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	-
14. Voges – Proskauer test	pink – to – red color	no color change	-
15. Methyl red test	diffuse red color	diffuse yellow color	+
16. Simmons citrate	Growth; blue color	No growth; no color change	v

[a]+, 90% or more positive in 1 or 2 days; -, 90% or more negative in 1 or 2 days; v, variable.

[b]Majority of *S.* Arizona cultures are negative.

[c]Majority of *S.* Arizonae cultures are negative.

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของเชื้อ Salmonella ในขั้นตอนทางชีวเคมี

ขั้นที่ 5) Serological test: การทดสอบทางซีโรวิทยา

แบคทีเรียซึ่งผ่านการทดสอบทางชีวเคมีมาแล้วว่าเป็น Salmonella มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบโดยอาศัยปฏิกริยาทางอิมมูนวิทยา เพื่อพิสูจน์ลักษณะแอนติเจนของเชื้อดังกล่าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *Salmonella* ได้เป็นอย่างดี การทดสอบในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิคทั่วไป นิยมใช้ Slide agglutination โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับแอนติซีรั่มที่จำเพาะ โดยการหยด antiserum 1 หยดบนสไลด์ จากนั้นถ่ายเชื้อที่สงสัยมาเกลี่ยผสมกับ antiserum ถ้ามีการตกตะกอน แสดงว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* sp.

ตารางที่ 2.4 การทดสอบยืนยันเชื้อ Salmonella

Biochemical reaction	Auto-agglutination[1]	Serological reaction	Interpretation
Typical	No	O-, Vi-, H- antigen positive	Strains considered to be *Salmonella*
Typical	No	All reactions negative	May be *Salmonella*
Typical	Yes	Not tested[2]	
No typical reactions	No/Yes	O-, Vi-, H- antigen positive	
No typical reactions	No/Yes	All reactions negative	Not considered to be *Salmonella*

[1] the agglutination of bacteria after tested with saline solution only

[2] the strain considered as auto-agglutination shall not be submitted to the following tests as the detection of the antigen is impossible.

ที่มา : ISO (2002)

จากข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้วิเคราะห์เชื้อ จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์และจำแนกเชื้อซัลโมเนลล่าแบบดั้งเดิมเป็นวิธีที่ใช้แรงงานและระยะเวลาประมาณ 7 วันเพียงเพื่อที่จะบอกว่ามีแนวโน้มว่าพบเชื้อซัลโมเนลล่าหรือไม่เท่านั้นดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าที่รวดเร็วกว่าเดิมตัวอย่างเช่นวิธี Fluorescent antibody (Cherry et al., 1975; Thomson, 1981; Insalata and Chordash, 1984) วิธี DNA/DNA hybridization assays (DNAH) (Fitts et al., 1983; Ewing, 1986) วิธี Enrichment Serology (Sperber and Diebel, 1969) วิธี Enzyme-linked immunosotbent assay (ELISA) (Minnich et al.,1982; Mattinglyand Gehle, 1984) วิธี Membrane filter – disc – immunoimmobilization (La Roche et al., 1981) และวิธี *Salmonella* phage tests (Welkos et al., 1974) แต่วิธี ELISA และวิธี DNAH (ไม่ว่าจะเตรียมจาก polyclonal หรือ monoclonal antibodies) และวิธี DNAH เป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจาก AOAC แล้ว (Flowers et al., 1986)

2.7 วิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* spp.

การตรวจวิเคราะห์ทั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารถือว่าเป็นมาตรฐานการปฏิบัติเพื่อให้แน่ใจในคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Conventional ใช้ระยะเวลานานหลายวันกว่าจะทราบผล ดังนั้นวิธีรวดเร็ว (rapid method) จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตรวจหาทั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ทั้งในวัตถุดิบและในผลิตภัณฑ์อาหาร (De Boer and Beumer, 1999)

วิธีรวดเร็วหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจหา Salmonella จากอาหารที่ได้ถูกนำมาใช้เป็น office methods โดย AOAC International และได้รับการรับรองโดย FDA อย่างไรก็ตามเมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี Conventional ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธีรวดเร็วนี้สามารถรายงานผลได้เลย วิธีรวดเร็วที่ได้รับการรับรองโดย AOAC International แสดงดังตารางที่ (Andrew et al., 1998)

ตารางที่ 2.5 วิธีรวดเร็วสำหรับการตรวจหา Salmonella ที่ได้รับการับรองโดย AOAC

Kit name	**Manufacture**	**Primary matrices**	**AOAC Official Methods of Analysis section number**
1-2 TEST	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	989.13
Assurance Gold Salmonella EIA	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	999.08
Assurance Salmonella EIA	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	992.11
VIP for Salmonella	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	999.09
VIDAS Immuno Concentation Salmonella	bioMerieux	All foods	2001.07;2001.08;2001.09
VIDAS Salmonella (SLM)	bioMerieux	Food and ingredients	996.08
GENE TRAK Salmonella Assay	Neogen Corporation	Food	987.10
Salmonella Tek	Organon Teknika	Food	986.35; 987.11; 993.08
TECRA Salmonella Unique	TECRA Diagnostics	Food and food related samples, environmental samples	2000.07
TECRA Salmonella VIA	TECRA Diagnostics	Food and food related samples, environmental samples	989.14

ที่มา : www.aoac.org (2004, October)

2.8 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับซัลโมเนลลา

ในปัจจุบันนี้ มีสูตรอาหารเหลวจำเพาะหลากหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกซัลโมเนลลาที่ดีขึ้นและยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาลง อาหารดังกล่าวยกตัวอย่างแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่มหลัก ตามบทบาทของสารยับยั้ง (inhibitor) ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง คือ กลุ่มที่มีสารยับยั้งคือ Malachite green และ $MgCl_2$ ตัวอย่างเช่น อาหาร RappaportVassiliadis soy broth (RVS) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มี Selenite เป็นสารยับยั้ง เช่น selenite cystine broth (SC) และ MüllerKauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTTn) (Taskilaet et al., 2012) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความจำเพาะและถูกต้องมากขึ้น แต่ยังคงกลุ่มสารยับยั้งหลักๆ ไว้ในสูตร อย่างไรก็ตามหลังจากบ่มในอาหารดังกล่าวแล้วจะต้องนำตัวอย่างไปเขี่ยบนอาหารแข็งจำเพาะ เพื่ออ่านผลการทดสอบในอีก 1 วันถัดมา ดังนั้นในการพัฒนาอาหารในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยอาศัยการวัดการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียนั้นๆ โดยวัดออกมาเป็นค่าต่างๆ อาทิเช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความขุ่น ค่าสี เป็นต้น (Shelef and Firstenberg-Eden, 1997)

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีปฏิริยาหนึ่งที่สำคัญในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งซัลโมเนลลาจัดอยู่ในกลุ่มด้วย ก็คือปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนโดยปฏิกิริยานี้เกิดจากการเปลี่ยนอะมิโนเป็นเอมีนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสและเอนไซม์ดังกล่าวจะได้รับการกระตุ้นเมื่ออยู่ในสภาวะกรดเมื่อกรดอะมิโนถูกย่อยเป็นเอมีนซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นด่างทำให้อาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์นั้นเปลี่ยนสี การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม จากการวิจัยของ Shelefet et al., (1998) ได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของกรดอะมิโนชนิดต่างๆได้แก่ ไลซีน อาร์จีนีน และออนิทีน ของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียอื่นๆในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยอาศัยเครื่อง BioSys สำหรับวัดค่า Transmittance ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร โดยพบว่าสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงค่า Transmittance

ซัลโมเนลลาและแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนได้ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดกับกรดอะมิโนหลักๆ 3 ชนิด ได้แก่ ไลซีน อาร์จีนีน และออนิทีน ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยกรดอะมิโนได้แตกต่างกันไป ในส่วนของซัลโมเนลลานั้น ทุกสายพันธุ์สามารถมีเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซีเลส ยกเว้น S. Paratyphi A ส่วนออนิทีนดีคาร์บอกซีเลสก็มีในซัล

โมเนลลาทุกสายพันธุ์ ยกเว้น S. Typhi และนอกจากนี้ ในแบคทีเรียชนิดอื่นบางสายพันธุ์ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาก็สามารถเกิดปฏิกิริยาไลซีน และออนิทีนดีคาร์บอกซีเลชั่น ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น แนวทางในการปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความจำเพาะกับซัลโมเนลลามากขึ้นก็คือการนำเอาสารยับยั้งมาช่วยลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในแบคทีเรียชนิดอื่นๆลง

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* เพื่อให้ได้ชุดวิเคราะห์ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และลดเวลาการดำเนินงานจากวิธีการปกติ (conventional method) ซึ่งใช้เวลานานจาก 3 – 5 วัน ให้เหลือเพียง 2 วัน ทั้งนี้ขั้นตอนที่พัฒนาศึกษาเป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไม่จำเพาะ (non – selective enrichment) และขั้นตอนการบ่งชี้จำเพาะการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารสีอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation) และอาหารสีจากปฏิกริยา H_2S production นอกจากนี้ในการตรวจติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อในรูปแบบจำนวนเซลล์ที่นับได้ (CFU/ml) เพื่อประเมินความสามารถในเงื่อนไขต่างๆ ของการเพิ่มจำนวนเชื้อถูกดำเนินการตรวจนับโคโลนีในระดับ microscale ด้วยเทคนิค Modified Drop Plate Technique (MDPT) โดยรายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

- *Salmonella* spp.
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter aerogen*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus vulgaris*
- *Enterococcus faecalis*,
- *Staphylococcus aureus*
- *Psuedomonas aeruginosa*
- *Shigella flexneri*
- *Shigella sonnei*
- *Serratia marcescens*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Listeria innocua*

3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 0.0001 g (Metter Toledo Model AG204, Switzerland)
- เครื่องชั่ง 0.01 g (Metter Toledo Model GG4002 - S, Switzerland)
- ตู้ปลอดเชื้อ (DWYER Series 0325, USA)
- ตู้เขย่าเชื้อ (New Brunwick Scientific, Enfield, CT)
- ตู้เย็น 4°C (Hitachi 35S I, Japan)
- ตู้บ่ม (Memmert Model ULM500, Japan)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Becthai and Hirayama Model HA300D, Japan)
- Microplate reader (M965, Metertech, Taiwan)
- พีเอชมิเตอร์ (S220 SevenCompact™, Mettler Toledo)
- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)
- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Nylon syringe filter membrane (13 mm diameter, 0.45 μm pore size, Filtrex, Thailand)
- Mechanical stepper (Biohit, Bohemia, NY, USA)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB, Lab M, UK)
- Trypticase soy agar (TSA, Lab M, UK)
- Soytone (USbiological, Salem, MA)
- Yeast extract (USbiological, Salem, MA)

3.1.4 กรดอะมิโนชนิดต่างๆ (USbiological, Salem, MA)

- ไลซีน
- ออร์นิทิน
- อาร์จินิน

3.1.5 พีเอชอินดิเคเตอร์ต่างๆ

- Bromocresol purple (BP; Fisher Scientific, Fair Lawn, Nj)
- Phenol red (PR; Acros organics, Fair Lawn, Nj)
- Thymol blue (TB; Acros organics, Fair Lawn, Nj)

3.2 การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหลวไม่จำเพาะสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella*

3.2.1 การออกแบบการทดลอง

ในงานวิจัยได้มีการออกแบบการทดลองเป็นแบบแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely random) ข้อมูลถูกตรวจสอบความน่าเชื่อถือโดยการใช้ analysis of variance (ANOVA) โปรแกรมทางสถิติ SPSS เวอร์ชั่น 16 ถูกนำมาใช้ในการคำนวณ ตัวแปรต้นหรือตัวแปรอิสระ พารามิเตอร์หลักที่ศึกษามี 2 ชนิดรวมถึงพารามิเตอร์ทางกายภาพ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ปริมาตร cultivation และคุณค่าทางอาหาร ชนิดของ medium (ทั้ง non – selective และ media ทางเลือกอื่น) ความเข้มข้นของ medium ซึ่งเป็นสัดส่วนของ TSB สำหรับตัวแปรตามเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) การเจริญเติบโตของ *Salmonella* และลักษณะการเจริญเติบโตเช่น maximum specific growth rate: μ_{max} และ first derivative maximum of the function: X_{max} เพื่อที่จะศึกษาระดับของ factor ที่แตกต่างกัน Duncan's multiple ถูกนำมาเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยถูกพิจารณาที่ 95% confidential interval ($\alpha = 0.05$) ทุกคู่ถูกเปรียบเทียบที่ระดับความแตกต่าง $P<0.05$

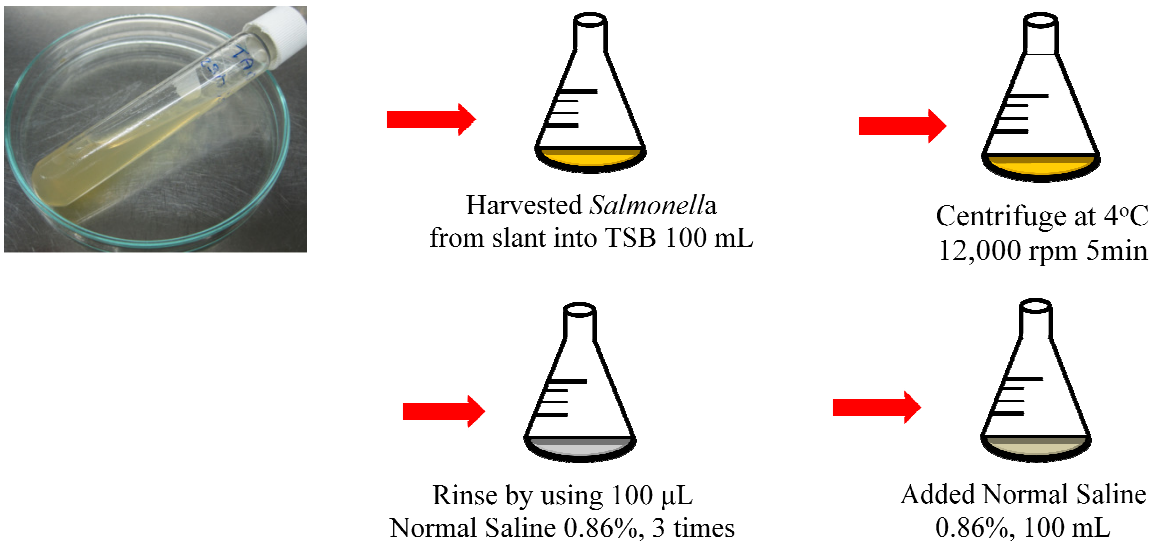
3.2.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อ *Salmonella* spp.

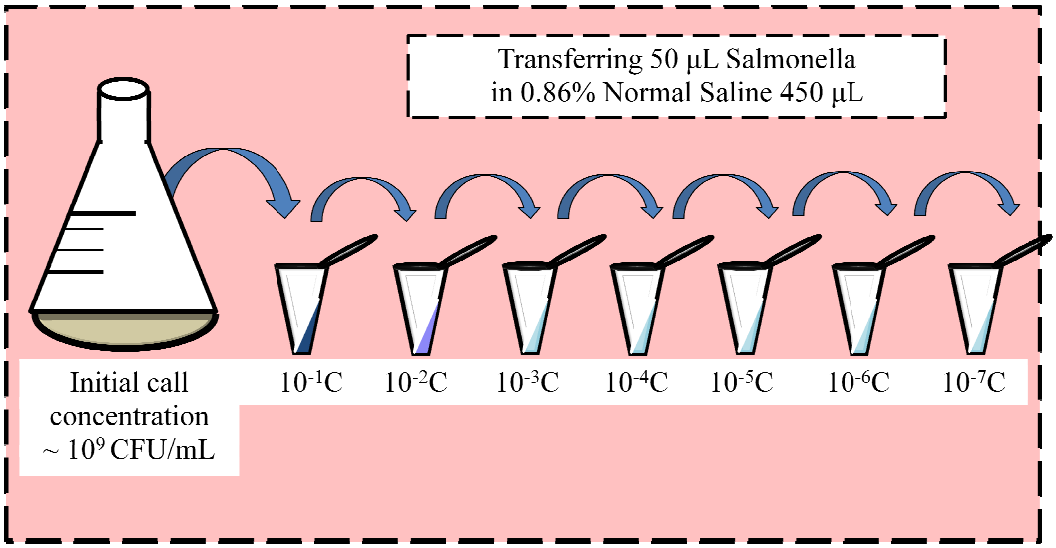
เชื้อ *Salmonella* บริสุทธิ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Thailand) ถูก streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเชื้อเดี่ยวดังกล่าวจะถูกเขี่ยด้วย loop ลงในอาหาร TSB ปริมาณ 100 ml และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ประมาณ 10^9 CFU/ml (Hayashi and Yamasaki, 1998; Karoonuthaisiri et al., 2009)

3.2.2.2 การเตรียม *Salmonella* spp. strain

เชื้อ *Salmonella* ใน stock ที่เตรียมจากการบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge เพื่อแยก cell pallet และ supernatant ที่ 12,000 rpm โดยใช้อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น rinse เชื้อ *Salmonella* ด้วย 100 μL ของ 0.86% น้ำเกลือ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำการ re-suspended cell ลงใน 100 ml ของ 0.86% น้ำเกลือ



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ *Salmonella*



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการทำ dilution ของเชื้อ *Salmonella*

และเมื่อนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วยการทำ dilution จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยอยู่ในระหว่าง10^2 – 10^8 CFU/ml

3.2.3 การเตรียม Media

3.2.3.1 การ vary ความเข้มข้นของ medium มาตรฐาน

ความเข้มข้นของอาหารเหลว (TSB) ที่ 5X, 4X, 3X, 2X, 1X, 0.5X, 0.25X และ 0.125X ถูกดำเนินการทดลอง โดยเตรียม stock อาหารเหลวความเข้มข้น 10X จำนวน 10 ml จากนั้นทำการเจือจางอาหารเหลวที่

ความเข้มข้น 5X และ 4X ด้วยการดึงอาหารเหลวจาก stock ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 5 และ 4 ml ผสมกับน้ำกลั่นที่ 5 และ 6 ml ตามลำดับ สำหรับการเตรียมอาหารเหลวที่ความเข้มข้น 3X และ 2X ดำเนินการโดยดึงอาหารเหลวจากความเข้มข้น 5X และ 4X ปริมาตร 3 และ 5 ml ผสมกับน้ำกลั่นที่ 2 และ 5 ml ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการเตรียม 1X, 0.5X, 0.25X และ 0.125X ของ standard media ด้วยการใช้สมการ 3.1

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (3.1)$$

3.2.3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การดำเนินการเตรียมไก่สกัดถูกเตรียมด้วยขั้นตอนที่แตกต่างกันไป 3 วิธี คือ การใช้อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที หรือ 60 นาที การใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และ การต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที เนื้อไก่ที่ได้ทำการบดถูกบรรจุลงในหลอด Duran tube ที่ผสมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทำการสกัดไก่ด้วยเทคนิคที่เงื่อนไขต่างๆ กันไป ตามขั้นตอนก่อนหน้านั้น หลังจากนั้นทำการแยก fiber ที่ติดอยู่ที่ไก่สกัดออกมา ปิเปตเชื้อ *Salmonella* ที่รู้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นจำนวน 100 μl ทำการ inoculation ลงในสารละลายไก่สกัดปริมาตร 5 ml ของแต่ละกรรมวิธีการเตรียมซึ่งมี 3 วิธี เมื่อนั้นทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex mixer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยในระหว่างการบ่ม ทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ชั่วโมง ด้วยการปิเปตตัวอย่างออกมาเพื่อหาปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค MDPT ที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้

3.2.3.3 การแปรเปลี่ยนทางเลือกอาหารเหลวชนิดอื่น

ทางเลือกอาหารชนิดอื่นถูกสกัดโดยการใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที ตัวอย่างที่สนใจในการสกัดทั้งหมด 13 ตัวอย่าง เพื่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* ประกอบไปด้วย ไก่, หมู, ปลาน้ำจืด, ปลาน้ำเค็ม, กุ้ง, หอยแมลงภู่, ปลาหมึก, เห็ด, 1% ของไข่ขาว, MSG 1% และ 0.5% จากนั้นทำการปิเปต 100 μl ของความเข้มข้นของ *Salmonella* ลงในตัวอย่างที่สกัดได้ที่ปริมาตร 5 ml ผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยในระหว่างการบ่ม ทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ชั่วโมง ด้วยการปิเปตตัวอย่างออกมาเพื่อหาปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค MDPT ที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้

รูปที่ 3.3 วัตถุดิบอาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นอาหารทางเลือกอื่นแทน TSB เพื่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella*

3.2.4 การติดตามการเจริญเติบโตโดยการใช้ Logistic Model

3.2.4.1 ค่า Maximum specific growth (μ_{max})

ขั้นตอนการคำนวณถูกดำเนินการโดยปริมาณเชื้อที่นับได้ถูกป้อนข้อมูลลงใน Excel file จากนั้นใช้โปรแกรม SigmaPlot 10.0 และนำข้อมูลจาก Excel file บรรจุลงใน work sheet ของโปรแกรม ทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่มกับปริมาณเชื้อที่นับได้ จากนั้น create กราฟเพื่อดำเนินการ run โปรแกรมให้ได้ค่า Maximum specific growth rate (μ_{max}) ของแต่ละเงื่อนไขการทดลองต่างๆ คำนวณค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ด้วยสมการที่ 3.2 จากค่าที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรม

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-(\frac{x - x_0}{b})}} \qquad (3.2)$$

y_0 = ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Salmonella*

a = ปริมาณเชื้อสูงสุดของ *Salmonella* ที่สามารถเจริญเติบโตได้

x_0 = first derivative maximum of the function

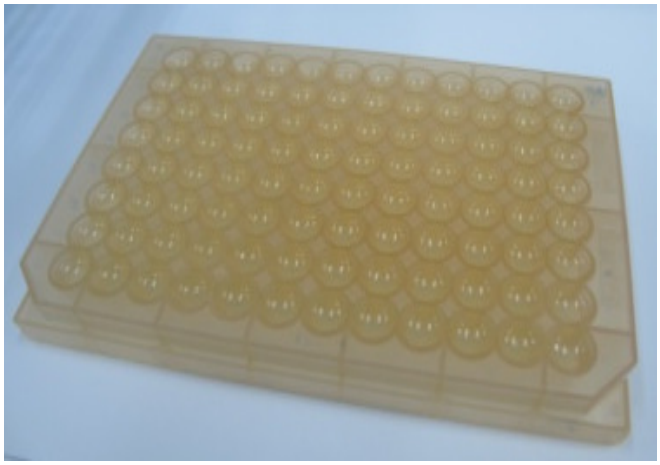
b = ค่าความชันของกราฟ

μ_{max} = อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด, $\frac{1}{b}$ (h^{-1})

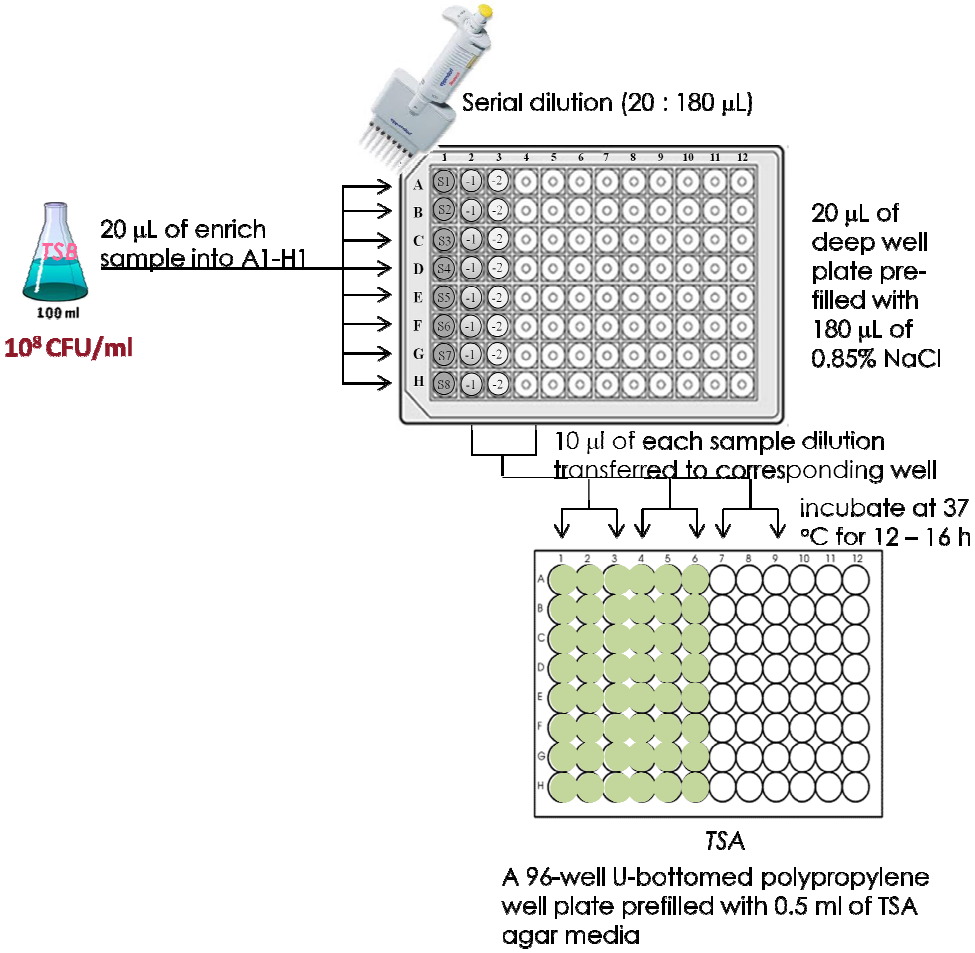
3.3 การพัฒนาเทคนิคเพื่อการนับจำนวนด้วย Modified Drop Plate Technique (MDPT)

ในการทดลองได้เลือกใช้ *S.* Typhi เป็น model ในการศึกษา โดยเชื้อดังกล่าวถูกนำมาทำให้มีการเจริญเติบโตในอาหาร TSB และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วง 8 – 9 log CFU/ml เซลล์เหล่านี้ถูกนำมานับโดยการใช้เทคนิค spread plate ที่เป็นวิธีการ conventional method เปรียบเทียบกับวิธีการที่นำเสนอซึ่งเป็นแบบ MDPT

สำหรับเทคนิค spread plate เชื้อ *S.* Typhi ที่ปริมาณเชื้อ 8 – 9 log CFU/ml ถูกทำการเจือจางให้อยู่ที่ประมาณ 10^2 – 10^5 CFU/ml ปริมาตรเชื้อที่ 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้นถูก spread โดยตรงลงบนเพลทอาหาร TSA สำหรับเทคนิค MDPT ที่ปริมาณเชื้อ 8 – 9 log CFU/ml ถูกทำการเจือจาง (10^{-1} – 10^{-5}) ดังแสดงในรูปที่ 3.5 โดยปิเปตตัวอย่าง 20 μl ลงใน 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ในแต่ละ well มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จำนวน 180 μl จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วย Multichannel pipette สำหรับการเตรียมเพลทอาหาร TSA โดย แผ่น 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ได้มีการฆ่าเชื้อแล้ว ถูกเติมด้วยอาหาร TSA ซึ่งในแต่ละ well ของเพลทมีปริมาตรของ TSA ประมาณ 0.5 ml (รูปที่ 3.4) ปริมาตรเชื้อของแต่ละ dilution ที่ 10 μl ถูก drop ลงบนอาหาร TSA ทั้ง 2 เทคนิคถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีในรูปแบบ log CFU/ml ถูกนับที่เวลาในการบ่มต่างๆ



รูปที่ 3.4 แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA



รูปที่ 3.5 แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA

3.4 การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะเพื่อการบ่งชี้การปนเปื้อนของ *Salmonella*

ในขั้นตอนการวิเคราะห์ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* โดย protocol การวิเคราะห์เมื่อได้ทำการเพิ่มเชื้อในอาหารเหลวไม่จำเพาะแล้วที่ได้มีการพัฒนาในหัวข้อ 3.2 ทั้งนี้ในการดำเนินการทดสอบกับตัวอย่างจริง (real food samples) ตัวอย่างดังกล่าวไม่เพียงแต่มีเชื้อ *Salmonella* ยังมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นเข้ามาด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการ screening การปนเปื้อนของ *Salmonella* ก่อนที่จะถูกนำไปลงในอาหาร selective agar ผู้วิจัยนำเสนอสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่ specific ต่อความสำมารถในการเกิดปฏิกริยาโดยเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งประกอบไปด้วยอาหารอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation) และอาหารความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) ทั้งนี้ในการตรวจติดตามการเปลี่ยนสีของอาหารดังกล่าวเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่มีจำนวนมากและรวดเร็ว โดยรายละเอียดการศึกษาวิจัยและการเตรียมอาหารสูตรจำเพาะทั้ง 2 แสดงดังต่อไปนี้

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation)

3.4.1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

Salmonella strains ที่ใช้ในการทดสอบเป็น 4 non-typhoid serovars (*S.* Anatum; *S.* Choleraesuis; *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum) และ typhoid (*S.* Typhi) และ paratyphoid (*S.* Paratyphi A) สำหรับแกรมลบที่เป็นแบคทีเรียแข่งขันเป็น *E. coli* และ *K. pnuemoniae* โดยเป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกริยาไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่นได้ ในขณะที่ *P. vulgalis* เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยา สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นเชื้อแข่งขันบางตัว เช่น *E. faecalis* และ *S. aureus* ถูกรวมอยู่ด้วยเหมือนกัน เพราะว่าเชื้อเหล่านี้ไวต่อตัวยับยั้งเป็นส่วนใหญ่ (Arroyo and Arroyo, 1995)

เชื้อ pure culture ทั้งหมดถูก sub-cultured ลงบนอาหาร TSA และในแต่ละ strain ใช้ loop เขี่ยเชื้อลงในอาหาร TSB 100 ml ที่บรรจุในหลอดทดลอง ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.1.2 การพัฒนาอาหารอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นและการเลือกใช้ pH อินดิเคเตอร์ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry)

3.4.1.2.1 การเตรียมอาหาร

อะมิโนที่ใช้ในการทดสอบเป็นไลซีน โดยอาหาร modified lysine decarboxylase broth (mLDB) เป็นอาหารที่พัฒนามาจาก lysine decarboxylase broth (LDB) (Falkow, 1958) ที่มีการใช้ soytone 4.5 g/l เพื่อแทนที่ยีสต์สกัดและเปปโตน Soytone เป็นแหล่งของไนโตรเจนใน Rappaport – Vassiliadis soya (RVS) broth ซึ่งเป็นอาหารเหลวจำเพาะที่ดีที่สุดสำหรับ *Salmonella* (Busse, 1995; Blivet et al., 1997) ส่วนผสมองค์ประกอบอื่นใน mLDB ยังคงเหมือนกับใน LDB ที่มี D-กลูโคส 1 g/l, และ L-ไลซีนปริมาณ 5 g/l pH อินดิเคเตอร์ที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิดคือ bromocresol purple (BP) 0.08 g/l, bromothymol blue (BB) 0.08 g/l และ phenol red (PR) 0.08 g/l ถูกเติมเพื่อเตรียม mLDB – BP, mLDB – BB, mLDB – PR ตามลำดับ เพื่อที่จะเลียนแบบผลของ pH จากปฏิกริยาอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น อาหารถูกปรับเป็นที่กลาง (pH 7), ช่วงเบส (pH 7.5, 8, 8.5, 9) โดยการใช้ NaOH 1 N และช่วงกรดที่ (pH 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5) โดยการใช้ 1 N ของ HCl โดยการใช้ pH/Ion meter กับ pH electrode อาหารเหลวที่ช่วงเบสได้แสดงถึงการเกิด positive ของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่น ในขณะที่ broth ที่ช่วงกรดคล้ายคลึงกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อาหารที่ pH 7 ปราศจาก pH อินดิเคเตอร์เป็น blank

3.4.1.2.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหารที่ความแตกต่างของ pH อินดิเคเตอร์ ที่ได้ปรับ pH ที่แตกต่างกัน

ปริมาณของอาหาร mLDB – BP, mLDB – BB, mLDB – PR ที่มีการปรับ pH ที่แตกต่างกันปริมาณ 200 µl ถูกบรรจุลงใน 96 – well flat bottom microplate โดยการใช้ multi - channel pipette ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ wavelength ดังต่อไปนี้ 340, 405, 450, 490, 550, 590, 600, และ 650 นาโนเมตร ที่ประยุกต์วิเคราะห์ด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ ค่าการสแกนที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของอาหารเหลวที่ช่วงกรด กลางและเบสจะถูกลบออกจากค่าการสแกนที่ reference (pH 7) เพื่อให้ได้ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงสำหรับ 3 ชนิดของอินดิเคเตอร์ ฟีนอลเรด แสดงค่าความแตกต่างสูงสุดที่ความยาวคลื่น 550 และ 430 nm สำหรับอาหารเหลวที่ช่วงเบสและกรดตามลำดับ โดยที่ wavelength ดังกล่าวถูกเลือกให้เป็น wavelength ที่จะถูกใช้ในการทดลองตลอดการศึกษาของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะ H_2S production

3.4.2.1 การเตรียมเชื้อ pure cultures และการเตรียม culture

แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกริยา Thiosulfate reducing หรือให้ผลบวกของ H_2S (H_2S^+) 7 ซีโรวาร์ เช่น *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Rissen, *Salmonella*

Typhimurium, *Salmonella* Weltevreden, *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Paratyphi B สำหรับแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นเชื้อแข่งขันและไม่สามารถเกิดปฏิกริยา non-thiosulfate reducing หรือให้ผลลบของ H_2S (H_2S^-) เช่น *Enterobacter aerogen*, *Escherichia coli*, *Psuedomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei, Serratia marcescens* และ *Yersinia enterocolitica* เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางตัวที่เป็นเชื้อแข่งขัน เช่น *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* ถูกนำมาทดสอบด้วยเหมือนกัน

เชื้อทั้งหมดถูก sub-culture บนอาหาร TSA และหลังจากนั้นจะใช้ loop ในการเขี่ยเชื้อในแต่ละ strain ลงใน 100 ml ของอาหารเหลว TSB และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ปริมาณเชื้อที่ได้หลังจาก 24 ชั่วโมงจะทำการ dilution เซลล์ลง 10 เท่าด้วยการใช้ 0.85% ของน้ำเหลือ

3.4.2.2 การเตรียม media

นำเสนออาหารเหลว H_2S ที่ประกอบไปด้วยส่วนประกอบ Soytone 4.5 g/l, xylose 1 g/l, ferric ammonium citrate 0.5 g/l, sodium thiosulfate 6.8 g/l และ L-lysine 5 g/l โดยอาหารดังกล่าวอยู่ในชื่อของ TFXL broth ส่วนประกอบทั้งหมดถูกผสมและละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการให้ความร้อนและทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 25 ºC ก่อนที่จะปรับ pH เป็นที่ 7.0±0.1 โดยการใช้กรด HCl ที่ความเข้มข้น 1 N และ NaOH ที่ความเข้มข้น 1 N หลังจากนั้นทำการ sterilized อาหารด้วยการกรองผ่าน filter เมมเบรนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm, 0.45 μm pore size ก่อนการใช้งาน เพื่อที่จะประเมินผลของความขุ่นที่มีต่ออาหารเหลว TFXL อาหารเหลวดังกล่าวถูกเตรียมโดยการผสมองค์ประกอบทั้งหมดยกเว้น ferric ammonium citrate (อินดิเคเตอร์ที่ทำให้เกิดตะกอนสีดำ)

3.4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับ microscale ของ *Salmonella* และ non-*salmonellae* ในอาหารเหลว TFXL

ปริมาณเชื้อที่ 6 – 7 log CFU/ml ของเชื้อที่สามารถ thiosulfate-reducing และ non-thiosulfate ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก แบคทีเรียที่ถูกเตรียมแต่ละชนิดปริมาณ 20 μl ถูกบรรจุลงในอาหารเหลว TFXL 180 μl ซึ่งแต่ละอาหาร TFXL จะถูกบรรจุลงใน microwell ของ 96-well flat bottom microplate โดยการใช้ multi-channel pipette โดย TFXL ปริมาณ 200 μl ที่ปราศจากการ inoculation ของเชื้อจะเป็นตัวอย่าง

control หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ทดสอบถูกบันทึกและถ่ายภาพด้วยกล้อง digital

3.4.2.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density spectra) ของอาหาร TFXL broth

เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจะผลิตความขุ่นในตัวอย่างที่ทำการทดสอบ เพื่อที่จะนำเสนอความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ optical density ในการวัดเพื่อตรวจติดตามการเกิดตะกอนสีดำโดยปราศจากการแทรกแซงของความขุ่น ผลของความขุ่น (optical effect of the turbidity) ถูกประเมินและแยกออกไป เทคนิควิธีการวัด optical density ของเชื้อที่เจริญเติบโตใน media โดยอาหารเหลว TFXL และ TXL ที่ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน ตัวอย่างอาหารเหลว TXL ทำหน้าที่เป็น control สำหรับการศึกษาความขุ่นซึ่งไม่มีการตกตะกอนสีดำ ดังนั้นไม่มีตะกอนสีดำเกิดขึ้น เชื้อ *Salmonella* และ non - *Salmonella* จำนวน 20 µl ของ 6 – 7 log CFU/ml ถูก inoculated ใน 180 µl ของแต่ละอาหารเหลว TFXL และ TFX และเมื่อนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย optical density ของตัวอย่างทั้งหมดที่ wavelength (340, 405, 450, 490, 550, 590, 600 and 650 นาโนเมตร) ถูกได้รับจากอุปกรณ์วัด ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างอาหารเหลว TFXL และ TXL เป็นค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจาก อาหารเหลวที่มีตะกอนสีดำลบกับอาหารเหลวขุ่นที่ไม่มีตะกอน ค่าการดูดกลืนแสงของความขุ่นที่ถูกหักออกของเชื้อ *Salmonella* และ non - *Salmonella* ถูกพล็อต ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกริยา H_2S^+ และ H_2S^- ถูกคำนวณและพล็อตเพื่อประเมินหาค่า wavelength ที่เหมาะสม สำหรับ H_2S production ของแบคทีเรียโดยผ่านการ detection ของการตกตะกอนสีดำ

3.4.2.5 การวัด optical detection ของ H_2S production ในอาหารเหลว TFXL ที่พัฒนา

ในแต่ละ well ของ 96-microwell plate ถูกบรรจุด้วย 180 µl ของอาหารเหลว TFXL และทำการ inoculated แต่ละเซลล์ของ *Salmonella* และ non-*Salmonella* ปริมาตร 20 µl จากนั้น microplate ถูกทำการบ่มภายใต้อุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการวัดค่า absorbance ที่ 650 nm (เป็น wavelength ที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 3.4.2.4) ในระหว่างทำการบ่ม

บทที่ 4

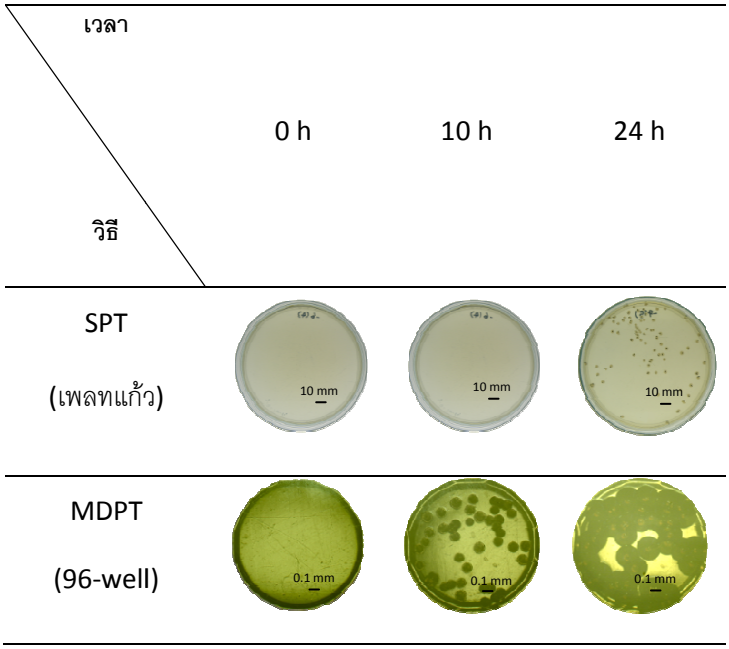
ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและปรับปรุงการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวไม่จำเพาะ (non selective enrichment) ด้วยการเพาะเชื้อระดับเล็ก (micro-scale) โดยการใช้อุปกรณ์ 96-microplate ลักษณะการเจริญเติบโต (maximum specific growth rate: μ_{max}) ถูกประมาณการและเปรียบเทียบในเงื่อนไขแต่ละ cultivation เพื่อค้นหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา *Salmonella* จากนั้นนำเสนออาหารเลี้ยงจำเพาะเพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ด้วยปฏิกริยาความสามารถการเกิดอะมิโนดีคาร์บอกวีเลชั่นและไฮโดรเจนซัลไฟต์ที่สามารถให้สีด้วยการ detect ตรวจวัดด้วยเครื่องไมโครเพลทลีดเดอร์ ในการตรวจติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมีการพัฒนาเทคนิค Modified Drop Plate Technique (MDPT) ทดแทนวิธีการแบบปกติ ผลการทดลองทั้งหมดถูกสังเกตการณ์และมีการวิเคราะห์โดยรูปภาพ

4.1 การพัฒนา Modified Drop Plate Technique (MDPT) สำหรับการตรวจนับปริมาณเชื้อ

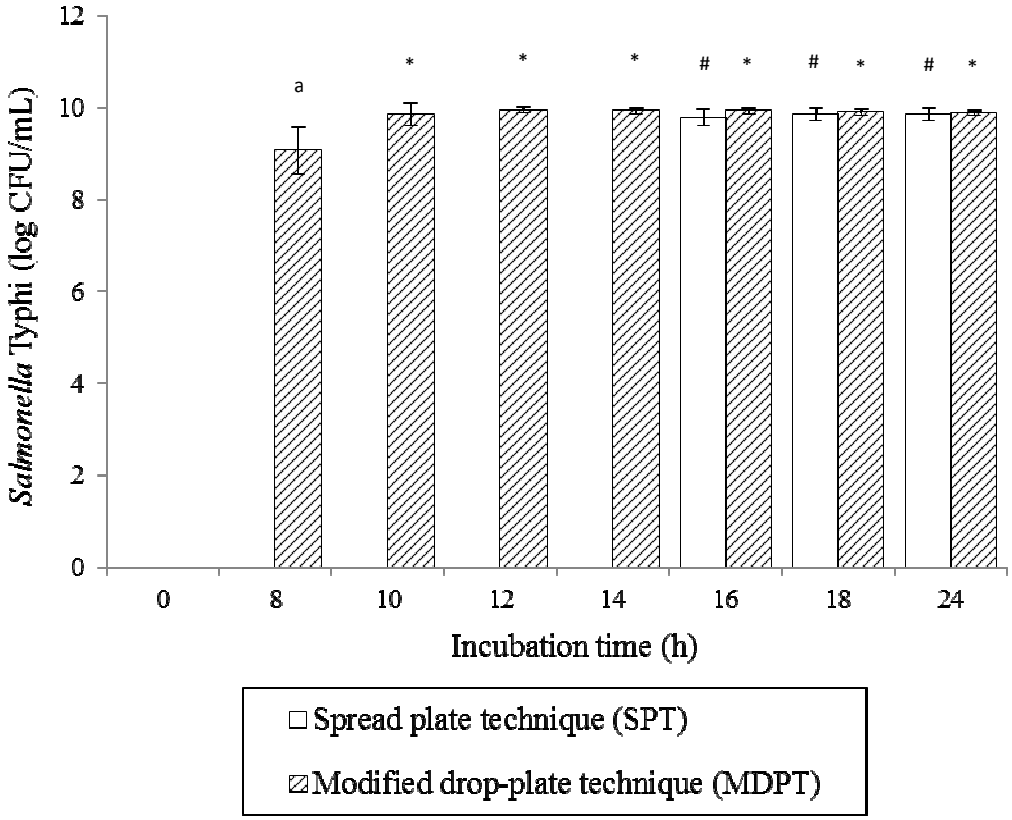
4.1.1 รูปแบบการวิเคราะห์ MDPT สำหรับการนับปริมาณแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับเล็กเป็นรูปแบบการวิเคราะห์ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแทนที่วิธีการวิเคราะห์แบบ spread plate (SPT) ซึ่งเป็นวิธีการแบบดั้งเดิม (conventional method) เทคนิคนี้ถูกปรับปรุงใหม่จากเทคนิคการวิเคราะห์แบบ drop plate เพื่อเร่งการนับจำนวนโคโลนีและประหยัดค่าใช้จ่าย เทคนิค SPT เป็นการใช้อุปกรณ์เพลทแก้วเพื่อบรรจุ agar ในขณะที่ MDPT ใช้ 96 – well flat bottom microplate การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า 96 – dropped inoculums ร่วมกันกับการใช้กล้องกำลังขยายสูงในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย เพียงพอสำหรับการตรวจนับการปนเปื้อนของแบคทีเรียรวดเร็วในปริมาณของตัวอย่างระดับอุตสาหกรรมและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (Khueankhancharoen et al., 2010; Supanivatin et al., 2010; Liamkaew et al., 2014) การศึกษาที่หลากหลายได้มีการจำลองการใช้ multiple – well ในการจัดการเพื่อให้เร็ว ประหยัดคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์ และสะดวกง่ายต่อผู้ใช้งานในการปฏิบัติงานระดับอุตสาหกรรม (Kang et al., 1999; Kan and Fung, 1999; Kim and Fung, 2005; Pavic et al., 2013)



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบโคโลนีที่ได้จากที่เวลาต่างกัน แถวบนเป็นการสังเกตด้วยสายตาและแถวล่างเป็นการใช้กล้องดิจิตอลกำลังขยายสูง

รูปที่ 4.1 แสดงการฟอร์มตัวของโคโลนี *S.* Typhi ที่ปริมาณเชื้อ (9 log CFU/ml) ภายใต้การเพาะเชื้อด้วยเทคนิค MDPT และ SPT จากนั้นสังเกตการที่เวลาต่างๆ กันจนกระทั่ง 24 ชั่วโมง เวลาในการที่จะสามารถตรวจพบโคโลนีของ *Salmonella* โดยการใช้ MDPT เป็นที่เวลาน้อยกว่า 8 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2) และเชื้อโคโลนีสามารถโตไปได้ถึงที่ stable cell ที่เวลา 10 ชั่วโมง ในขณะที่ไม่มีการฟอร์มตัวของโคโลนี โดยเทคนิค SPT ที่ถูกตรวจ detect โดยการใช้ตามนุษย์ภายใต้ 16 ชั่วโมง และใช้เวลา 18 – 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สภาวะการนับเชื้อที่คงที่ไม่มีการโตหรือเพิ่มจำนวนเชื้อ (steady cell count) เวลาในการตรวจวิเคราะห์ของ SPT เป็น 8 – 14 ชั่วโมงหลังจากเวลาของเทคนิค MDPT



รูปที่ 4.2 จำนวนโคโลนีของ *Salmonella* ในรูปแบบ log CFU/ml ที่นับโดยการใช้เทคนิค 2 วิธี (SPT และ MDPT) ที่เวลาในการบ่มต่างๆ กัน ในแต่ละการนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM แท่งกราฟที่มี * หรือ # บ่งบอกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในวิธีการเดียวกัน; แท่งกราฟที่มี * ไม่มีความแตกต่างจากแท่งกราฟที่มีเครื่องหมาย # (Duncan's multiple range tests, $p > 0.05$); แท่งกราฟที่มี a เป็นปริมาณโคโลนีที่ได้จากเทคนิค MDPT ที่เวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญน้อยกว่าที่เวลาถัดไป

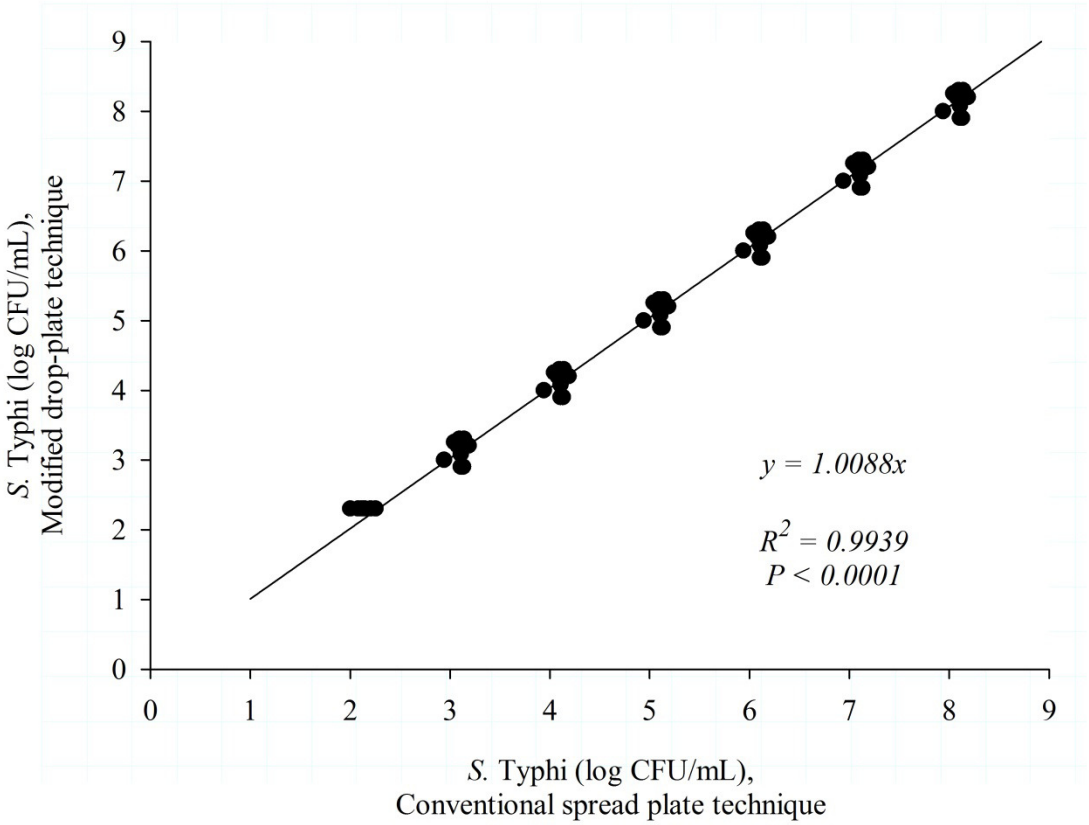
ที่เวลา 8 ชั่วโมงของเทคนิค MDPT การนับโคโลนีพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญน้อยกว่าที่เวลาถัดไป ดังนั้น MDPT ใช้เวลา 10 ชั่วโมง ที่แสดงปริมาณเชื้อสูงสุด (รูปที่ 4.2) ในการทดลองดังกล่าว pure culture cells ถูกนำมาใช้ในการทดลองที่จำเพาะนี้ เวลาสำหรับการนับเชื้อที่เจริญเติบโตคงที่ไม่เพิ่มจำนวนแล้วในตัวอย่างจริงของโรงงานต้องถูกตัดสินใจหรือพิจารณาเป็นกรณีกรณีไป การนับเชื้อด้วยเทคนิคจาก MDPT และ SPT ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการทดลองเท่ากัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Duncan's multiple range test)

4.1.2 การสอบเทียบวิธีการวิเคราะห์ของ MDPT และ SPT สำหรับการนับเชื้อ *Salmonella*

การทดลองดำเนินการโดยเชื้อ pure cultures ของ *S.* Typhi ปริมาณเชื้อที่ใช้ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 8 log CFU/ml ตัวอย่างเชื้อปริมาตร 10 μl ถูก drop ลงบนผิวอาหารแข็ง TSA ที่อยู่บนชั้นผิว micro-well plate และที่ปริมาณ inoculums เดียวกันถูก inoculated บนอาหาร TSA ด้วยเหมือนกันในพื้นที่ 90 – mm ของเพลทแก้ว โดย set ของการทดลองทั้ง 2 ให้วิธีถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าการนับโคโลนีจากทั้ง 2 วิธี ถูกนำมาเปรียบเทียบกัน ปริมาณเชื้อที่นับได้ (log CFU/ml) ที่แต่ละปริมาณเชื้อถูกนำมาพล็อตเพื่อให้ได้ความสัมพันธ์โดยเป็น linear regression ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งเป็นเทคนิคการนับเชื้อด้วย MDPT และ SPT (slope = 1.0088, R^2 = 0.9939, $P < 0.0001$) การสอบเทียบความถูกต้องของการนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ถูกดำเนินการที่ช่วงโคโลนีแคบ ยกเว้นที่ปริมาณเชื้อต่ำ ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 1 - 2 log CFU/ml เทคนิค MDPT ไม่สามารถนับได้ที่ปริมาณเชื้อดังกล่าวเนื่องจาก ต่ำกว่า limit detection ดังนั้นจึงให้ผลปริมาณเป็น 0 ในขณะที่เทคนิค SPT สามารถตรวจนับได้ที่ปริมาณต่ำสุด 1 log CFU/ml ปริมาณ inoculum ที่ใช้ของเทคนิค MDPT เป็น 10 μl ซึ่งตรงกันข้ามกับที่ปริมาณ 100 μl ที่ใช้ในเทคนิคของ SPT ปริมาณ inculum สามารถมีผลต่อการอ่าน (Badger and Pankhurst, 1960) ดังนั้นความเข้มข้นของเชื้อในตัวอย่างปริมาณมากเป็นที่ต้องการเพื่อที่จะชดเชยสำหรับปริมาตรของตัวอย่างที่ทดสอบน้อย

ค่าความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันชี้ให้เห็นว่าเทคนิค MDPT เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับวิธี SPT ในการนับปริมาณเชื้อของ *Salmonella* ดังนั้นเทคนิคที่ได้มีการพัฒนาปรับปรุงดังกล่าว สามารถที่จะให้ผลที่รวดเร็ว คุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์ แทนที่วิธีการวิเคราะห์แบบ SPT สำหรับการนับปริมาณโคโลนี เทคนิค MDPT ถูกนำมาใช้ในขั้นตอนของการนับปริมาณเชื้อของงานวิจัยนี้ และเป็นพื้นฐานของการพัฒนาต่อไปของ MDPT เพื่อตัดสินใจลักษณะที่จำเพาะของโคโลนี *Salmonella* เพื่อที่จะนับปริมาณเชื้อ

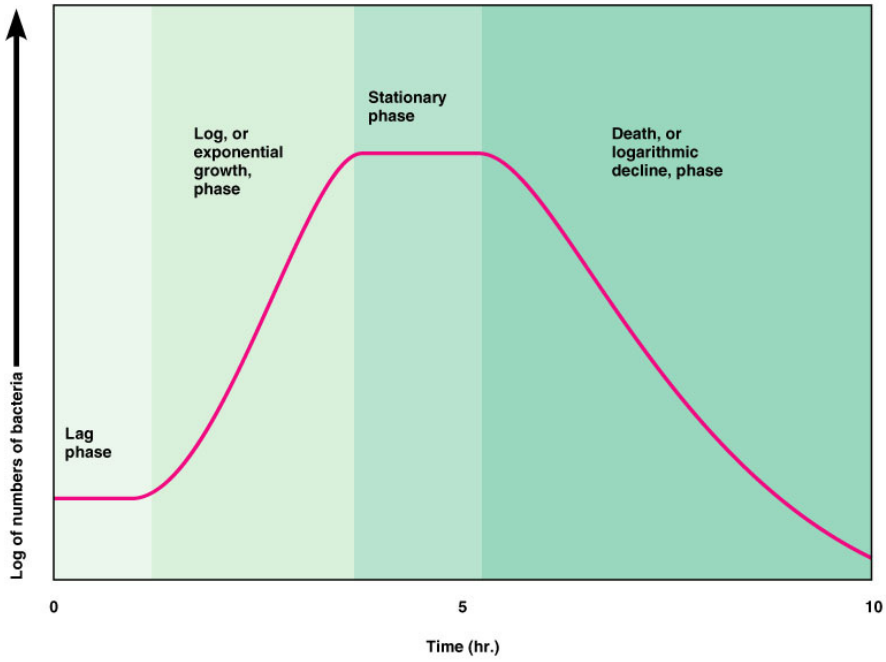
โดยวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิค MDPT ถูกออกแบบเพื่อเป็นทางเลือกเทคนิคการนับเชื้อที่เหมาะสมแทนที่วิธีการแบบดั้งเดิม รวมถึงกับ pure cultures ที่ความเข้มข้นมากกว่า 2 log CFU/ml ในการเพาะเชื้อระดับเล็ก การประยุกต์ใช้ MDPT สำหรับการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างอาหารถูกแนะนำสำหรับวัตถุดิบอาหารสดซึ่งมีปริมาณของแบคทีเรียจำนวนมากปรากฏอยู่ ตัวอย่างเช่น เนื้อ อาหารพร้อมทานที่เป็นเนื้อ



รูปที่ 4.3 กราฟปริมาณเชื้อของ *S.*Typhi ที่นับได้จากเทคนิค SPT (แกน X) และเทคนิค MDPT (แกน Y) สำหรับเทคนิคทั้งคู่ใช้ pure culture ของ *S.*Typhi ที่ปริมาณจาก 0 ถึง 8 log CFU/ml (n = 90) ปริมาณเชื้อดังกล่าวถูก inoculated บนอาหาร TSA และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (SPT) และ 12 ชั่วโมง สำหรับ (MDPT) เส้นแนวโน้มกราฟที่ได้โดยสมการสัมพันธ์

4.2 สมการทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

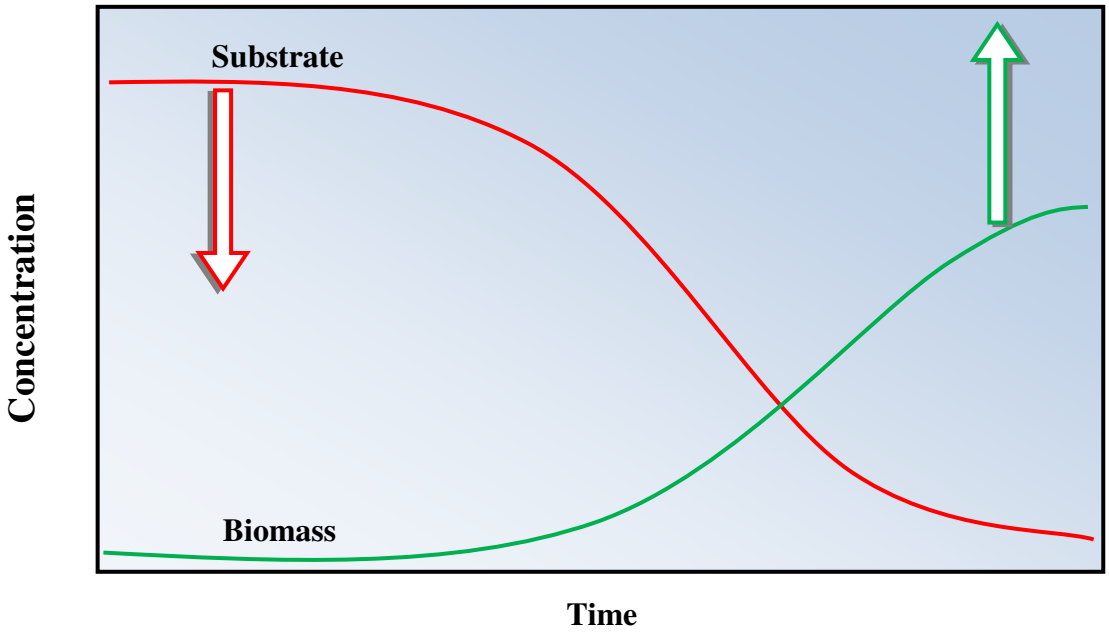
จากการศึกษารวบรวมงานวิจัยที่ผ่านมา นักวิจัยเหล่านั้นใช้สมการทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายพฤติกรรมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โมเดลที่ถูกใช้ได้บรรยายพฤติกรรมของจุลินทรีย์ภายใต้เงื่อนไขทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกัน เช่น แหล่งของพลังงาน อุณหภูมิ pH และปริมาณน้ำอิสระ(water activity) ในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร (Genevieve, 1978; Zwietering, 1990; Lobry, 1992; Rutledge, 2004; Matthew, 2004 และ Christian, 2008) การเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยปกติแสดงเป็น phase ซึ่งเป็น specific growth rate เริ่มที่ 0 และเมื่อนั้นการเจริญเติบโตสูงสุดจะอยู่ที่ค่าที่แน่นอนช่วงหนึ่ง



รูปที่ 4.4 กราฟแสดง 4 ช่วงของ Sigmoid หรือกราฟ S – shaped

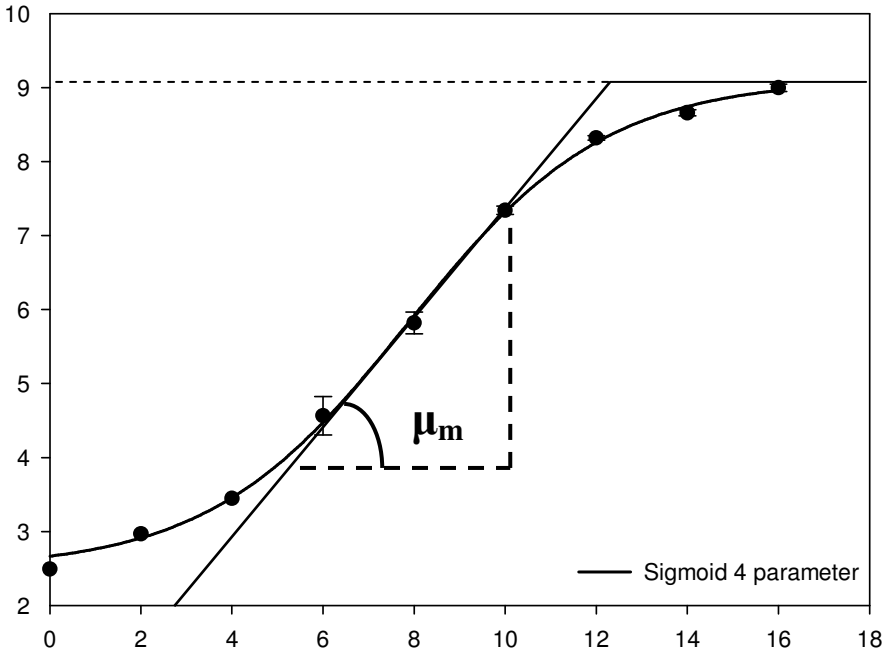
แหล่ง : Pearson Education, Inc (2004)

กราฟการเจริญเติบโตในรูปแบบ S-shape เป็นรูปแบบการเจริญเติบโตที่มีลิมิตจากปริมาณของสารอาหารดังแสดงในรูปที่ 4.4 ความหนาแน่นของประชากรจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงแรก ในช่วงที่เป็น positive อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องของเวลา เมื่อปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน exponential growth rate ซึ่งอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามเวลา ระหว่าง stationary เฟส สารอาหารถูกนำไปใช้และสร้างของเสียออกมาและเกิดผลผลิตพลอยได้ จากนั้นอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำไปถึงจุดๆ หนึ่ง และเมื่อถึงในช่วงที่ปริมาณเชื้อลดลงในสภาวะที่เป็นการเร่งเป็น negative ที่ 0 อัตราการเจริญของประชากรยังคงมีแบคทีเรียที่มีชีวิตลดลงตามเวลา เนื่องจากการขาดสารอาหารและเกิดผลผลิตพลอยได้ที่เป็นอันตราย (Michael, 1999; Tullmin, 2001)



รูปที่ 4.5 ปฏิกริยาระหว่างมวลสารและความเข้มข้นของสับเสตรท

รูปที่ 4.5 แสดงมวลสารของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงแรกและหลังจากนั้นมีการปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโต แต่ในเฟสนี้จุลินทรีย์ไม่ได้มีการพักตัว แต่ในทางตรงกันข้าม สับเสตรทตัวอย่างเช่น ไนโตรเจน คาร์บอน และสารสำคัญอื่นๆ ถูกลดลงอย่างช้าๆ ในระหว่างที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่ lag phase เมื่อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนในช่วง exponential phase มีช่วงลักษณะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า ถ้าการเจริญเติบโตไม่ถูกจำกัด การเพิ่มจำนวนแบบ 2 เท่าจะยังคงต่อเนื่องที่อัตราคงที่ ดังนั้นทั้งจำนวนของเซลล์และอัตราของประชากรที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลาตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตที่เป็นจริงขึ้นกับเงื่อนไขของการเจริญเติบโต ดังนั้นมวลสารของจุลินทรีย์ยังคงเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่สับเสตรทลดลง นั้นแสดงให้เห็นว่าความสำคัญของความเข้มข้นของสับเสตรทที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค

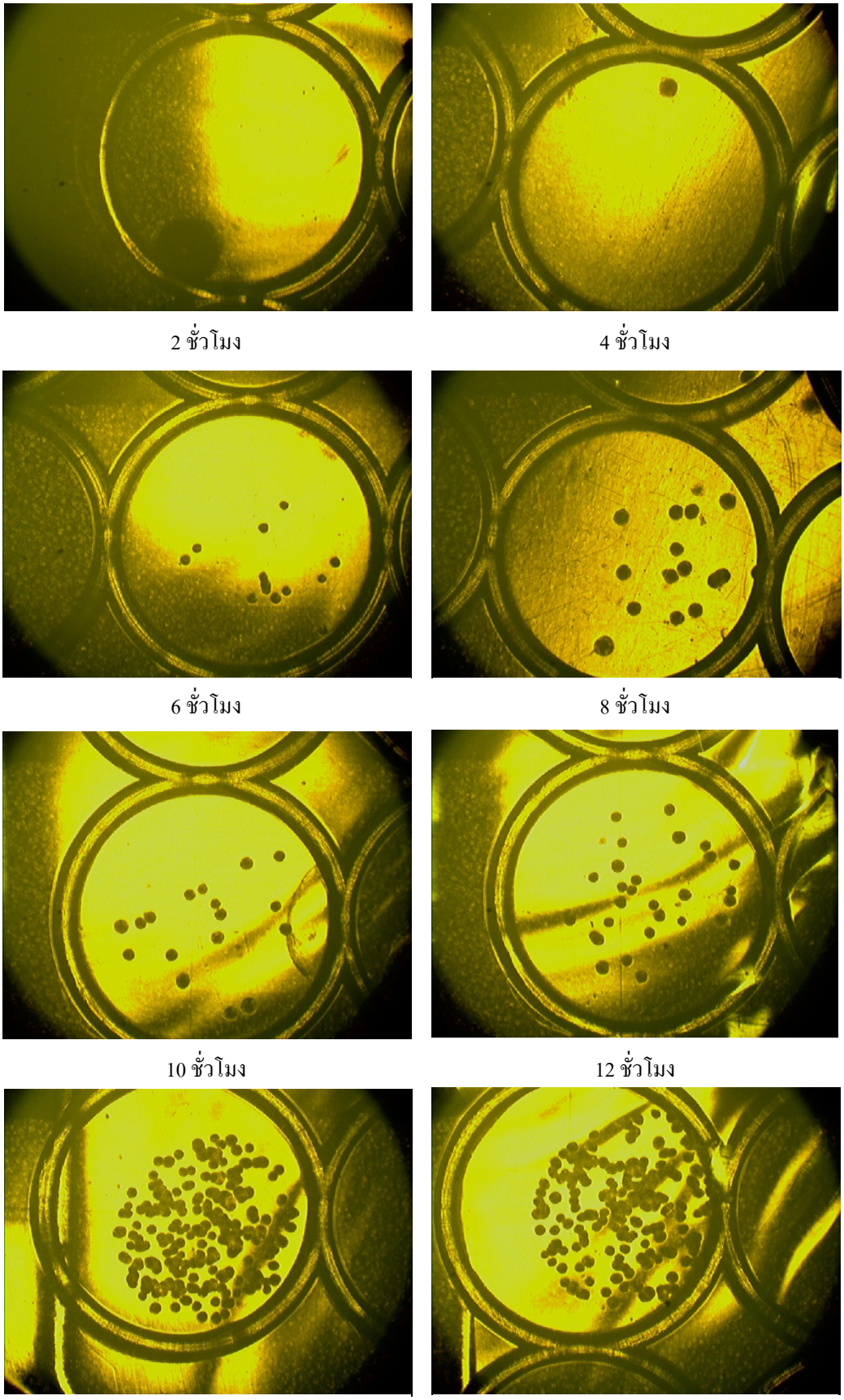


รูปที่ 4.6 กราฟการเจริญเติบโต

เมื่อกราฟการเจริญเติบโตถูกนิยามเป็น logarithm ของจำนวนจุลินทรีย์กับเวลา กราฟอัตราการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนแปลงแสดงผลในรูปของ sigmoid curve ดังแสดงรูปที่ 4.6 มากไปกว่านั้น ช่วง lag phase ของการเจริญเติบโตเป็น ค่า maximum specific growth rate (μ_{max})

4.2.1 รายละเอียดการดำเนินการ

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Salmonella* ถูกเตรียมที่ 10^2 - 10^3 CFU/ml จากนั้นเชื้อปริมาณ 100 μl ถูก inoculated ลงใน eppendorf ที่บรรจุน้ำเกลือ 0.86% ปริมาณ 900 μl TSB ถูกเตรียมเพื่อการทดสอบในหลอดทดลองกับ 0.86% ของน้ำเกลือจำนวนสำหรับ 5 ml ปริมาตรสุดท้ายของ cultivation ใน 96-microwell plate เป็น 150 μl อุณหภูมิของ cultivation ถูกควบคุมที่ 37 °C การใช้วิธีนี้ รูปภาพที่ได้สามารถคลอบคลุมทั้งหมดของพื้นที่ของ well และเหมาะสมในการดำเนินการ drop ลงบน 96 – microwell plate



2 ชั่วโมง | 4 ชั่วโมง

6 ชั่วโมง | 8 ชั่วโมง

10 ชั่วโมง | 12 ชั่วโมง

14 ชั่วโมง | 16 ชั่วโมง

รูปที่ 4.7 การนับปริมาณเชื้อ *Salmonella* บน microwell plate หลังจากทำการบ่มใน TSB ที่สูตรปกติ 1X ที่เวลาต่างๆ กัน (2 – 6 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.1 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella*

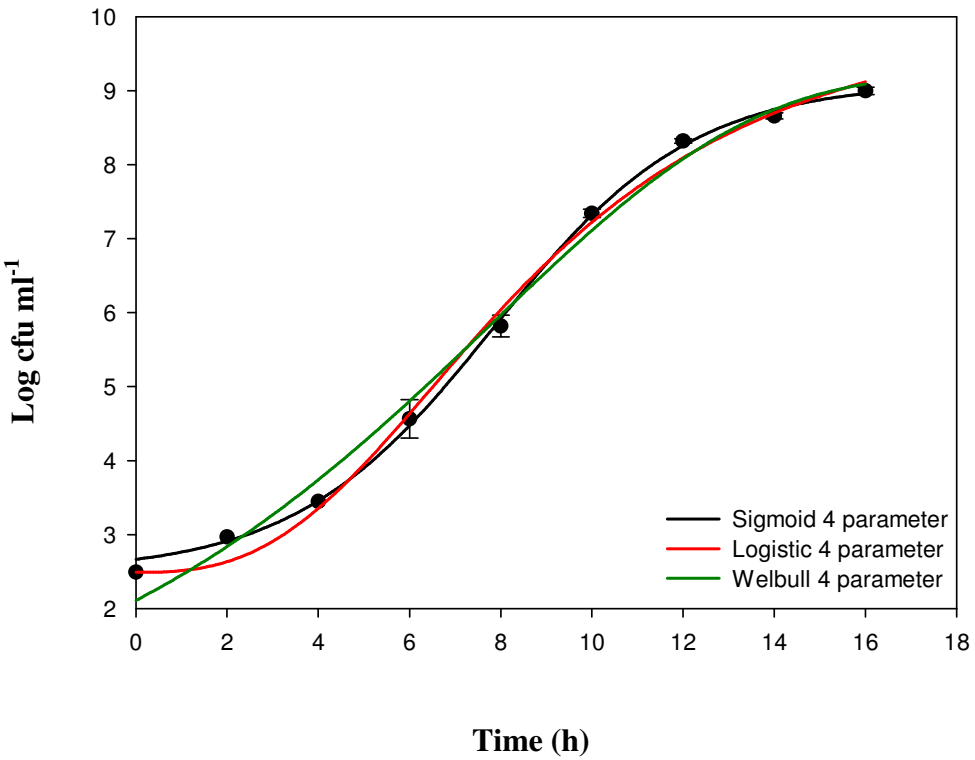
Sigmoidal Model	**Equation**
Sigmoid	$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{\frac{-(x - x_0)}{b}}}$
Logistic	$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$
Weibull	$y = a\ [\ 1 - e^{\frac{-(x - x_0 + b \ln 2^{1/c})^c}{b}}\ ]$
Gompertz	$y = y_0 + ae^{-e^{\frac{(x - x0)}{b}}}$
Hill	$y = y_0 + \frac{ax^b}{c^b + x^b}$
Chapman	$y = y_0 + a\left(1 - e^{-bx}\right)^c$

แหล่งที่มา: Sigmaplot 11.0

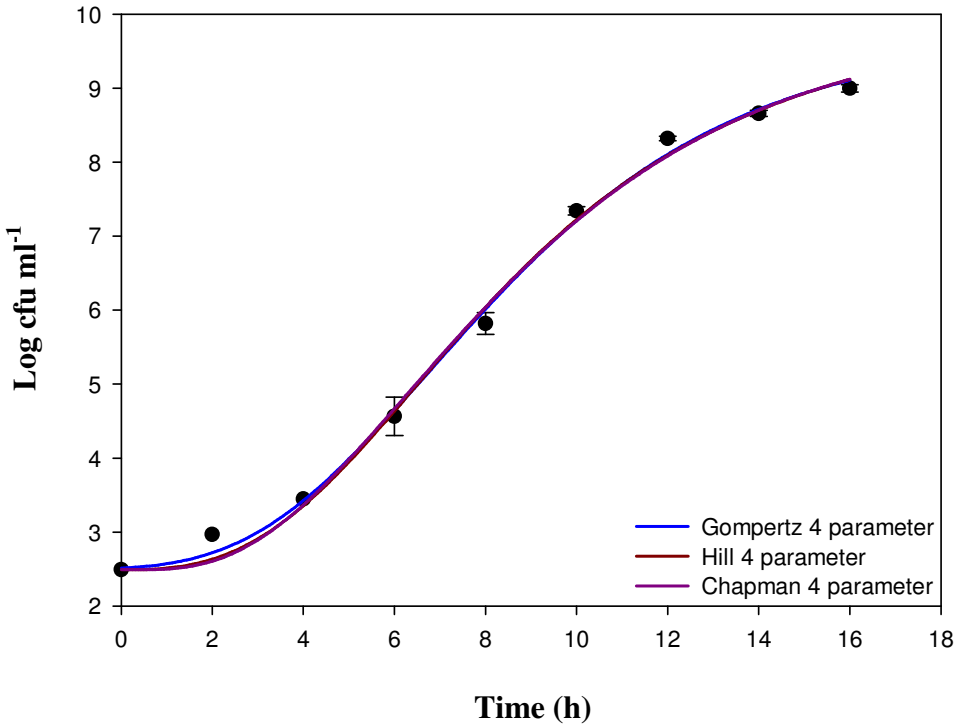
ผลการทดลองของการพล็อตกราฟข้อมูลแสดงดังกราฟรูปที่ 4.8, 4.9 และตารางที่ 4.1 ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (RMSE) ถูกวัดเพื่อแสดงความเหมาะสมของข้อมูล โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดเป็น Sigmoid โดยให้ค่าต่ำที่สุดของ standard error น้อยกว่าของ Gompertz, Hill, Logistic, Chapman และ Weibull model

กราฟความสัมพันธ์ที่ไม่เป็นเส้นตรงถูกบรรยายเน้นย้ำเป็นสิ่งสำคัญ ไม่มีตัวอย่างเดี่ยวสำหรับ nonlinear regression ในทางตรงกันข้ามกับ linear regression การใช้กลยุทธ์ใน nonlinear regression ขึ้นกับค่าพารามิเตอร์ตอนเริ่มต้น ดังนั้นผลของการทดลองนี้ถูกนำเสนอให้ใช้แบบจำลอง Sigmoid เพื่ออธิบาย kinetic model ของการเจริญเติบโตของ *Salmonella* แทนที่ด้วย model อื่น

4.2.2 ผลการทดลอง



รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Salmonell* spp. ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C จากการพล็อตด้วยการใช้แบบจำลองชนิดต่าง ๆ (Sigmoid, Logistic, Welbull)



รูปที่ 4.9 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Salmonell* spp. ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C จากการพล็อตด้วยการใช้แบบจำลองชนิดต่าง ๆ (Gompertz, Hill, Chapman)

ตารางที่ 4.2 ผลของแบบจำลอง Sigmoidal ในการพล็อตกราฟข้อมูลการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.

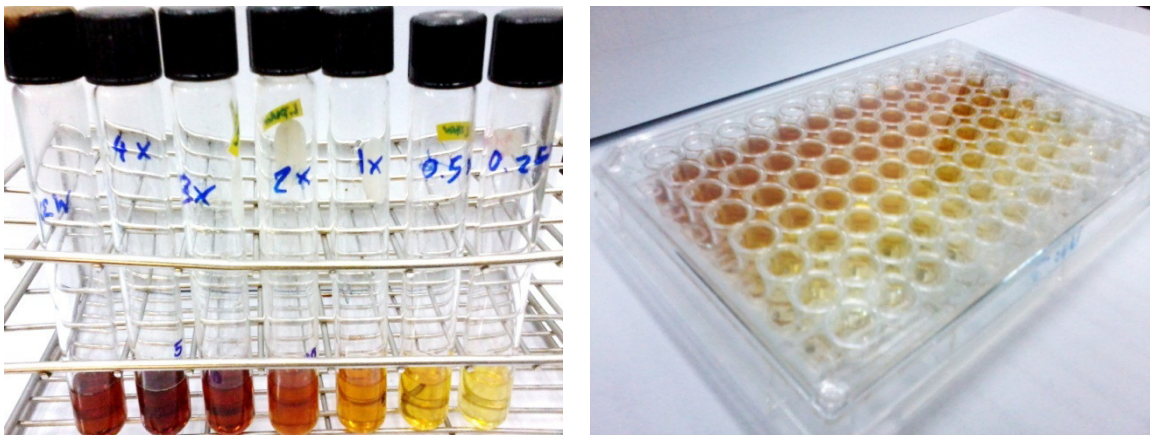
Model	R^2_{ave}	RMSE
Sigmoid	0.9988	0.1036
Gompertz	0.9965	0.1750
Hill	0.9952	0.2069
Logistic	0.9952	0.2069
Chapman	0.9945	0.2200
Weibull	0.9915	0.3013

4.3 ผลของความเข้มข้นของ standard media

รายละเอียดของงานในส่วนนี้เป็นการศึกษาอาหารเหลวไม่จำเพาะ TSB ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* เพื่อหาสภาวะความเข้มข้นของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน เป็นการเพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย

4.3.1 รายละเอียดการดำเนินการ

ในการทดลองดังกล่าวเชื้อ *Salmonella* ถูกเตรียมจนได้ความเข้นของเชื้อที่ประมาณ 10^9 CFU/ml ใน shake flask ปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Salmonella* ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 10^2 - 10^3 CFU/ml โดยการใช้เทคนิคการ dilution ปริมาณเชื้อ 100 µl ถูก inoculation ลงใน eppendorf ที่มี 0.86% ของน้ำเกลือ 900 µl

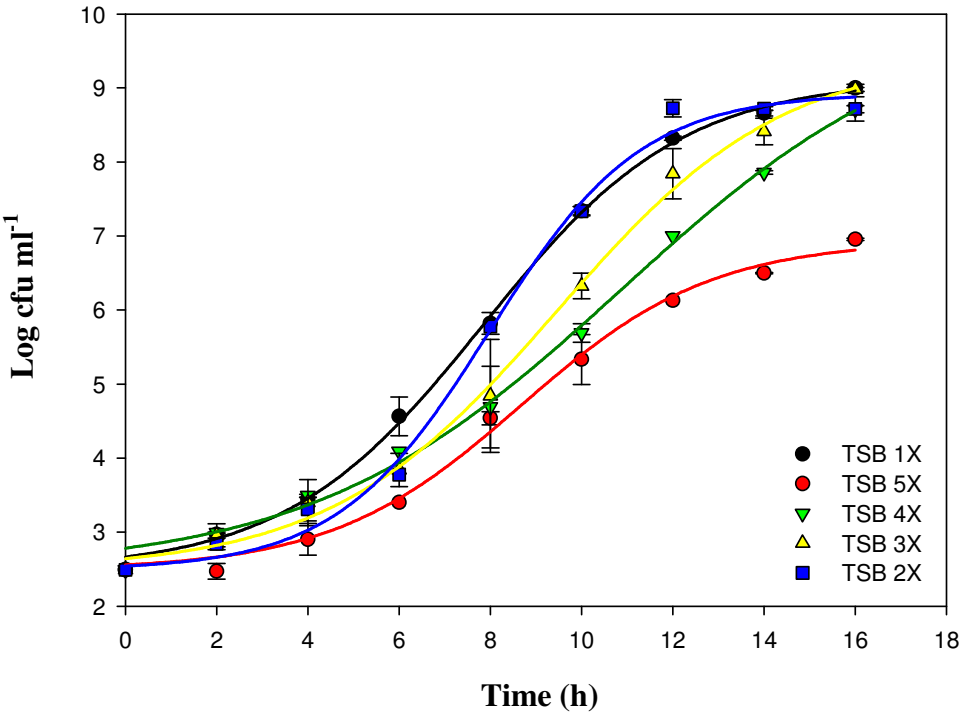


รูปที่ 4.10 การ varied ความเข้มของอาหาร TSB เพื่อการเจริญเติบโตของ Salmonella ใน 96 – microplate

อาหารมาตรฐาน TSB ถูกเตรียมใน test tube โดยการปรับความเข้มข้นของ TSB ที่ 5X, 4X, 3X, 2X, 1X, 0.5X, 0.25X, 0.125X และ 0.86% ของน้ำเกลือ (NaCl) ปริมาตร 5 ml ของแต่ละความเข้มข้น ปริมาณเชื้อ *Salmonella* เริ่มต้นที่ประมาณ 10^2 - 10^3 CFU/ml ถูกบรรจุลงใน test tube ซึ่งมี TSB จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ vortex mixer และปริมาตรของ cultivation สุดท้ายใน 96 – microwell plate เป็น 150 µl อุณหภูมิของ cultivation ถูกควบคุมที่ 37 °C ปริมาณเชื้อถูกนับจำนวนที่เวลาต่างๆ กันด้วยเทคนิค MDPT ที่ได้นำเสนอไปแล้วในหัวข้อ 4.1

4.3.2 ผลการทดลอง

ปริมาณเชื้อ *Salmonella* เริ่มต้นปริมาณ 10^2 - 10^3 CFU/ml ถูก inoculation ลงในอาหาร TSB ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในระหว่างการบ่ม จะสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณเชื้อที่เวลาต่างๆ นำค่าปริมาณเชื้อที่ได้พล็อตกราฟความสัมพันธ์กับเวลา ดังแสดงในรูปที่ 4.11



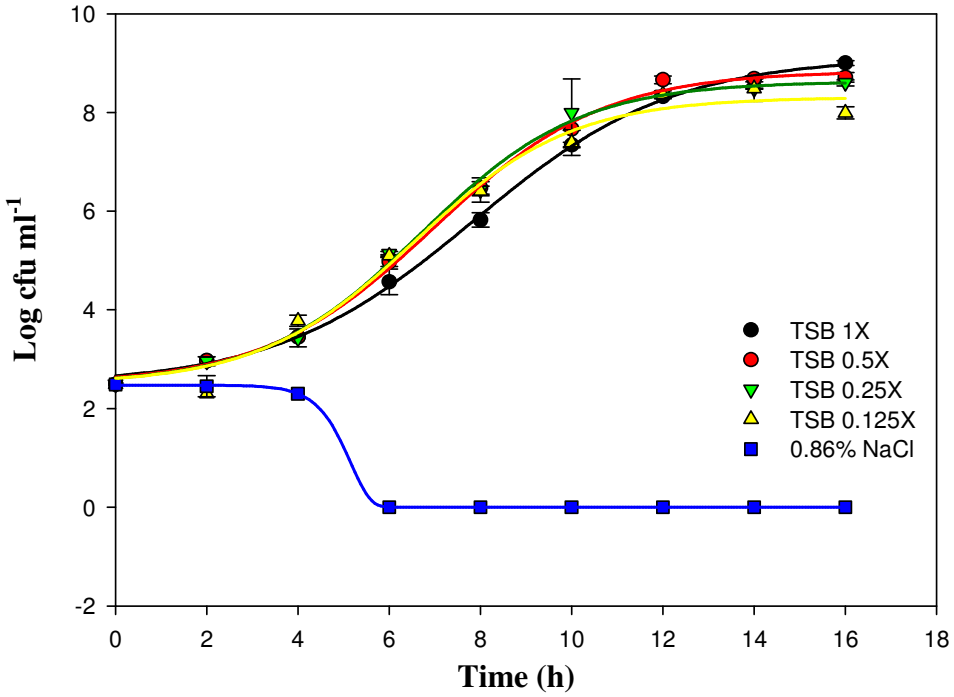
รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบ kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ที่สูตรความเข้มข้นอาหารปกติ (1X) และที่การความเข้มข้นอื่นๆ ที่มากกว่า (e.g. 5X, 4X, 3X และ 2X)

รูปที่ 4.11 แสดงผลการเจริญเติบโตของ *Salmonella* โดยการใช้ความเข้มข้นของ TSB ที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารจำเพาะของ TSB กับความเข้มข้นอื่นๆ จากกราฟที่ความเข้มข้นต่างๆ มีแนวโน้มที่จะให้ผลเช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 1X แต่อย่างไรก็ตามกราฟข้อมูลดังกล่าวค่อนข้างให้ผลแตกต่างในเรื่องของ maximum growth rate เพราะว่าผลโดยทั่วไปของที่ค่า a_w ต่ำกว่าที่สภาวะเหมาะสม ($a_w < 0.9$) สามารถเพิ่มความยาวของ lag phase ของการเจริญเติบโต และลดอัตราการเจริญเติบโต ผลกระทบเหล่านี้อาจมีผลต่อปริมาณน้ำที่น้อยลงบนกิจกรรมของ metabolic เพราะปฏิกริยาของสารเคมีเหล่านี้ต่อเซลล์ต้องการสิ่งแวดล้อมที่ปราศจากน้ำ (M. Jay, 2000) ดังนั้น ความเข้มข้นของ TSB มากกว่า 1X จึงไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Salmonella* เพราะ *Salmonella* ค่อนข้าง sensitive กับที่ความเข้มข้นสูงและความเข้มข้นของอาหารเหลวที่มากกว่าสูตรปกติ (1X) มีผลต่อ *Salmonella* ในเรื่องของความดันที่แตกต่าง (Mountnev, 1988)

กระบวนการออสโมซิส (osmosis) เป็นการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ โดยเป็นการเคลื่อนที่ของน้ำจากส่วนที่มีความเข้มข้นสูงผ่าน membrane ที่สามารถทะลุผ่านได้ไปยังส่วนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า โมเลกุลของน้ำอิสระผ่านข้ามเยื่อบุผนังเมมเบรนเซลล์ในทิศทางทั้งคู่ ยกเว้นแต่ใน solute molecule ถ้า medium รอบ ๆ ของเซลล์ มีความเข้มข้นของโมเลกุลน้ำสูงกว่าเซลล์ (very dilute solution) เซลล์จะได้รับน้ำโดยการออสโมซิส ถ้า medium มีความเข้มข้นเดียวกันกับในเซลล์จะไม่มีการเคลื่อนที่ของน้ำข้ามผ่านเยื่อบุผนังเมมเบรนเซลล์ น้ำข้ามเซลล์เมมเบรนใน 2 ทิศทาง แต่ปริมาณที่เข้าไปเหมือนกับปริมาณที่ออก ดังนั้นไม่มีการเคลื่อนที่ทั้งหมดของน้ำ เซลล์ยังคงรักษาขนาดของโมเลกุลไว้ ถ้า medium มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำน้อยกว่าเซลล์ เซลล์จะได้รับน้ำจากการออสโมซิส ถ้า medium มีความเข้มข้นของน้ำเดียวกันกับของเซลล์ จะไม่มีการเคลื่อนที่ของน้ำข้ามผ่านเยื่อบุผนังเมมเบรน น้ำสามารถข้ามผ่านเมมเบรนได้ทั้ง 2 ทิศทาง แต่ปริมาณน้ำที่เข้าไปเหมือนกับปริมาณที่ออกมา ดังนั้นไม่มีการเคลื่อนที่ของน้ำทั้งหมดในเซลล์ จะยังคงอยู่ที่ขนาดเหมือนกัน ถ้า medium มีความเข้มข้นของน้ำต่ำกว่ารอบนอกเซลล์ เซลล์จะเกิดการสูญเสียน้ำโดยการออสโมซิส เมื่อน้ำข้ามผ่านเยื่อบุผนังเมมเบรนเซลล์ทั้ง 2 ทิศทาง แต่ที่เวลานี้มีปริมาณน้ำออกจากเซลล์มากกว่าที่เข้าไป ดังนั้นเซลล์จะเกิดการหดตัวและจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรีย

เหตุการณ์ดังกล่าวเป็นข้อจำกัดอีกอันหนึ่งของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แบคทีเรียประมาณ 80-90% ต้องการน้ำเพื่อการเจริญเติบโตเพราะแบคทีเรียทั้งหลายได้รับสารอาหารส่วนใหญ่จากสภาพแวดล้อมที่เป็น

น้ำ ในเพิ่มเติมความเข้มข้นที่เพียงพอของ media ซึ่งที่ความเข้มข้นสูงกว่าภายในเซลล์เหล่านี้ สาเหตุเพราะน้ำสูญเสียจากเซลล์โดยการออสโมซิส มันเป็นสาเหตุให้เยื่อบุผนังเมมเบรนแยกจาก overlying ผนังเซลล์ ผลกระทบเหล่านี้ถูกเรียกว่าพลาสโมไลซิส ดังนั้นแนวโน้มของอัตราการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ TSB



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบ kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ระหว่างสูตรความเข้มข้นอาหารปกติ (1X) และที่การความเข้มข้นอื่นๆ ที่น้อยกว่า (e.g. 0.5X, 0.25X, 0.125X และ 0.86% NaCl)

จากรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นผลของความเข้มข้นต่างๆของ TSB ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* สารประกอบออร์แกนิกส์เช่น แหล่งของ nitrogen เป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองจาก 0.86% NaCl ได้ถูกอธิบายว่าน้ำเกลือมีปริมาณของสารอาหารไม่มากต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* แม้ว่าสารละลาย NaCl มี A_w สูงกว่าตัวอย่างอื่นแต่อาหารเหลวดังกล่าวขาดสารอาหาร นอกเหนือจากนั้น ที่ความเข้มข้น 0.5X, 0.25X และ 0.125X เป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1X ของสูตรมาตรฐาน TSB ปกติ แต่ *Salmonella* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีอัตราการเจริญที่เหมือนกับ 1X มันถูกแสดงให้เห็นเป็นนัยแล้วว่า องค์ประกอบในอาหาร TSB เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* เพราะว่าเทคนิค MDPT ปรารถนาให้แบคทีเรียสามารถตรวจพบได้ภายใน 6 ชั่วโมง ดังนั้นสูตรอาหารที่จำเพาะที่สูตรปกติ 1X มีสารอาหารมากเกินความจำเป็น

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของ TSB ต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.

TSB Concentration	μ_{max}	R^2_{ave}	RMSE
5X	1.844	0.997	0.105
4X	2.109	0.995	0.136
3X	2.156	0.997	0.129
2X	2.346	0.993	0.239
1X	2.177	0.998	0.103
0.5X	1.852	0.997	0.145
0.25X	1.731	0.996	0.162
0.125X	1.703	0.985	0.346
0.86% Normal Saline	-0.814	0.946	0.235

แบบจำลองของ Sigmoid ถูกใช้ในการประมาณค่า maximum growth rate จากข้อมูลการเจริญเติบโตที่สภาวะความเข้มข้นของ TSB ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.3 ค่าความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดจากแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติวิธีที่เป็นมาตรฐานใช้ 1X ของความเข้มข้นของ TSB ต่อการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจากตารางถูกแสดงให้เห็นว่าที่ 1X ของ TSB ใช้ปริมาณสารอาหารมากเกินไป ในการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยเทคนิค MDPT เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง 1X กับ 0.5X ของ TSB ค่า maximum growth rate ของ *Salmonella* ซึ่ง cultivated ใน 0.5X กับ 1X เป็น 1.852 และ 2.177 h^{-1} ตามลำดับ เพราะว่าแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นสำหรับการสร้างผนังเซลล์ กรดอะมิโนทั้งหมดซึ่งสร้างโปรตีนและเป็นสารที่สำคัญสำหรับ Nucleic acids, DNA และ RNA ถ้าปราศจากแหล่งไนโตรเจนการเจริญเติบโตของ *Salmonella* เป็นไปไม่ได้ ไม่เพียงแต่แหล่งของไนโตรเจน แบคทีเรียยังต้องการปริมาณน้ำบางส่วน น้ำสามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิด (Eddleman, 1999)

ที่ความเข้มข้นของ TSB ต่ำสุดซึ่งเป็นไปได้ว่า *Salmonella* จะสามารถเจริญเติบโต และมี maximum growth rate ที่เหมือนกันกับสูตรอาหาร TSB โดยทั่วไปซึ่งเป็น 0.5X อย่างไรก็ตามการใช้ 0.86% ของ NaCl สามารถรักษา *Salmonella* เซลล์ แต่มันไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* เซลล์ แม้ว่ามันมีสารอาหารบางส่วนในน้ำเกลือ แต่มันไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

ในกรณีนี้ ผลของความเข้มข้นที่ 1X ของอาหารเหลวมาตรฐาน TSB ถูกเลือกมาเพื่อเปรียบเทียบทางเลือกของ media สำหรับการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ในการทดลองถัดไป จากเหตุผลทั้งหมดที่กล่าวมา ทางเลือกของ media อาจจะเป็นทางเลือกสำหรับการเพาะเลี้ยง *Salmonella* เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ กับที่สูตรอาหารเหลว TSB ปกติที่ความเข้มข้น 1X การสมมติทางเลือกของ media อาจจะมีปริมาณของสารอาหารที่มากเกินพอ ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ภายใน 8 ชั่วโมง

4.4 ผลของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

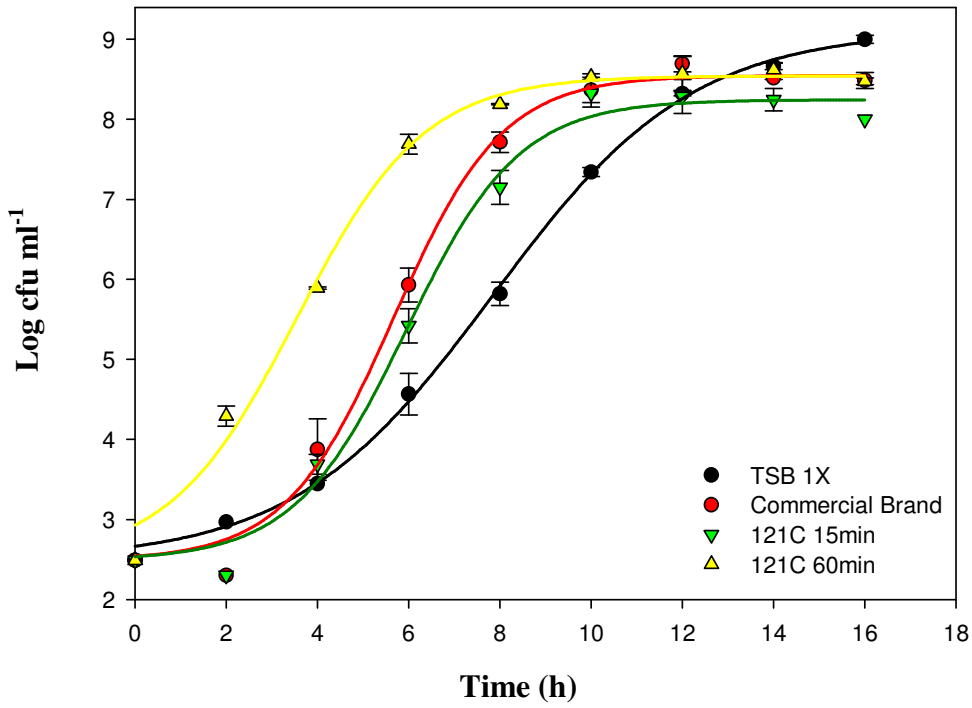
ขั้นตอนการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ดังนั้นที่สภาะการเตรียมด้วยเทคนิคต่าง ๆ จึงถูกนำมาศึกษาเพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะ

4.4.1 รายละเอียดการดำเนินการ

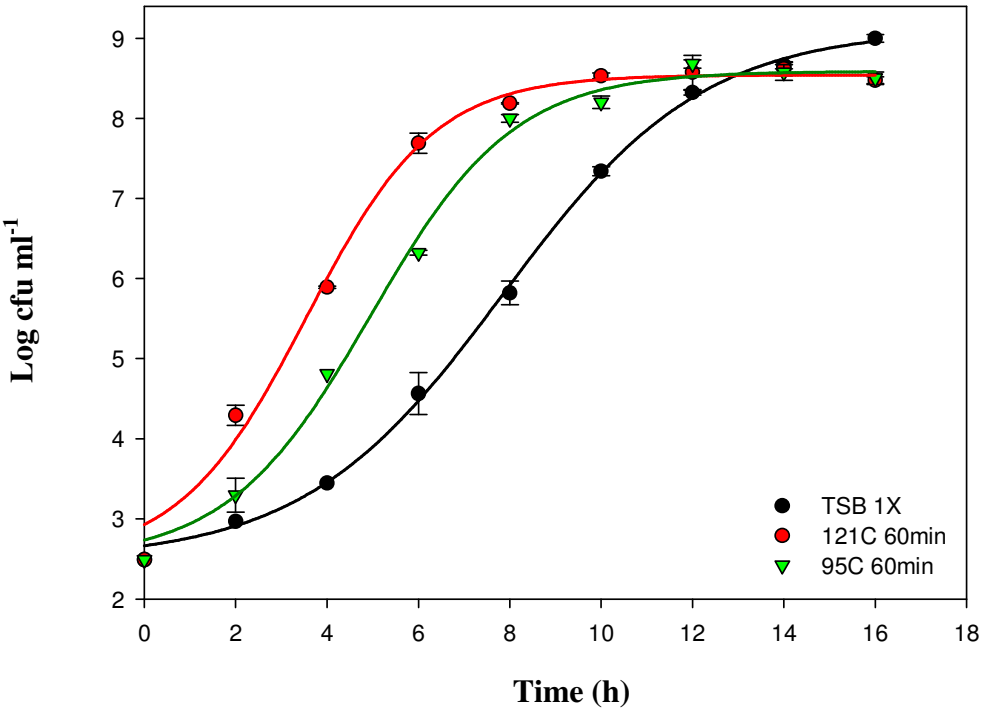
ทางเลือกการเตรียมอาหาร media ถูกเตรียมในหลอดทดลอง Duran tube โดยมีการศึกษาในหลายๆ อุณหภูมิ เวลาและขั้นตอน ซึ่งมี 3 วิธีในการดำเนินการสกัดไก่ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที, 121°C เป็นเวลา 60 นาทีและอื่นๆ อีกเป็นการต้มให้เดือดที่ 95°C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อนั้นทำการเปรียบเทียบกับไก่สกัดที่มีการจำหน่ายในระดับเชิงการค้า (BRAND) ตัวอย่างทั้งหมดเหล่านี้ถูกใช้เพียง 5 ml ในหลอดทดลองกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการศึกษา เพื่อแทนที่สูตรอาหารเหลวจำเพาะเดิมที่เป็น TSB เมื่อทำการ inoculation เชื้อ *Salmonella* ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ $10^2 – 10^3$ CFU/ml ลงในสูตรอาหารที่เตรียมด้วยกรรมวิธีต่างๆ จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ vortex mixer และปริมาตรของ cultivation สุดท้ายใน 96 – microwell plate เป็น 150 µl อุณหภูมิของ cultivation ถูกควบคุมที่ 37°C ปริมาณเชื้อถูกดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MDPT

4.4.2 ผลการทดลอง

การใช้ logistic model เพื่อเปรียบเทียบค่า maximum specific growth ของ media ไก่สกัด โดยปราศจาก non-selective TSB media ที่ได้จากอุณหภูมิการบ่มที่ 37°C แสดงดังกราฟรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญเติบโตของ *Salmonella spp.* ที่สภาวะการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะจากวัตถุดิบไก่ด้วยวิธีการแบบต่างๆ (i.e., 121°C 15 นาที, 121°C 60 นาที) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญเติบโตของ *Salmonella spp.* ที่สภาวะการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะจากวัตถุดิบไก่ด้วยวิธีการแบบต่างๆ (i.e., 121°C 60 นาที, 95°C 60 นาที) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 4.4 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการเตรียมอาหารเหลวไม่จำเพาะจากวัตถุดิบไก่ (ไก่สกัด) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.

Alternative source	$\mu_{max}(h^{-1})$	R^2_{ave}	RMSE
TSB 1X	0.460^{c} ±0.022	0.9988	0.1036
Commercial (BRAND)	0.853^{ab} ±0.091	0.9951	0.2188
121°C for 15 minute	0.730^{b} ±0.033	0.9919	0.2336
121°C for 60 minute	0.881^{a} ±0.027	0.9924	0.2587
95°C for 60 minute	0.764^{ab} ±0.036	0.9955	0.1896

จากกราฟรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นผลของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะแบบต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* เมื่อเปรียบเทียบผลของการเตรียมกับสูตรปกติอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะที่ 1X กับที่สภาวะการเตรียมอาหารที่อื่นๆ แสดงให้เห็นว่าให้ผลที่เหมือนกันกับสูตรอาหารปกติ และตารางที่ 4.4 แสดงค่า maximum growth rate ของไก่สกัด โดยค่า maximum growth rate แสดงค่าสูงสุดที่สภาวะการเตรียมไก่สกัดด้วยอุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการที่จะทำให้ kinetic ของการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ดีขึ้นโดยให้ค่า maximum growth rate ที่ 0.881 เพราะว่าที่เงื่อนไขนี้ด้วยอุณหภูมิสูงใช้เวลานานสามารถที่จะปลดปล่อยกรดอะมิโนจากเนื้อไก่ เมื่อนั้นกรดอะมิโนละลายอยู่ในสารละลายไก่สกัดระหว่างที่ทำการให้ความร้อน (e.g., ไลซีน, อะจินิน, เมทไธโอนีน) และมันสามารถลดน้ำตาลด้วยเหมือนกัน (Hurrel et al., 1976) ดังนั้นเป็นการแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสารละลายไก่สกัดที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที เป็นเงื่อนไขที่ดีมากในการสกัดสารสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยง *Salmonella*

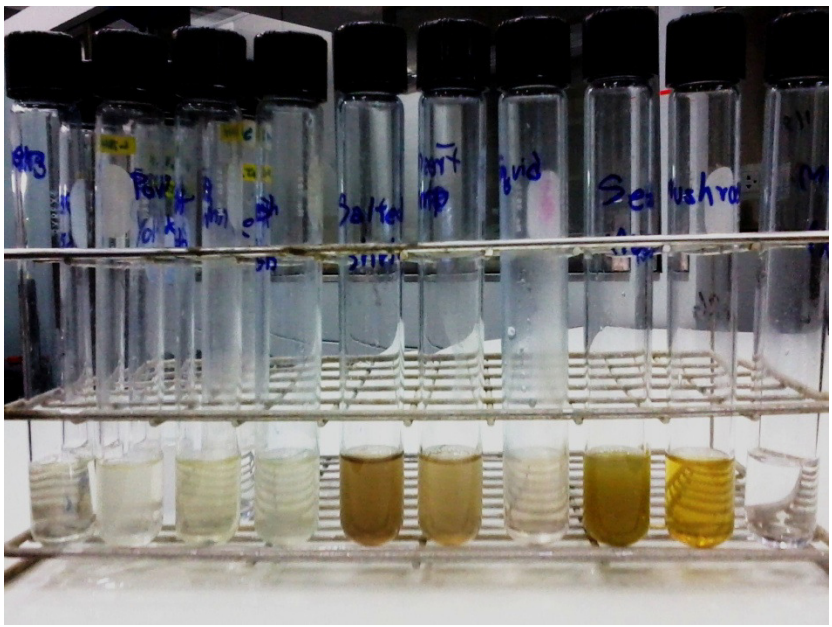
ส่วนเพิ่มเติม เมื่อเปรียบเทียบผลจากไก่สกัดที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที กับที่ 95°C ที่ช่วงเวลาเดียวกัน ที่อุณหภูมิสูงใช้เวลานานสามารถปล่อยปริมาณของสารอาหารที่สำคัญออกจากวัตถุดิบได้ดีกว่าการสกัดโดยการใช้เวลาน้อย แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที เป็นเงื่อนไขการสกัดที่ดีในการสกัดทางเลือก media อื่นๆ สำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Salmonella* โดยสรุปอาหารเหลวไม่จำเพาะเลี้ยง TSB ความเข้มข้นยังไม่ใช่ทางเลือกที่ดีที่สุด สำหรับการเพาะเลี้ยง *Salmonella* แต่ทางเลือก media อื่น ๆ หรือการดำเนินการ enrichment เองมีความสะดวกกว่า TSB เพื่อการเพิ่มค่าเป็น 2 เท่าของ maximum growth rate ดังนั้นการใช้ TSB สามารถถูกเปลี่ยนแปลงจากเพียงแค่ไก่สกัดเป็นทางเลือกโปรตีนอาหารอื่นๆ ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่แตกต่าง เช่น ตัวอย่างเช่น กุ้ง เห็ด หอยแมลภู่ ไก่ เนื้อหมู และปลาหมึก

4.5 ผลของทางเลือก media อื่นๆ สำหรับการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าความเข้มของสูตรอาหาร TSB ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella* โดยที่ความเข้มข้นของ TSB ที่ต่ำกว่าให้ผลอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับที่สูตร TSB ปกติ ดังนั้นการมองหาทางเลือกด้วยการแทนที่สูตรใน media ของ TSB จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถเพิ่มจำนวนของ *Salmonella*

4.5.1 รายละเอียดการดำเนินการ

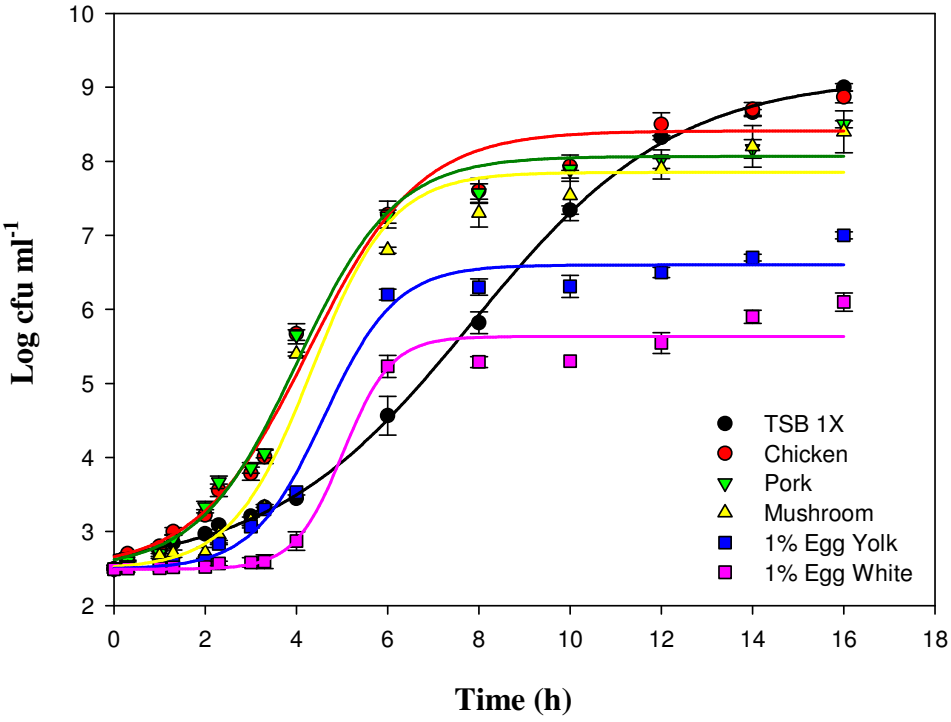
มีตัวอย่างจำนวน 13 ตัวอย่าง ในการนำเสนอรูปแบบทางเลือกอาหาร media ปริมาณของ media แต่ละชนิดจำนวน 5 ml จะถูกบรรจุในหลอดทดสอบ ในการทดลองปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการของ *Salmonella* อยู่ที่ประมาณ 10^2 - 10^3 CFU/ml อาหาร media ดังกล่าวใช้แทนที่อาหารเหลวไม่จำเพาะมาตรฐาน TSB หลังจากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ vortex mixer และปริมาตรของ cultivation สุดท้ายใน 96-microwell plate เป็น 150 µl อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงถูกควบคุมที่ 37°C ปริมาณเชื้อทั้งหมดถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MDPT



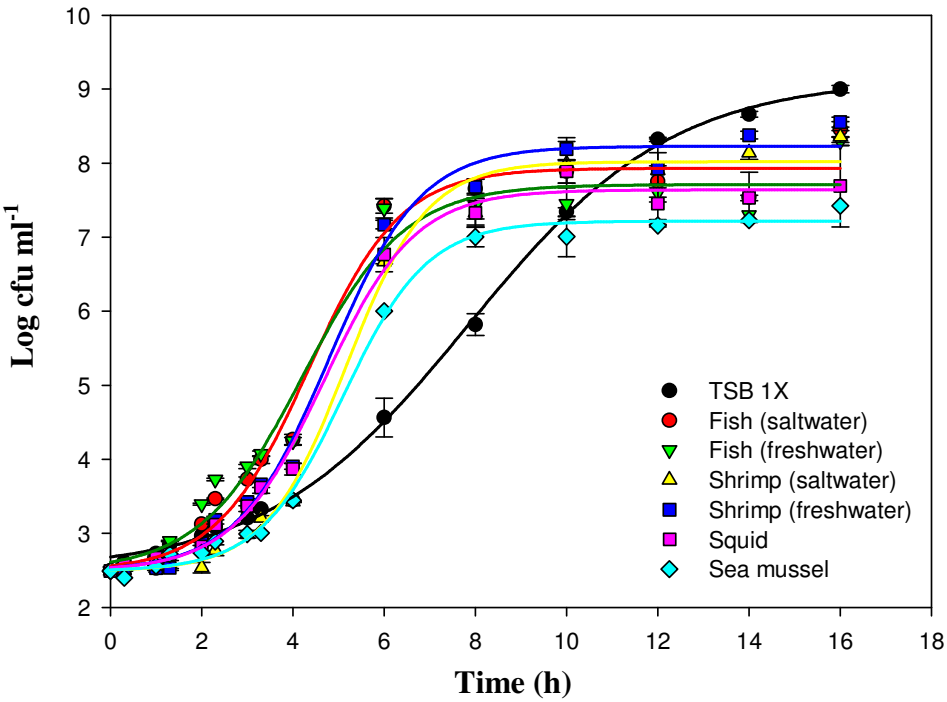
รูปที่ 4.15 ทางเลือก media ที่เป็นแหล่งของไนโตรเจน

4.5.2 ผลการทดลอง

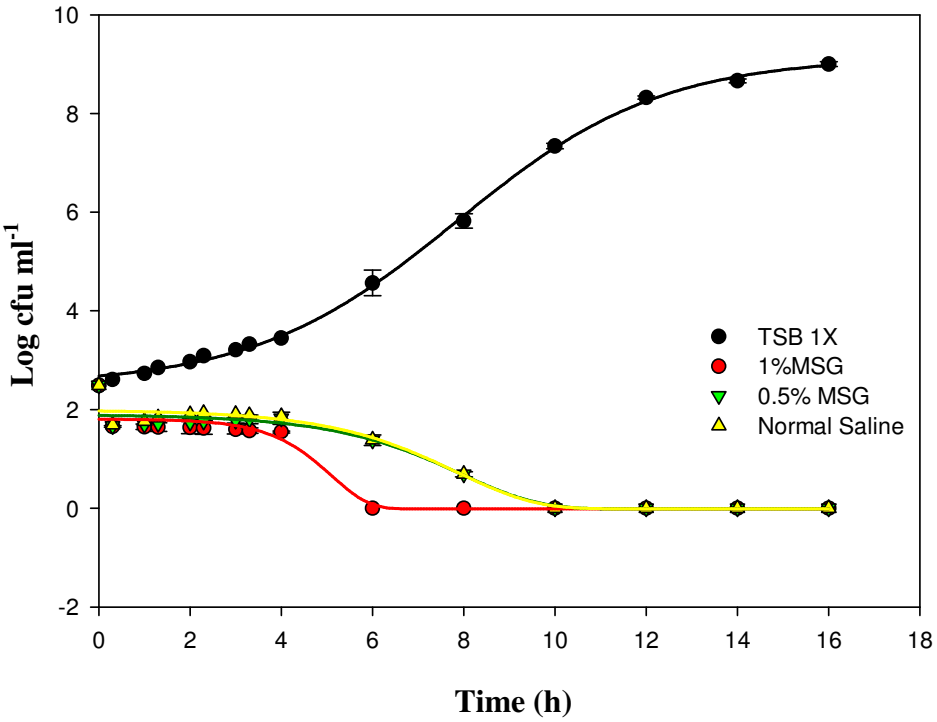
จากการศึกษาทางเลือก media ที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนชนิดต่างๆ เพื่อแทนที่สูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะ TSB ถูกนำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ที่เวลาต่างๆ แสดงดังกราฟรูปที่ 4.16, 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 กราฟเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร media ต่างชนิด (i.e., TSB, ไก่, หมู, เห็ด, 1% egg yolk, 1% egg white) ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C



รูปที่ 4.17 กราฟเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร media ต่างชนิด (i.e., TSB, ปลาน้ำจืด, ปลาน้ำแข็ง, กุ้งน้ำจืด, กุ้งน้ำเค็ม, ปลาหมึก, หอยแมลงภู่) ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C



รูปที่ 4.18 กราฟเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร media ต่างชนิด (i.e., TSB, 1% MSG, 0.5% MSG และน้ำเกลือ) ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C

รูปที่ 4.16 ถึง 4.18 แสดงแบบจำลองการเจริญเติบโตที่ได้มีการพล็อตกราฟกับปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เวลาต่างๆ กันในอาหารทางเลือกที่แตกต่างกัน การทดลองมีการเปรียบเทียบผลระหว่างสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะที่เป็นมาตรฐานที่ 1X ของ TSB กับทางเลือกอาหารอื่น โดยในการเตรียมอาหารทางเลือกอื่น เป็นการใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 60 นาที มีช่วง lag phase ที่มากกว่าอาหารเหลวไม่จำเพาะที่เป็นมาตรฐานความเข้มข้น 1X ของ TSB อาจเป็นทางเลือกของวัสดุถูกสกัดสำหรับสารองค์ประกอบซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์กว่าการใช้อาหาร TSB มาตรฐานทั่วไป สำหรับตัวอย่างไก่สกัด มีชนิดของกรดอะมิโนเช่น Asx, Thr, Gly, Ala, Val and His (Yonemitsu et al., 1997)

ท่ามกลางทางเลือกชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกัน ดูเหมือนว่าไก่ ปลาน้ำจืด และหมูให้กลุ่มกรดอะมิโนที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของ *Salmonella* โปรตีนไข่ขาวและไข่แดง นำไปสู่ความเหมาะสมเมื่อการเปรียบเทียบกลุ่มนี้กับเนื้อที่สามารถสกัดได้ง่ายและเห็ด สำหรับแหล่งโปรตีนอื่นจากอาหารทะเลและปลาน้ำจืด ประกอบไปด้วย ปลาน้ำเค็มและกุ้ง และปลาน้ำจืดและกุ้งกับหอยแมลงภู่ ปลาทั้งหมดและกุ้งให้ profile ที่ดี ในขณะที่หอยแมลงภู่เป็นที่ต้องการน้อยกว่า ความแตกต่างของแหล่งโปรตีนทั้งหมดสามารถถูกใช้เพื่อให้การเจริญเติบโตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะ TSB

แหล่งของไนโตรเจนสุดท้ายเป็นรูปผงจากตัวอย่าง MSG ที่ความเข้มข้นที่แตกต่าง แม้ว่า MSG เป็นสารของแหล่งไนโตรเจนสำหรับแบคทีเรีย ซึ่งสามารถถูกใช้เป็นสับเสตรทเพื่อการเจริญเติบโตแต่มันไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* (Roberts et al., 2008) โมโนโซเดียมกลูตาเมทเดี่ยวนี้อาจเป็นสารที่ไม่เหมาะสมในการเป็นแหล่งของสับเสตรท แต่มันอาจจะมีแนวโน้มเป็นแหล่งของกรดอะมิโนสำหรับสารความเข้มข้น โดยเฉพาะสารละลายน้ำเกลือ MSG นี้ยังคงให้การเจริญเติบโตเล็กน้อยแต่ไม่มากนักในการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.5 ทางเลือกของ media ที่ดีที่สุดที่ให้ค่า maximum growth สูง และสูงกว่าสูตรปกติของ TSB โดยเป็นไก่สกัดที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า *Salmonella* สามารถเจริญเติบโตภายในเวลา 8 – 16 ชั่วโมง อย่างรวดเร็ว

มากไปกว่านั้นแหล่งของไนโตรเจน *Salmonella* มีการเจริญเติบโตโดยการใช้ supplement อื่นๆ เช่น คาร์บอน และสารสำคัญต่างๆ เพราะว่าแหล่งของคาร์บอนเป็น building block ขององค์ประกอบออร์แกนิกที่จำเป็นในการมีชีวิต และแบคทีเรียสามารถได้รับพลังงานโดยการหมัก และหรือการหายใจ (Eddleman, 1999) การมี sigmoidal model เป็นเครื่องมือของการทดลอง μ_{max} ต้องมีการเปรียบเทียบ ท่ามกลางของทางเลือกโปรตีน (ไก่ หมู และปลา) ให้ profile การเจริญเติบโตที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ TSB และนี้สามารถถูกใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมในการวิจัย

ตารางที่ 4.5 ผลของทางเลือก media อื่นๆ ต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.

ทางเลือก media อื่นๆ	μ_{max}	R-square	RMSE
TSB1X	2.229	0.999	0.090
Chicken	1.213	0.985	0.329
Fish (freshwater)	1.120	0.977	0.363
Pork	1.074	0.991	0.251
Fish (saltwater)	1.006	0.987	0.296
Shrimp (freshwater)	1.002	0.993	0.233
Squid	0.994	0.995	0.175
Sea Mussel	0.922	0.997	0.128
Shrimp (saltwater)	0.886	0.995	0.203
Mushroom	0.874	0.980	0.377
1% Egg Yolk	0.789	0.990	0.201
1% Egg White	0.530	0.984	0.209
0.86% Normal Saline	-0.814	0.946	0.235
1% MSG	-1.679	0.951	0.213
0.5% MSG	-1.680	0.963	0.192

4.6 การพัฒนาสูตรอาหารจำเพาะเพื่อการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*

ในการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ประกอบไปด้วยขั้นตอน non-selective enrichment ในอาหารเหลวไม่จำเพาะซึ่งในการทดลองหน้านี้เป็นการใช้อาหารเหลว TSB ที่ความเข้มข้น 1X และนอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้แหล่งของทางเลือก media ใหม่แทนการใช้ TSB เป็นการสกัดไก่ด้วยกรรมวิธีการให้ความร้อนที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที ได้สารสกัดไก่ที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่ง media อื่นๆ โดยวัตถุประสงค์ของขั้นตอน non – selective enrichment เป็นการเพิ่มจำนวน *Salmonella* ในตัวอย่างที่อาจมีอยู่น้อยหรือบาดเจ็บจากกระบวนการผลิตอาหาร (food processing) เช่น การอบ การทอด การอบแห้ง เป็นต้น จากนั้นเพื่อเป็นการบ่งชี้การปนเปื้อนของ *Salmonella* ตัวอย่างที่มีการเพิ่มจำนวนใน non-selective enrichment จะมีการวิเคราะห์ในอาหารเหลวจำเพาะ enrichment ซึ่งในสูตรอาหารปกติจะมีการเติมสารยับยั้ง (inhibitor) เพื่อกำจัดเชื้อแข่งขันที่อยู่ในตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามอาหาร

เหลวจำเพาะดังกล่าวไม่สามารถที่จะ detect การปนเปื้อนของ *Salmonella* ได้เบื้องต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการ primary screening ของการติดเชื้อ *Salmonella* จึงนำเสนออาหารเหลวจำเพาะที่บ่งบอกการปนเปื้อนของ *Salmonella* ด้วยการเกิดสีในอาหารเหลว ทางผู้วิจัยจึงนำเสนอการพัฒนาอาหารเหลวจำเพาะ 2 ชนิด ที่เป็นปฏิกริยาของ *Salmonella* โดยประกอบไปด้วย

4.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation)

4.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะ H_2S production

4.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation)

4.6.1.1 การศึกษา wavelength และชนิดของ pH indicator ที่เหมาะสม

การพัฒนาอาหารเหลวคัดเลือกที่เห็นสีโดยใช้หลักการบนพื้นฐานของ amino acid decarboxylase ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของ *Salmonella* และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ สามารถใช้ปฏิกริยากรดอะมิโน โดยเอนไซม์ decarboxylase ซึ่งเป็นวิธีอย่างปกติในการขั้นตอนการใช้ชีวเคมีในการยืนยันการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารและตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมใช้ media ปริมาณ 5 ml และใช้เวลา 3 ถึง 4 วันเพื่อที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสี Lysine Decarboxylase Agar จาก pale สีม่วง เป็นสีเหลือง และจากสีเหลืองเป็นสีชมพูบานเย็น งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาการวิเคราะห์ขนาดเล็กระดับ microscale แต่ให้ผลวิเคราะห์ที่เร็ว ชัดเจน และค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ใน selective enrichment step สำหรับอาหารแข็ง Lysine Decarboxylase ถูกปรับเปลี่ยนสูตรโดยการใช้ soytone เป็นแหล่งของไนโตรเจนในการ enrichment ของ *Salmonella* นอกจากนี้ pH indicators ที่ใช้ใน pH ระดับกลางเพื่อหา pH indicator ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ broth ระหว่างการเกิดปฏิกริยา decarboxylation (โบรโมไทมอลบลูและฟีนอลเรด) ถูกนำมาเปรียบเทียบกับ bromocresol purple การวิเคราะห์ในรูปแบบลดขนาด (2 ml ของ broth ใน cuvette reactor) และ micro – cultivation (200 μl broth ใน 96 – well microplate) โดยปราศจากการเคลือบด้วย mineral oil ที่ผิวหน้า เพื่อสะดวกต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และกิจกรรมของเอนไซม์ decarboxylase ปฏิกริยา DC สะดวกในการติดตามด้วย microplate reader ซึ่งจะเขย่าตัวอย่างภายในเครื่องด้วย shaker เพื่อให้ตัวอย่างมีการ uniform เป็นเนื้อเดียวกัน ระหว่างที่ทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง

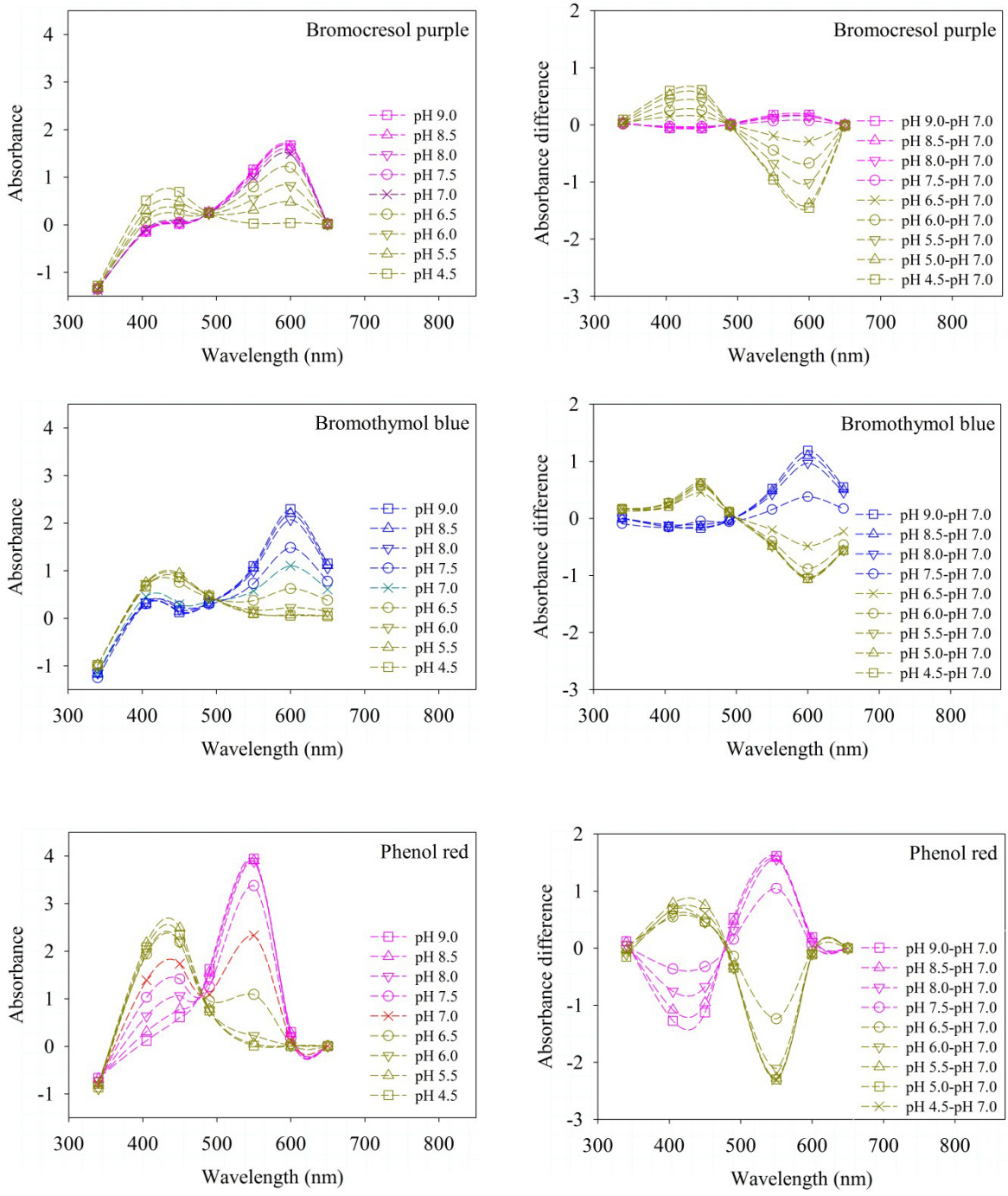
การหาชนิดของ pH ของ indicator และค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม สำหรับการตรวจติดตามปฏิกริยา amino acid decarboxylase activity บนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลง pH ในการศึกษาปฏิกริยาดีคาร์บอก

ซีเลชั่น ถูกขยายการศึกษาโดยการใช้ microplate assay ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้ microplate reader ในการทดลองเลือกชนิดของ pH indicator ที่เหมาะสม ปริมาณสารที่เตรียมจำนวน 200 µl ที่มี pH แต่ละชนิด ที่เป็น mLDB-BP, mLDB-BB และ mLDB-PB ที่ความแตกต่างของ pH (4.5 – 9.0) ถูกบรรจุลงในแต่ละ well ของ 96 – well flat bottom microplate ค่าการดูดกลืนแสงของ media ที่ wavelength 340, 405, 450, 490, 550, 590, 600 และ 650 nm ได้จากเครื่อง microplate reader ค่าการดูดกลืนแสงของกรดและอาหารโดยพื้นฐานถูกหักออกเพื่อให้ได้ค่าความแตกต่าง โดยการใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 7 สำหรับ pH indicator ทั้ง 3 ชนิด

ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ bromocresol purple, bromothymol blue และ phenol red ในอาหาร modified LDB (mLDB) ที่ความแตกต่างของ pH ชนิดต่างๆ ถูกเปรียบเทียบดังแสดงในรูปที่ 4.19

ค่าการดูดกลืนแสงมี 2 peak คือ 430 และ 550 นาโนเมตร อาหารเหลวมีค่าความเป็นกรด – ด่างสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าที่ A_{430} และอาหารเหลวที่ค่าความกรด – ด่างเป็นกลางจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าที่ A_{550} อาหารเหลวที่มีความเป็นกรด – ด่างเล็กน้อยเป็นผลมาจากช่วงแรกของปฏิกริยา แบคทีเรียมีการใช้กลูโคสใน broth ทำให้เกิดกระบวนการ fermentation เป็นผลให้เกิดกรดซึ่งเป็น by product ในอาหารเหลว การเกิดกรดดังกล่าวเป็นสาเหตุที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแล้วใช้น้ำตาลในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี indicator ทั้ง 3 ชนิด phenol red ให้การเปลี่ยนแปลงของสีที่ค่อนข้างชัดเจนในการตรวจ detected ด้วยสายตา และให้ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างอาหารเหลวที่สภาวะเป็น alkaline หรือเป็น acid และอาหารเหลวที่เป็นกลาง neutral ที่ wavelength ที่ 430 และ 550 นาโนเมตรในปริมาณสูง (รูปที่ 4.19) เราใช้ค่าความแตกต่างเป็น criterion เพื่อตัดสินใจเลือกชนิดของ indicator ที่เหมาะสม ซึ่ง indicator เหล่านี้ไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของ indicator โดยตรง จากการทดลองพบว่า phenol red แสดงให้เห็นค่าความแตกต่างที่ upward และ downward ของ wavelength ที่ 550 nm. คุณสมบัตินี้เป็นประโยชน์ในการ detect และแยกความแตกต่างของเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเหลว (พิจารณาการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน) และผลการทดลองของปฏิกริยาอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นให้ผลเป็น positive ดังนั้นค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร A_{550} ของตัวอย่างที่มีเชื้อ – ตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ inoculation ของเชื้อซึ่งมี pH 7 ถูกใช้ในการติดตามปฏิกริยาของอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นในแบคทีเรียกับการลดขนาดการวิเคราะห์ในระดับ microscale ที่ได้ทำการวัด optical measurement บนพื้นฐานของ pH changes ที่เหมือนกัน Onal และ Frigi (2013) ใช้ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ล้ำสมัยในการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometric assay (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm) สำหรับ

ปฏิกริยาการใช้ยูเรียในแบคทีเรีย วิธีเหล่านี้มีความถูกต้องในการตัดสินใจปฏิกริยาของการใช้ยูเรียที่เป็น positive และ negative ในชนิดของตัวอย่างที่แตกต่างกันกว่าการใช้ Nessler method

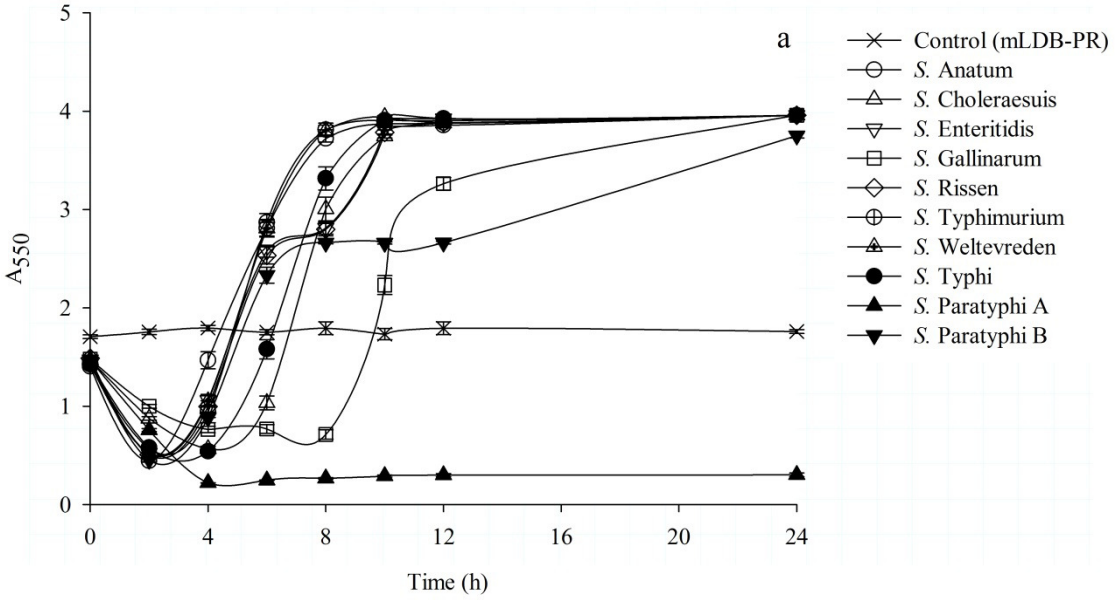


รูปที่ 4.19 ค่าการดูดกลืนแสงของ mLDB ที่มีการเติม bromocresol purple, bromothymol blue, and phenol red ที่มีการปรับ pH จาก 4.5 ถึง 9 สำหรับกราฟที่มาจาก 3 อินดิเคเตอร์มีปรากฏ 2 peaks ที่ 430

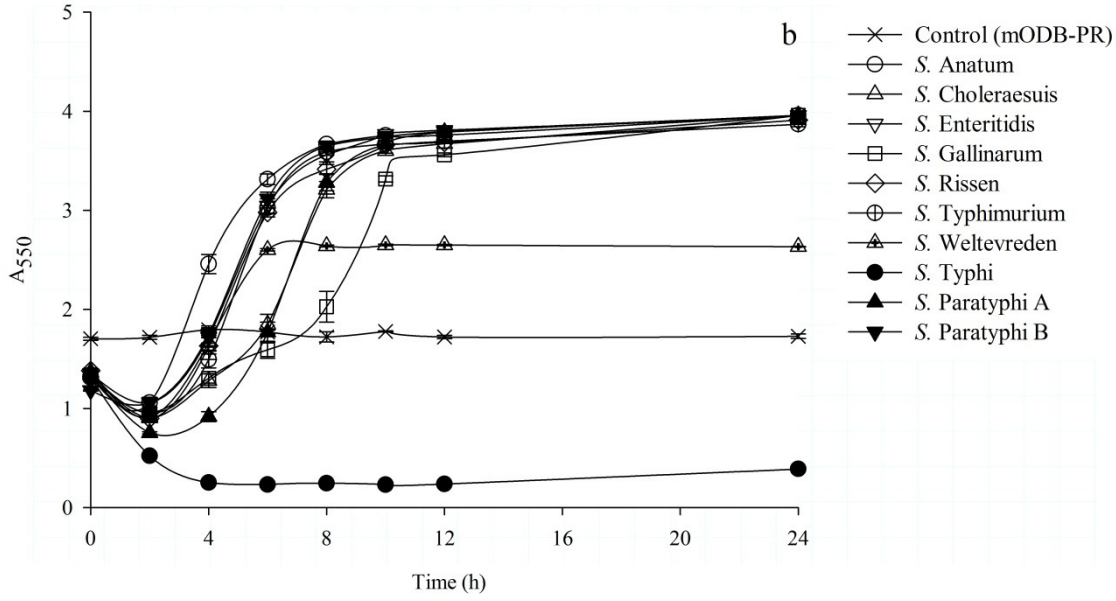
และ 550 nm ที่อาหารเหลวที่มี pH น้อยจะปรากฏค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{430} สูง ที่อาหารเหลวที่มี pH สูงมากจะปรากฏค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{550} สูง ความเบี่ยงเบนจากค่าความเป็นกลางไปเป็นกรด เนื่องจากเกิดการ fermentation ของกลูโคสสะท้อนให้เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อ การเพิ่ม pH จาก pH 7 เป็นผลจากการผลิตเอมีนเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส กราฟด้านขวาเป็นกราฟค่าความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ broth ที่แต่ละ pH จาก 4.5 ถึง 9 ลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 7 อินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดค่อนข้างที่จะแสดงค่าพีคที่สูงสุดของค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ทั้งคู่ของ 430 นาโนเมตรและ 550 นาโนเมตร

4.6.1.2 การศึกษา wavelength และชนิดของ pH indicator ที่เหมาะสม

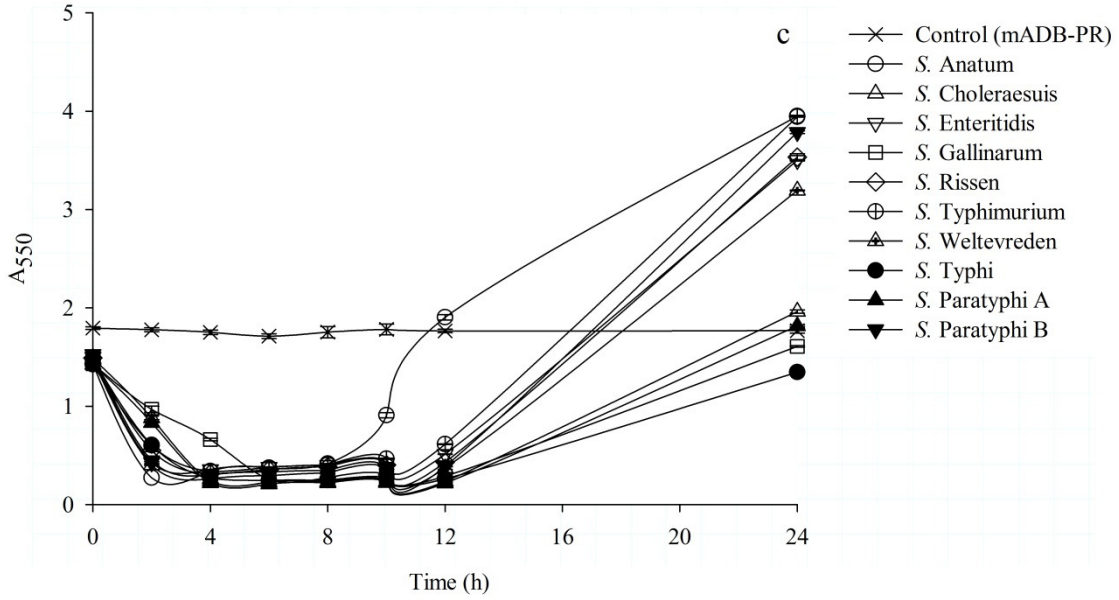
การตรวจวัดด้วยสายตาของปฏิกริยากรดอะมิโน decarboxylation ใน *Salmonellae* และ non - *Salmonellae* ใน modified media 96 – microwell plate ได้ทำการทดลองซ้ำด้วยการใช้กรดอะมิโนชนิดอื่น (ออร์นิทินและอะจินิน) นอกเหนือจากปฏิกริยา lysine decarboxylation ได้ถูกเพิ่มขึ้นมาในการทดสอบ และใช้ serovars ของ *Salmonella* และ non – *Salmonellae* ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย microplate ปฏิกริยากรดอะมิโน decarboxylation ของ *Salmonella* ด้วย 10 เชื้อ (7 non – typhoidal, 1 typhoidal, และ 2 paratyphoidal *Salmonella*) และ 14 non – *salmonellae* (11 แกรมลบ, และ 3 แกรมบวกแบคทีเรีย) ถูกนำมาทดสอบโดยการใช้ mLDB-PR, mODB-PR และ mADB-PR ในการทดลองเราใช้ 200 μl ของ culture broth ในแต่ละ microwell และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ซึ่งเราสามารถ detect กิจกรรมของ lysine และ ornithine decarboxylase ได้ภายใน 8 ชั่วโมง หลังจากทำการบ่ม arginine ถูกลดลงเป็น ornithine ก่อนเกิดปฏิกริยา decarboxylated (Morris and Fillingame, 1974) ดังนั้นใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมง เพื่อแสดงให้เห็นสีที่เปลี่ยนไปอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.20)



(a) mLDB-PR



(b) mODB-PR

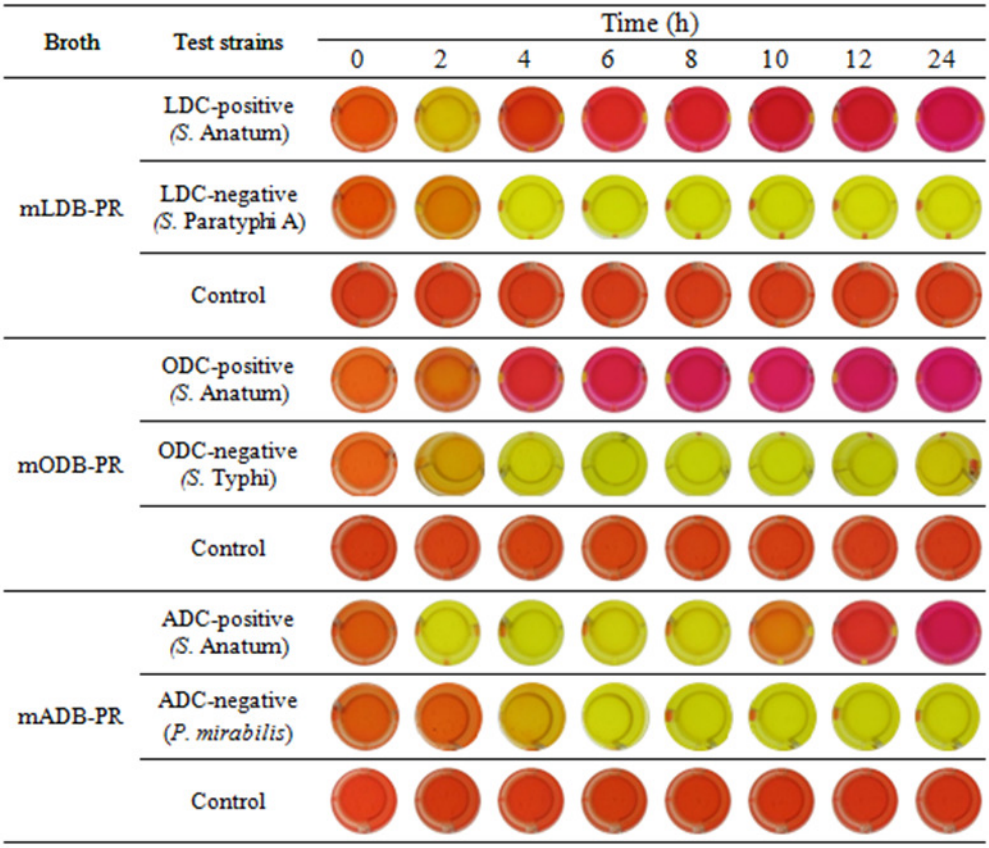


(c) mADB-PR

รูปที่ 4.20 ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปเทียบกับเวลาที่ wavelength 550 nm ของอาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนา mLDB-PR (a), mODB-PR (b), and mADB-PR (C) ซึ่ง inoculated ด้วยเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ (7 log CFU/ml) โดยในแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 ซ้ำตัวอย่าง ±SEM ค่าการดูดกลืนแสงมีการตกลงช่วงแรกสะท้อนให้เห็นการลดลงของ pH เนื่องจากการ fermentation ของกลูโคส การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ pH เป็นผลเนื่องจากกรดอะมิโนจากปฏิกริยา decaboxylation โดย acid-activated ของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสจากแบคทีเรียตัวอย่างที่เป็น positive ของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นแสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 สูงกว่าอาหารเหลวที่ไม่ได้มีการ inoculation ของเชื้อ (ตัวอย่าง control สัญลักษณ์ X)

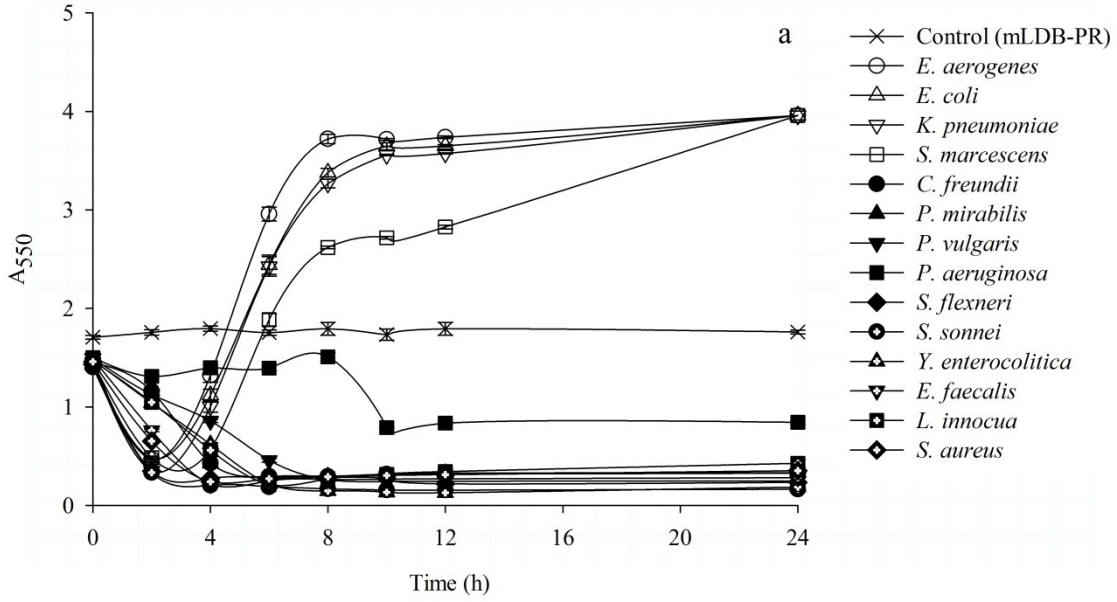
รูปที่ 4.21 แสดงสีของอาหารเหลวที่มีเชื้อใน microwells ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากทำการบ่มด้วย DC positive และ DC negative – *Salmonella* เวลาในการบ่มของการเปลี่ยนแปลงของสีสอดคล้องดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{550} (รูปที่ 4.20) ค่า absorbance ที่ลดลงในช่วงแรก รูปที่ 4.20 สะท้อนให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ pH จาก neutral (orange - red) ไปเป็นกรด (yellow) ใน mLDB-PR, mODB-PR, และ mADB-PR (รูปที่ 4.21) pH ของอาหารเหลวที่ลดลงเนื่องจากการหมักของกลูโคสโดยการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกับกรดอะมิโนที่จำเพาะจากปฏิกริยา amino decarboxylation การ metabolize กรดอะมิโนในสภาวะเงื่อนไขที่เป็นสภาพกรด (Viala et al., 2011) กิจกรรมเมทาบอลิซึมที่ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ทำให้ pH ของ broth สูงและสีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีแดง เป็นผลให้ค่า absorbance สูงขึ้น รูปที่ 4.20 ใน mLDB-

PR เมื่อ inoculated กับ *S.* Anatum, ค่าความเป็นกรด – ด่างลดจาก 6.5 ไปเป็น 5.5 โดยผลพลอยได้จากการหมักกลูโคส และเมื่อนั้นเพิ่มไปเป็น 9 โดยเอนไซม์ decarboxylase ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดคาร์ดาร์เวอรีน เอมีน อาหารเหลวที่มีการควบคุมโดยปราศจากการ inoculation ของเชื้อ จะยังคงเป็นสีแดง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง ปฏิกริยา decarboxylation ที่เป็น positive ถูก identified เมื่อค่า A_{550} สูงกว่า absorbance ของ control (ไม่ได้มีการ inoculation เชื้อใน broth ที่ pH 7) สอดคล้องกับการเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพู A_{550} ของ broth ที่สภาวะ control ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.8 สำหรับ mLDB-PR และยังคง steady state ตลอดการทดลอง (รูปที่ 4.20a และ 4.22a) เวลาเมื่อ A_{550} ไปถึงค่า 1.8 เป็น detection time โดย A_{550} ให้คำอธิบายที่ดีของกรดอะมิโน decarboxylation ท่ามกลางแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (รูปที่ 4.20) และสอดคล้องเห็นด้วยกับการสังเกตดูด้วยตาของปฏิกริยาที่เป็น positive สำหรับ lysine และ ornithine (24 ชั่วโมง) และ arginine (2 – 4 วัน) ที่เป็นรายงานในการยืนยันผลด้วยระบบชีวเคมี (biochemical identification) ท่ามกลางเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae (Ewing, 1986; Cowan and Steel, 2004) วิธีที่สามารถ detect ปฏิกริยาได้เร็วกว่าการใช้สายตาสังเกต ตัวอย่างเช่น ออร์นิทิน decarboxylation ใน *S.* Anatum (รูปที่ 4.20b) แสดงให้เห็นผลการทดลองที่เป็น positive ซึ่ง detect โดย microplate reader ที่ประมาณ 4 ชั่วโมง ในขณะที่ มันใช้เวลา 6 ชั่วโมง เพื่อพัฒนาสีชมพู ซึ่งถูก detectable โดยการใช้ตา

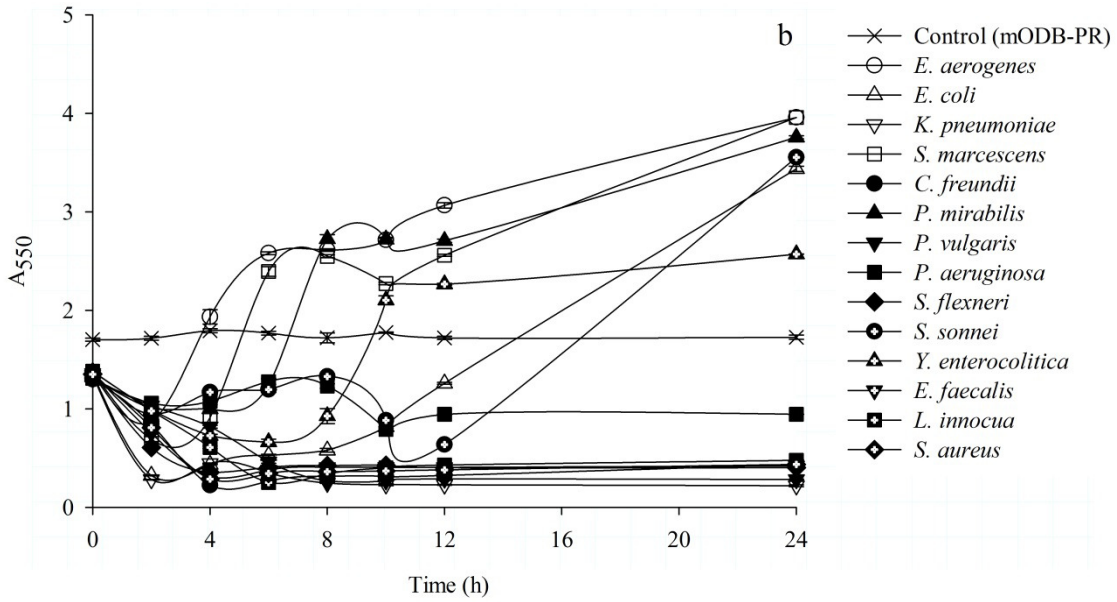


รูปที่ 4.21 แสดงรูปภาพ microwell ของอาหาร modified broth media ที่เวลาการบ่มต่างๆ หลังจากการ inoculation ของเชื้อแบคทีเรียที่ 7 log CFU/ml ที่สภาวะ control เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของสีสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงในรูป 4.20

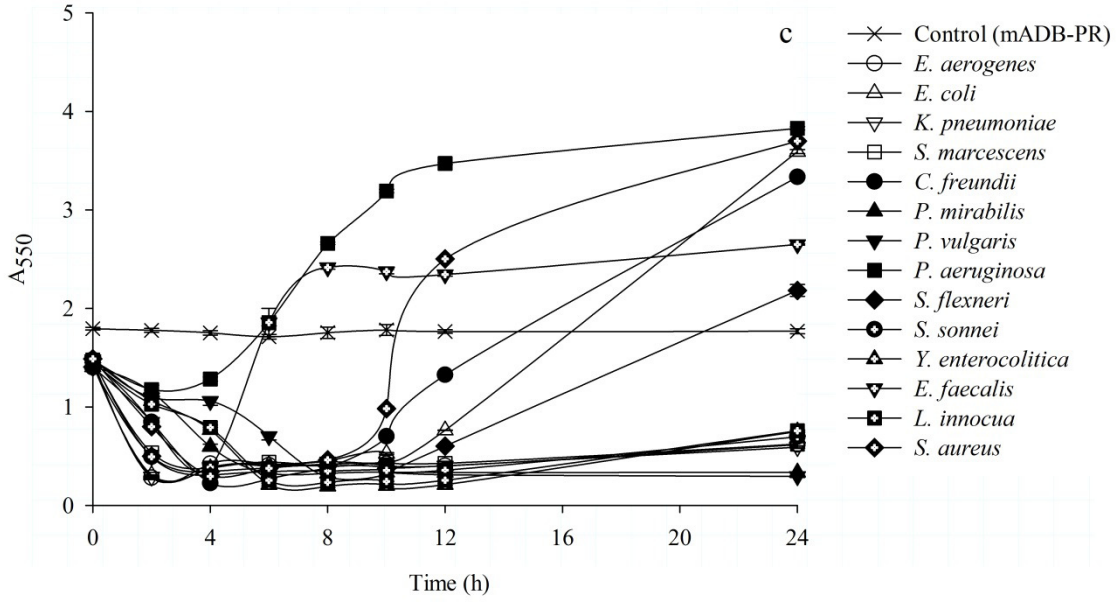
รูปแบบค่าการดูดกลืนแสงที่เหมือนกันถูกได้รับจากเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกริยากรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น ออร์นิธินดีคาร์บอกซีเลชั่น สามารถเกิดปฏิกริยาได้อย่างรวดเร็วภายใน 4 – 9 ชั่วโมง ตามด้วยไลซีน (6 – 10 ชั่วโมง) และเมื่อนั้นเป็นอาร์จินิน (16 – 24 ชั่วโมง) ปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของไลซีน และออร์นิทีน ให้ cadaverine และ putrescine ตามลำดับ ซึ่งอาร์จินินมีความซับซ้อนกว่า (Ozogul and Ozogul, 2007) อะจินินต้องถูกลดลงไปเป็นออร์นิทีนในตอนแรกและเป็น putrescine ตามลำดับ (Morris and Fillinfame, 1974; Shelef et al., 1998) เชื้อที่จำเพาะบางตัวและ*Salmonella* บางตัวเช่น *S.* Gallinarum, *S.*Typhi และ *S.* Paratyphi A ไม่สามารถอธิบายปฏิกริยา ADC activity ภายใน 24 ชั่วโมง แต่ ODC - positive (*S.* Gallinarum, *S.* Paratyphi A) และ LDC – positive (*S.* Gallinarum, *S.* Typhi) ดังนั้น อาร์จินินถูกแยกออกไปจาก media ที่ได้มีการพัฒนา มันเป็นความจำเป็นในการใช้ทั้งออร์นิทีนและไลซีน ในการพัฒนาต่อไปสำหรับการเร่งให้เร็วขึ้นและการตอบสนองของการ detection ของ *Salmonella* เพราะว่า *S.* Paratyphi A และ *S.* Typhi อาหารเหลวที่ไม่มีเอนไซม์ lysine และ ornithine decarboxylase จากเชื้อ (Ewing, 1986) ความจริงนี้ถูกเคลียร์แสดงให้เห็นโดยผลการทดลองการใช้อาหารเหลว mLDB-PR และ mODB-PR (รูปที่ 4.20a และ b) *S.* Paratyphi A ใน mLDB-PR และ *S.* Typhi ใน mODB-PR แสดงเฉพาะกลูโคสที่เกิดการ fermentation แต่ไม่ได้มีการเกิด decarboxylation ต่อ ปฏิกริยาของ positive และ negative decarboxylase แบคทีเรียสามารถแยกออกจากกันได้ที่ A_{550}



รูปที่ 4.22 (a)



รูปที่ 4.22 (b)



รูปที่ 4.22 (c)

รูปที่ 4.22กราฟค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรที่ได้รับจากอาหารดัดแปลง mLDB-PR (a), mODB-PR (b) และ mADB-PR (c) โดยอาหารดังกล่าว inoculated ด้วยเชื้อ non-salmonellae ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml ในแต่ละจุดของกราฟเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±SEM ที่วัดจากตัวอย่าง ค่าการเปลี่ยนแปลงของกราฟที่สูงขึ้นไปจาก control ของที่ wavelength 550 เป็นกราฟของแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกริยา

สำหรับ modified media ที่เหมือนกันถูกนำมาทดสอบด้วยเหมือนกันกับ 11 Enterobacteriaceae ของแกรมลบ และ 3 แกรมบวก (*E. feacalis, L. innocua,* และ *S. aureus*) ทิศทางที่แน่นอนของเอนไซม์ decarboxylase ท่ามกลาง 3 อะมิโนในการ enrichment, mLDB-PR แสดงให้เห็นมีความ high selectivity สำหรับ *Salmonella* spp. โดยยอมให้เพียงแค่ 4 strains ของ 11 Gram ลบที่เป็นเชื้อแข่งขัน (*E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pnuemoniae* และ *S. marcescense*) ใช้ออร์นิทีนใน mODB-PR สำหรับ 4 เชื้อแข่งขันแกรมลบ (*E. coli*, *C. freundii*, *P. aeruginosa*, และ *S. flexneri*) และแกรมบวก 2 strains (*E. feacalis* และ *S. aureus*) metabolized อะจินินใน mADB-PR ไม่มีเชื้อ 3 gram บวกที่เป็นเชื้อแข่งขันที่สามารถ metabolized กรดอะมิโน lysine และ ornithine ใน 24 ชั่วโมง แบคทีเรียแกรมบวกเหล่านี้มีเอนไซม์ lysine decarboxylase กับการเกิด lysine metabolism ที่ช้ากว่า lactic acid DC, LDC เป็นเป้าหมายที่ดีที่สุดในการใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ใน selective enrichment step เชื้อแข่งขันที่สามารถเกิด positive LDC (*E. aerogenes, E. coli, S.marcescens, P.mirabilis, S.sommei, Y.enterocolitica*) ต้องถูก selected out ออกไป

4.6.2 การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะ H_2S production

ในการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะของ H_2S production ได้ใช้คุณสมบัติด้านแสงมาประยุกต์ใช้เช่นเดียวกับการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำเพาะอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation) ถูกนำเสนอขึ้นมาเพื่อตรวจวิเคราะห์แยก *Salmonella* ด้วยกลไกปฏิกริยา thiosulfate – reducing โดย *Salmonella* ในอาหารคัดเลือก การพัฒนาอาหารเหลวคัดเลือกโดยการใช้กิจกรรมของ thiosulfate – reductase เพื่อ identify การปนเปื้อนของ *Salmonella* โดยหลักการดังกล่าวมีการทดสอบเชิง biochemical test ซึ่งได้รับการตอบรับเป็นอย่างดี และถูกใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบปกติ องค์ประกอบของสารไธโอซัลเฟต เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท ไซโลส ไลซีน ซอยโตน และ Sodium chloride ถูกประยุกต์ใช้เพื่อการ คัดเลือกเชื้อ *Salmonella* จำนวน 7 strains ที่สามารถเกิดปฏิกริยา thiosulfate – reducing และเชื้อแบคทีแกรมลบและแกรมบวกที่เป็นเชื้อแข่งขันอีกจำนวน 14 strains โดยตะกอนของ ferrous sulfide (FeS) ทำให้เกิดสีดำน้ำตาลและมากพอ สัญลักษณ์ของการเปลี่ยนแปลงของสีซึ่งถูกตรวจพบได้ด้วยค่า OD_{650} ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วสำหรับเชื้อ 7 strains ที่สามารถ thiosulfate – reducing Salmonella ภายใน 24 ชั่วโมง มีเพียง *Salmonella* Typhi ไม่ปรากฏความสามารถในการ generate ตะกอน iron sulfide ตะกอนสีดำของ *Salmonella* Anatum โชว์ความสามารถในการเกิดปฏิกริยาการเกิดสีดำและปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่ทำให้ใช้เวลาในการบ่มนาน มากกว่า 24 ชั่วโมง

เป้าหมายของการพัฒนาอาหารเหลวคัดเลือก H_2S production เพื่อนำเสนออาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีด้วย indicator เมื่อมีการปนเปื้อนของ *Salmonella* เบื้องต้น ก่อนที่จะไปทำการคัดแยกเชื้อด้วย agar และตามด้วยการ biochemical test และ serological confirmation เป้าหมายของการพัฒนา TFXL broth แสดงให้เห็นแนวโน้มสูงในการบ่งชี้การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในขณะที่ไม่มีในเทคนิคของอาหารเหลวคัดเลือกแบบวิธีปกติที่มีการใช้ระบบ indicator ต่างๆ การใช้ TFXL broth ไม่สามารถจำเพาะเจาะจงในการแยก H_2S เชื้อแข่งขันที่เป็น positive กับปฏิกริยาดังกล่าวได้ เช่น เชื้อ *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* และ *Proteus vulgalis* อย่างไรก็ตามเชื้อดังกล่าวสามารถถูกแยกได้โดยอาหารโครโมเจนิก agar ความขุ่นที่แทรกแซงใน TFXL broth สามารถถูกตรวจพบได้โดยการใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสง ถึงแม้ว่ามันมีผลกระทบค่อนข้างน้อย ความยาวคลื่นที่ 650 nm ถูกใช้ในการตรวจ detection ของตะกอนสีดำที่เกิดจากการฟอร์มตัวโดยเชื้อ *Salmonella* การพัฒนา TFXL broth การวัดค่าการดูดกลืนแสงถูกใช้ในการวัดปริมาณของตะกอน H_2S ในการเลือกช่วงแสงและสูตรอาหารเหลวคัดเลือก selective H_2S broth ที่เหมาะสม

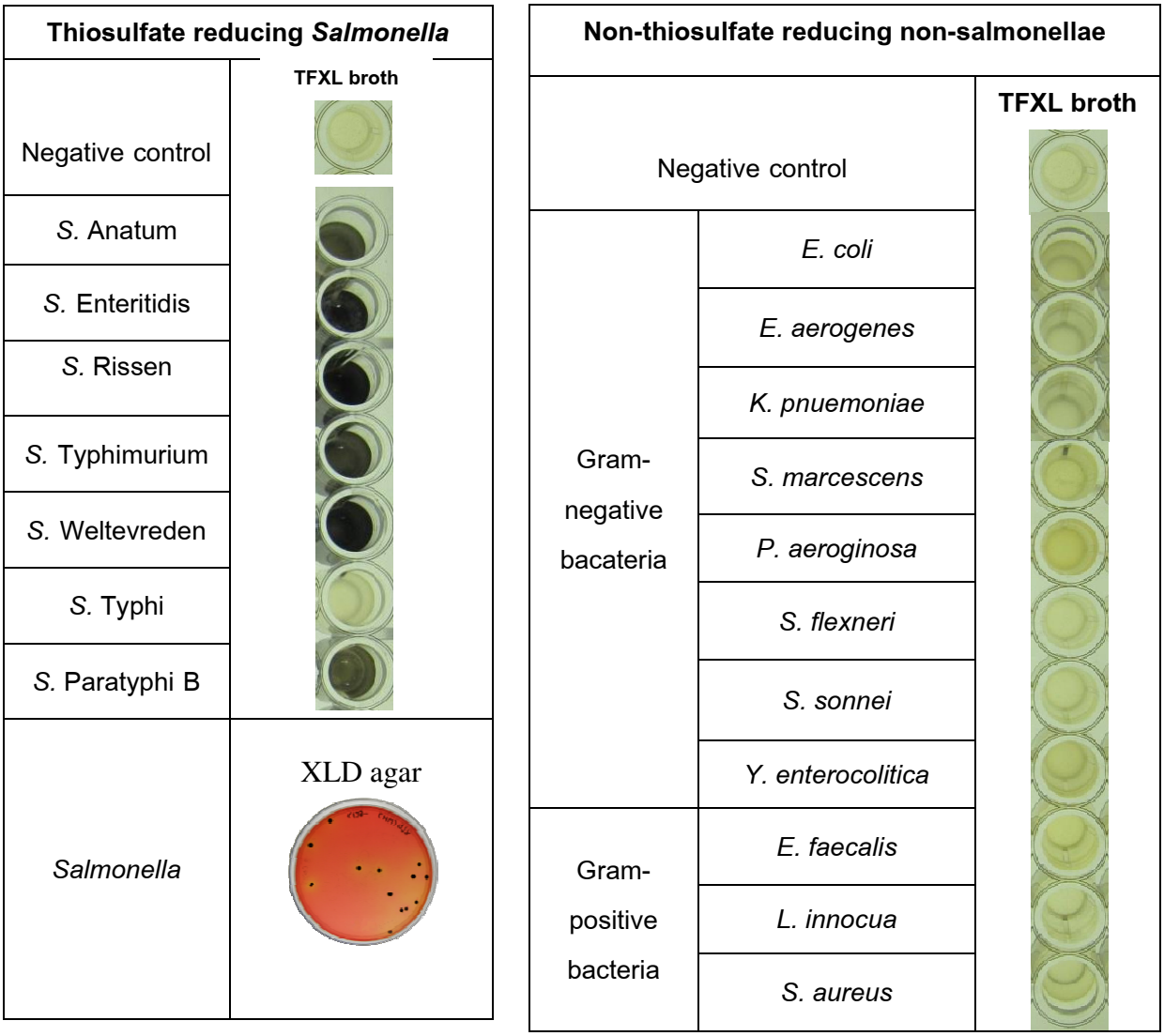
การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* สอดคล้องกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบให้เห็นบ่อยๆ ในรายงานการติดเชื้อทั่วโรคและมีหลายๆ กรณีที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนที่เกิดจากการที่การรับประทานของอาหารโดยมนุษย์โดยอาหารจากสัตว์ปีกและอาหารพร้อมรับประทาน (Schönenbrücher et al., 2008; Alakomi and Saarela, 2009) ปัญหาหลักของของมนุษย์ในกรณีการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* หรือ *Salmonellosis* เนื่องจากการติดเชื้อโดย non – typhoid *Salmonella* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยแนวโน้มการระบาดขยายตัวเป็นวงกว้างของโรคที่เกิดจากเชื้อในมนุษย์ ที่เกิดจากการติดเชื้อจากอาหารได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนดังกล่าว และหยุดระงับการปล่อยของผลิตภัณฑ์ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ (Shelef and Firstenberg-Eden, 1997; Fung, 2000) กระบวนการวิเคราะห์ที่ให้ผลการดำเนินงานที่สูงและเป็นที่น่าสนใจในอุตสาหกรรมอาหารและการวิเคราะห์ในระดับจุลินทรีย์

เพื่อให้ใช้เวลาการวิเคราะห์น้อย ลดข้อจำกัดการวิเคราะห์และสามารถแยกเชื้อแข่งขันเป้าหมาย แนวคิดการลดขนาดการวิเคราะห์ควบคู่กับคุณสมบัติเชิงกายภาพ (ความขุ่น, สี, ค่าการนำไฟฟ้า, การเปล่งแสงที่เกิดปฏิกริยาเคมี, และการเรืองแสง) เป็นกลยุทธ์ที่ดีสำหรับการประยุกต์การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและการวิเคราะห์ทาง biochemical ของตัวอย่างอาหาร (Phirke, 1977; Firstenberg-Eden and Sharpe, 1991; Stager and Davis, 1992; Kalamaki et al., 1997; Shelef and Firstenberg-Eden, 1997) อย่างไรก็ตามมีงานที่ได้มีการประยุกต์พัฒนาโดยใช้หลักการวิธีการลดขนาดการวิเคราะห์ในการตรวจ *Salmonella* ในระดับ presumptive step (Blivet et al., 1997; Shelef and Tan, 1998; McLaughlin, 2006). การลดลงของไธโอซัลเฟตเพื่อที่จะผลิตตะกอนสีดำเป็นการตัดสินใจกลไกคุณสมบัติสำหรับการบ่งชี้และการแยกการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ออกจาก species อื่นของ Enterobacteriaceae และรูปแบบการวิเคราะห์ที่ใช้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายของการวิเคราะห์ (Barrett and Clark, 1987; Barrow and Feltham, 1993; ISO, 2002) Tan และ Shelef (1999) ใช้ Thiosulfate, ferric ammonium citrate, และ xylose กับชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน (ไลซีน, ออร์นิทีน, อาร์จินิน) เป็นอาหารเหลวในการคัดเลือกเชื้อจำเพาะเหนืออาหารที่เป็นระบบ agar ร่วมกับการใช้ระบบการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวัดของ *Salmonella* spp. สำหรับตัวอย่างอาหารสีดำจากการตกตะกอนของ iron sulfide ถูกผลิตขึ้นมาและแพร่เข้าไปใน agar เพื่อวัดค่าการส่องสว่างผ่านตะกอนสีดำในอาหาร media เหล่านี้ ค่าการส่องสว่างที่ชัดเจนระหว่าง thiosulfate-reducing *Salmonella* และ strain แกรมลบอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบ แต่ทำให้ตกตะกอนหลังจาก 16 – 20 ชั่วโมง เพราะว่าเป็นเวลาที่เกิดจากการแพร่ใน agar

เพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่ดีของการวิเคราะห์นี้ งานวิจัยนี้ถูกนำเสนอเป็นการลดขนาดการวิเคราะห์ของ H_2S production ในรูปแบบ broth เพื่อการคัดเลือกใน 96 – microplate well ในการวัดปริมาณระดับของตะกอนสีดำที่ผลิตขึ้นในตัวอย่าง broth การวัดค่า optical detection โดยการใช้ microplate reader ถูกนำเสนอและประเมินความเป็นไปได้ในการวัดสูตรอาหารที่เหมาะสมในอนาคต

4.6.2.1 ผลการทดลองของการพัฒนาสูตรอาหารเหลวคัดเลือก H_2S production ในระดับ micro - scale

รูปแบบวิเคราะห์ขนาดเล็กของ *Salmonella* และ non – *salmonellae* ของ TFXL broth ที่นำเสนอ การใช้ H_2S production เป็นอาหารเหลวจำเพาะชีวเคมีมีประสิทธิภาพเพื่อการ identified และแยก *Salmonella* spp. ในอาหาร agar ความจำเพาะและ media ที่ใช้ในการคัดแยกรวมด้วยกับ xylose lysine deoxycholate (XLD) agar อาหาร Hektoen enteric agar (HEA) และ Bismuth sulfite agar (BSA) ได้มีการพัฒนาสำหรับเป้าหมายนี้ (Rambach, 1990) การใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติเชิงชีวเคมีถูกพัฒนาและผนวกในรูปแบบของเหลวที่มีความสะดวก เพื่อให้เป็นสัญลักษณ์ของการมีอยู่ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอุตสาหกรรมอาหาร ดังแสดงรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 แสดงเปรียบเทียบเชื้อ *Salmonella* 7 ซีโรวาร์ที่สามารถเกิด thiosulfate-reductase และ 11 เชื้อแข่งขันในการใช้การเพาะเชื้อขนาดเล็ก (TFXL) ในการนำเสนอการเกิด H_2S production หลังจาก 24 ชั่วโมง เพื่อการบ่งบอกการปนเปื้อนของ *Salmonella*

จากรูปที่ 4.23 แสดงให้เห็นการพัฒนาของ ferrous sulfide (FeS) หรือตะกอนดำของ *Salmonella* และ Gram-negative และ Gram-positive ของ non – *salmonellae* ใน TFXL broth ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ทดสอบ 7 log CFU/ml โดยทั้งเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกริยาได้ทำการเปลี่ยนสีของ TFXL broth ซึ่งแต่เดิมไม่มีสีเพื่อแยกแถบสีของอาหารเหลวที่ใสและเปลี่ยนเป็นสีดำของ broth ภายใน 24 ชั่วโมง *Salmonella* จำนวน 6 strains เช่น *S.* Anatum, *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden และ *S.* Paratyphi B สามารถที่จะ metabolized thiosulfate ในการพัฒนาเป็นตะกอนสีดำที่สามารถสังเกตได้ด้วยการใช้สายตา

มนุษย์ ความแตกต่างที่ชัดเจนของตะกอนสีดำ iron sulfide ในการพัฒนาในอาหารเหลวคัดเลือก ถูกสอดคล้องด้วยดีกับผลของโคโลนีที่เป็นสีดำซึ่งแสดงอยู่บน XLD agar รูปที่ 4.23 อย่างไรก็ตาม *S.* Typhi สามารถผลิตตะกอน iron sulfide ที่เห็นไม่ชัดเจน ดังนั้นการเจริญเติบโตของ strain นี้ ใน TFXL broth แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ broth ที่อ่อนมาก การบ่งชี้ด้วยการเกิดตะกอนของ H_2S ใน TFXL broth ถูก modified จาก XLD agar โดยการใช้ thiosulfate เป็น sulfur สับเสตรทสำหรับ H_2S production *S.* Typhi ชอบ sulfite กว่า Thiosulfate ดังนั้นการแทนที่ thiosulfate ด้วย sulfite บางทีสามารถถูกใช้ในการแยก *S.* Typhi ได้ (Fricker, 1987; Cox, 1993)

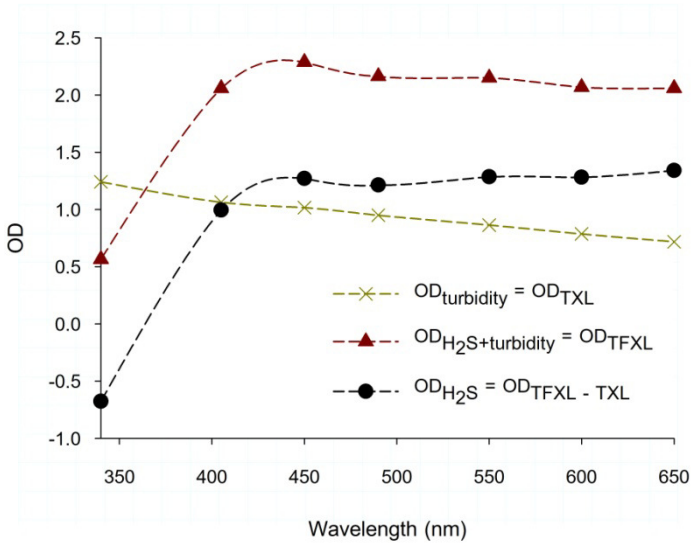
สำหรับ 11 strains อื่นๆ ที่เป็น non – thiosulfate – reducing ที่เป็น non – *Salmonellae* (ทั้งแกรมลบและแกรมบวก) ถูกนำมาประเมินความสามารถในการ selectivity ของ TFXL broth (รูปที่ 4.23) ไม่มีกลุ่มของ Enterobacteriaceae ที่สามารถตกตะกอนสีดำ ถึงแม้ว่า broth สีจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเดิมที่ไม่มีสี เป็นสีเหลืองอ่อน สีของ broth มีการพัฒนาในการ selected เชื้อ Gram-positive ที่เป็นเชื้อแข่งขันประพฤติตัวมากกว่าหรือใกล้เคียงซึ่ง non – thiosulfate – reducing สำหรับเชื้อ Enterobacteriaceae ไม่มีสีของสีน้ำตาลใส สามารถนำเสนอในการแยกความแตกต่างระหว่าง thiosulfate – reducing strains ยกเว้นในกรณีของ *S.* Typhi ซึ่งการตกตะกอนสีดำ แสดงผลที่อ่อน รูปที่ 4.23 อัตราและระดับของการตกตะกอนสอดคล้องกับซีโรไทด์และมุ่งประเด็นไปที่ทางเลือกของแหล่งของคาร์บอน กรดอะมิโน ความเข้มข้นของ iron และ micro-nutrients ที่ใช้ใน liquid substrates (Park et al., 2012) บางทีการพัฒนาบางอย่างของอาหารเหลวที่เกี่ยวกับสารอาหารสำหรับแหล่งของ sulfur ชนิดของน้ำตาล ถูกเป็นความต้องการเพื่อที่จะทำให้สะดวกในการผลิต hydrogen dulfide production

มากไปจากนั้น จากสายตามนุษย์ในการตรวจ detect อาจจะไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร และความน่าเชื่อถือสำหรับการประเมินระดับของปริมาณตะกอนสีดำ ท่ามกลางระหว่าง thiosulfate – based broth ดังนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสงถูกนำมาเสนอเพื่อการวัดที่มีประสิทธิภาพสำหรับระดับของตะกอนสีดำ บางทีมันอาจจะเป็นประโยชน์ที่จะเป็นเครื่องมือในการวัดปริมาณสำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการทดลองถัดไป

4.6.2.2 การวัดการดูดกลืนแสง (optical density spectra) ของ TFXL broth

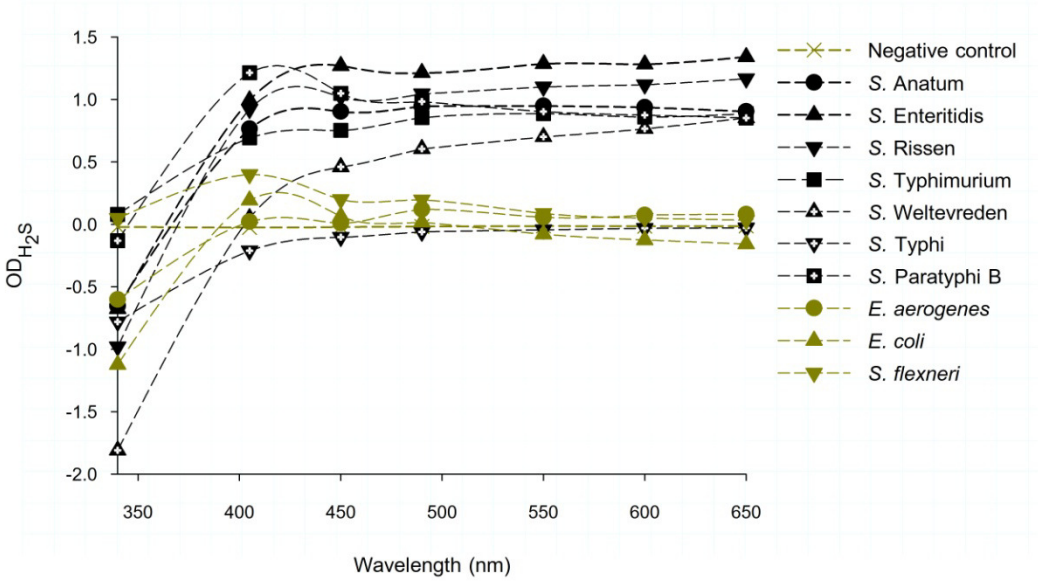
ในระหว่าง selective enrichment broth ของ *Salmonella* spp. การเจริญเติบโตเป็นสาเหตุให้เกิดความขุ่น ซึ่งอาจจะรบกวนความถูกต้องของการวัดค่าการดูดกลืนแสง เนื่องจากการผลิตของตะกอนสีดำใน TFXL broth

ดังนั้นผลค่าการดูดกลืนแสงของ H_2S broth กับ ferric ammonium citrate (TFXL) และที่ปราศจาก ferric ammonium citrate (TXL) ถูกดำเนินการทดลองเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของ optical density ของ H_2S positive *Salmonella* (*S.* Enteritidis)



รูปที่ 4.24 แสดง profile ค่าการดูดกลืนแสงที่ wavelength ต่างๆ ของปฏิกริยาการเกิด H_2S production ที่ inoculation ด้วยเชื้อ *S.* Enteritidis ซึ่งสามารถเกิดปฏิกริยาได้อย่างดีมาก (H_2S^{++}) สำหรับการตรวจสอบผลกระทบของความขุ่นในอาหารเหลวที่มีสับเสตรทที่ทำให้เกิดตะกอนสีดำและปราศจากสับเสตรทที่ทำให้เกิดตะกอนสีดำ

จากรูปที่ 4.24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ทำการแยกของ TFXL broth กับ TXL broth แสดงให้เห็นผลของ iron sulfide การตกตะกอนโดยปราศจากผลกระทบที่เกิดจากความขุ่น

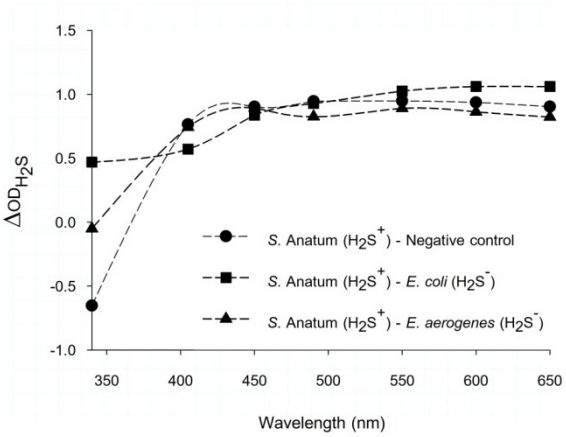


รูปที่ 4.25 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกริยา H_2S กับเชื้อแข่งขันที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยาได้ในอาหารเหลว TFXL

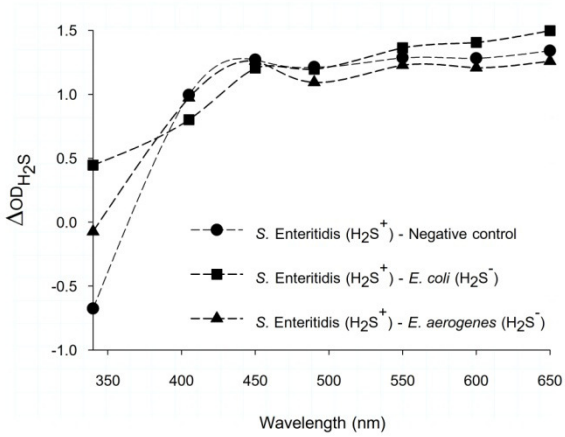
รูปที่ 4.25 แสดงให้เห็นโปรไฟล์ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันของ *Salmonella* ในการเกิด H_2S^+ (*S.* Anatum, *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden และ *S.* Paratyphi B) และ 3 strains ของเชื้อ non – *salmonellae* (*E. aerogenes*, *E. coli* และ *S. flexneri*) ที่ไม่สามารถเกิด H_2S^- ผลการทดลองการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงแสดงให้เห็นการพัฒนา hydrogen sulfide broth สามารถที่จะแยก *Salmonella* thiosulfate – reducing จากเชื้อแข่งขัน เพราะ *S.* Enteritidis แสดงให้เห็นมีความสามารถในการเกิดปฏิกริยา iron sulfide production ได้ดีมากและ *S.* Anatum ถูกควบคุมเพื่อแสดงให้เห็นตัวอย่างของเชื้อที่ให้ iron sulfide production ต่ำ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่สูงเป็นผลจากการเกิด thiosulfate reduction ที่ทำให้เกิดตะกอนสีดำสามารถที่จะถูกใช้ในการแยกเชื้อ *Salmonella* ในกลุ่มที่เกิดปฏิกริยา thiosulfate – reducing *Salmonella* จาก Enterobacteriacea อื่นๆ

เพื่อที่จะตัดสินใจหา wavelength ที่เหมาะสมในการใช้การตกตะกอนสีดำในการ identification ค่าการดูดกลืนแสงของ H_2S จาก *Salmonella* ที่เป็น positive ถูกทำการเปรียบเทียบกับ H_2S ที่เป็น negative แบคทีเรีย และ negative อาหาร media ที่ใช้เป็น control รูปที่ 4.26a และ b แสดงให้เห็นค่า absorbance ที่แตกต่างกันของ *E. coli* และ *E. aerogenes* ค่า absorbace ที่แตกต่างกันเพียงพอในการแยกเชื้อที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยา H_2S production ที่ wavelength มากกว่า 405 nm (รูปที่ 4.26a และ b) wavelength ที่ 650 nm ถูก

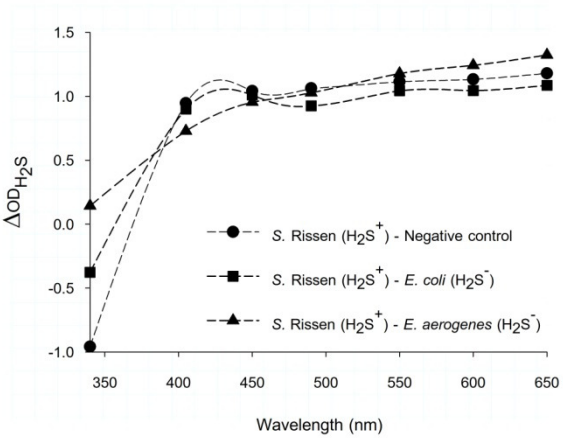
เลือกเพื่อที่จะประเมินการเกิดปฏิกริยา H_2S ที่จะส่งผลให้เกิดตะกอนสีดำ เพราะมันทำให้เกิดค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดและมีผลกระทบจากความขุ่นน้อยที่สุด (รูปที่ 4.24) McLaughlin (2006) ใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเหมือนกันในการวัดแบบคู่ของวิธี microplate reader (i.e., 405 และ 590 นาโนเมตร) เพื่อที่จะทำการทดลองการเกิดปฏิกริยาของ iron sulfide จากแบคทีเรีย



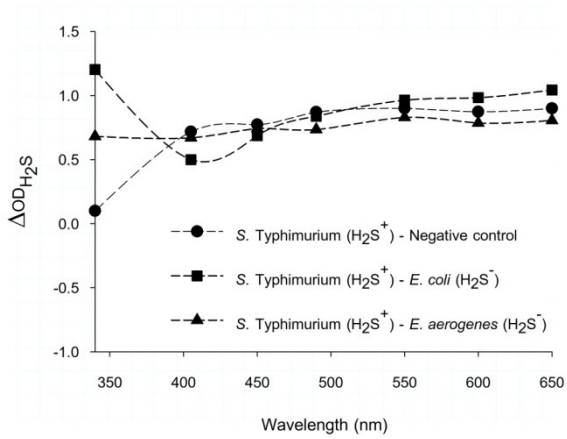
(A) *S.* Anatum



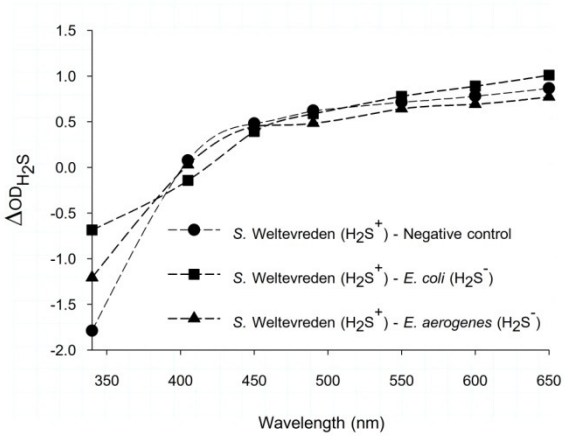
(B) *S.* Enteritidis



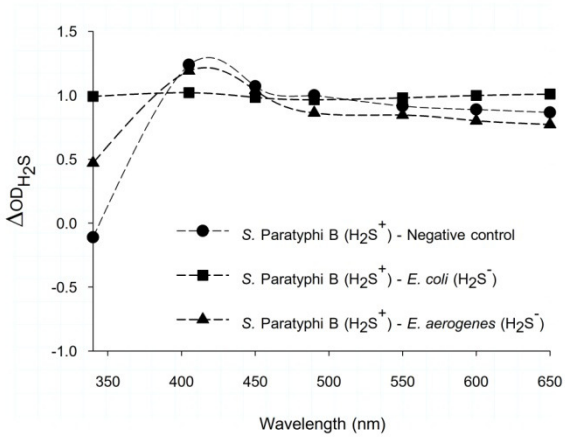
(C) *S.* Rissen



(D) *S.* Typhimurium



(E) *S.* Weltevreden

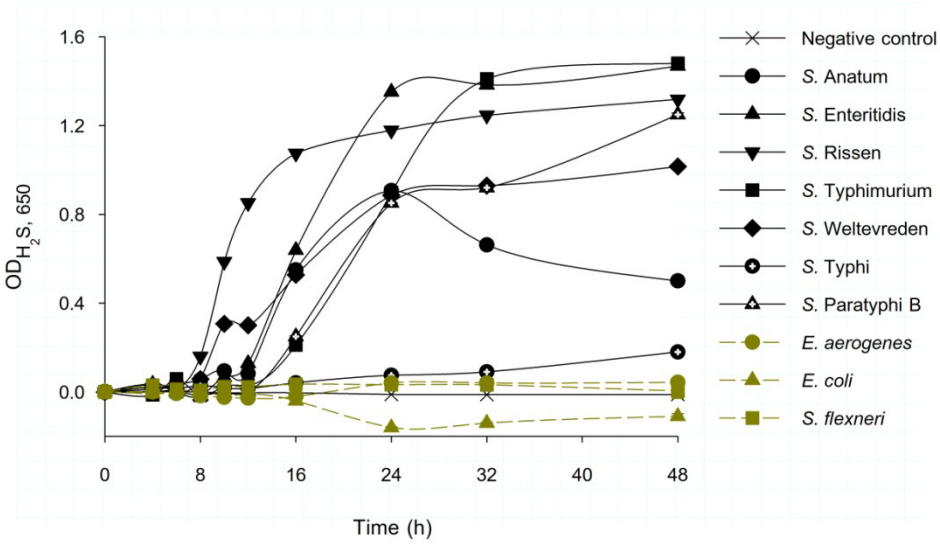


(F) *S.* Paratyphi B

รูปที่ 4.26 ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของ *S.* Anatum (A), *S.* Enteritidis (B), *S.* Rissen (C), *S.* Typhimurium (D), *S.* Weltevreden (E), *S.* Paratyphi B (F) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เป็น control (ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ) และ H_2S^- ที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* แต่ทำให้เกิดความขุ่น (*E. coli* และ *E. aerogenes*) ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างของ broth ที่มี *Salmonella* แสดงให้เห็นอย่างไม่สำคัญที่ค่าสูงในช่วงของ 405 – 650 nm แต่ให้ค่าสูงสุดที่ 650 nm ของ 6 เชื้อ *Salmonella*

4.6.2.3 Optical detection ของ hydrogen sulfide production ในการพัฒนา TFXL broth

เมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 7 ของ *Salmonella* ถูกติดตามที่ wavelength 650 nm และเปรียบเทียบกับเชื้อแข่งขันอีก 2 ตัวอื่นที่ให้ผลลบของ hydrogen sulfide – negative ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm แสดงสัญลักษณ์ที่ชัดเจนระหว่าง H_2S^+ and H_2S^- แบคทีเรีย (รูปที่ 4.27) ในอาหาร TFXL แบคทีเรียที่ให้ผลลบกับ H_2S^- จะ produced อาหารเหลวเป็นสีเหลืองและอาหารสีน้ำตาลใส (light brown broth) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างต่ำที่ OD_{650} ระหว่าง -0.2 – 0.1 ในขณะที่ *Salmonella* H_2S^+ โดยส่วนมาก จะเปลี่ยนให้ค่าดูดกลืนแสงที่สูงมากที่ OD_{650} อย่างไรก็ตามมี 2 กรณีซึ่งอาจจะนำเสนอความสับสนบางส่วนกับ H_2S^- แบคทีเรีย *S.* Typhi ที่แสดงผลที่อ่อนของตะกอน iron sulfide มีความสามารถในการทำให้เกิดสีน้ำตาลอ่อนสว่างโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำตลอดของการ enrichment ด้วยเหมือนกัน มีกรณีของ *S.* Anatum ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.27 กราฟค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาที่ได้มีการหักผลของความขุ่นที่ wavelength 650 nm ของเชื้อ *Salmonella* กับที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella*

มีรายงานวิจัยได้มีการสังเกตเกี่ยวกับตัวอย่างที่เปิดรับออกซิเจนมีผลเป็น negative บน iron sulfide detection ในบาง broth ซึ่งบรรจุ thiosulfate-ferric ammonium citrate โดยอย่างสมมติ การลดลงของการเกิดตะกอนของ iron sulfide การตกตะกอนอาจจะเปลี่ยนแปรจากการมีปฏิกริยาต่อกันของการยับยั้งของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเกิด thiosulfate reductase activity (Barrett and Clark, 1987) และการ oxidation ของ iron sulfide (Kuester and Williams, 1964) การเกิดกรดจาก xylose ที่เกิดจากการ fermentation สามารถยับยั้ง hydrogen sulfide production เป็นผลให้ผลของการแทรกสอดจากปริมาณกรดที่มากเกินพอกับการตกตะกอนของ FeS (Park et al., 2012) มากไปจากนั้น เมื่อเร็ว ๆ นี้ วิถีทางการยั้บยังการเกิด thiosulfate reductase โดยกลูโคส และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ที่สามารถเกิดการ ferment ได้ ถูกทำให้ชัดเจนขึ้น (Clark and Barrett, 1987b, a) ดังนั้นการบ่มที่ใช้เวลานานไม่จำเป็นที่จะต้องใช้ หรือเป็นประโยชน์ ช่วงเวลาการบ่มที่เหมาะสมถูกแสดงให้เห็นในระหว่าง 16 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งค่าความหนาแน่นของการดูดกลืนแสงของ TFXL เริ่มต้นให้ค่าที่แตกต่างจาก H_2S^- แบคทีเรีย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพัฒนาอาหารเหลวไม่จำเพาะและแนวทางทางเลือกใหม่ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella* ในขั้นตอน non selective enrichment นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาอาหารเหลวจำเพาะเพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของ *Salmonella* เบื้องต้นด้วยปฏิกริยาที่จำเพาะอะมิโนดีคาร์บอกซีลั่นและการเกิด H_2S production ในงานวิจัยมีการตรวจติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการนับโคโลนี Modified Drop Plate Technique (MDPT) โดยรายละเอียดผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยง *Salmonella* spp. ดำเนินการใน 96-well microplate เพื่อลดการใช้ media และลดเวลาการ diffusion ด้วย R^2 ที่ 0.9939 แบบจำลอง Sigmoid ถูกนำเสนอเพื่อ fit กับข้อมูลการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ซึ่งครอบคลุมในส่วนของ lag, exponential และ stationary phase เซ็ทของ optimal enrichment สำหรับ *Salmonella* spp. การเจริญเติบโตถูกติดตามแบบจำลองดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่าง 1X กับความเข้มข้นของ TSB อื่นๆ ที่ความเข้มข้น 0.5X ของ TSB ให้ค่า maximum growth rate ของ *Salmonella* โดยเฉลี่ยกับ 1X เป็น 1.852 และ 2.177 ตามลำดับ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 1X ของ TSB เป็นความเข้มข้นที่มีคุณค่าทางอาหารเพียงพอหรืออาจจะมากเกินไปเพื่อ detect การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาผลของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างต่อ kinetic การเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. การเปรียบเทียบกรรมวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันจำนวน 4 วิธีด้วยค่า maximum growth สูงสุดของ *Salmonella* พบว่าจากทางเลือกอาหารนั้นถูกเตรียมโดยการใช้ 121°C เป็นเวลา 60 นาที ให้ค่าที่ 1.655 h^{-1} และนอกจากนี้มีสูตรหลายสูตรซึ่งสามารถแทนที่อาหาร TSB ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ *Salmonella* ดังนั้นไก่ ปลา และหมู ถูกสกัดโดยการใช้ autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที ทางเลือก media เหล่านี้ต้องการเวลา 8 ชั่วโมงสำหรับ liquid cultivation และให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ที่สูงขึ้น สำหรับ *Salmonella* สามารถเพิ่มปริมาณของโคโลนีที่ปริมาณของเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2.49 log CFU/ml ถึง 7 log CFU/ml อาหาร media เหล่านี้สามารถถูกเลือกให้เหมาะสมกับเงื่อนไขการเจริญเติบโตเพื่อเร่งการตรวจวิเคราะห์และลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์
3. สำหรับความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการบ่งชี้ปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนไลซีน ออร์นิทีนและอาร์จินีนคือที่ 550 nm โดยใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์

4. อาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนที่มี thiosulfate และ ferric ammonium citrate ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวัดการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยไมโครเพลทลีดเดอร์ได้ถูกนำเสนอเพื่อการวัดปริมาณการเกิดปฏิกริยา H_2S production ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับ microscale เพื่อการ screening อย่างรวดเร็วต่อการปนเปื้อนของ *Salmonella* ด้วยปฏิกริยา thiosulfate-reducing *Salmonella* ช่วงความยาวคลื่นของ spectrum ถูกนำมาใช้ในการประเมิน wavelength ที่เหมาะสมเพื่อตรวจติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป และ minimize สิ่งรบกวนเนื่องจากความขุ่นให้น้อยที่สุด wavelength ของ spectral ที่ให้ good signal เป็น wavelength ที่มากกว่า 405 nm สามารถที่จะแยกแบคทีเรียที่เกิด H_2S^+ และ H_2S^- มีเพียง *S.* Typhi ที่ให้ปฏิกริยาการเกิดตะกอนของ H_2S production ที่อ่อนจาก thiosulfate และ iron sulfide ต่างจาก *S.* Anatum โดยเนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ทำให้เวลาในการเกิดปฏิกริยาขยายไปมากกว่า 24 ชั่วโมง การประเมินด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร ในอาหารเหลว TFXL ถูกเป็นเทคนิคที่สำเร็จในการตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็วสำหรับ thiosulfate-reducing non-Typhi *Salmonella*

เอกสารอ้างอิง

กรุงเทพธุรกิจออนไลน์, 2555, พบเชื้อซัลโมเนลลาระบาดเอี่ยวซูชิทูน่า, ค้นเมื่อ 8 กันยายน 2555,จาก http://www.bangkokbiznews.com/home/detail/politics/world/20120415/446828/พบเชื้อซัลโมเนลลาระบาดเอี่ยวซูชิทูน่า.html

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2540, การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ : ผลการสำรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย, การสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าในการตรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ. บริษัทเมอร์ค จำกัด, กรุงเทพฯ, 215 หน้า

อรุณบ่างตระกูลนนท์, สุมณฑาวัฒนสินธุ์และชัยวัฒน์พูลศรีกาญจน์, 2555, โรคซัลโมเนลโลซิส (*Salmonellosis*), ค้นเมื่อ 9 กันยายน 2555, จาก http://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=ลักษณะSalmonellawebdb.dmsc.moph.go.th

ASTVผู้จัดการออนไลน์, 2555, สสจ.เชียงใหม่ฟันธง “ไข่ต้มมีเชื้อซัลโมเนลลา” ต้นเหตุนักเรียนศึกษาสงเคราะห์ป่วยระนาว, ค้นเมื่อ 8 กันยายน2555, จาก http://www.manager.co.th/Local/ViewNews.aspx?NewsID=9550000084946

Alakomi, H.L. and Saarela, M., 2009, “*Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods”, Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, Vol. 1, pp. 142-152.

Allen, G., Bruce, V.R., Stephenson, P., Satchell, F.B. and Andrews, W.H., 1991, “Recovery of *Salmonella* from high moisture foods by abbreviated selective enrichment”, Journal of Food Protection, Vol. 54, pp. 492 – 495.

Anon, 2003, “Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods”, FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, USDA/Food Safety and Inspection Service, Centers for Disease Control and Prevention, September 2003.

Badger, E.H.M. and Pankhurst, E.S., 1960, “Experiments on the accuracy of surface drop bacterial counts”, Journal of applied bacteriology, Vol. 23, No. 1, pp. 28 – 36.

Barrett, E.L. and Clark, M.A., 1987, "Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate", Microbiological Reviews, Vol. 51, pp. 192-205.

Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A., 1993, "Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria", 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.

Blackburn, C.W. and McClure, P.J. (Eds.), 2002, "*Salmonella*", In Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control, Woodhead, Cambridge, pp. 307-327.

Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F. and Colin, P., 1997, "Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products", International Journal of Food Microbiology, Vol. 38, pp. 211 – 216.

CDC., 2007, Salmonella *Surveillance: Annual Summary, 2005*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services.

Chen, H., Fraser, A.D.E. and Yamazaki, H., 1993, "Evaluation of the toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enrichment period", International Journal of Food Microbiology, Vol. 18, pp.151 – 159.

Christine, S., 2010, *Salmonella* outbreak egg recall FAQ frying your mind.[Online], Available: http://www.knowabouthealth.com/salmonella-outbreak-egg-recallfaq-frying-your-mind/5718/ [2010, September 16].

Clark, M.A. and Barrett, E.L., 1987a, "Catabolite repression of thiosulfate reduction by *Salmonella typhimurium*", Current Microbiology, Vol. 16, pp. 27-31.

Clark, M.A. and Barrett, E.L., 1987b, "The phs gene and hydrogen sulfide production by *Salmonella typhimurium*", Journal of Bacteriology, Vol. 169, pp. 2391-2397.

Cox, J.M., 1993, "Lysine-mannitol-glycerol agar, a medium for the isolation of *Salmonella* spp., including *S. typhi* and atypical strains", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, pp. 2602-2606.

Cowan, S.T. and Steel, K.J., 2004, Manual for the identification of medical science, 3rd, Cambridge University Press, Pages.

De Boer, E, 1998, "Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods", International Journal of Food Microbilogy, Vol. 45, pp. 43 – 45.

D' Aoust J.-Y., 1989, "*Salmonella* ", *In* Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle M.P. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 327 – 445.

D' Aoust, J.-Y., Sewell, A.M. and Warburton, D.W., 1992, "A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*", International Journal of Food Microbiology, Vol. 16, pp. 41 – 50.

D' Aoust J.-Y., Sewell, A.M. and McDonald, C., 1995, "Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated pre-enrichment cultures of dry food composites", Journal of AOAC International, Vol. 78, pp. 1322 – 1324.

De Boer, E, 1998, "Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods", International Journal of Food Microbilogy, Vol.45, pp. 43 – 45.

De Boer, E. and Beumer, R.R., 1999, "Methodology for detection and typing foodborne microorganisms", International Journal of Food Microbilogy, Vol. 50, pp. 119 – 130.

Doyle, M.P. (Ed.), 2001, "*Salmonella*", In Foodborne Bacteria Pathogens, Marcel Decker Inc, New York, pp. 384-386.

Ewing, W.H., 1986, "Biochemical identification of *Salmonella*", in Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriacea, 4th, Elsevier Science Publishing Co., Inc., pp. 187.

Fall, 2000, "*Salmonella* ", BSCT 424 Pathogenic Microbiology, Available : http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Salmonella.htm. (2002, April 29)

Favrin, S.J., Jassim, S.A. and Griffiths, M.W., 2003, "Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* 0157:H7 in Food", International Journal of Food microbiology, Vol. 85, pp. 63-71.

Firstenberg-Eden, R. and Sharpe, A.N., 1991, "Impact of biotechnology and new methodology on microbial testing foods", In I. Goldberg and R. Williams (Eds.), Biotechnology and Food Ingredients (pp. 502-535), Van Nostrand Reinhold, New York.

Fricker, C.R. 1987, "The isolation of salmonellas and campylobacters", Journal of Applied Bacteriology, Vol. 63, pp. 99-116.

Fries, R. and Steinhof, U., 1997, "Growth kinetics of *Salmonella* in mixed cultures incubated in Rappaport – Vassiliadis medium", Food Microbiology, Vol. 14, pp. 505 – 513.

Fung, D.Y.C., 2000, "Rapid methods and automation in microbiology : A review", Irish Journal of Agricultural and Food Research, Vol. 39, pp. 301-307.

Giannella, R.A., 2000, *"Salmonella"*, Medical Microbiology, Available:http:gsbs.utmb.edu/microbook/eh021.htm. (2002, April 29).

ISO, 2002., "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.", International Organization for Standardization, Geneva.

Jay, J. M. (Ed.), 2000, "Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and Shigella", In Modern Food Microbiology, 6th ed., Aspen publication, Gaithersburg, MDU, p.513.

Jenikova, G., Pazlarova, J. and Demnerova, K., 2000, "Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR Assay, "International Journal of Food Microbiology, Vol. 3, pp. 225 – 229.

Liamkaew, R., Thipayarat, A. and Saranak, J., 2014, "*Listeria* Detection in microscale solid state inoculation with minimal selective agents", Food control, Vol. 43, pp. 183 – 192.

June, G.A., Sherrod, P.S., Hammack, T.S., Amaguana, R.M. and Andrew, W.H., 1996, "Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh, highly contaminated foods and poultry feed:collaborative", Journal of AOAC International, Vol. 79, pp. 1307 – 1323.

Kalamaki, M., Price, R.J. and Fung, D.Y.C., 1997, "Rapid methods for identifying seafood microbial pathogens and toxins", Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, Vol. 5, pp. 87-137.

Kang, D.H. and Fung, D.Y., 1999, "Development and evaluation of a 24 well microtitre plate method for isolation of *Listeria* spp. or *Listeria monocytogenes* from foods", Letters in Applied Microbilogy, Vol. 28, No. 4, pp. 280 – 284.

Kang, D.H., Fung, D.Y.C. and Jiang, G., 1999, "Multi-Pipette system for recovery of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. simultaneously", Journal of Rapid Methods & Automation in Microbilogy, Vol. 7, No. 2, pp. 95 – 102.

Khueankhancharoen, J., Supanivatin, P., Saeaung, W., Boonyaprapasorn, A. and Thipayarat, A., 2010, "Evaluation of practical analyses of *Coliforms* and *E. coli* detection and enumeration for industrial food samples" The international conference for a sustainable Greater Mekong Subregion", August 26-27, Bangkok, Thailand.

Kim, S. and Fung, D.Y.C., 2005, "Modified microtiter counter method for viable cell counts from pure cultures and foodmodel samples", Food microbiology, Vol. 22, No. 6, pp. 595 – 599.

Kuester, E. and Williams, S.T., 1964, "Production of hydrogen sulfide by *Streptomycetes* and methods for its detection", Applied Microbiology, Vol. 12, pp. 46-52.

Le Minor, L., 1981, "The genus *Salmonella*", *In* The Prokaryotes, Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (Eds.), Springer – Verlag, New York, N.Y., pp. 1148 – 1159.

Maijala, R., Johansson, T. and Hiern, J., 1992, "Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis(RV)-media", International Journal of Food Microbilogy, Vol. 17, pp. 1-8.

Matthew, P. Johnson, Larisa, M. Haupt and Lyn R., 2004, "Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR", Genomics Research Centre, School of Health Science, Australia.

McLaughlin, M.R., 2006, "Factors affecting iron sulfide-enhanced bacteriophage plaque assays in *Salmonella*", Journal of Microbiological Methods, Vol. 67, pp. 611-615.

Michael, A., 2010, "S-shaped growth curve", A Dictionary of Zoology 1999, Retrieved October 19, from Encyclopedia.com.

Morris, D.R. and Fillingame, R.H., 1974, "Regulation of amino acid decarboxylation", Annual Review of Biochemistry, Vol. 43, No. 0, pp. 303 – 325.

O'Donoghue, D. and Winn, E., 1993, "Comparison of the MSRV method with an in-house conventional method for the detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods", Letters in Applied Microbiology, Vol. 17, pp. 174 – 177.

Onal, O.T. and Frigi, R.D., 2013, "High throughput colorimetric assay for rapid urease acitivity quantification", Journal of microbiological methods, Vol. 95, No. 3, pp. 324 – 326.

Ozogul, F. and Ozogul, Y., 2007, "The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures", European food research and technology, Vol. 225, No. 3-4, pp. 385 – 394.

Park, S.H., Ryu, S. and Kang, D.H., 2012, "Development of an improved selective and differential medium for isolation of *Salmonella* spp.", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 50, pp. 3222-3226.

Pavic, A., Groves, P.J., Bailey, G. and Cox, J.M., 2010, "A validated miniaturized Mpn method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration fo *Salmonella* from poultry matrices", Journal of Applied Microbilogy, Vol. 109, No. 1, pp. 25 – 34.

Phirke, P.M., 1977, "Application of the rapid lysine decarboxylase test for early isolation and detection of salmonellae in sewage and other wastewaters", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 34, pp. 453-455.

Pless, P. and Reissbrodt, R., 1995, "Improvement of *Salmonella* detection on motility enrichment media by ferrioxamine E-supplementation of pre-enrichment culture", International Journal of Food Microbilogy, Vol.27, pp. 147 – 159.

Popoff, M.Y., Bockemuhl, J. and Brenner, F. W., 2000, "Supplement 1998 (no.42) to the Kauffmann – White scheme", Research in Microbiology, Vol. 151, pp.63 – 65.

Rambach, A., 1990, "New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria", Applied and Environental Microbiology, Vol. 56, pp. 301-303.

Rutledge, R.G., 2004, "Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications", Natural Resources Canada.

Ryan, K.J. and Ray, C.G., 2004, "Enterobacteriaceae", In Medical Microbiology; an Introduction to Infectious Diseases, 4th ed., McGraw-Hill, Boston, pp. 363-367.

Schönenbrücher, V., Mallinson, E.T. and Bulte, M., 2008, "A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media", International Journal of Food Microbiology, Vol. 123, pp. 61-66.

Shelef, L.A. and Firstenberg-Eden, R., 1997, "Novel selective and non-selective optical detection of microorganisms", Letters in Applied Microbiology, Vol. 25, pp. 202-206.

Shelef, L.A. and Tan, W., 1998, "Automated detection of hydrogen sulfide release from thiosulfate by *Salmonella* spp.", Journal of Food Protection, Vol. 61, pp. 620-622.

Shelef, L.A., Surtani, A., Kanagapandian, K. and Tan W., 1998, "Automated detection of amino acid decarboxylation in salmonellae and other Enterobacteriaceae, Food Microbiology, Vol. 15, pp. 199-205.

Stager, C.E. and Davis, J.R., 1992, "Automated systems for identification of microorganisms", Clinical Microbiology Reviews, Vol. 5, pp. 302-327.

Supanivatin, P., Khueankhancharoen, J., Saeaung, W., Boonyaprapasorn, A. and Thipayarat, A., 2010, "Industrial implementation of fast total plate count analysis applying micro inoculation culture on frozen ready-to-eat products", The international conference for a sustainable greater mekong subregion", August 26 – 27, Bangkok, Thailand.

Tan, W. and Shelef, L.A., 1999, "Automated detection of *Salmonella* spp. in foods", Journal of Microbiological Methods, Vol. 37, pp. 87-91.

Taskila, S., Tuomola, M., Ojamo, H., 2012, "Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*", Food Control, Vol. 26, pp. 369-377.

Voetsch, A.C., Gilder, T.J.V., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. and Tauxe, R.V., 2004, "FoodNet estimate of the burden of illness caused by non typhoidal *Salmonella* infections in the United States".

Waltman, W.D., Horne, A.M. and Pirkle, C., 1993, "Influence of enrichment incubation time on the isolation of *Salmonella*", Avian Diseases, Vol. 37, pp. 884 – 887.

WHO., 2002, 2010, *Salmonella*[Online], Available:http://www.who.int/topics/salmonella/en/ [2010, September 16].

ภาคผนวก

(ผลงานตีพิมพ์)