รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงขนาดจุลภาคร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ สำหรับตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลากลุ่มที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นได้อย่างรวดเร็ว

Microscale detection and hydrogen sulfide indicator enrichment media for rapid presumptive screening of thiosulfate-reducing Salmonella

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(จากเงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080001
สัญญาเลขที่ 22/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงขนาดจุลภาคร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ สำหรับตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลากลุ่มที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นได้อย่างรวดเร็ว

Microscale detection and hydrogen sulfide indicator enrichment media for rapid presumptive screening of thiosulfate-reducing Salmonella

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์
สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 22/2561

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงขนาดจุลภาคร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์สำหรับตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลากลุ่มที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นได้อย่างรวดเร็ว (ภาษาอังกฤษ) Microscale detection and hydrogen sulfide indicator enrichment media for rapid presumptive screening of thiosulfate-reducing Salmonella รหัสโครงการ 256101A1080001 / สัญญาเลขที่ 22/2561 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,022,100 บาท (หนึ่งล้านสองหมื่นสองพันหนึ่งร้อยบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 6 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2560 – วันที่ 31 มีนาคม 2562) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาอาหารเหลวบ่งชี้โอกาสการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาซึ่งได้นำคุณสมบัติการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นของซัลโมเนลลาในกลุ่มที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ ปฏิกิริยาการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถบ่งชี้ได้จากการเกิดตะกอนสีดำของไอรอน ซัลไฟด์ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของซัลไฟด์ไอออนกับไอรอนซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไป ในขณะที่แบคทีเรียแข่งขันส่วนใหญ่ ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นได้ จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นตะกอนสีดำ ทำให้สามารถแยกและบ่งชี้โอกาสการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในกลุ่มดังกล่าวเบื้องต้นได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาสูตรใหม่โดยปรับมาจากสูตรอาหารแข็งจำเพาะมาตรฐานไซโลสไลซีนดีคาร์บอกซีเลสเป็นรูปแบบอาหารเหลว โดยใช้องค์ประกอบหลักตามเดิมคือ โซเดียมไทโอซัลเฟต เฟอร์ริกแอมโนเนียมซิเตรท น้ำตาลไซโลส แต่มีการปรับปรุงองค์ประกอบอื่นๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ใช้จากไลซีนไปเป็นกรดอะมิโนออร์นิทีนและอาร์จินีน นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ประยุกต์ใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยไมโครเพลทเพื่อตรวจติดตามปฏิกิริยา การประยุกต์วิธีการตรวจสอบของอาหารเหลวที่พัฒนาขึ้นนี้เหมาะกับตัวอย่างในอุตสาหกรรมซึ่งมีความต้องการทราบผลการทดสอบเบื้องต้นในระยะเวลาที่รวดเร็ว สามารถบ่งชี้โอกาสการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นได้ภายใน 1-2 วันโดยผลบวก หมายถึงในตัวอย่างอาจมีซัลโมเนลลาและ/หรือแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนจากไทโอซัลเฟตได้ ส่วนผลลบ หมายถึงในตัวอย่างไม่มีซัลโมเนลลากลุ่มที่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากไทโอซัลเฟตปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งวิธีการทดสอบนี้

สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพและสามารถอ่านผลได้อย่างรวดเร็วกว่าอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานในปัจจุบัน อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน เทคนิคการวิเคราะห์แบบเพาะเลี้ยงขนาดเล็กที่นำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้ที่พัฒนาขึ้นนี้ ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในจำนวนมากขึ้นต่อรอบการวิเคราะห์ ซึ่งนับว่าทำให้เกิดความสะดวก รวดเร็วในการปฏิบัติงานของบุคลากรในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอีกด้วย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบ่งชี้ในระดับไมโครสเกล เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นในผลิตภัณฑ์อาหารและบริเวณผลิต โดยมีการพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้ชนิดใหม่ที่อาศัยหลักการของปฏิกิริยาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของซัลโมเนลลา ซึ่งสามารถบ่งชี้การปนเปื้อนได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวในตัวบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม การอ่านผลจากอาหารเหลวบ่งชี้สูตรที่ใช้ไทโอซัลเฟตเป็นสารตั้งต้น ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มซัลโมเนลลาที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตออกจากกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตได้ เมื่อตรวจวัดสมบัติทางแสงของระบบบ่งชี้แต่ละชนิดในอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงซัลโมเนลลาและแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาโดยวิธีทางสเปคโตรโฟโตรเมตรีด้วยการใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 650 นาโนเมตร (ใช้เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทเป็นอินดิเคเตอร์) ตามลำดับ สำหรับการทดลองพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้นชนิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ที่มีองค์ประกอบเป็นไทโอซัลเฟตเป็นหลักนั้น พบว่าในการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สูตรอาหาร TFTOA (องค์ประกอบหลักได้แก่ ไทโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ทรีฮาโลส ออร์นิธินและอาร์จินีน) มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มการเกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์และค่า OD_{650} ใน *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Anatum และค่อนข้างสูงในซัลโมเนลลาซีโรวาร์อื่นๆ ที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตได้ ในขณะที่ซัลโมเนลลาซีโรวาร์ทั่วๆ ไป สร้างตะกอนสีดำได้ในปริมาณมากในสูตร TFXOA แต่ *S.* Typhi และ *S.* Anatum นั้นสร้างตะกอนสีดำได้น้อย นอกจากนี้สูตรอาหารทั้งสองยังมีความจำเพาะในการคัดเลือกซัลโมเนลลาจากแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ มากกว่าอาหารในปัจจุบัน เพราะสามารถแยก *Citrobacter freundii* และ *Proteus vulgaris* ออกได้ ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าวิธีการใหม่ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้น มีความสะดวกในการวิเคราะห์และให้ผลการทดลองรวดเร็ว โดยให้ผลเบื้องต้นในอาหารเหลวในวันแรกของการทดสอบและให้ผลเบื้องต้นครั้งที่สองบนอาหารแข็งในวันที่สอง ในขณะที่วิธีการมาตรฐานนั้นจำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน สำหรับให้ผลการทดสอบเบื้องต้นครั้งแรก

คำสำคัญ: การตรวจวิเคราะห์หาซัลโมเนลลา/ การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์/ ไมโครเพลทแบบ 96 หลุม/ อาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้น

บทคัดย่อ

Our rapid microscale assay (RapidSAL) uses an array of new presumptive indicator in the enrichment step. The new indicator broths are based on hydrogen sulfide (H_2S) production. The presence of *Salmonella* is indicated by clear changes of broth color. Collectively, the broth formulations with thiosulfate as sulfur substrates could distinguish between thiosulfate reductase-positive salmonellae and reductase-negative non-salmonellae. Spectrophotometrically, the highest difference in absorbance between broths spiked with *Salmonella* spp. and non-salmonellae was at 650 nm. (ferric ammonium citrate) for H_2S production, respectively. The optimized thiosulfate-based broth, named TFTOA (thiosulfate, ferric ammonium citrate, trehalose, ornithine, and arginine), effectively increased black precipitates and OD_{650} of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Anatum, and displayed good sensitivity for other thiosulfate – reducing *Salmonella,* while TFXOA broth within 24 h showed high sensitivity for typical *Salmonella*, but low for *S.* Typhi and *S.* Anatum. These developed H_2S broths had more selectivity than the conventional media since the common false positive competitors (*C. freundii* and *P. vulgaris*) could be distinguished. RapidSAL satisfied our main research goals of no false negative results, high throughput, and rapid analytical time; first presumptive result on day 1 and second presumptive result on day 2, in contrast to the conventional method that requires 3 days for the first presumptive result.

Keywords: Hydrogen sulfide production/ Industrial food sample/ Presumptive broth/ Salmonella detection/ 96-well microplate

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	IV
สารบัญเรื่อง	VI
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	6
3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย	27
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	36
5 สรุปผลการทดลอง	71
ผลผลิต (output)	72
เอกสารอ้างอิง	73
ประวัติคณะผู้วิจัย	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	อาหารที่พบว่าสามารถเป็นสาเหตุการเกิดโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี 1973-1978	16
2.2	แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการกระตุ้นและคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*	18
2.3	ปฏิกิริยาชีวเคมีของ Salmonella	22
2.4	การทดสอบยืนยันเชื้อ Salmonella	23
2.5	วิธีรวดเร็วสำหรับการตรวจหา Salmonella ที่ได้รับการับรองโดย AOAC	24
4.1	สรุปความสามารถในการคัดเลือกในอาหารเหลวไธโอซัลเฟต-เฟอร์ริก แอมโมเนียมซิเตรท (TFX) ที่ได้มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O), และอาร์จินิน (A) ทดสอบด้วยเชื้อ Salmonellae หรือที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ที่ 7 log CFU/mL ทำการบ่มที่ 37°C (ผลที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม)	60
4.2	สรุปความสามารถในการคัดเลือกจากอาหารเหลวไธโอซัลเฟต-เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท บนพื้นฐานอาหารเหลว (TFX) ที่มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; (1) ไลซีน (L) และ ออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และอาร์จินีน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A) เป็นอาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ภายใต้การบ่มเพาะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารที่สภาวะ control เป็น TFX ที่มีไลซีน, TFXL	64
4.3	ค่า OD_{650} ของอาหารที่มีการบ่มเพาะเชื้อ Salmonella ซีโรวาร์ในการใช้กรดอะมิโนเดี่ยว, แบบคู่, และแบบผสมสามชนิดในอาหารเหลว TFX ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	66
4.4	ค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ของเชื้อ *Salmonella* (7 log CFU/mL) ที่ได้บ่มเพาะเจริญในอาหารเหลว TFOA ที่มี xylose/ไม่มี xylose หรือทรีฮาโลส (คัดเลือกจาก 19 น้ำตาล) ที่ได้ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	68
4.5	สรุปความสามารถในการ selectivity ไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทของอาหารเหลว (TFOA) ที่ได้มีการเสริมด้วยทรีฮาโลสเป็นแหล่งของคาร์บอนโดยมีการ inoculated ด้วยเชื้อ Salmonellae และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ที่ 7 log CFU/mL, ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} และการสังเกตด้วยตาภายใน 24 ชั่วโมงหลังการบ่ม	69

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แฟลกเจลลา (flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (ก) และลักษณะของเชื้อ *Salmonella* เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข)	7
2.2	แผนภาพแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella แบบดั้งเดิม	17
2.3	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งต่างกัน	21
2.4	แสดงลักษณะของเชื้อ Salmonella ในขั้นตอนทางชีวเคมี	23
3.1	Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า	29
3.2	แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA	30
3.3	แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA	31
4.1	แสดงภาพของ microwells ที่เวลาต่างๆ ของการเปลี่ยนสีไอรอนซัลไฟด์โดยไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่ง Salmonella (3 และ 7 log CFU/mL) ที่ทำการบ่มในอาหาร TFXL และ XLD agar (อาหารทางด้านขวาบน) ที่อุณหภูมิ 37°C	40
4.2	กลุ่มเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella ที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา non-thiosulfate ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ทดสอบเป็น 7 log CFU/mL ถูกทำการบ่มในอาหารเหลว TFXL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	41
4.3	เชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella ที่สามารถเกิด Thiosulfate-reducing ปริมาณเซลล์ประมาณ 7 log CFU/mL ทำการบ่มในอาหารเหลว TFXL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	42
4.4	ค่า OD สเปคตราของเชื้อ *S.* Rissen ในอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ (TFXL และ TXL) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า OD_{TFXL} เป็นผลจากการตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์และเซลล์ความขุ่น OD_{TXL} จากเซลล์ความขุ่นเพียงอย่างเดียว ความแตกต่างของ 2 สเปคตราได้แสดงให้เห็นการหักลบค่า OD สเปคตรัมเนื่องจากไอรอนซัลไฟด์ ผลของการหักลบและไม่หักลบสเปคตรา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan's multiple range tests, $p > 0.05$)	45
4.5	ค่า OD สเปคตราของอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ (TFXL และ TXL) ที่มีการ inoculated ด้วย *E. coli* ที่ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/mL ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลของแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ ดังนั้นจึงไม่มีการตกตะกอนสีดำที่จะไปเพิ่มค่า OD	46
4.6	ค่าการหักลบสเปคตรัมการดูดกลืนแสง (OD_{FeS}) ที่ได้รับจากเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกริยา H_2S^+ และเชื้อแข่งขันที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา H_2S^- ปริมาณ 7 log CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลว TFXL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	47

รูปที่		หน้า
4.7	พื้นที่การตอบสนอง (Response surface plots) ของค่าการดูดกลืนแสงของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ Salmonella ที่สามารถเกิดการตกตะกอนของ FeS ที่สูง เชื้อ *S.* Rissen (a) และเชื้อ *S.* Enteritidis (b) ในอาหารเหลว TFXL ก่อน (คอลัมน์ซ้าย) และหลังการหักลบค่าความขุ่น (คอลัมน์ทางขวา) ด้วยความยาวคลื่นที่แตกต่างกันที่ 340, 405, 450, 490, 550, 600, และ 650 นาโนเมตร และทำการบ่มที่เวลา 0 – 48 ชั่วโมง	48
4.8	พื้นที่การตอบสนองของค่าการดูดกลืนแสงของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ Salmonella ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของ FeS ที่น้อย *S.* Anatum (a) และ *S.* Typhi (b) ในอาหารเหลว TFXL ก่อน (คอลัมน์ด้านซ้าย) และหลังการหักค่าความขุ่น (คอลัมน์ด้านขวา) ด้วยความยาวคลื่นที่แตกต่างกันที่ 340, 405, 450, 550, 600, และ 650 nm และทำการบ่มที่เวลา 0 – 48 ชั่วโมง	49
4.9	กราฟการตอบสนองค่า OD ของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ *Salmonella* ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของ FeS ที่เป็นกลางโดยมี *S.* Weltevreden (a), *S.* Paratyphi B (b), และ *S.* Typhimurium (c) ในอาหารเหลว TFXL ก่อน (คอลัมน์ซ้าย) และหลังการหักค่าความขุ่น (คอลัมน์ขวา) ด้วยค่าความยาวคลื่นที่แตกต่างกันที่ 340, 405, 450, 490, 550, 600, และ 650 nm และทำการบ่มที่เวลา (0 – 48 ชั่วโมง)	51
4.10	เวลาในการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่ปราศจาก (a) และมี (b) การหักค่าความขุ่น เป็นสาเหตุโดย *Salmonella* ซีโรวาร์ และที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* ที่โตในอาหารเหลว TFXL	52
4.11	ที่เวลาในการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่ปราศจาก (a) และมี (b) การหักค่าความขุ่น เป็นสาเหตุโดย *Salmonella* ซีโรวาร์ และที่ไม่ใช่เชื้อ non-salmonellae ที่โตในอาหารเหลว TFXL	53
4.12	ค่าการดูดกลืนแสงที่ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรเทียบกับเวลาของเชื้อ *Salmonellae* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/mL; (a) *S.* Enteritidis (b) *S.* Typhi และ (c) Anatum, และทำการเติมเชื้อลงในไธโอซัลเฟต-เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหาร TFX ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไปของไลซีน (TFXL), ออร์นิธิน (TFXO), และอาร์จินิน (TFXA) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในแต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM, n = 3	55
4.13	รูปอาหารเหลวใน microwells ที่มีไธโอซัลเฟตเฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหารเหลว (TFX) ที่มีการเติมไลซีน (L), ออร์นิธิน (O), และอาร์จินิน (A) โดยในการทดลองมีการเติมเชื้อ Salmonellae ที่ 3 และ 7 log CFU/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C	57
4.14	ค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่เวลาต่างๆ ของไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่งของกลุ่มเชื้อ	58

รูปที่		หน้า
4.14	*Salmonella* ไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งและที่ไม่ใช่ไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งซึ่งไม่ใช่เชื้อกลุ่ม Salmonellae (7 log CFU/mL) ในอาหาร TFX (a), มีส่วนผสมไลซีน (b), ออร์นิธิน (c), และอาร์จินิน (d) อาหารเหลวบรรจุในเพลท microwell ภายใต้การเพาะบ่มที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	58
4.15	การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ *Salmonella* ชนิดต่าง ๆ (ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/mL) ในอาหารเหลวไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท เบสอาหารเหลว (TFX) ที่มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; (1) ไลซีน (L) และออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และอาร์จินิน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินีน (A) เพื่อให้ได้อาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ภายใต้การบ่มเพาะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหารที่เป็นสภาวะควบคุมเป็น TFX ที่มีไลซีน, TFXL อาหารเหลว	62
4.16	การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ non-salmonellae (7 log CFU/mL) ในไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทบนเบสอาหารเหลว (TFX) ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; (1) ไลซีน (L) และ ออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และอาร์จินิน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A) เพื่อให้ได้อาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ภายใต้การบ่มเพาะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ medium ที่เป็นสภาวะควบคุมเป็น TFX ที่มีไลซีน, TFXL อาหารเหลว	63

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ซัลโมเนลลาเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญอย่างยิ่งในคนและสัตว์ สามารถก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตและมีการแพร่ระบาดเกิดขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก ส่งผลให้เกิดความสูญเสียด้านเศรษฐกิจและค่าใช้จ่ายในการรักษา การแพร่ระบาดของโรคดังกล่าว มีสาเหตุสำคัญมาจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเข้าไป ดังนั้นผู้ผลิตอาหาร สินค้าอุปโภคบริโภคและสินค้าแปรรูปสินค้าเกษตรต่างๆ จึงได้ให้ความสำคัญและตระหนักถึงสุขอนามัยตลอดกระบวนการผลิต เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับสินค้าและผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยทางชีวอนามัยสูงตามหลักมาตรฐานสากล โดยการนำระบบและแนวทางมาตรฐานความปลอดภัยต่างๆ มาร่วมด้วย เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิเช่น หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice, GMP), เอชเอซีซีพี (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) เป็นต้น สำหรับระบบมาตรฐานเอชเอซีซีพีนั้นจะเกิดประสิทธิภาพสูงสุดได้ ถ้าวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารเป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วและสามารถใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนได้ครอบคลุมทุกจุดสุ่มเสี่ยงต่างๆ ที่มีอยู่ในบริเวณการผลิต แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดในหลายๆ ด้านของมาตรฐานการวิเคราะห์ในปัจจุบันนั้น นั่นคือประกอบไปด้วยขั้นตอนที่ใช้เวลานานถึง 3 วัน และค่อนข้างซับซ้อน ประกอบไปด้วยขั้นตอนการตรวจสอบการปนเปื้อนเบื้องต้น (Presumptive step) มีถึง 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะ (Non-selective enrichment) เพื่อเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลา 2) การเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment) ซึ่งมีสารยับยั้งหรือลดจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลา และ 3) การคัดแยกโคโลนีบนอาหารแข็งจำเพาะ (Selective agar plating) โดยอาศัยการจำแนกสีของโคโลนีของซัลโมเนลลา ซึ่งจะมีลักษณะที่จำเพาะแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น การทดสอบทั้ง 3 ขั้นตอนดังกล่าวทำให้เกิดค่าใช้จ่ายและภาระงานในการสุ่มตรวจวิเคราะห์ที่สูง โรงงานผลิตสินค้าอุปโภคบริโภคส่วนใหญ่จึงจำกัดจำนวนตัวอย่างหรือจำนวนซ้ำในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งทำให้มีปริมาณการสุ่มวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมทั้งจำนวนตัวอย่างและความถี่ในการสุ่มตรวจ จึงทำให้ผู้บริโภคสุ่มเสี่ยงต่อการบริโภคสินค้าและผลิตภัณฑ์ที่มีโอกาสปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเกิดความเสียหายทั้งชีวิตสุขภาพและส่งผลกระทบต่อความเชื่อมั่นในสินค้าในที่สุด

แนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจซัลโมเนลลาให้มีประสิทธิภาพสูงสุดนั้น จะต้องตอบโจทย์ 3 ส่วน สำคัญคือ 1) ความถูกต้อง แม่นยำของผลการตรวจวิเคราะห์ 2) ความรวดเร็วในการให้ผลการทดลอง รวมไปถึงความง่ายและสะดวกในการดำเนินการวิเคราะห์ และ 3) ค่าใช้จ่ายและความคุ้มค่าในการวิเคราะห์และการลงทุนอุปกรณ์เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ ดังนั้น ทางคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าการปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความจำเพาะต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีของซัลโมเนลลาร่วมกับการวิเคราะห์ในระดับไมโครสเกล จะสามารถตอบโจทย์ทั้ง 3 ส่วนได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้หากนำแนวทางดังกล่าวมาใช้ในขั้นตอนแรกหรือขั้นตอนที่สองของการวิเคราะห์จะทำให้สามารถบ่งชี้เบื้องต้นได้ว่ามีโอกาสปนเปื้อนซัลโมเนลลาหรือไม่ ซึ่งในปัจจุบันในขั้นตอนการบ่งชี้ดังกล่าวจำเป็นต้องอ่านผลการทดสอบดังกล่าวในวันที่ 3 หรือในขั้นตอนที่ 3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซึ่งอาหารแข็งดังกล่าวก็มีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณเชื้อขั้นต่ำที่เลี้ยงลงไปต้องมีมากถึงระดับ 10^4 - 10^5 CFU/mL เนื่องจากในสูตรของอาหารแข็งจำเพาะดังกล่าวนั้นมีองค์ประกอบของสารยับยั้งเชื้อแข่งขันของซัลโมเนลลา แต่ก็มีผลกับซัลโมเนลลาเล็กน้อยถึงปานกลางขึ้นอยู่กับซีโรวาร์และปริมาณเริ่มต้น ทำให้ในปัจจุบันจึงมีการรายงานผลการทดสอบผิดพลาดในเชิงลบ หรือ False negative result ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาส่งผลกระทบสูงมาก

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารเหลวบ่งชี้โอกาสการปนเปื้อนของซัลโมเนลลากลุ่มที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ (Indicator enrichment mediumfor thiosulfate-reducing *Salmonella*) โดยนำคุณสมบัติการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จากปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่น (Thiosulfate reduction) ของซัลโมเนลลาในกลุ่มที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur source) ซึ่งจะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะด่าง จึงต้องมีการใช้ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโน (Amino acid decarboxylation) ร่วมด้วยเพื่อสร้างสภาวะด่าง ปฏิกิริยาการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ดังกล่าว สามารถบ่งชี้ได้จากการเกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ (Iron sulfide หรือ ferrous sulfide, FeS) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของซัลไฟด์ไอออน (S^{2-}) กับไอรอน (Fe^{2+}) อินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไป ในขณะที่แบคทีเรียแข่งขันส่วนใหญ่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นได้ จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นตะกอนสีดำดังกล่าวได้ ทำให้สามารถแยกและบ่งชี้โอกาสการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในกลุ่มดังกล่าวเบื้องต้นได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาสูตรใหม่ โดยปรับมาจากสูตรอาหารแข็งจำเพาะมาตรฐานไซโลสไลซีนดีคาร์บอกซีเลส (Xylose Lysine Decarboxylase Agar, XLD) แต่มีการปรับให้อยู่ในรูปแบบอาหารเหลว โดยใช้องค์ประกอบหลักตามเดิมคือ โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium Thiosulfate) เฟอร์ริกแอมโนเนียมซิเตรท (Ferric Ammonium Citrate) น้ำตาลไซโลส (Xylose) แต่มีการปรับปรุงองค์ประกอบอื่นๆ เพื่อเพิ่มความสามารถให้การเกิดปฏิกิริยาและ

ความสามารถในการตรวจสอบซัลโมเนลลามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการปรับปรุงชนิดของกรดอะมิโนที่ใช้จากไลซีน (Lysine) ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ และมีการศึกษาผลของการใช้พีเอชอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับช่วยจำแนกในกรณีใช้การตรวจวัดค่าทางสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrometry) นอกจากนี้ มีข้อแนะนำเพิ่มเติมสำหรับซัลโมเนลลาหนึ่งในกลุ่มนี้ คือ ซัลโมเนลลาอะนาตัม (*Salmonella* Anatum) ซึ่งพบว่าซีโรวาร์นี้สามารถเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่น หรือสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ดีในสภาวะที่ไม่เป็นด่าง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับชนิดของกรดอะมิโนที่เหมาะสมหรืออาจไม่จำเป็นต้องใส่กรดอะมิโนลงไปเลยก็ได้ จากคุณสมบัติการบ่งชี้ดังกล่าวค่อนข้างมีความจำเพาะและคัดเลือกซัลโมเนลลากลุ่มใหญ่นี้ออกจากแบคทีเรียแข่งขันในกลุ่มใกล้เคียงกับซัลโมเนลลาซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกเกือบทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพในระดับสูง แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดสำหรับการคัดแยกออกจากแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์ อาทิ ไซโตรแบคเตอร์ (*Citrobacter*) และโปรเตียส (*Proteus*) เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวก็สามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้เหมือนซัลโมเนลลาเช่นกัน

นอกจากนี้การประยุกต์การใช้งานวิธีการตรวจสอบของอาหารเหลวที่จะพัฒนาขึ้นนี้เหมาะกับตัวอย่างในอุตสาหกรรมซึ่งมีความต้องการทราบผลการทดสอบเบื้องต้น (Presumptive result) ในระยะเวลาที่รวดเร็วสามารถบ่งชี้โอกาสการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นได้ ภายใน 1-2 วัน โดยผลบวก (Positive result) หมายถึงในตัวอย่างอาจ**มี**ซัลโมเนลลาและ/หรือแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนจากไทโอซัลเฟตได้ ส่วนผลลบ (Negative result) หมายถึงในตัวอย่าง**ไม่มี**ซัลโมเนลลากลุ่มที่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากไทโอซัลเฟตปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งวิธีการทดสอบนี้สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพและสามารถอ่านผลได้อย่างรวดเร็วกว่าอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานในปัจจุบันอีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน เทคนิคการวิเคราะห์แบบเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก (Microscale enrichment) ที่นำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้ที่พัฒนาขึ้นนี้ ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในจำนวนมากขึ้นต่อรอบการวิเคราะห์ ซึ่งนับว่าทำให้เกิดความสะดวก รวดเร็วในการปฏิบัติงานของบุคลากรในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1.2.1 พัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้นที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นในขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลว (Enrichment) โดยอาศัย

หลักการเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นของซัลโมเนลลาที่มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วและเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่มีจำนวนมากและรวดเร็ว

1.2.2 ปรับชุดตรวจสอบแบบสำเร็จรูปและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการตรวจการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาที่สามารถให้ผลวิเคราะห์เบื้องต้นภายในเวลา 24 - 48 ชั่วโมงโดยให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำเทียบเท่าวิธีการมาตรฐาน

1.2.3 เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาสำหรับอุตสาหกรรมไทย ทำให้สามารถลดการนำเข้าชุดวิเคราะห์เชื้อสำเร็จรูปและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น

1.2.4 พัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตรวจการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สามารถจำแนกความแตกต่างของสีและตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่นของซัลโมเนลลากลุ่มที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตได้ และสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงสีกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้

1.3.2 ศึกษาผลของชนิดสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาไทโอซัลเฟตรีดักชั่น ได้แก่ กรดอะมิโนและน้ำตาล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดตะกอนสีดำของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ เพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถจำแนกซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆได้ โดยอาศัยการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนสีของอาหาร

1.3.3 ศึกษาผลของพีเอชอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ สำหรับการเพิ่มความสามารถในการจำแนกซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ในสูตรอาหารบ่งชี้ที่เลือกกรดอะมิโนและน้ำตาลที่เหมาะสมแล้ว

1.3.4 ทดสอบการใช้อาหารเหลวบ่งชี้ที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองในเชื้อบริสุทธิ์ ในการตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารจากท้องตลาดและอุตสาหกรรมอาหาร โดยสอบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเหลวร่วมกับวิธีการใหม่ที่

อาศัยหลักการการลดขนาดของอาหารและตัวอย่าง (Miniaturization) กับวิธีการมาตรฐานในการวิเคราะห์ซัลโมเนลลาขององค์กรต่างๆ อาทิ เช่น องค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐาน (International standard organization, ISO) คู่มือการวิเคราะห์แบคทีเรีย (Bacteriological Analytical Manual, BAM) เป็นต้น โดยอาศัยค่าการคำนวณทางสถิติ

1.3.5 พัฒนารูปแบบของชุดตรวจวิเคราะห์ซัลโมเนลลาให้เหมาะกับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

2.1 จุลชีววิทยาของซัลโมเนลลา

2.2 ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลาแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิสัยการเจริญเติบโต

2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา

2.5 การปนเปื้อนจากซัลโมเนลลาและการป้องกัน

2.6 วิธีการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.

2.7 วิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* spp.

2.8 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับซัลโมเนลลา

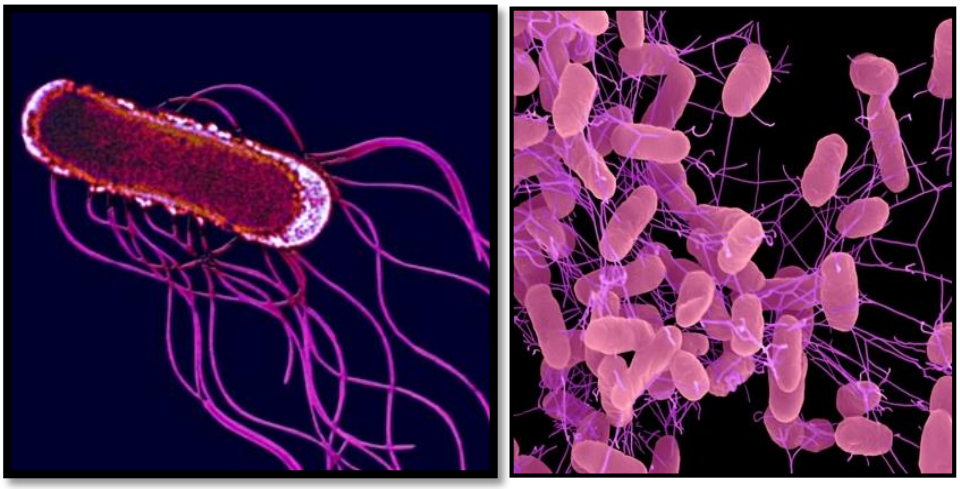
ในบรรดาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดในคนนั้นซาลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียที่มีการวิวัฒนาขนานไปกับวิวัฒนาของมนุษย์ แต่เดิมแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสัตว์และก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีเพียงไม่กี่ชนิด เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์โดยตรงและอาศัยอยู่ในคนแต่ปัจจุบันนี้ซาลโมเนลลาจากสัตว์หลายชนิดทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและอาศัยเป็นพาหะอยู่ในคนได้เป็นเวลานานทั้งนี้เพราะซาลโมเนลลาสามารถปรับตัวได้ดีทำให้สามารถอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นเรื่องของเทคโนโลยีใหม่ๆ เช่นการผลิตอาหารกระป๋อง อาหารแช่แข็งหรือขบวนการต่างๆ ในการเตรียมอาหารสำเร็จรูปทั้งอาหารที่ยังไม่สุกและอาหารที่สุกแล้วซึ่งในปัจจุบันเกิดขึ้นมากมายเพื่อสนองความต้องการของประชาชนที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยเป็นครัวอาหารโลกจำเป็นอย่างยิ่งต้องควบคุมป้องกันพร้อมทั้งหาทางหยุดยั้งซัลโมเนลลามิให้แพร่กระจายไปในอาหารสิ่งแวดล้อมต่างๆ เพิ่มขึ้น ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาจึงเป็นสิ่งที่ทางโรงงานอุตสาหกรรมอาหารไม่สามารถที่จะหลีกเลี่ยงได้

2.1 จุลชีววิทยาของซัลโมเนลลา

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ที่พบได้ทุกหนทุกแห่งและทั่วโลกโดยเข้ามามีบทบาทไม่เฉพาะแต่ในคนและสัตว์เลี้ยงของคนเท่านั้น หากยังพบได้ในสัตว์ทั่วๆไปเช่น

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

Salmonella เดิมเรียกว่า paratyphoid bacteria เป็นจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ พบได้ทั่วไปในแต่ละปีถือว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นกับประชากรต่างๆ ทั่วโลก แม้ว่ามีผู้วิจัยหลายท่านได้กล่าวถึง นิเวศวิทยา สรีระวิทยา ระบาดวิทยา และวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับการแยกและการตรวจพิสูจน์ *Salmonella* ที่ได้มีการตีพิมพ์ไปแล้วจำนวนมาก แต่วิวัฒนาการของ *Salmonella* ทำให้จำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้ทันสมัยอยู่เสมอเพื่อนำมาซึ่งความรู้ใหม่ ๆ เกี่ยวกับ *Salmonella* และผลเสียหายของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* ที่มีความสัมพันธ์กับอาหาร



(ก) (ข)

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

ประวัติของเชื้อซัลโมเนลลาเดิมเรียกว่า 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* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากผู้ป่วยและ

สัตว์ที่ป่วยด้วยโรคต่างๆ มีมากขึ้นทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ ๆ เหล่านี้จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1926 Kauffmann, Edwards, และ Ewing ได้ร่วมกันจัดทำหนังสือ Kauffmann – White Schema ขึ้นเพื่อเป็นเอกสารสำคัญแยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* (Ewing, 1986)

ในยุคต้นของศตวรรษที่ 19 นักพยาธิวิทยาคลินิคในฝรั่งเศส ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของการเป็นแผลในลำไส้ของมนุษย์กับการเป็นโรคติดต่อเป็นครั้งแรก ซึ่งโรคที่ถูกตรวจพบได้แก่ ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ต่อมาได้มีการแยกและอธิบายลักษณะของ typhoid bacillus โดยชาวยุโรป พบว่า เชื้อนี้เป็นต้นเหตุของไข้ไทฟอยด์และต่อมาได้พิสูจน์ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพาราไทฟอยด์ (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 ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ ๆ 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 โดยเห็นพ้องต้องกันใช้ชื่อนี้และเริ่มใช้ชื่อนี้ทั่วไปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1955 เป็นต้นมา (อรุณ บ่างตระกูลนนาท์และคณะ, 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 และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น *S.* Gallinarum อุณหภูมิที่เจริญได้ 37 – 45°C โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ

42 °C เจริญได้ในช่วงความเป็น กรด – ด่าง 4.5 – 9.0 ความชื้น (A_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ประมาณ 0.93 – 0.99 ภายใต้อุณหภูมิและอาหารที่เหมาะสม *Salmonella* ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60°C นาน 15 – 20 นาที หรือที่ 62°C นาน 4 นาที การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลาย *Salmonella* เพียงแต่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น

2.1.2 การเรียกชื่อ

การเขียนหรือพิมพ์ชื่อซีโรวาร์เปลี่ยนจากการใช้ตัวอักษรเล็กและตัวพิมพ์เอียงเป็นอักษรใหญ่ เช่น *Salmonella typhimurium* เปลี่ยนเป็น *Salmonella* Typhimurium นอกจากนี้ในบางซีโรวาร์ มี Phage เข้าไปแทนที่ทำให้ antigen เปลี่ยนไปซึ่งระบบเดิมจะเปลี่ยนชื่อเป็นซีโรวาร์ใหม่ แต่ระบบใหม่จะไม่มีการเปลี่ยนชื่อซีโรวาร์ 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 รายงานเรื่อง 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 ซีโรวาร์ สปีชีส์ที่ 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 ประกอบด้วยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ โปรตีนและฟอสโฟลิปิด มีคุณสมบัติคือ สามารถทนความร้อนที่ 100°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ทนต่อกรดเจือจาง ปฏิกริยาของโอแอนติเจนกับแอนติซีรั่มจำเพาะ จะมีลักษณเป็น granular โอแอนติเจนของ *Salmonella* ถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ 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 เกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการหรือไม่มีอาการของโรคปรากฏ อาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* จำแนกออกเป็น 3 แบบคือ

2.1.5.1 Enteric fevers ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ ได้แก่ *S.* Typhi เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไข้พาราไทฟอยด์ได้แก่ *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B, *S.* Paratyphi C ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์จะเกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น สาเหตุที่สำคัญในการติดเชื้อคือได้รับเชื้อปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่ม เชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ไปตามทางเดินอาหาร ต่อมน้ำเหลือง และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ผู้ป่วยที่มีอาการเฉียบเพลัน สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกระแส

โลหิต เชื้อสามารถเข้าไปยังอวัยวะต่างๆ ได้รวมทั้งไต ไขกระดูก ลำไส้ ถุงน้ำดี เชื้อถูกขับออกมากับอุจจาระและอาจพบได้ในปัสสาวะ เชื้อทำให้มีอาการอักเสบของ lymphoid tissue ต่างๆ บางครั้งทำให้เยื่อหุ้มกระดูก ปอดมีการอักเสบได้ 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 ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้สูงเป็นระยะ ๆ ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม อาจทำให้เกิดอาการปวดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อบุลิ้นหัวใจอักเสบ เชื้อที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S.* Choleraesuis

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

2.1.6 ระบาดวิทยา

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

2.2 ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลา แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิสัยการเจริญเติบโต

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

2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

ซัลโมเนลลาอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง คนและบางทีก็พบในแมลง แม้ว่าแหล่งกำเนิดของเชื้อคือลำไส้ของสัตว์ แต่บ่อยครั้งที่พบเชื้อซัลโมเนลลาตามร่างกายส่วนอื่น ๆ ของสัตว์ด้วย (Jay, 1996) เนื่องจากสัตว์จะปล่อยเชื้อซัลโมเนลลาผ่านทางอุจจาระซึ่งจะแพร่ผ่านแมลงและสัตว์อื่นๆ ขยายวงกว้างออกไปด้วยเหตุนี้เชื้อซัลโมเนลลาอาจพบในน้ำโดยเฉพาะในน้ำสกปรกและในอาหารที่มีแมลงวันตอม เมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารและน้ำที่มีเชื้อนี้เข้าไปบางครั้งจะแสดงอาการป่วยออกมาแต่บางครั้งก็กลายเป็นพาหนะ (carrier) คือไม่แสดงอาการป่วยทั้งๆ ที่มีเชื้อซัลโมเนลล่าอยู่ในร่างกายมนุษย์ผู้นั้นอาจกลายเป็นพาหะของเชื้อต่อไปมนุษย์และสัตว์ขับเชื้อซัลโมเนลล่าออกจากทางเดินอาหารทางอุจจาระ อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะได้ทำการสำรวจอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารที่ปฏิบัติงานในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งพบอัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าสูงสุดร้อยละ 15.38 อัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าสูงสุดในฤดูร้อนและต่ำสุดในฤดูฝน (อรุณบ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2545) เชื้อซัลโมเนลล่าในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์สามารถแพร่กระจายไปในดิน น้ำและสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้หลายทางซึ่งจะเป็นอันตรายอย่างยิ่งถ้านำสัตว์ที่มีเชื้อซัลโมเนลลามาใช้เป็นอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ

สถานการณ์ปัจจุบันในประเทศไทยที่ยังขาดการบริการทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรค Salmonellosis ได้ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว สวนทางกับการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์และอาหารสำเร็จรูปที่เห็นความสำคัญของการควบคุมคุณภาพด้านจุลินทรีย์มากน้อยต่างกันตลอดจนการเคลื่อนตัวของประชากรเข้าสู่เมืองใหญ่ๆ และการเกิดธุรกิจการจำหน่ายอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งปรากฏให้เห็นอยู่โดยทั่วไปเหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรจะคาดคะเนได้ว่า หากยังไม่สามารถลดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเครื่องอุปโภคของคนแล้ว การติดเชื้อจาก *Salmonella* จะมีแต่การเพิ่มขึ้นให้เป็นอุปสรรคต่อความหวังในการนำสาธารณสุขที่ดีมาให้แก่ประชากรชาวไทย (พนิดา ชัยเนตร, 2531)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา

2.4.1 อุณหภูมิ

ซัลโมเนลลาเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแม้ว่าจะมีรายงานว่าเชื้อซัลโมเนลลาในบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°C (D'Aoust, 1991) ก็ตาม สำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้คือ 49.5°C (ICMSF, 1996) ด้วยเหตุนี้การปฏิบัติอย่างถูกต้องเพื่อเก็บรักษาอาหารร้อนหรืออุ่นอาหารเพื่อให้ปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลลาตามที่ USDA/FSIS แนะนำจึงใช้อุณหภูมิ 63°C เป็นเกณฑ์ (แม้ว่าในทฤษฎีที่อุณหภูมิ 55°C จะสามารถทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้แล้วก็ตาม)

2.4.2 pH

ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างกับการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา พบว่าค่า pH ต่ำสุดที่ซัลโมเนลลาชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้อยู่ที่ pH 3.8 และ pH สูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วง pH ที่เชื้อซัลโมเนลลาส่วนมากเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของซัลโมเนลลาแต่ละสปีชีส์ด้วย จากการทดลองของชุงและก๊อฟเฟิร์ท (Chung และ Goepfert, 1970) พบว่ากรดที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อซัลโมเนลลา กล่าวคือในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับ pH เชื้อซัลโมเนลลาปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าการใช้กรดน้ำส้มหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อซัลโมเนลลาไวต่อกรดน้ำส้มมากกว่ากรดเกลือและกรดซิตริก

2.4.3 วอเตอร์แอคติวิตี้ (A_w)

มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลากล่าวคือ เชื้อซัลโมเนลลาเจริญได้ในช่วงที่มี A_w แคบมาก คือค่า A_w ต่ำสุดอยู่ที่ 0.94 ส่วนค่า A_w สูงสุดอยู่ในช่วง 0.99 – 1.00 ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา เช่น มีอาหารเหมาะสม มี A_w เหมาะสม มีอุณหภูมิเหมาะสม เชื้อซัลโมเนลลาสามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าปกติ ฉะนั้นปัจจัยร่วม (Combined effects) จึงมีความสำคัญในแง่ของการประยุกต์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลลามากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว

2.5 การปนเปื้อนจากซัลโมเนลลาและการป้องกัน

2.5.1 ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์อันเนื่องมาจากการระบาดของโรค Salmonellosis

การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์อาหารถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสังคมในเชิงเศรษฐศาสตร์และระบบสุขภาพของมนุษย์ในกรุงเทพมหานคร มีผลงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจหาซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้า พบว่ามีซัลโมเนลลาจำนวน 30 ตัวอย่างจากทั้งหมด 40 ตัวอย่าง (75%) ฉะนั้นเพื่อความปลอดภัยควรบริโภคแหนมฉายรังสี การตรวจพบซัลโมเนลลาปนเปื้อนในผักสด ทำให้ต่างประเทศระงับและสั่งห้ามนำเข้าสินค้าผักสดของประเทศไทย ช่วงปลายเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 ประเทศไทยได้รับแจ้งจากประเทศนอร์เวย์ห้ามนำเข้าสินค้าผักสดจากไทยเป็นการชั่วคราวจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สะระแหน่ ต้นหอม ผักชีฝรั่ง ผักชีโหระพา ใบจันทร์หอม ผักคะแยง และใบกระเพราเนื่องจากตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาและอีโคไลปนเปื้อน ต่อมาเดือนกันยายน พ .ศ.2548 ประเทศเดนมาร์กได้ตรวจพบจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในใบกระเพรา 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 เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในวัตถุดิบจำพวกไข่ ไก่ วัว ที่มีการปนเปื้อนข้ามมายังผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อาหารที่พบว่าสามารถเป็นสาเหตุการเกิดโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่าง ปี 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

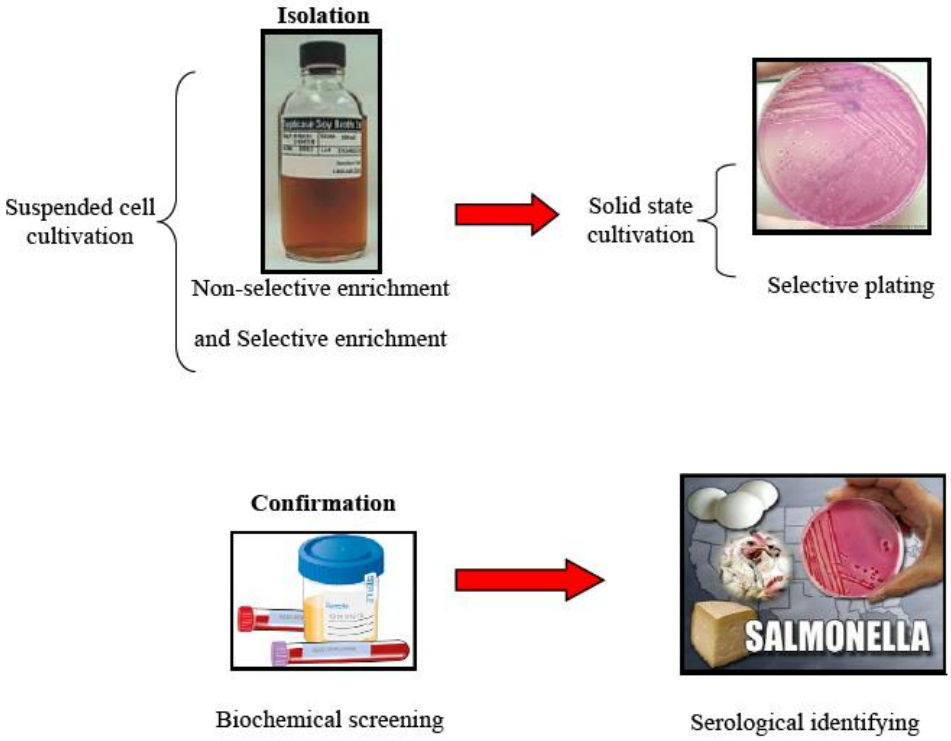
ที่มา: Ray (1996)

การระบาดของโรคนี้เกิดจากการรับประทานอาหารต่างๆ ที่อาจจะได้รับการปนเปื้อนของเชื้อโดยตรงหรือโดยอ้อมจากอุจจาระของสัตว์และมนุษย์ โดยการรับประทานอาหารดิบ หรือปรุงสุกไม่เพียงพอหรือเป็นอาหารที่ได้รับการปนเปื้อนซ้ำภายหลังการปรุงสุกด้วยความร้อน การปนเปื้อนแบบข้ามไปมา การปรุงอาหารภายในบ้านและร้านอาหาร ก็เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดโรคนี้ ในส่วนของการพบเชื้อในผลิตภัณฑ์ประเภทผักซึ่งเชื้อจะปนเปื้อนผ่านทางน้ำที่ไม่สะอาดมาใช้ในการรดผักหรือปุ๋ยต่างๆ ที่ใส่บำรุงพืชผักให้งอกงามหรือการล้างผักด้วยน้ำสกปรก

2.6 วิธีการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.

การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* เริ่มต้นจะทำให้ *Salmonella* แข็งแรงและเพิ่มจำนวน เนื่องจาก *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหารมีการบาดเจ็บหรืออ่อนแอเนื่องจากกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออาจมีปริมาณเชื้อน้อยแต่เป็นเชื้อที่ยังมีชีวิต และมีในปริมาณน้อย เมื่อเชื้อปนเปื้อนในอาหารและเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภคซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นและก่อให้เกิดโรค

ทางเดินอาหารได้ การมีเชื้อปนเปื้อนในอาหารน้อย รวมทั้งการใช้อาหารไม่เหมาะสมในการตรวจ จะทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งจะทำให้เป็นการรายงานผลที่ผิดพลาดว่าอาหารชนิดนั้นปลอดภัยต่อผู้บริโภค



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella แบบดั้งเดิม

ที่มา: Andrews และ Hammack (1998)

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* แบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Andrews และ 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 อีกทั้งยังเสถียรต่อสภาวะทางกายภาพ

และยอมให้มีการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* และจุลินทรีย์อื่นๆ Pre – enrichment broth มีหลายชนิด ได้แก่ 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 ทั่วไป ๆ คือ 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* และในเวลาเดียวกันเป็นการลดจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ 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 และ Winn, 1993) และในทางปฏิบัติเมื่อมีการใช้ enrichment medium เพียงตัวเดียวจะมีการเลือกใช้ RV broth หรือการดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อยู่เป็นประจำ เหตุที่ไม่นิยมเลือกใช้ Selenite cystine (SC) broth เพราะว่ามีความเป็นพิษ

ต่อเซลล์สูงมากและมีการพัฒนา 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 และ Steinhof (1997) พบว่าจำนวนที่น้อยมากของ *S.* Enteritidis ซึ่งมีปนอยู่กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีจำนวนมาก สามารถตรวจพบโดย RV enrichment อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าในการตรวจหา *Salmonella* ในเนื้อสัตว์ปีก tetrathionate brilliant green bile broth มีคุณสมบัติสูงกว่า RV broth (De Boer, 1998)

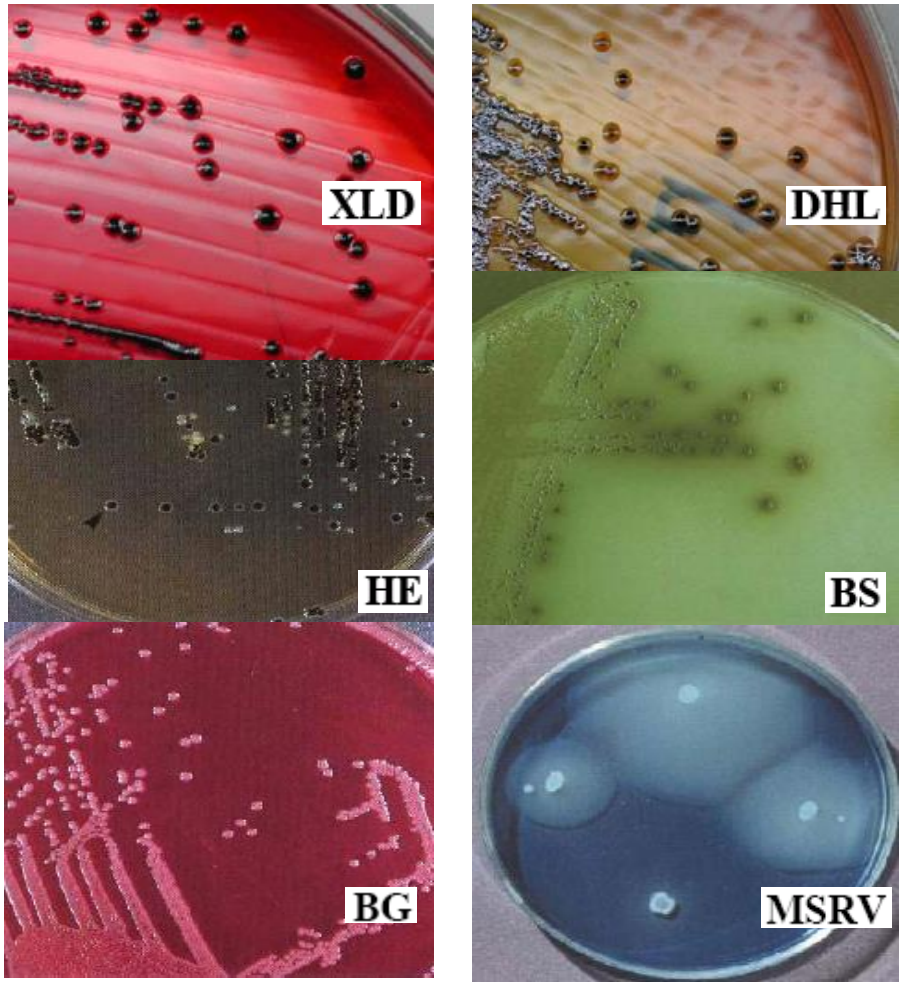
Waltman และคณะ (1993) แสดงถึงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม enrichment cultures คือ 24 ชั่วโมง D'Aoust และคณะ (1995) พบว่าการระงับการวิเคราะห์ *Salmonella* โดยการแช่เย็นของ pre-enrichment และ enrichment culture ในช่วงวันหยุด ไม่มีผลต่อการลดลงของการพบ *Salmonella* มีการศึกษายืนยัน พบว่า motility enrichment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

หลังจากกระตุ้นให้เชื้อซัลโมเนลลา (ที่อาจมีในอาหาร) แข็งแรงขึ้นแล้วจึงนำมาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (เลือกเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลา) ตัวอย่างเช่นสี (dyes) tetrathionate selenite อุณหภูมิ ระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อจะต้องเหมาะสมกับเชื้อซัลโมเนลลาซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อซัลโมเนลลาเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และปรากฏโคโลนีขึ้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบน selective differential plating media หรือนำไปจำแนกเชื้อโดยใช้เทคนิคอื่นตามปกติใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อประมาณ 16-24 ชั่วโมง อุณหภูมิที่ใช้บ่มเพาะเชื้อซัลโมเนลลาโดยทั่วไปอยู่ที่ 35-40°C แต่บ่อยครั้งพบว่าการบ่มเพาะเชื้อที่ 41-43°C มีโอกาสให้ได้เชื้อซัลโมเนลลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไวต่ออุณหภูมิไม่เจริญรบกวนเชื้อซัลโมเนลลา 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 และสารปฏิชีวนะอาหารเหล่านี้จำแนกเชื้อซัลโมเนลลาโดยอาศัยลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนวุ้นอาหารสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ pH indicators ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออันเป็นผลจากความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลแลคโตสหรือซูโครสผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) นอกจากนี้ยังอาจตอบสนองต่อความสามารถของเชื้อที่จะสร้างก๊าซไข่เน่า (H_2S) หรือความสามารถในการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) ออกจากกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เป็นต้น วุ้นอาหาร (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 และการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่สำหรับแยก *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 ก่อน จากนั้นจึงทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีอีก 14 อย่างเพื่อจำแนกสมาชิกในตระกูล Enterobacteriaceae ในระดับ genus (ในทางการค้ามีอุปกรณ์ test kits สำหรับจำแนกเชื้อจำพวก Enterobacteriaceae ในชื่อการค้าต่าง ๆ กัน เช่น Micro ID, Minitek, API20E, Entero-tube II และ Vitek เป็นต้น)

การทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนก *Salmonella* ได้พอสังเขปและถึงแม้ว่าจะแยกได้ *Salmonella* ที่มีลักษณะชีวเคมีใดก็ตามก็มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบ 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 โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับแอนติซีรั่มที่จำเพาะโดยการหยด antiserum 1 หยดบนสไลด์ จากนั้นถ่ายเชื้อที่สงสัยมาเกลี่ยผสมกับ antiserum ถ้ามีการตกตะกอนแสดงว่าเป็นเชื้อ *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 จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์และจำแนกเชื้อซัลโมเนลลาแบบดั้งเดิม เป็นวิธีที่ใช้แรงงานและระยะเวลาประมาณ 7 วันเพียงเพื่อที่จะบอกว่ามีแนวโน้มว่าพบเชื้อซัลโมเนลลาหรือไม่เท่านั้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาที่รวดเร็วกว่าเดิม ตัวอย่างเช่น วิธี Fluorescent antibody (Cherry et. al., 1975; Thomson, 1981; Insalata และ Chordash, 1984) วิธี DNA/DNA hybridization assays (DNAH) (Fitts et. al., 1983; Ewing, 1986) วิธี Enrichment Serology (Sperber และ 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 และ 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 มีสูตรอาหารเหลวจำเพาะหลากหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกซัลโมเนลลาที่ดีขึ้นและยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาลง อาหารดังกล่าวยกตัวอย่างแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่มหลัก ตามบทบาทของสารยับยั้ง (inhibitor) ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่งคือกลุ่มที่มีสารยับยั้งคือ Malachite green และ $MgCl_2$ ตัวอย่างเช่น อาหาร Rappaport Vassiliadis soy broth (RVS) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มี Selenite เป็นสารยับยั้ง เช่น selenite cystine broth (SC) และ MüllerKauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTTn) (Taskilaet et. al., 2012) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความจำเพาะและถูกต้องมากขึ้น แต่ยังคงกลุ่มสารยับยั้งหลักๆ ไว้ในสูตร อย่างไร

ก็ตามหลังจากบ่มในอาหารดังกล่าวแล้วจะต้องนำตัวอย่างไปเขี่ยบนอาหารแข็งจำเพาะ เพื่ออ่านผลการทดสอบในอีก 1 วันถัดมา ดังนั้นในการพัฒนาอาหารในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยอาศัยการวัดการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียนั้นๆ โดยวัดออกมาเป็นค่าต่างๆ อาทิเช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความขุ่น ค่าสี เป็นต้น (Shelef และ Firstenberg-Eden, 1997)

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีปฏิริยาหนึ่งที่สำคัญในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งซัลโมเนลลาจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ก็คือปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนโดยปฏิกิริยานี้เกิดจากการเปลี่ยนอะมิโนเป็นเอมีนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสและเอนไซม์ดังกล่าวจะได้รับการกระตุ้นเมื่ออยู่ในสภาวะกรด เมื่อกรดอะมิโนถูกย่อยเป็นเอมีนซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นด่างทำให้อาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์นั้นเปลี่ยนสี การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม จากการวิจัยของ Shelefet และคณะ (1998) ได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ 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 ส่วนออนิทีนดีคาร์บอกซีเลสก็มีในซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์ ยกเว้น *S.* Typhi และนอกจากนี้ในแบคทีเรียชนิดอื่นบางสายพันธุ์ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาก็สามารถเกิดปฏิกิริยาไลซีนและออนิทีนดีคาร์บอกซีเลชั่นได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นแนวทางในการปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความจำเพาะกับซัลโมเนลลามากขึ้นก็คือ การนำเอาสารยับยั้งมาช่วยลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ลง

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* เพื่อให้ได้ชุดวิเคราะห์ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และลดเวลาการดำเนินงานจากวิธีการปกติ (conventional method) ซึ่งใช้เวลานาน 3 – 5 วัน ให้เหลือเพียง 2 วัน ทั้งนี้ขั้นตอนที่พัฒนาศึกษาเป็นขั้นตอนการบ่งชี้จำเพาะการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารสีจากปฏิกิริยา H_2S production เพื่อให้ได้สูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ได้อย่างถูกต้อง ในขณะที่อาหารสีจากปฏิกิริยา H_2S production มีการพัฒนาสูตรเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกให้สูงขึ้น โดยรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานแสดงดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

Group	Organisms	Culture collection number
เชื้อ Salmonella ที่ให้ผลบวกในการเกิดปฏิกิริยา H_2S production	*Salmonella* Anatum	DMST 19600
	Salmonella Enteritidis	DMST 15673
	Salmonella Rissen	DMST 17365
	Salmonella Typhimurium	TISTR 292
	Salmonella Weltevreden	TISTR 292
	Salmonella Typhi	DMST 22842
	Salmonella Paratyphi B	DMST 28118
เชื้อแข่งขันที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ให้ผลลบในการเกิดปฏิกิริยา H_2S production	*Enterobacter aerogenes*	DMST 8216
	Escherichia coli	DMST 4609
	Pseudomonas aeruginosa	DMST 4739
	Shigella flexneri	DMST 4423
	Shigella sonnei	DMST 561
	Serratia marcescens	DMST 8845
	Yersinia enterocolitica	DMST 8012
เชื้อแข่งขันที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ให้ผลบวกในการเกิดปฏิกิริยา H_2S production	*Citrobacter freundii*	DMST 16368
	Proteus mirabilis	TISTR 100
	Proteus vulgalis	DMST 557

เชื้อแข่งขันที่เป็นแบคทีเรีย	*Enterococcus faecalis*	DMST 4736
แกรมบวกที่ให้ผลลบในการ	*Listeria innocua*	DMST 9011
เกิดปฏิกิริยา H_2S production	*Staphylococcus aureus*	TISTR 808

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)
- ปิเปตแบบ Multichannel (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Nylon syringe filter membrane (13 mm diameter, 0.45 μm pore size, Filtrex, Thailand)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB, Lab M, UK)
- Trypticase soy agar (TSA, Lab M, UK)

3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

3.2.1 การทำ frozen stocks

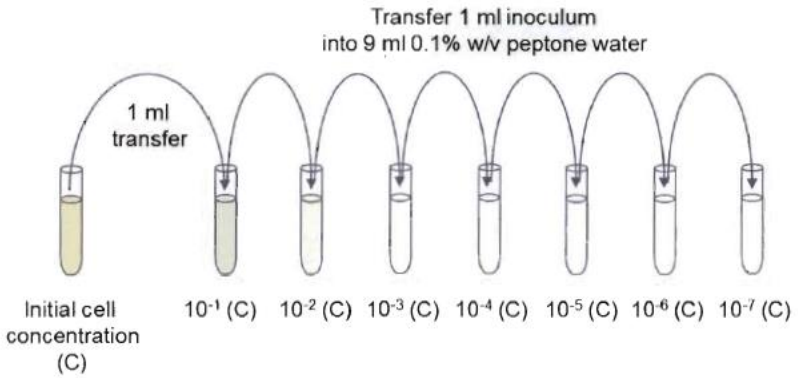
เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Thailand) ถูก streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวจะถูกถ่ายลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาณ 100 mL และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนทำการแช่แข็ง เชื้อถูกผสมอย่างดีกับกลีเซอรอลจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 – 15% (v/v) ปริมาณ 1.5 mL และถูกบรรจุลงในเอพเพนดอร์พเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20°C

3.2.2 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จาก frozen stock ถูกทำให้เพิ่มจำนวนด้วย 100 mL ของ TSB ในขวดลูกชมพู่ขนาด 250 mL และทำการบ่มด้วยอุณหภูมิ 37±1°C ภายใต้การเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง นำลูปที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อที่ถูกทำให้เพิ่มจำนวน จากนั้นนำมา streak ลงบนอาหารแข็ง TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ agar ที่มีโคโลนีของเชื้อถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C สำหรับใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง

3.2.3 การเตรียม cell culture

1 ลูปของแต่ละโคโลนีที่อยู่บนอาหาร TSA ถูกนำไปใส่ในอาหาร TSB ปริมาตร 10 mL ที่บรรจุในหลอดทนความร้อนสามารถฆ่าเชื้อได้และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการ ทำการเจือจางเชื้อที่ 10 เท่า ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% w/v ปริมาณเชื้อถูกวัดด้วยเทคนิค spread plate



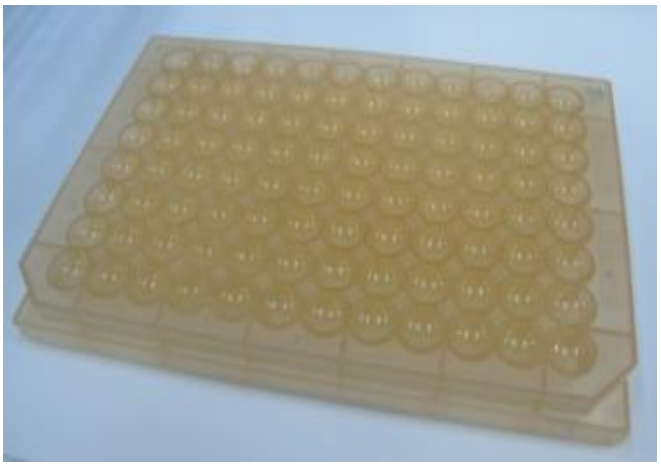
รูปที่ 3.1 Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า

3.2.4 เทคนิคการหาปริมาณเชื้อ

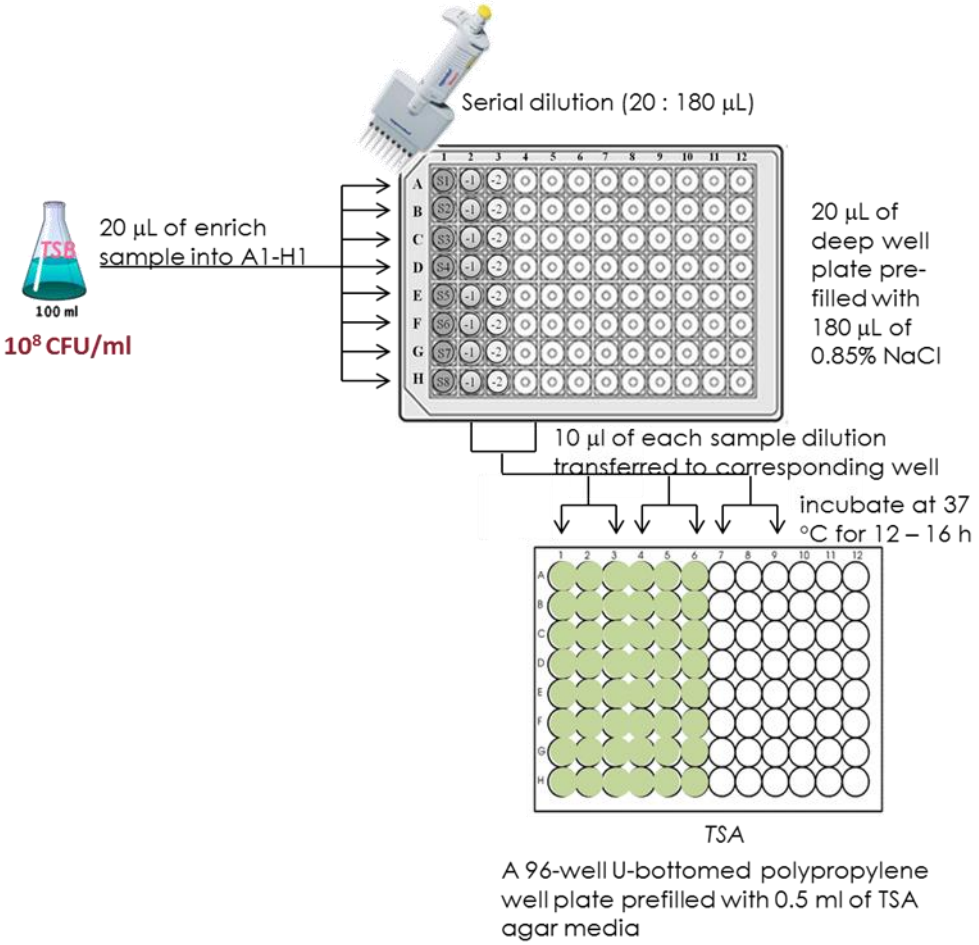
ในการทดลองได้เลือกใช้ *S.* Typhi เป็นเชื้อตัวอย่างที่ใช้ศึกษา โดยเชื้อดังกล่าวถูกนำมาทำให้มีการเจริญเติบโตในอาหาร TSB และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วง 8 – 9 log CFU/mL เซลล์เหล่านี้ถูกนำมานับโดยการใช้เทคนิค spread plate ที่เป็นวิธีการ conventional method 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 โดยตรงบนเพลท

อาหาร TSA สำหรับเทคนิค MDPT ที่ปริมาณเชื้อ 8 – 9 log CFU/mL ถูกทำการเจือจาง (10^{-1} – 10^{-5}) โดยปิเปตตัวอย่าง 20 μL ลงใน 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ในแต่ละ well มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จำนวน 180 μL จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วยปิเปตแบบ multichannel สำหรับการเตรียมเพลทอาหาร TSA ใช้แผ่น 96-well U-bottomed polypropylene เพลทที่ได้มีการฆ่าเชื้อแล้ว ถูกเติมด้วยอาหาร TSA ซึ่งในแต่ละ well ของเพลทมีปริมาตรของ TSA ประมาณ 0.5 mL (รูปที่ 3.2) ปริมาตรเชื้อของแต่ละ dilution ที่ 10 μL ถูก drop ลงบนอาหาร TSA ทั้ง 2 เทคนิคถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีในรูปแบบ log CFU/mL ถูกนับที่เวลาในการบ่มต่างๆ



รูปที่ 3.2 แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA

3.3 การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนขนาดเล็กของเชื้อ Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ในอาหารเหลว TFXL

นำเสนออาหารเหลว H_2S ที่มีชื่อว่า TFXL ที่ประกอบไปด้วยส่วนประกอบในหน่วย g/L ซอยโตน (USbiological, Salem, MA), 4.5; ไซโลส (Acros organics, Fair Lawn, NJ), 1; เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), 0.5; โซเดียมไธโอซัลเฟต, 6.8, L-ไลซีน, 5, และโซเดียมคลอไรด์, 5. ส่วนประกอบอาหารทั้งหมดถูกผสมและละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยน้ำกลั่นและให้ความร้อนและทำให้เย็นจนถึงที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนที่จะมีการปรับ pH ให้เป็น pH เริ่มต้นประมาณ 7.0±0.1 ด้วยกรด HCl (QRëC®, Malaysia) ความเข้มข้น 1 N และ NaOH (Carlo Erba, France) ความเข้มข้น 1 N และเมื่อนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการกรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm. ที่เป็นไนล่อนมี pore size ขนาด 0.45 µm (Filtrex, Thailand) ก่อนการใช้

ปริมาณเชื้อที่น้อย (2-3 log CFU/mL) และที่มาก (6-7 log CFU/mL) ทำการ inoculums ด้วยเชื้อ Salmonella ที่สามารถเกิด H_2S^+ และที่ปริมาณเชื้อสูง (6-7 log CFU/mL) ของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^-) โดยแบคทีเรียได้ถูกเตรียมในแต่ละ inculum ที่ปริมาณ 20 μL จากนั้นปิเปตลงใน 180 μL ของ TFXL ที่อัตราส่วน 1:10 ใน microwell ของ 96-well flat bottom ไมโครเพลทที่มีการใช้ปิเปตแบบ multi-channel อาหารเหลว TFXL 200 μL ถูกใช้เป็นตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่ทดสอบถูกบ่มที่ 37±1°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อนั้นในแต่ละอาหารเหลว ตัวอย่างในแต่ละ well ได้ถูกทดลองและบันทึกในรูปแบบภาพ digital camera

3.4 การประยุกต์ใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงในการตรวจการเกิดตะกอนสีดำในอาหารเหลว TFXL

เพื่อที่จะวัดปริมาณเปรียบเทียบความสามารถในการ sensitivity และ selectivity ของสูตรอาหารที่หลากหลายของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S-based broth media) เราได้ใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) เพื่อวัดปริมาณเฟอรัสซัลไฟด์ (FeS) ของการตกตะกอนสีดำที่เกิดขึ้นในอาหารเหลวตัวอย่าง อย่างไรก็ตามไม่เพียงแต่การเกิดตะกอนสีดำ มันยังรวมถึงความขุ่นที่จะมีผลกับค่า OD ดังนั้นผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีต่อความขุ่นได้ถูกประเมินวัดเพื่อที่จะสามารถนำมาหักล้างกัน

เราได้ประเมินผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงในการวัดค่าความขุ่นโดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลว 2 ชนิดที่แตกต่างกันที่มีการเติมเชื้อ TFXL และ TXL (ไม่มีเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท) ภายใต้สภาวะเงื่อนไขเดียวกัน TXL บรรจุส่วนประกอบทั้งหมดเป็น TFXL ยกเว้น เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับการเกิดตะกอนสีดำ) การเพาะบ่มลงในอาหาร TXL จัดเป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับเซลล์ตัวอย่างที่ขุ่น ไม่ได้เกิดการตกตะกอนสีดำ กลุ่มของ Salmonellae ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (H_2S^+) เช่น *S.* Anatum, *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi B และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ไม่สามารถเกิดปฏิกริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^-) เช่น *E. aerogenes*, *E. coli*, และ *S. flexneri* ปริมาตรเชื้อแต่ละชนิดที่ 20 μL ของ 6-7 log CFU/mL ได้ถูก inoculated ลงใน 180 μL ในแต่ละอาหาร TFXL และ TXL และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของทุกตัวอย่างจะถูกทำการวัดหลังจาก 24 ชั่วโมงของการบ่มที่ความยาวคลื่น 340, 405, 450, 490, 550, 590, 600, และ 650 nm โดยการใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ อาหารเหลว pH 7 ที่ไม่มีการ inoculation ของเซลล์เป็น blank ของตัวอย่าง ความแตกต่างใน OD ระหว่างตัวอย่างอาหารเหลว TFXL และ TXL ได้ถูกวัดเป็นค่า OD เนื่องจากการตกตะกอนสีดำของ iron sulfide ($OD_{corrected}$) ค่า $OD_{corrected}$ spectra ของเชื้อ Salmonellae ที่ใช้ทดสอบ

ทั้งหมดและที่ไม่ใช่เชื้อ salmonellae ได้ถูกพล็อตกราฟ หลังจากนั้น, $OD_{corrected}$ ของ H_2S^+ และ H_2S^- ของแต่ละแบคทีเรียได้ถูกเปรียบเทียบและสเปคตรัมของ OD ที่แตกต่างกันระหว่าง H_2S^+ และ H_2S^- ได้ถูกพล็อตกราฟเพื่อค้นหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจติดตามการเกิดปฏิกริยาของ H_2S^+ ในแบคทีเรีย

เราได้ประเมินการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเหมือนกันในสภาวะที่ตัวอย่างไม่ขุ่น การทดสอบกับเชื้อเป็นที่ 6-7 log CFU/mL ที่ได้มีการ inoculum ด้วยเชื้อ Salmonella ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ เช่น *S.* Rissen ส่วน *S.* Anatum เป็นตัวแทนของเชื้อที่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่อ่อน *E. aerogenes* และ *E. coli* เป็นตัวแทนของเชื้อที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในแต่ละเชื้อปริมาณ 20 μL ได้ถูกปิเปตลงใน 180 μL ของแต่ละอาหาร TFXL ใน microwell ของ 96-well flat bottom โดยการใช้ปิเปตแบบ multi-channel อาหารเหลว TFXL ปริมาตร 200 μL ที่ไม่มีการเติมเชื้อให้เป็นสภาวะควบคุม ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทั้งหมดถูกวัดที่ความยาวคลื่น 340, 405, 450, 490, 550, 590, 600, และ 650 nm โดยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ค่าสเปคตรัมของ *S.* Rissen ได้ถูกลบออกโดย *S.* Anatum เพื่อให้ได้ค่าความแตกต่างของ $OD_{difference}$ สเปคตรัมในการค้นหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยแบคทีเรีย ค่า spectra ของ *S.* Rissen และ *S.* Anatum ได้ถูกแบ่งโดยเชื้อ *E. aerogenes* และ *E. coli* สำหรับการพล็อตค่า OD_{ratio} สเปคตราเพื่อบ่งชี้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีผลกระทบเนื่องจากการแทรกแซงของความขุ่นทั้ง 2 วิธีแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ H_2S^+ และ H_2S^- เป็นค่าสูงสุดที่ 650 nm ด้วยความขุ่นที่น้อย ความยาวคลื่นนี้ถูกใช้ในการเปรียบเทียบที่ 600 nm ซึ่งโดยปกติความยาวคลื่นธรรมดาสำหรับการประเมินค่าของเซลล์ความขุ่น (Sutton, 2011) ดังนั้นที่ 650 nm ถูกใช้เพื่อแยกความแตกต่างสภาวะที่สามารถเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (positive) และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (negative) ตลอดการศึกษาได้มีการพัฒนาอาหารไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทเป็นเบสอาหาร

3.5 กราฟการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของ OD_{650} ที่ได้จากเชื้อ Salmonellae ที่สามารถเกิด H_2S^+ และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ที่ได้มีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว TFXL

เพื่อยืนยันและแสดงให้เห็นการหักลบค่าความขุ่นและไม่หักลบค่าความขุ่นของค่าการดูดกลืนแสงได้ถูกเปรียบเทียบและสามารถแลกเปลี่ยนกันได้ การวัดค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่เวลาต่างๆ ได้รับโดยทั้ง 2 วิธีถูกนำไปพล็อตกราฟภายใต้การทดลองที่เหมือนกัน ในแต่ละหลุมของ 96-microwell plates ได้ถูกบรรจุด้วย 180 μL ของอาหาร TFXL และ TXL และทำการบ่มเชื้อในแต่ละหลุมด้วย Salmonellae ที่

สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (H_2S^+) เช่น *S.* Anatum, *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi B และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^-) เช่น *E. aerogenes*, *E. coli*, และ *S. flexneri* เชื้อแต่ละชนิดที่ปริมาตร 20 μL จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6-7 log CFU/mL ตัวอย่างถูกบ่มภายใต้สภาวะคงที่ที่ 37±1°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่า OD_{650} ได้ถูกวัดที่เวลาต่างๆ ในระหว่างการบ่ม

3.6 ผลของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นที่มีต่อการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่งด้วยเชื้อ Salmonella และเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่ Salmonellae

อาหารเหลวบ่งชี้ 3 ชนิดที่เป็น TFXL, TFXO, และ TFXA อาหารเหลวดังกล่าวประกอบไปด้วยส่วนประกอบในหน่วย g/L: ซอยโตน (USbiological, Salem, MA), 4.5; ไซโลส (Acros organics, Fair Lawn, NJ), 1; เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), 0.5; โซเดียมไธโอซัลเฟต, 6.8, โซเดียมคลอไรด์, 5; และ L-ไลซีน (TFXL) หรือ L-ออร์นิธิน (TFXO) หรืออาร์จินิน (TFXA), 5. ตัวอย่างควบคุมเป็น TFX ที่บรรจุส่วนประกอบที่เหมือนกันยกเว้นไม่มีกรดอะมิโน ส่วนประกอบทั้งหมดถูกผสมและละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยน้ำกลั่นและให้ความร้อนและทำให้เย็นจนถึงที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนที่จะใช้มีการปรับ pH ให้เป็น pH เริ่มต้นประมาณ 7.0±0.1 ด้วยกรด HCl (QRëC®, Malaysia) ความเข้มข้น 1 N และ NaOH (Carlo Erba, France) ความเข้มข้น 1 N และเมื่อนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการกรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm. ที่เป็นไนล่อนมี pore size ขนาด 0.45 μm (Filtrex, Thailand) ก่อนการใช้ ปริมาณเชื้อที่ 7 log CFU/mL เชื้อ Salmonellae ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (H_2S^+) เช่น *S.* Anatum, *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi B และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^-) เช่น *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *S. sonnei, S. marcescens, Y. enteritidis, E. faecalis, L. innocua,* และ *S. aureus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น *C. freundii*, *P. mirabilis*, และ *P. vulgalis* ได้ถูกปิเปตลงในอาหารเหลว TFX, TFXL, TFXO, และ TFXA อัตราส่วน 1:10 ของการเพาะบ่มเชื้อลงไปในอาหารเหลว ค่าการดูดกลืนแสงที่ O_{650} ถูกวัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ที่เวลาต่างๆ ระหว่างการบ่ม อาหารที่ไม่มีเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุม เพื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนที่เป็น double และ triple ของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นที่มีต่อการตกตะกอนสีดำ กรดอะมิโนเดี่ยวในอาหารข้างบนถูกแทนที่โดยไลซีน-ออร์นิธิน, ออร์นิธิน-อาร์จินิน, หรือไลซีน-อาร์จินิน, และไลซีน-อาร์จินิน-ออร์นิธิน (5 กรัมของแต่ละกรดอะมิโน) เพื่อเตรียมเป็น

อาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA การทดลองที่เหมือนกันเป็นอาหารเหลวที่มีเพียงกรดอะมิโนชนิดเดียว

3.7 ผลของคาร์โบไฮเดรตที่มีต่อการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ชิ่งในตัวอย่างอาหารเหลวที่มีเชื้อ Salmonella และเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่ Salmonellae

การเกิด H_2S ที่เป็นตัวบ่งชี้อาหารเหลวที่มีออร์นิธินและอาร์จินิน แต่ไม่มีน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ TFOA ที่เป็นอาหารเหลวประกอบไปด้วยส่วนประกอบดังนี้ในหน่วย g/L: ซอยโตน, 4.5; เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท, 0.5; โซเดียมคลอไรด์, 6.8, และ L-ออร์นิธิน และ L-อาร์จินินม 5 กรัม ในแต่ละองค์ประกอบ TFOA ถูกใช้เป็นอาหารเหลวสำหรับเตรียมอาหาร 19 ชนิดโดยการเติม 3.5 g/L ของน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น อะโดนิทอล (Ourchem, China), อะราบิโนส (Ourchem, China), เซลโลไบโอส (SCR, China), D-เด็กซ์โตรส (Merck, Germany), ดูซิทอล (Ourchem, China), D-(-)-ฟรุคโตส (Sigma-Aldrich, Singapore), D-(+)-กาแลคโตส (SCR, China), อิโนซิทอล (SCR, China), แมนนิทอล (USbiological, Salem, MA), แมนโนส (SCR, China), D-(+)-เมลิไบโอส (Aladdin, China), แรมโรส (SCR, China), D(-)-ซาลิซิน (Acros Organics, Fair Lawn, NJ), D-ซอร์บิทอล (Sigma-Aldrich, Singapore), ซูโครส (Merck, Germany), ทรีฮาโลส (Ourchem, China), D-(+)-ไซโลส (Acros Organics, Fair Lawn, NJ) อาหารเหลว TFOA ที่มีไซโลส 3.5 g/L ถูกใช้ในการเป็นตัวควบคุมเพื่อหาชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมและ TFOA เป็นตัวอย่างควบคุมในการประเมินการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต

ส่วนผสมทั้งหมดถูกผสมและละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยน้ำกลั่นและให้ความร้อนและทำให้เย็นจนถึงที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนที่จะมีการปรับ pH ให้เป็น pH เริ่มต้นประมาณ 7.0$\pm$0.1 ด้วยกรด HCl (QRëC®, Malaysia) ความเข้มข้น 1 N และ NaOH (Carlo Erba, France) ความเข้มข้น 1 N และเมื่อนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการกรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm. ที่เป็นไนล่อนมี pore size ขนาด 0.45 μm (Filtrex, Thailand) ก่อนการใช้ เชื้อที่ใช้ในการบ่มเพาะเพิ่มจำนวนเป็นเชื้อ H_2S^+ Salmonella และ H_2S^- ที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ในทุกอาหารเหลวที่ใช้ในการทดสอบได้ถูกประเมินเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในระหว่างการบ่มโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm.

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะ (Non selective enrichment) เป็นการประยุกต์ใช้อาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนาจากการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ในขณะเดียวกันมีการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวได้ โดยการเกิดปฏิกิริยาสามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) การเพาะเชื้อระดับเล็ก (micro-scale) เป็นการใช้อุปกรณ์ 96-microplate นอกจากนี้ในการพัฒนาสูตรอาหารการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* มีการแทนที่ด้วยน้ำตาลที่สามารถเกิดปฏิกิริยา fermentation และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดผลการทดลองต่อไปนี้

4.1 การพัฒนาสูตรอาหารการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*

การรีดักชั่นของไทโอซัลเฟตไปเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์มีความสำเร็จในการผสมผสานทำงานร่วมกันเพื่อทดสอบการบ่งชี้และแยกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยส่วนใหญ่ออกจากสปีชีส์อื่นๆ ที่เป็น Enterobacteriaceae (Barrett และ Clark, 1987; Shelef และ Tan, 1998) กิจกรรมของปฏิกิริยานี้มีความสัมพันธ์ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับ *Salmonella* และมีเชื้อบางตัวที่ไม่ใช่ *Salmonella* สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ เช่น *Proteus* และ *Citrobacter* (Park et. al., 2012) โดยปกติมันถูกนำไปใช้ควบคู่กับอาหารจำเพาะแข็งเพื่อคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* เช่น อาหารแข็งไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่นในไลซีนไอรอนและอาหารแข็งไซโลสไลซีนดีคาร์บอกซีเลสด้วยเหมือนกัน ด้วยตัวยับยั้งที่หลากหลายเพื่อใช้ในการบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของโคโลนีเชื้อ *Salmonella* เบื้องต้นและเพื่อเป็นการยืนยันผลของการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* เชื้อดังกล่าวจะถูกนำมายืนยันด้วยการใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีในตัวอย่างอาหารและตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (Taylor, 1965; Hoben et. al., 1973; Miller et. al., 1991) ทั้งนี้อาหารที่ใช้บ่งบอกการปนเปื้อนของ *Salmonella* ที่ใช้ปฏิกิริยาการเกิด H_2S production อยู่ในรูปของแข็ง ดังนั้นในการปรับเปลี่ยนเป็นรูปแบบอาหารเหลวจำเพาะจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาเพื่อให้ได้อาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะกับการบ่งชี้การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella*

ถึงแม้ว่าคุณลักษณะความจำเพาะของไธโอซัลเฟตรีดักชั่น มีการศึกษาหลายอันที่ได้นำไปสู่การบ่งบอกการปนเปื้อนเบื้องต้นด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวขนาดเล็ก Shelef และ Tan (1998) ได้ศึกษาอาหารเหลวที่มีการใส่ไธโอซัลเฟต, เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท, ไซโลสและกรดอะมิโน (ไลซีน, ออร์นิธิน, หรืออาร์จินิน) ที่มีโบรโมครีซอลเพอเพิลและไม่มีโบรโมครีซอลเพอเพิลแทนที่ระบบอาหารที่เป็นของแข็ง เพื่อการวิเคราะห์แบบอัติโนมัติ สำหรับการแยกเชื้อ Salmonella บริสุทธิ์ จากเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella หลังจากนั้นสูตรอาหารเหลวไธโอซัลเฟต 3 ชนิดที่ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดด้วยวิธีทางแสงแบบอัตโนมัติได้ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบสำหรับการคัดแยกเชื้อ Salmonella ที่มีปริมาณน้อยในนม ไข่และตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคและตัวอย่างของสด โดยหลังจากเวลา 6 ชั่วโมงของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนในอาหาร non-selective enrichment (Tan และ Shelef, 1999; Peng และ Shelef, 2001) หลักการของวิธีเหล่านี้ที่เป็นสีดำตะกอนของไอรอนซัลไฟด์ที่แพร่เข้าไปในอาหารแข็งต่ำกว่าการส่งผ่านทางแสง การเกิดตะกอนสีดำในอาหารเหล่านี้ทำให้เกิดการส่งผ่านของการเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซิ่งจากเชื้อที่ให้ผลลบอื่นๆ เวลาในการตรวจวิเคราะห์โดยการอ่านค่าการส่งผ่านสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาประมาณ 10 ถึง 17 ชั่วโมง สำหรับที่ปริมาณเชื้อ 10^5 ไปเป็น 10^1 ของเชื้อ *S.* Enteritidis เซลล์ต่อ mL ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งแบคทีเรียแต่เชื้อที่สามารถเกิดตะกอนสีดำที่เป็น *S.* Anatum และ *S.* Typhi ได้ถูกทดสอบในการศึกษานี้

การตระหนักถึงข้อจำกัดของอาหารคัดเลือกที่ใช้และอาหารคัดแยก มันเป็นความต้องการเพื่อที่จะพัฒนาความจำเพาะ specificity และ sensitivity ของอาหารในขณะที่ยังคงรักษาราคาที่มีประสิทธิภาพโดยเฉพาะเป็นพิเศษ มันเป็นสิ่งที่ต้องการเพื่อที่จะแยกเชื้อ *Salmonella* spp. ออกจาก *Proteus* spp. เช่นเดียวกับการแยกจาก *Citrobacter* spp. เพื่อที่จะพัฒนาผลที่ได้และราคาของการตรวจวิเคราะห์ เราได้นำเสนอการใช้รูปแบบ 96-microwell สำหรับอาหารเหลวอินดิเคเตอร์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ในการเพิ่มจำนวน อัตราของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์โปรดักชั่นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณและชนิดของสับสเตรท (แหล่งของซัลเฟอร์, น้ำตาล, และกรดอะมิโน), pH, ออกซิเจน, และความเข้มข้นของตัวบ่งชี้ไอรอน (Rambach, 1990; McLaughlin, 2006; Park et. al., 2012) เงื่อนไขความเป็นกรดที่สูงได้ถูกผลิต โดยการเกิด fermentation ของคาร์โบไฮเดรตสามารถที่จะยับยั้งการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ผ่านกิจกรรมของไธโอซัลเฟตรีดักเตส (Bulmash และ Fulton, 1964; Barret และ Clark, 1987) งานนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะใช้กรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นควบคู่ ซึ่งรีดิวซ์ความเป็นกรดของอาหารเหลวในไฮโดรเจนซัลไฟด์โปรดักชั่นและพัฒนาให้เร็วและมีความ sensitive ในการทดสอบสำหรับไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่ง *Salmonella* spp. โดยเฉพาะเป็นพิเศษสำหรับเชื้อ Salmonella ซีโร

วาร์ที่พบค่อนข้างน้อย อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลชั่นของอะมิโนเดี่ยว คู่และแบบสามชนิดถูกใช้ในการศึกษาเพื่อที่จะปรับปรุงให้ดีขึ้นในการแยกเชื้อ Salmonella ที่สามารถเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง Salmonella ซีโรวาร์จากเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella โดยส่วนใหญ่ สภาวะที่เหมาะสมของการใช้น้ำตาลยกตัวอย่างเช่น การใช้ดูซิทอลช่วยในการคัดเลือกเชื้อ *P. mirabilis* และ *C. freundii* ออกจากเชื้อ Salmonella โดยการขัดขวางอัตราการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์โปรดักชั่นของ *P. mirabilis* และ *C. freundii* การประยุกต์ใช้อาหารด้วยกันของขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอย่างแม่นยำและวิธีการวิเคราะห์เชื้อมีความสำคัญสำหรับการตรวจวิเคราะห์ Salmonella ที่ประสบความสำเร็จในผลิตภัณฑ์อาหาร

การตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์จากการที่ไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทถูกสังเกตได้ง่ายโดยการใช้สายตา อย่างไรก็ตามการใช้ไมโครเพลทร่วมกับระบบการเขย่าตัวอย่างเพื่อการอ่านค่าการดูดกลืนแสง optical density (OD) ได้ถูกจัดเตรียมสำหรับการวัดเชิงปริมาณเพื่อที่จะคัดเลือกอาหารที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพ สำหรับผลของความขุ่นของเซลล์ที่มีต่อการอ่านค่าการดูดกลืนแสง OD ได้ถูกประเมินและวัดผลเพื่อเก็บข้อมูล นอกจากนี้มีการใช้ pH อินดิเคเตอร์เพื่อการเปลี่ยนให้ใกล้กับ pH ที่เป็นกลาง (โบรโมครีซอลเพอเพิล, โบรโมไทมอลบลู, และฟีนอลเรด) ได้ถูกทดสอบสำหรับการทำให้ดีขึ้นเพื่อเพิ่มความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาที่เป็น positive- และ negative-ไฮโดรเจนซัลไฟด์โปรดักชั่นในการดูด้วยสายตาและการวัดด้วย optical detection อย่างในที่สุดสูตรอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีประสิทธิภาพโดยส่วนใหญ่ได้ถูกทดสอบด้วยสายตาในตัวอย่างอาหารควบคู่ไปกับอาหารเหลว AADC

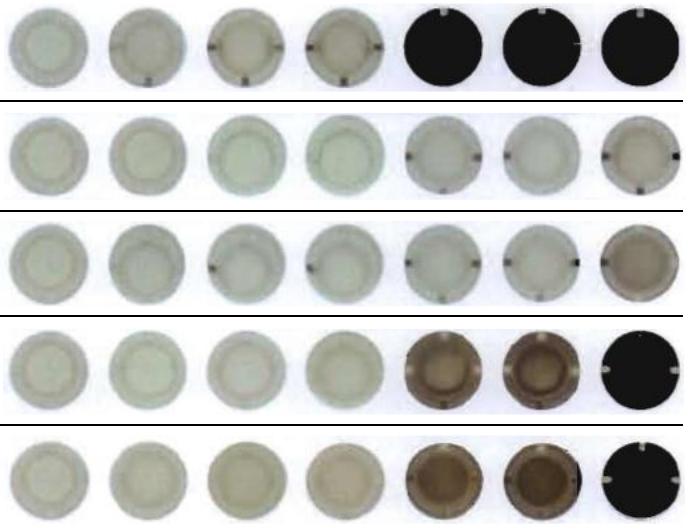
4.2 อาหารเหลวเพิ่มจำนวนขนาดเล็กสำหรับ Salmonella และเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella ในอาหารเหลว TFXL

การใช้ประโยชน์ของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์โปรดักชั่นได้ถูกปรับและแปลงไปเป็นอาหารเหลวเพิ่มจำนวนที่มีความสะดวกในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* spp. ท่ามกลางแหล่งของซัลเฟอร์ที่หลากหลายและตัวบ่งชี้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไธโอซัลเฟตและเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทได้ถูกคัดเลือกเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกเชื้อ Salmonella โดยส่วนใหญ่จากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น อาหารเหลวจำเพาะที่หลากหลายและอาหารคัดเลือกรวมถึง xylose lysine deoxycholate (XLD) agar, Hektoen enteric agar (HEA), และ triple sugar iron (TSI) agar ได้พัฒนาจากพื้นฐานระบบไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (Rambach, 1990)

รูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นการพัฒนาของเฟอรัสซัลไฟด์ไปเป็นตะกอนสีดำในอาหารเหลวที่ได้มีการปรับปรุง (TFXL) โดยทำการทดสอบกับเชื้อที่ปริมาณเชื้อน้อย (3 log CFU/mL) และที่ปริมาณเชื้อมาก (7 log CFU/mL) เชื้อ Salmonella ที่ทดสอบทั้งหมดสามารถเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซึ่งเปลี่ยนจากอาหารเหลวสีใสไปเป็นอาหารที่มีลักษณะสีดำน้ำตาลภายใน 24 ชั่วโมง ในบางเชื้อที่ปรากฏ *S.* Rissen และ *S.* Weltevreden สามารถที่จะย่อยไธโอซัลเฟตได้อย่างรวดเร็วภายใน 10 – 12 ชั่วโมง และพัฒนาให้เห็นการตกตะกอนสีดำซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยสายตา การแยกความแตกต่างของการเกิดตะกอนสีดำไอรอนซัลไฟด์ใน TFXL สัมพันธ์สอดคล้องกันดีกับผลของอาหารแข็ง XLD (รูปที่ 4.2) แต่ด้วยการวิเคราะห์ที่ใช้เวลาสั้นกว่าการใช้อาหารจำเพาะแข็ง XLD (24 - 48 ชั่วโมง) อัตราการเกิดตะกอนสีดำที่ฟอร์มตัวใน TFXL อาหารเหลวขึ้นอยู่กับซีโรไทด์และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน กรดอะมิโน ความเข้มข้นของไอรอนและสารอาหารที่ใช้ในของเหลวซับเสตรท Park และคณะ (2012) ได้แทนที่ไซโลสโดยการใช้อะราบิโนสเพื่อปรับปรุงความ specificity และ sensitivity ของอาหารแข็ง XLD การใช้อาหาร modified XLD agar เชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่ Salmonella เช่น *Proteus* spp. และ *Citrobacter* spp. สามารถที่จะเจริญเติบโตได้

TFXL broth	log CFU/mL	เวลา (ชั่วโมง) 0	8	10	12	24	32	48	24-48 ชั่วโมง
สภาวะควบคุม									
S. Anatum	3								
	7								
S. Enteritidis	3								
	7								
S. Rissen	3								
	7								โคโลนีสีแดงเหลืองที่มีสีดำอยู่ตรงกลางบนอาหารแข็ง XLD
S. Typhimurium	3								

	7	
S. Typhi	3	
	7	
S. Paratyphi B	3	
	7	



รูปที่ 4.1 แสดงภาพของ microwells ที่เวลาต่างๆ ของการเปลี่ยนสีไอรอนซัลไฟด์โดยไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่ง Salmonella (3 และ 7 log CFU/mL) ที่ทำการบ่มในอาหาร TFXL และ XLD agar (อาหารทางด้านขวาบน) ที่อุณหภูมิ 37°C

อาหารเหลว TFXL	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	4	8	10	12	24	32	48
	แบคทีเรียแกรมลบ							
Enterobacter aerogenes								
Escherichia coli								
Klebsiella pneumoniae								
Pseudomonas aeroginosa								
Serratia marcescens								
Shigella flexneri								
Shigella sonnei								
Yersinia enterocolitica								

	แบคทีเรียแกรมบวก
Enterobacter faecalis	
Staphylococcus aureus	
Listeria innocua	

รูปที่ 4.2 กลุ่มเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella ที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยา non-thiosulfate ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ทดสอบเป็น 7 log CFU/mL ถูกทำการบ่มในอาหารเหลว TFXL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Citrobacter และ *Proteus* spp. เป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถที่จะเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง เชื้อแข่งขันที่เป็นแกรมลบที่ไม่สามารถแยกจาก Salmonella นำไปสู่ผลที่เป็น false positive โดย *C. freundii, P. mirabilis,* และ *P. vulgaris* สามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลว TFXL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อที่จะประเมินความเป็น selectivity ของอาหารเหลว (รูปที่ 4.3) เชื้อแข่งขันทั้ง 3 ตัวที่เป็น thiosulfate-reducing สามารถเกิดปฏิกริยาได้ (7 log CFU/mL, สภาวะเชื้อแข่งขันที่มีปริมาณสูงจัดเป็นตัวแทนที่เกิดขึ้นในสภาวะจริง) จะเปลี่ยนอาหารเหลวสีเหลืองใสไปเป็นสีดำภายใน 24-48 ชั่วโมง การเกิดตะกอนสีดำที่เร็ว (4-8 ชั่วโมง), ขนาดกลาง (8 ชั่วโมง), และที่ช้า (24-48 ชั่วโมง) ที่เกิดจากเชื้อ *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, และ *C. freundii* ตามลำดับ การเกิดตะกอนสีดำจาก *C. freundii* จะเป็นลักษณะค่อยๆ เกิดและเกิดสีเต็มใน well ที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ *Proteus* เหล่านั้นสามารถที่จะ produced การเกิดไอรอนซัลไฟด์อย่างรวดเร็วและปรากฏเริ่มต้นไม่มีสีให้เห็นหลังจาก 24 ชั่วโมง การลดลงของการเกิดตะกอนสีดำหลังจากใช้เวลาในการบ่มที่นานขึ้นถูกเป็นสาเหตุจากการเกิดออกซิเดชั่นของไอรอนซัลไฟด์และการยับยั้งการเกิดกิจกรรมไธโอซัลเฟตรีดักเตส (Kuester และ Williams, 1964)

TFXL broth	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	4	8	10	12	24	32	48
Citrobacter freundii								
Proteus mirabilis								

Proteus vulgaris

รูปที่ 4.3 เชื้อที่ไมใช่ Salmonella ที่สามารถเกิด Thiosulfate-reducing ปริมาณเซลล์ประมาณ 7 log CFU/mL ทำการบ่มในอาหารเหลว TFXL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไธโอซัลเฟต-เฟอร์ริกบนพื้นฐานอาหารเหลวที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว เช่น Tergitol 7 นอกเหนือจากนั้น ได้แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการคัดเลือกที่ดีสำหรับ Salmonella (Shelef และ Tan, 1998) Tergitol 7 มีความสะดวกในการใช้ในอาหารแข็ง XLT-4 (อาหารที่พัฒนามาจาก XLD) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก ราและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมดรวมถึง Citrobacter, Proteus, Providencia, และ Pseudomonas (Miller et. al., 1991; Waltman, 2003) เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงอันตรายจากผล false negative มันได้ถูกแนะนำให้มีการใช้เพียงหลังจากการฟื้นตัวของเชื้อเป้าหมาย Salmonella เพื่อให้ได้จำนวนของประชากรที่มากพอเพื่อที่จะสามารถทน Tergitol ได้ (Bibek, 1989)

สำหรับเกณฑ์ในการพัฒนาอาหารเหลวบ่งชี้เพื่อที่จะตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ Salmonella ซีโรวาร์ที่มีปริมาณเซลล์น้อย ความสามารถในการคัดแยกเชื้ออื่นที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ถือได้ว่าประสบความสำเร็จ การพิจารณาถัดไปเป็นการ selectivity สำหรับเชื้อเป้าหมาย Salmonella การค้นพบเป็นการหลีกเลี่ยงเชื้อยับยั้งตัวอื่นเพื่อป้องกันผลที่เป็น false negative ดังนั้นได้มีการพัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมของสารในไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหารเหลวหรือ TFXL broth อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลชั่นและน้ำตาลชนิดต่างๆ ถูกใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาปัจจัยที่สำคัญเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีประสิทธิภาพใน Salmonella ที่ตรวจพบได้น้อย โดยการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella ทั้งหมด แต่ไม่ใช่ *Citrobacter* และ *Proteus* spp.

การตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์จากการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยสายตา หลังจากนั้นนักวิจัยหลายๆ ท่านได้นำเสนอรูปแบบการวิเคราะห์จากการวัดค่าความหนาแน่นทางแสงหรือการวัดการส่งผ่าน (Shelef และ Firstenberg – Eden, 1997; Shelef และ Tan, 1998; McLaughlin, 2006) เพื่อที่จะวัดปริมาณของระดับการตกตะกอนสีดำที่เกิดขึ้นโดยอินดิเคเตอร์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่หลากหลายในการศึกษา การตรวจวิเคราะห์ด้วยการวัดความหนาแน่นของแสงโดยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ได้ถูกนำเสนอ การโตของเชื้อ *S.* Typhi ในอาหารเหลว TFXL ได้แสดงให้เห็นอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีที่อ่อนและใช้เวลานานในการบ่มที่ (48 ชั่วโมง) เพื่อพัฒนา

เป็นตะกอนสีดำที่ชัดเจน โดยปริมาณเซลล์ที่น้อย 3 log CFU/mL และปริมาณเซลล์ที่มาก 7 log CFU/mL (รูปที่ 4.1) *S.* Typhi ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งได้ดีในแหล่งซัลเฟอร์อื่นๆ (เช่น ซัลไฟต์) มากกว่าไธโอซัลเฟต (Fricker, 1987; Cox, 1993) ดังนั้นการผลิตการเกิดตะกอนที่น้อยของไอรอนซัลไฟด์จากไธโอซัลเฟต การแทนที่ของไธโอซัลเฟตซัลไฟด์ บางทีควรที่จะถูกใช้เพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนของ *S.* Typhi การเกิดสีน้ำตาลที่น้อยของอาหารเหลวของเชื้อ *S.* Anatum ได้มีเอกสารที่กว้างขวางในการกล่าวถึงเชื้อที่สามารถเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง (Midorikawa et. al., 2014) สามารถที่จะถูกใช้เป็นข้อผิดพลาดสำหรับอาหารเหลวที่มีลักษณะใส สีน้ำตาลสว่างที่พัฒนาโดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางตัวหรือเทียบเท่ากับเชื้อแข่งขันแกรมบวก (รูปที่ 4.1) บางทีการพัฒนาอาหารเหลวด้วยสารอาหาร (กรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นและน้ำตาล) ถูกเป็นที่ต้องการเพื่อที่จะทำให้สะดวกขึ้นในการเกิดไธโอซัลเฟตรีดักชั่น

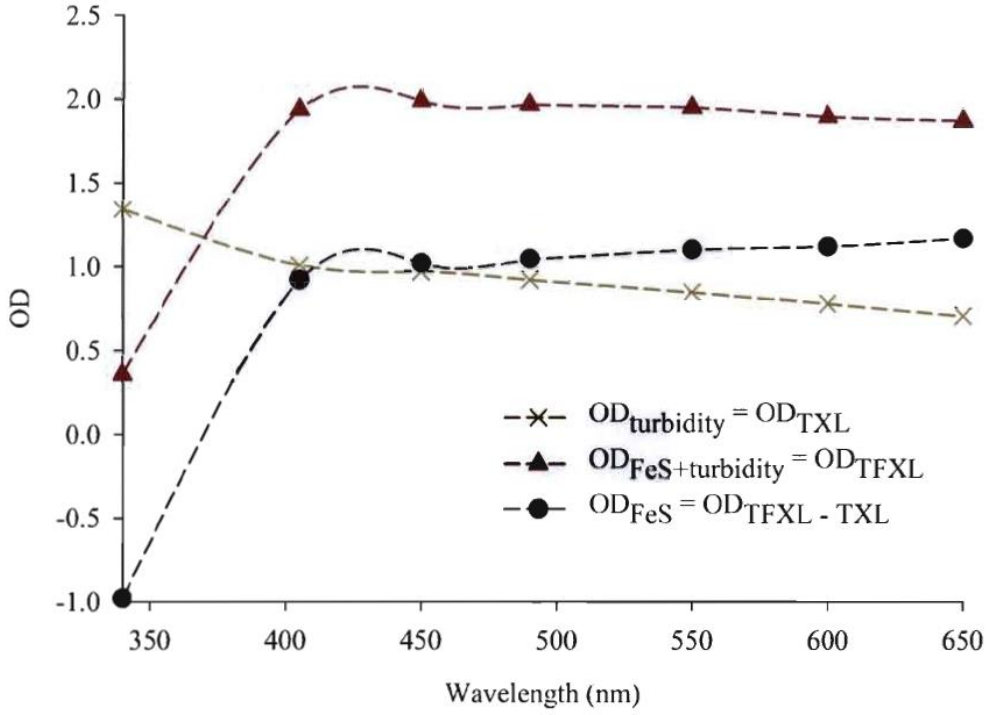
เชื้อแบคทีเรีย Enterobacteriaceae จำนวน 8 ชนิดที่ไม่สามารถเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งและเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกถูกใช้ในการประเมินความสามารถในการ selectivity ของ TFXL อาหารเหลว (รูปที่ 4.2) ไม่มี Enterobacteriaceae และเชื้อแข่งขันแกรมบวกที่แสดงให้เห็นการเกิดตะกอนสีดำ ถึงแม้ว่าอาหารเหลวสีจะเปลี่ยนจากสีที่เป็นดั้งเดิมที่ไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาลสว่าง โดยเฉพาะเชื้อใน *E. coli* และ *E. aerogenes* สีน้ำตาลสว่างของอาหารเหลวถูกแตกต่างจากสีดำของการตกตะกอนส่งผลให้เกิดโดยไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง ยกเว้นเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Typhi ซึ่งเกิดเป็นตะกอนสีดำที่น้อยเมื่อดูด้วยตา (รูปที่ 4.1) และเราได้สมมติค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ (OD) เพื่อช่วยในการแยกความแตกต่างจากเชื้อที่เป็นผลลบของ H_2S ดังนั้นวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ถูกนำเสนอในหัวข้อถัดไป

4.3 การสแกนความยาวคลื่นของการเกิดตัวบ่งชี้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารเหลว

การกระจายของแสงเป็นเทคนิคโดยทั่วไปเพื่อที่จะตรวจติดตามความเข้มข้นของเชื้อที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ถูกนำเสนอเพื่อที่จะสามารถทำการวัดความหนาแน่นของแสงที่เปลี่ยนและแยกการตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์จากอาหารเหลวสีน้ำตาลที่ไม่มีตะกอนสีดำ (Sutton, 2011) เทคนิคนี้ได้มีการจำลองและประยุกต์เพื่อตรวจติดตามการเกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ในการแยกความแตกต่างของเฟอร์ริกแอมโมเนียมไธโอซัลเฟตในอาหารเหลวของชั้นผิวอาหารแข็งและกึ่งอาหารแข็งที่มีการผลิตโดยเชื้อ Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella (Shelef และ Tan, 1998; McLaughlin, 2006)

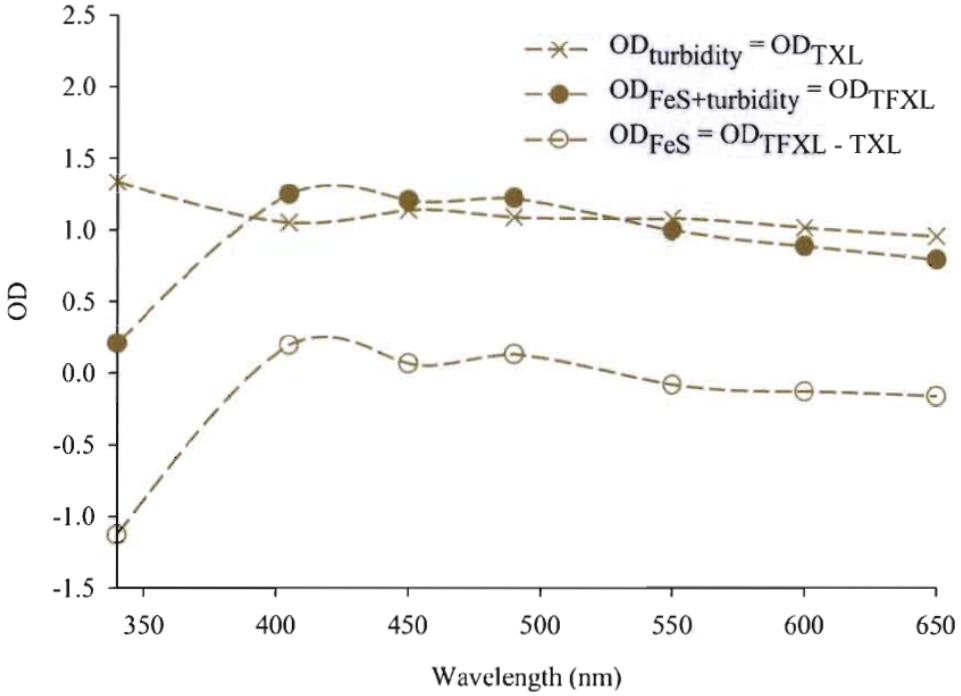
การเข้าแทรกแซงของเซลล์ความขุ่นในการตรวจวัดค่าความหนาแน่นของแสงของการเกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ การเจริญเติบโตของเชื้อได้ส่งผลให้เกิดความขุ่นในตัวอย่างที่ทำการทดสอบเพื่อที่จะให้ได้ค่าการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ถูกต้องของการตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์ โดยปราศจากความขุ่นที่จะไปแทรกแซง ผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากความขุ่นได้ถูกประเมินเพื่อตัดสินใจในการเก็บข้อมูลที่ถูกต้อง วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่โตในอาหารที่แตกต่างกันในอาหารเหลว TFXL และ TXL ภายใต้เงื่อนไขการเจริญเติบโตที่เหมือนกัน ตัวอย่างในอาหาร TXL ถูกใช้เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับความขุ่นของเซลล์ซึ่งไม่ได้เกิดเป็นตะกอนสีดำ เชื้อ Salmonellae และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ปริมาตร 20 μL ที่ปริมาณเซลล์ 6-7 log CFU/mL ได้มีการปิเปตลงในอาหาร 180 μL ในแต่ละ TFXL และ TXL และเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การวัดสเปคตราของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทั้งหมดที่ความยาวคลื่น 340, 405, 450, 490, 550, 600, และ 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับการเกิดตะกอนสีดำของ TFXL และ TXL ความแตกต่างในค่าการดูดกลืนแสง (OD) ระหว่าง TFXL และ TXL ที่มีการบ่มเพาะเชื้อได้ถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง OD เนื่องจากการตกตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ที่ปราศจากผลของความขุ่น

ค่าการดูดกลืนแสง (OD spectra) ของการเกิด H_2S ที่เป็น positive ของ *Salmonella*, *S.* Rissen ที่เจริญเติบโตในอาหาร TFXL และ TXL ได้ถูกแสดงให้เห็นในรูปที่ 4.4 การลบออกของค่า OD ในอาหาร TFXL มีการ inoculation ของเชื้อโดยค่า OD ของ TXL ในอาหารเหลวที่มีเชื้อได้แสดงให้เห็นค่า OD ของไอรอนซัลไฟด์ตะกอนสีดำปราศจากผลจากเซลล์ความขุ่น ตัวอย่างที่ไม่มีการหักลบ (การเกิดตะกอนสีดำ+เซลล์ความขุ่น) และตัวอย่างที่มีการหักลบ (ตะกอนสีดำเพียงอย่างเดียว) ค่า OD ถูกพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan's multiple range tests, $p > 0.05$) เซลล์ความขุ่นที่ปรากฏได้มีการรบกวนต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงของไอรอนซัลไฟด์ การแก้ไขของเซลล์ความขุ่นได้ถูกมีความจำเป็นสำหรับ protocol



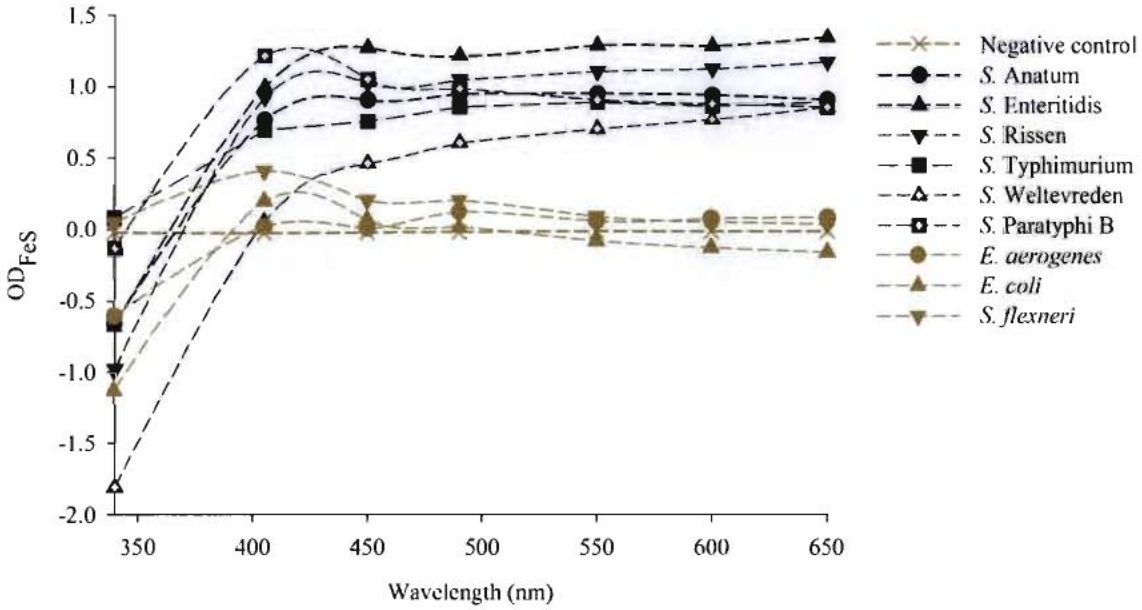
รูปที่ 4.4 ค่า OD สเปคตราของเชื้อ *S.* Rissen ในอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ (TFXL และ TXL) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า OD_{TFXL} เป็นผลจากการตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์และเซลล์ความขุ่น OD_{TXL} จากเซลล์ความขุ่นเพียงอย่างเดียว ความแตกต่างของ 2 สเปคตราได้แสดงให้เห็นการหักลบค่า OD สเปคตรัมเนื่องจากไอรอนซัลไฟด์ ผลของการหักลบและไม่หักลบสเปคตรา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan's multiple range tests, $p > 0.05$)

รูปที่ 4.4 ได้แสดงให้เห็นผลของความขุ่นที่มีต่อค่า OD ที่อ่านได้ของ H_2S ที่ให้ผลเป็นลบซึ่งไม่ใช่เชื้อ Salmonella (*E. coli*) ไม่มีการตกตะกอนเกิดขึ้น ดังนั้นในทุกความยาวคลื่น (ยกเว้น 340 nm) $OD_{TFXL-TXL}$ เป็น 0 หมายถึงไม่มีการตกตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ที่เกิดขึ้น เซลล์ในอาหารทั้งคู่ขุ่นเท่าเทียมกัน



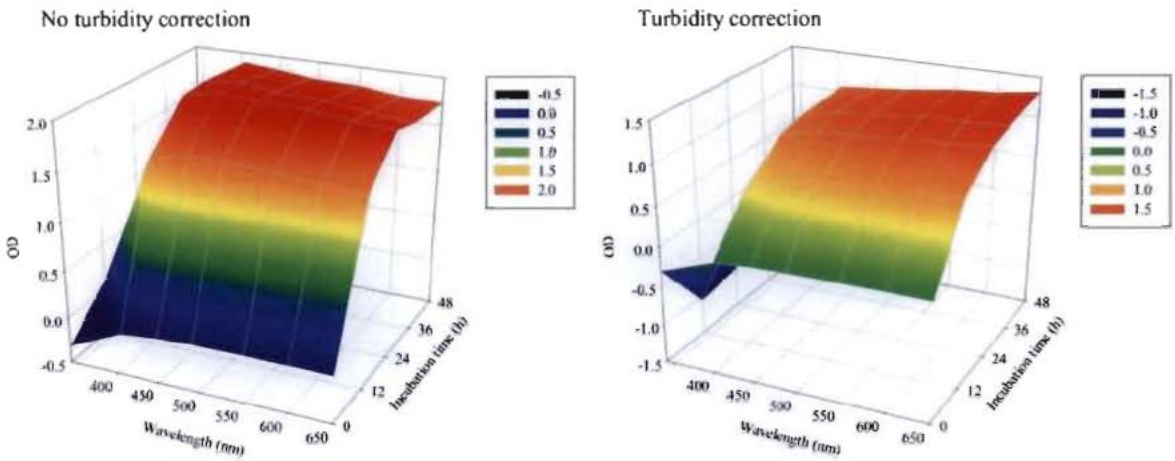
รูปที่ 4.5 ค่า OD สเปคตราของอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ (TFXL และ TXL) ที่มีการ inoculated ด้วย *E. coli* ที่ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/mL ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลของแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ ดังนั้นจึงไม่มีการตกตะกอนสีดำที่จะไปเพิ่มค่า OD

การหักลบค่าความขุ่นของค่าการดูดกลืนแสง OD spectra ของแบคทีเรีย Salmonella กลุ่มที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^+) เช่น *S.* Anatum, *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi และแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^-) ที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae เช่น *E. aerogenes*, *E. coli*, และ *S. flexneri* ได้ถูกพล็อตกราฟดังแสดงในรูปที่ 4.6 ค่า OD spectra ของ H_2S^+ ได้แยกความแตกต่างเห็นได้อย่างชัดเจนจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิด H_2S^- การทดสอบเชื้อ Salmonella ทั้งหมด รวมถึงการเกิดไอรอนซัลไฟด์ที่อ่อนสำหรับเชื้อที่เกิดได้โดย *S.* Anatum ได้ให้ค่า OD ที่สูงกว่าแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิด H_2S^- ที่เป็นเชื้อแข่งขัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้บ่งชี้อาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ TFXL ด้วยการวัดค่า OD ที่มีความถูกต้องได้บ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือ FeS การตกตะกอนท่ามกลางแบคทีเรียด้วยการพัฒนาอาหารที่สามารถเกิดไธโอซัลเฟตได้ดี ในการเพิ่มการตรวจสอบ *S.* Typhi และ *S.* Anatum ค่า OD ที่สูงขึ้นเป็นผลให้ไธโอซัลเฟตรีดักชั่นสามารถที่จะถูกใช้ในการคัดแยกไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของ Salmonella จากเชื้อ Enterobacteriaceae

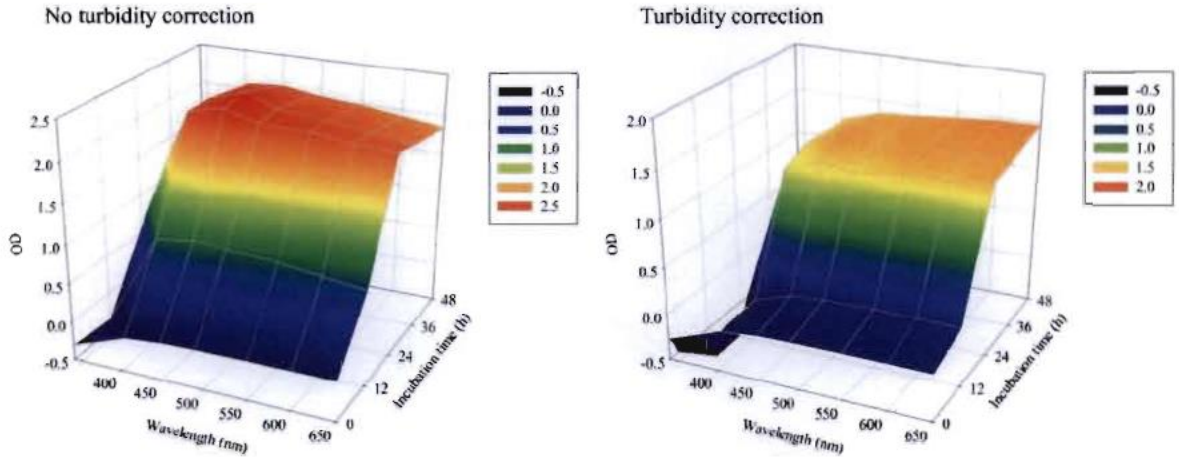


รูปที่ 4.6 ค่าการหักลบสเปคตรัมการดูดกลืนแสง (OD_{FeS}) ที่ได้รับจากเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา H_2S^+ และเชื้อแข่งขันที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา H_2S^- ปริมาณ 7 log CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลว TFXL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ก่อนการพัฒนาอาหาร ผู้วิจัยได้พยายามที่จะศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมเพื่อที่จะใช้ในการตรวจติดตามสภาวะที่มีประสิทธิภาพของเชื้อ Salmonella ในการเกิดปฏิกิริยา H_2S^+ จากน้อยไปมาก ออกจากเชื้อแข่งขันที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา H_2S^- รูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นกราฟพื้นที่ของค่าการดูดกลืนแสงของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ Salmonella ที่ผลิตตะกอนของ FeS ในปริมาณที่สูง (*S.* Rissen และ *S.* Enteritidis) ในอาหารเหลว TFXL เราได้ทำการพล็อตค่าการดูดกลืนแสงเป็นฟังก์ชั่นกับค่าความยาวคลื่นที่ 340, 405, 450, 490, 550, 600, และ 650 นาโนเมตร และทำการบ่มเป็นเวลา 0 – 48 ชั่วโมง อย่างใดอย่างหนึ่งก่อนหรือหลังการหักลบค่าความขุ่น การหาสภาวะของความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวิเคราะห์การตกตะกอนของ FeS สำหรับเชื้อ *S.* Rissen และ *S.* Enteritidis จาก 405 – 650 nm และที่การบ่มเวลา 24 – 48 ชั่วโมง



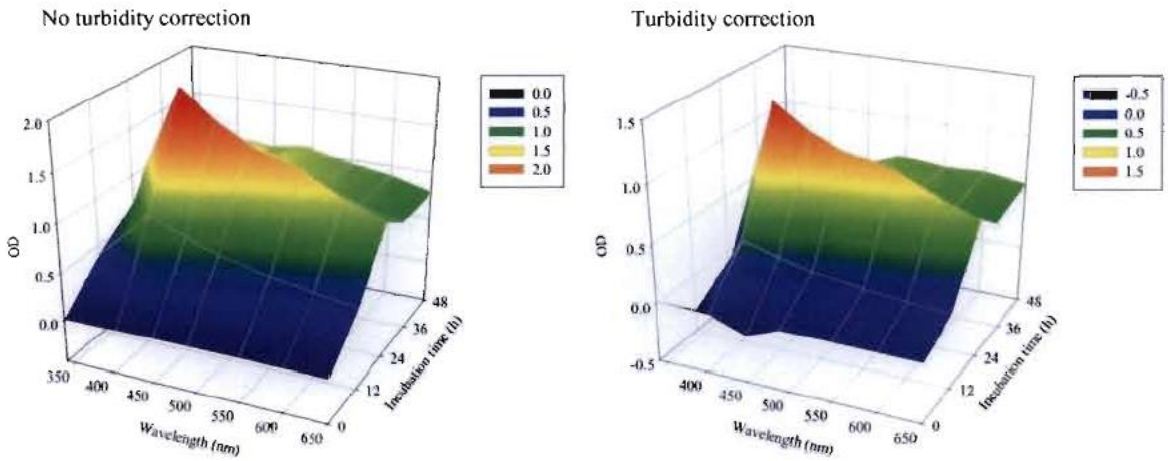
(a) *S.* Rissen



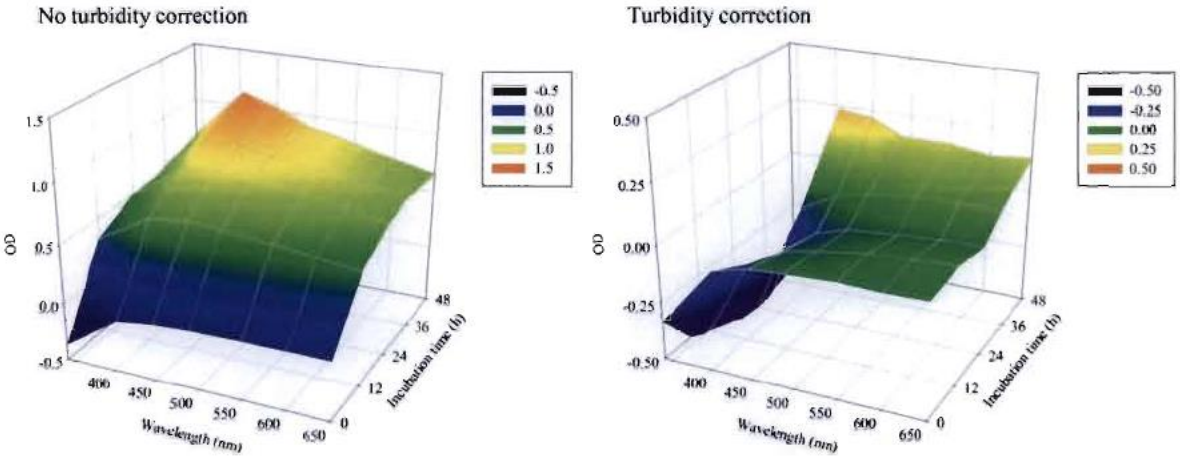
(b) *S.* Enteritidis

รูปที่ 4.7 พื้นที่การตอบสนอง (Response surface plots) ของค่าการดูดกลืนแสงของไซโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ Salmonella ที่สามารถเกิดการตกตะกอนของ FeS ที่สูง เชื้อ *S.* Rissen (a) และเชื้อ *S.* Enteritidis (b) ในอาหารเหลว TFXL ก่อน (คอลัมน์ซ้าย) และหลังการหักลบค่าความขุ่น (คอลัมน์ทางขวา) ด้วยความยาวคลื่นที่แตกต่างกันที่ 340, 405, 450, 490, 550, 600, และ 650 นาโนเมตร และทำการบ่มที่เวลา 0 – 48 ชั่วโมง

โดยในทางตรงกันข้าม *S.* Anatum และ *S.* Typhi ได้ทำให้เกิดการตกตะกอนสีดำที่อ่อน แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนสูงสุดอยู่ที่ 405 นาโนเมตรหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) ผลของที่มีและไม่มีการหักความขุ่นแสดงให้เห็นพ้องตรงกันที่ดี



(a) *S.* Anatum



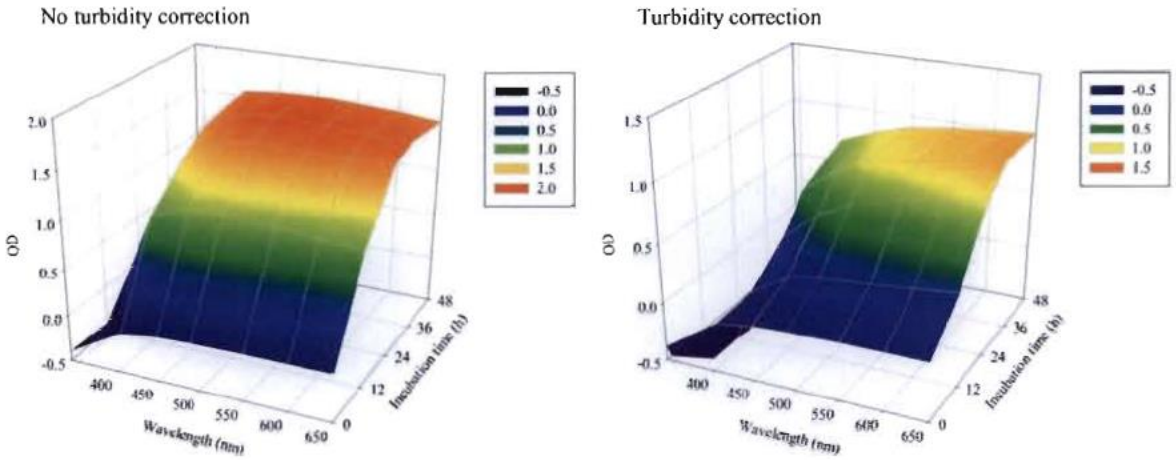
(b) *S.* Typhi

รูปที่ 4.8 พื้นที่การตอบสนองของค่าการดูดกลืนแสงของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ Salmonella ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของ FeS ที่น้อย *S.* Anatum (a) และ *S.* Typhi (b) ในอาหารเหลว TFXL ก่อน (คอลัมน์ด้านซ้าย) และหลังการหักค่าความขุ่น (คอลัมน์ด้านขวา) ด้วยความยาวคลื่นที่แตกต่างกันที่ 340, 405, 450, 550, 600, และ 650 nm และทำการบ่มที่เวลา 0 – 48 ชั่วโมง

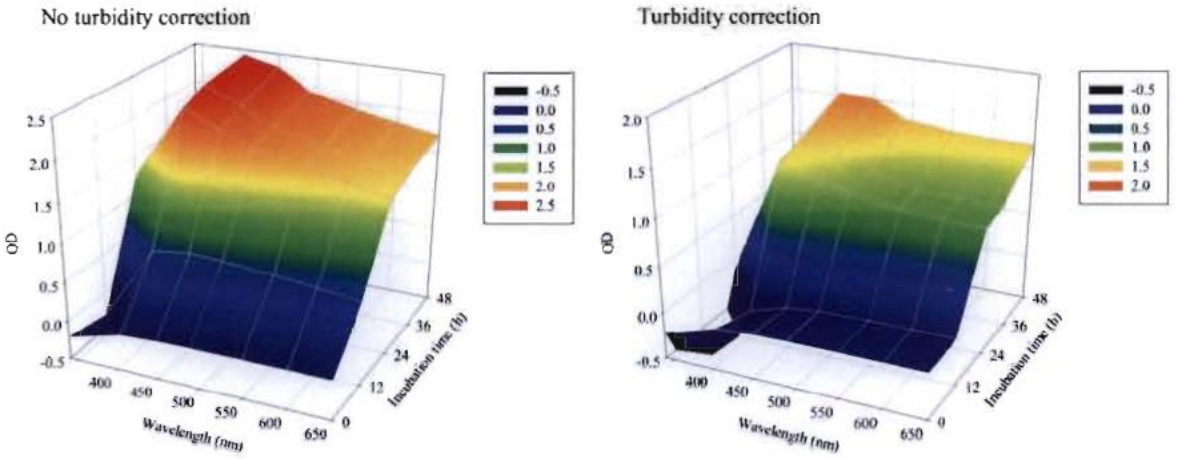
สำหรับการตกตะกอน FeS ที่ปานกลางที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ *S.* Weltevreden, *S.* Paratyphi B, และเชื้อ *S.* Typhimurium การพล็อตกราฟของเชื้อ Salmonella ทั้ง 3 ตัว ก่อนและหลังการหักค่า OD ได้ให้ผลที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.9) ก่อนการหักค่าความขุ่น ค่า OD ที่สูงถูกได้รับจาก *S.* Weltevreden และ *S.* Typhimurium ที่ทุกความยาวคลื่นเหนือ 405 นาโนเมตร ในเวลาการบ่มที่ 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากการลบออกของค่าความขุ่น ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเป็น 650 นาโนเมตร และ 550 – 650 นาโนเมตร สำหรับ *S.* Weltevreden และ *S.* Typhimurium ตามลำดับ ในการบ่มที่เวลา 32 – 48 ชั่วโมง สำหรับ *S.*

Paratyphi B ค่า OD พีค ก่อนและหลังการหักลบค่าความขุ่นได้ถูกแสดงที่ 405 นาโนเมตร (24 – 48 ชั่วโมง) และ 405 – 450 นาโนเมตร (48 ชั่วโมง) ตามลำดับ

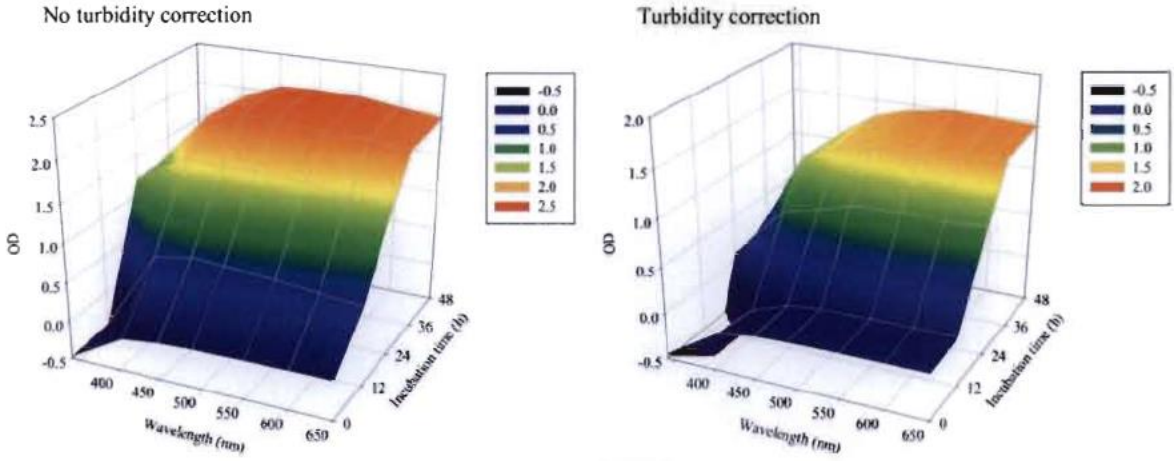
โดยสรุปความยาวคลื่นที่เหมาะสมเป็นไปได้สำหรับการวัดไอรอนซัลไฟด์สำหรับ Salmonella ซีโรวาร์เป็น 405 และ 650 nm ดังนั้น เราได้พล็อตค่า OD ที่เวลาต่างๆ ของ 2 ความยาวคลื่นของอาหารเหลว TFXL ที่มีการ inoculated ด้วยเชื้อ Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella เพื่อที่จะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.9 และ 4.10) แม้ว่าค่า OD_{405} สามารถที่จะช่วยขยายสัญญาณของ *S.* Anatum และ *S.* Typhi มันได้ลดสัญญาณของเชื้อ Salmonella ซีโรวาร์อื่นๆ นำไปสู่การพล็อตกราฟที่ใกล้เคียงกับเชื้อแข่งขันทั้งคู่ใน OD ที่ไม่ได้หักลบออก (รูปที่ 4.9a) และหักลบออก (รูปที่ 4.10b) วิธีนอกเหนือจากนั้น OD_{650} ที่เวลาการบ่มต่างๆ ของเชื้อ Salmonella ทั้ง 7 ซีโรวาร์แสดงให้เห็นการแยกที่ชัดเจนจากเชื้อแข่งขันอีก 3 ตัวที่ไม่สามารถเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (รูปที่ 4.10a) โดยแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา H_2S^- ได้จะส่งผลให้อาหารเหลวเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลสว่างด้วยค่า OD_{650} อยู่ระหว่าง -0.2 และ -0.1 ในขณะที่เชื้อ Salmonella โดยส่วนใหญ่ที่สามารถเกิด H_2S^+ ปรากฏสีดำมากด้วยค่า OD_{650} ที่สูงกว่า ทั้งค่าความขุ่นที่หักออกทั้งคู่และที่ไม่ได้หักค่าออก ได้ผลิตโดยเชื้อ Salmonella ที่แข็งแรง 5 ตัวที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ดี (H_2S^+) และ 3 ตัวที่เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S^-) แบคทีเรียได้ถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจนโดยประมาณเป็นค่าการดูดกลืนที่ประมาณ 0.8 (รูปที่ 4.10b)



(a) *S.* Weltevreden

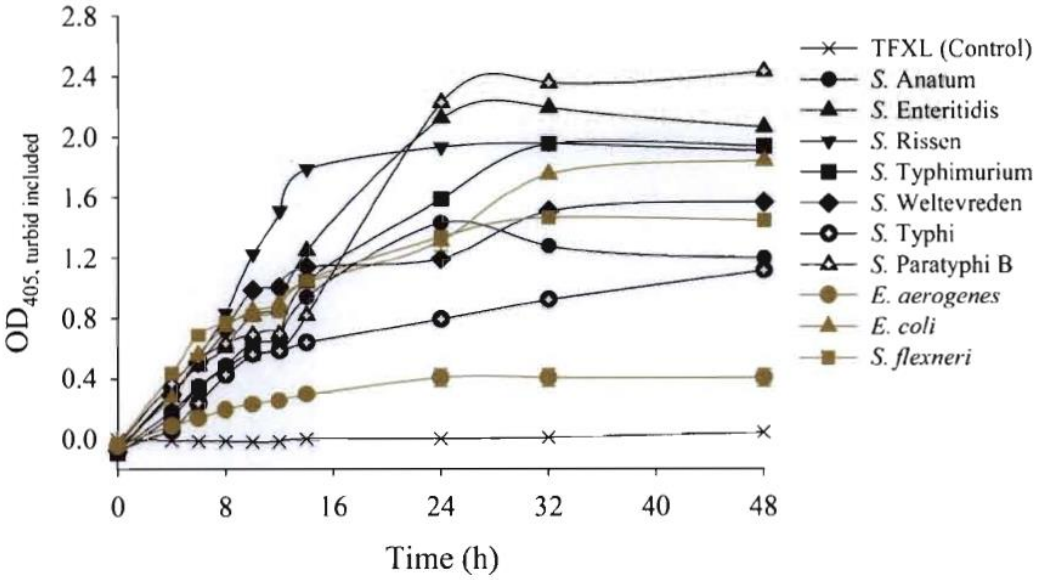


(b) *S.* Paratyphi B

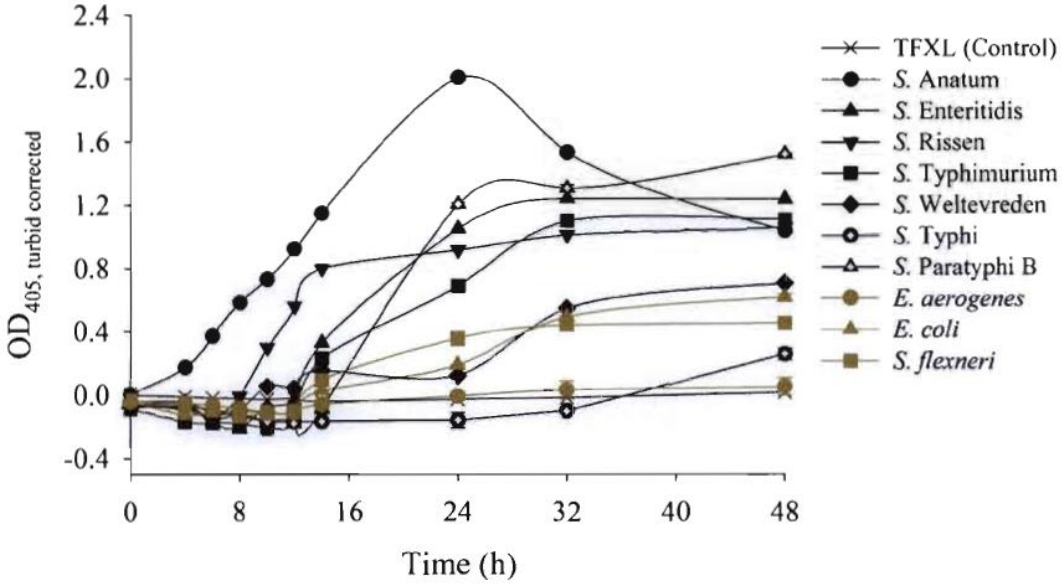


(c) *S.* Paratyphi B

รูปที่ 4.9 กราฟการตอบสนองค่า OD ของไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งของเชื้อ *Salmonella* ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของ FeS ที่เป็นกลางโดยมี *S.* Weltevreden (a), *S.* Paratyphi B (b), และ *S.* Typhimurium (c) ในอาหารเหลว TFXL ก่อน (คอลัมน์ซ้าย) และหลังการหักค่าความขุ่น (คอลัมน์ขวา) ด้วยค่าความยาวคลื่นที่แตกต่างกันที่ 340, 405, 450, 490, 550, 600, และ 650 nm และทำการบ่มที่เวลา (0 – 48 ชั่วโมง)

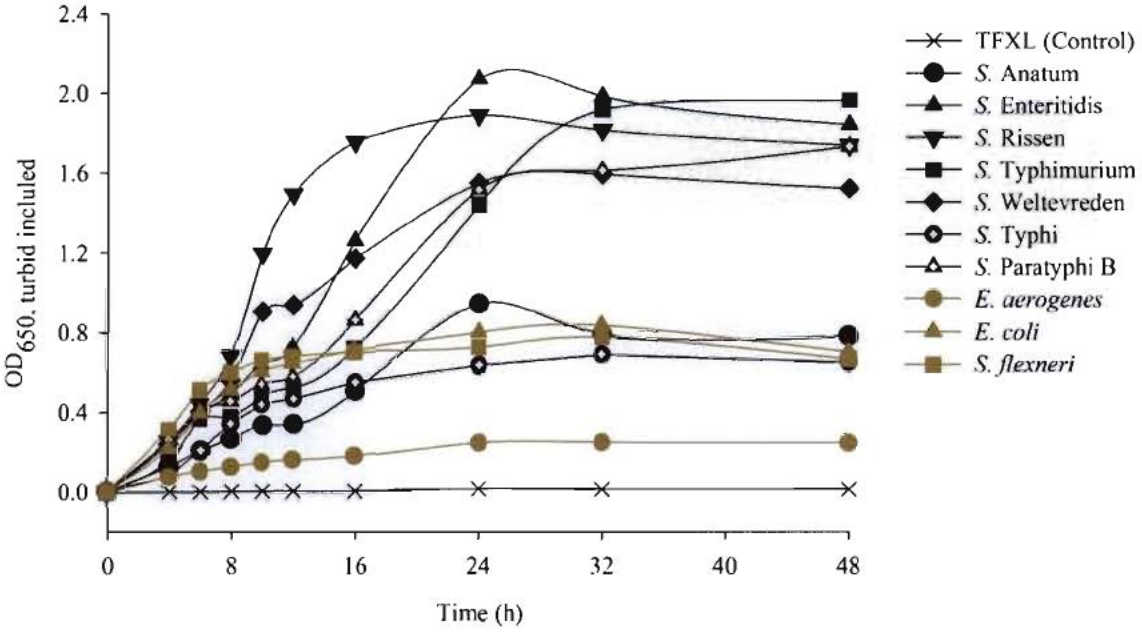


(a) ไม่มีการหักค่าความขุ่น

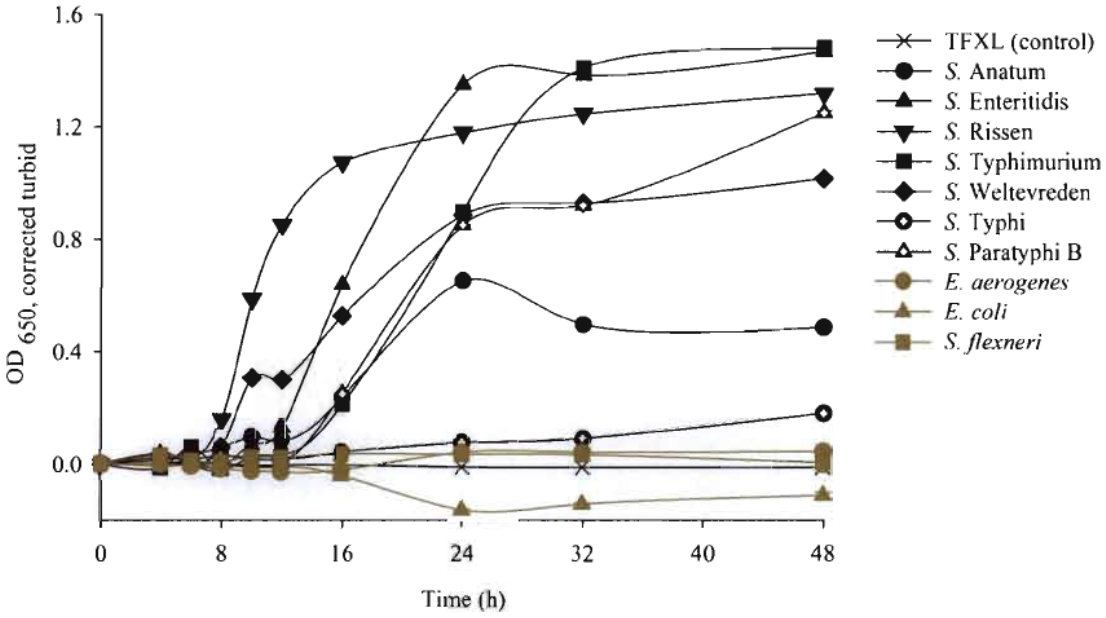


(b) มีค่าความขุ่น

รูปที่ 4.10 เวลาในการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่ปราศจาก (a) และมี (b) การหักค่าความขุ่นเป็นสาเหตุโดย *Salmonella* ซีโรวาร์และที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* ที่โตในอาหารเหลว TFXL



(a) ไม่มีการหักค่าความขุ่น



(b) มีการหักค่าความขุ่น

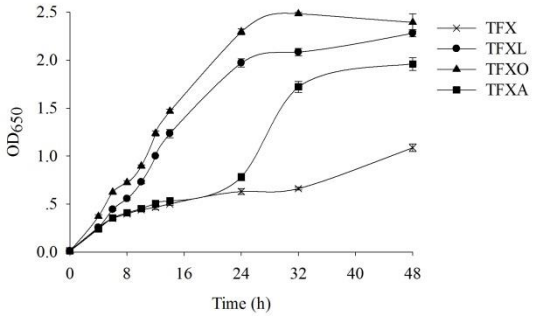
รูปที่ 4.11 ที่เวลาในการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่ปราศจาก (a) และมี (b) การหักค่าความขุ่นเป็นสาเหตุโดย *Salmonella* ซีโรวาร์และที่ไม่ใช่เชื้อ non-salmonellae ที่โตในอาหารเหลว TFXL

4.4 การแทนที่ของไลซีนในอาหารเหลว TFXL โดยการใช้กรดอะมิโนชนิดอื่นเพื่อให้เกิด H_2S production มากในการคัดเลือกเชื้อ Salmonella

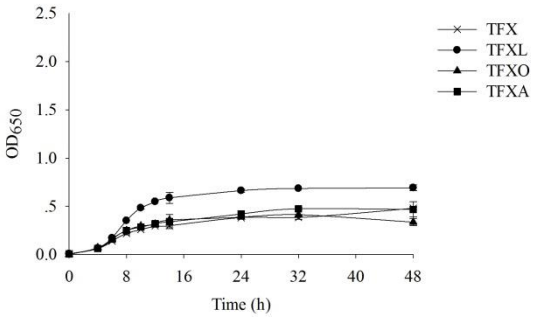
อะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นเป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถป้องกันการเกิดสีที่ผิดปกติของการตรวจวิเคราะห์การเกิด H_2S^+ ในกรณีที่มีน้ำตาลซึ่งจะไปส่งผลให้เกิดกรดที่มากเกินพอในการเกิดเป็นตะกอนสีดำของ FeS (Bulmash และ Fulton, 1964; Barrett และ Clark, 1987) โดยกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ ได้ถูกจำลองสาธิตขึ้นมา (Clark และ Barrett, 1987b; Clack และ Barrett, 1987a) เพื่อที่จะลดผลกระทบที่จะเกิดกับอาหารเหลวที่เป็นกรดและพัฒนาความสามารถในการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของการตกตะกอนสีดำ สำหรับกรดอะมิโนอื่นๆ (ออร์นิธิน, อาร์จินิน, และการผสมใช้ร่วมกัน) ได้ถูกประเมินสำหรับเชื้อ Salmonella ที่สามารถเกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ โดยถูกนำมาทดสอบในการเตรียมอาหารเพื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นในการเพิ่มขึ้นของการเกิดตะกอนสีดำ ในขณะที่การเลือกเอาออกของเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ที่เป็นเชื้อแข่งขันออกไป อาหารที่เป็นตัวควบคุมถูกใช้เป็นเบสที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโนเป็นอาหาร TFX

4.4.1 การใช้กรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นเดี่ยวในการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์

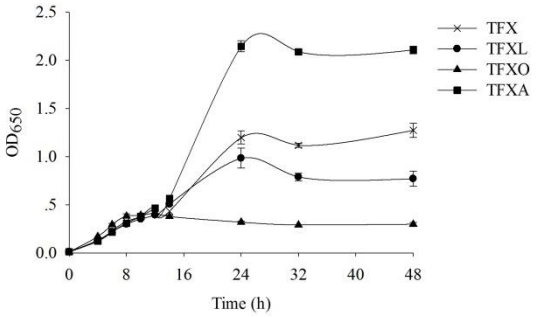
การเปลี่ยนแหล่งของกรดอะมิโนจากไลซีน (TFXL) ไปเป็นออร์นิธิน (TFXO) และอาร์จินิน (TFXA) ในอาหารเหลว TFX ที่มีผลกับการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์และอัตราการเกิดตะกอนสีดำของ Salmonella ในทุกความแตกต่างขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (รูปที่ 4.12) เชื้อ Salmonella ซีโรวาร์โดยปกติ เช่น *S.* Enteritidis (รูปที่ 4.12a) และ *S.* Typhi (รูปที่ 4.12b) ในอาหาร TFXO แสดงให้เห็นอัตราการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟต์มากที่สุดและมีอัตราเร็วที่สุดของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟต์กว่าไลซีนและอาร์จินิน *S.* Typhi อย่างไรก็ตามมีช่วง lag time ที่ยาวนานกว่า *S.* Enteritidis ท่ามกลางกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลส 3 ชนิด (AADC) ODC ได้ถูกรายงานว่าสามารถให้ค่าอัตราการเกิดดีคาร์บอกซีเลชั่นสูงที่สุด (Shelef และ Tan, 1998) ดังนั้นอัตราการเกิดอัลคาไลน์เอมีนที่เร็วจากการสนับสนุนของออร์นิธินและเร่งการเกิด H_2S production และการตกตะกอนสีดำในอาหารเหลว ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} ที่เวลาต่าง ๆ ของอาหารเหลว TFXL (ไม่มีกรดอะมิโน) ที่มีการ inoculated ด้วยเชื้อ *Salmonella* ในรูปที่ 4.12a และ b แสดงให้เห็นการไม่มีกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นในอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวต่ำ และการเกิด H_2S production ได้ถูกปิดบัง



(a) *S.* Enteritidis



(b) *S.* Typhi

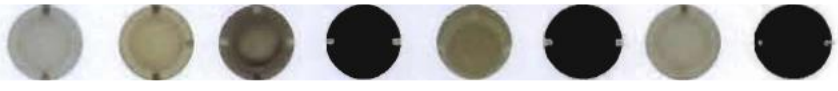


(c) *S.* Anatum

รูปที่ 4.12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรเทียบกับเวลาของเชื้อ *Salmonellae* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/mL; (a) *S.* Enteritidis (b) *S.* Typhi และ (c) Anatum, และทำการเติมเชื้อลงในไธโอซัลเฟต-เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหาร TFX ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไปของไลซีน (TFXL), ออร์นิธิน (TFXO), และอาร์จินิน (TFXA) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในแต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM, n = 3

S. Anatum นอกเหนือจากนั้นได้แสดงให้เห็นผลที่แตกต่าง (รูปที่ 4.12c) เป็นที่น่าแปลกใจเป็นอย่างมาก อัตราการเกิด H_2S production สูงที่สุดได้มาจากอาหารเหลว TFXA ถึงแม้ว่าอัตราการเกิดของ ADC จะ

น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ ODC และ LDC ในโดยทั่วไป Goldschmidt และ Lockhart (1971) ได้แสดงให้เห็นว่า *S.* Anatum สามารถที่จะใช้อาร์จินีนไปเป็น agmatine และ putrescine มีประสิทธิภาพดีกว่าที่สภาวะเป็นกลางและเป็นกรด ซึ่งสามารถบอกได้ว่า *S.* Anatum เปรียบเทียบกับ *S.* Enteritidis เกิดความเป็นกรดได้ช้ากว่า xylose ดังนั้นอาหารเหลวมีค่าความเป็นกรด-ด่างยังคงใกล้เคียงกับ 7 เป็นที่สังเกตว่าที่รูป 4.12c อาหารเหลว TFX ที่มีเชื้อ *S.* Anatum ได้แสดงให้ค่า OD_{650} ที่สูงกว่าอาหารเหลวที่มี *S.* Typhi และ *S.* Enteritidis เพราะว่าเกิดการ fermentation ที่ช้า ส่งผลให้ ADC เพื่อผลิตเอมีนที่มากกว่าในการยังคงอาหารเหลวให้เป็นกลาง การเกิดดีคาร์บอกซีเลชั่นไม่จำเป็นเพื่อจะทำให้ค่าความเป็น กรด-ด่าง สูงขึ้นและดังนั้นการเกิด H_2S ที่ดีเป็นผลให้ *S.* Anatum เกิดตะกอนสีดำใน TFXA

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	log CFU/mL	อาหารเหลว							
		TFX		TFXL		TFXO		TFXA	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Typical									
S. Enteritidis	3								
	7								
S. Rissen	3								
	7								
	7								
S. Weltevreden	3								
	7								
S. Paratyphi B	3								
	7								
Atypical									
S. Anatum	3								

	7	
S. Typhi	3	
	7	

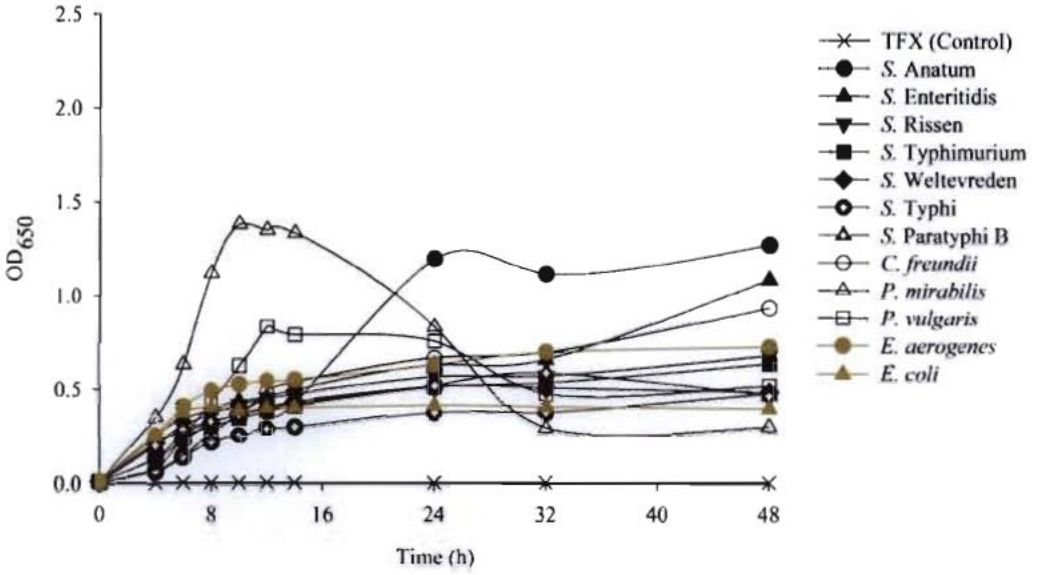
รูปที่ 4.13 รูปอาหารเหลวใน microwells ที่มีไธโอซัลเฟตเฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหารเหลว (TFX) ที่มีการเติมไลซีน (L), ออร์นิธิน (O), และอาร์จินิน (A) โดยการทดลองมีการเติมเชื้อ Salmonellae ที่ 3 และ 7 log CFU/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นสีของอาหารเหลว TFX, TFXL, TFXO, และ TFXA ที่ได้มีการ inoculated ด้วยเชื้อ *Salmonella* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เวลาการบ่มสอดคล้องกับกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} (รูปที่ 4.12) การปรากฏของตะกอนสีดำสอดคล้องกันดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} ที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.12

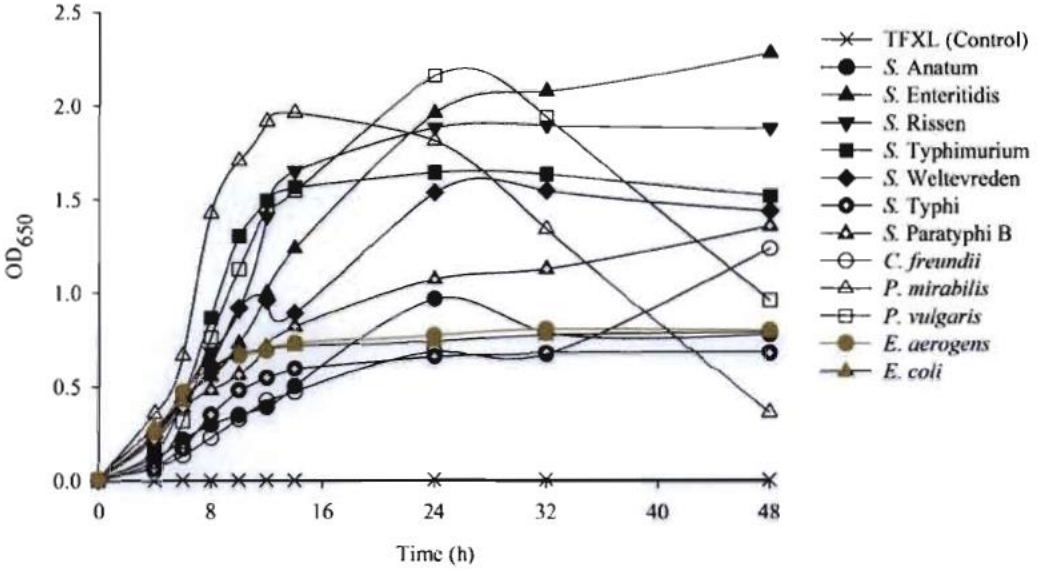
การเกิดผลบวกของ H_2S ที่เวลา 24 ชั่วโมงได้ถูกใช้ในการตัดสินใจเป็นองค์ประกอบปัจจัยสำหรับการเลือกกรดอะมิโน ออร์นิธินถูกเลือกใช้สำหรับเชื้อ typical *Salmonella* เพราะสามารถเร่งการเกิด H_2S production ภายใน 8-14 ชั่วโมง อาร์จินินถูกพิจารณาสำหรับ *S.* Anatum ซึ่งเกิดซัลไฟด์ที่ต่ำในอาหารเหลวออร์นิธิน สำหรับ *S.* Typhi พัฒนาค่าการดูดกลืนแสงที่น้อย เมื่อออร์นิธินดีคาร์บอกซีเลชั่นให้ประสิทธิภาพที่ดีส่วนมากสำหรับ *S.* Typhi ด้วยสัญญาณที่น้อย (OD_{650} = 0.7205)

เพื่อที่จะตัดสินใจคัดเลือกอาหารเหลว เราได้พล็อตค่า OD_{650} ของเชื้อ Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ในอาหารเหลว TFX, TFXL, TFXO, และ TFXA สำหรับ 48 ชั่วโมง และอ่านผลบวกและลบของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (รูปที่ 4.14) ในตารางที่ 4.1 ผลที่อธิบายเป็น H_2S ที่เป็น (+) เมื่อ OD_{650} ของตัวอย่าง $>$ OD_{650} ของเชื้อแข่งขันที่ไม่สามารถเกิดเป็นไธโอซัลเฟตรีดิวซิ่งซึ่งให้ค่าความขุ่นสูงที่สุด และ H_2S ที่เป็น (-) เมื่อ OD_{650} ของตัวอย่าง $\leq$ OD_{650} ของเชื้อแข่งขัน ไม่เกิดไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งที่เป็นเชื้อแข่งขันซึ่งให้ค่าความขุ่นสูงที่สุด การอ่านผลจากรูปที่ 4.14 ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มได้ถูกสรุปในตารางที่ 4.1 ไลซีนและออร์นิธินที่เป็นเบสอาหารเหลวได้ประสบความสำเร็จในการแยก *Citrobacter*

freundii ออกจาก *Salmonella* ในขณะที่ *P. mirabilis* และ *P. vulgaris* ยังคงให้ผลบวก การพิจารณาทั้ง sensitivity และ selectivity ของ *Salmonella,* ไลซีน, ออร์นิธิน, และอาร์จินิน แสดงให้เห็นผลสำเร็จในแง่มุมที่แตกต่างกัน ออร์นิธิน (sensitive กับเชื้อโดยส่วนใหญ่ของ *Salmonella*) และอาร์จินิน (sensitive กับเชื้อ *S.* Anatum) ถูกเป็นสารที่สนใจโดยส่วนมากสำหรับการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเหลว เพื่อพัฒนาความเป็น sensitivity สำหรับ *S.* Typhi ดังนั้นได้ยืนยันต่อไปและประเมินการใช้ร่วมกันของออร์นิธินและอาร์จินินในทั้งคู่และแบบ triple กรดอะมิโน



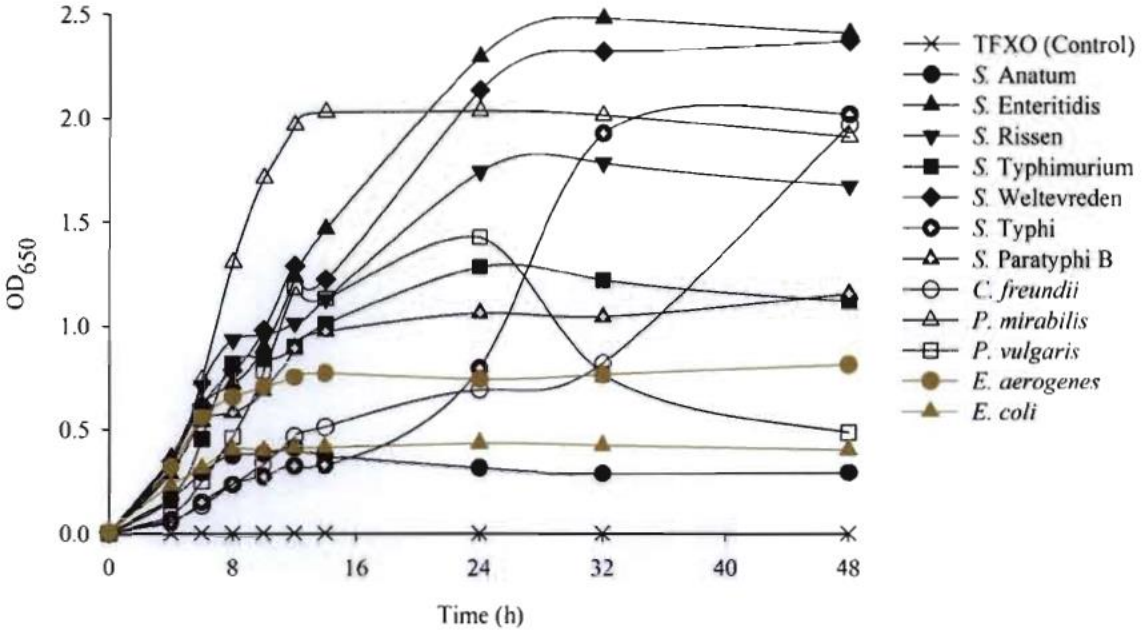
(a) TFX



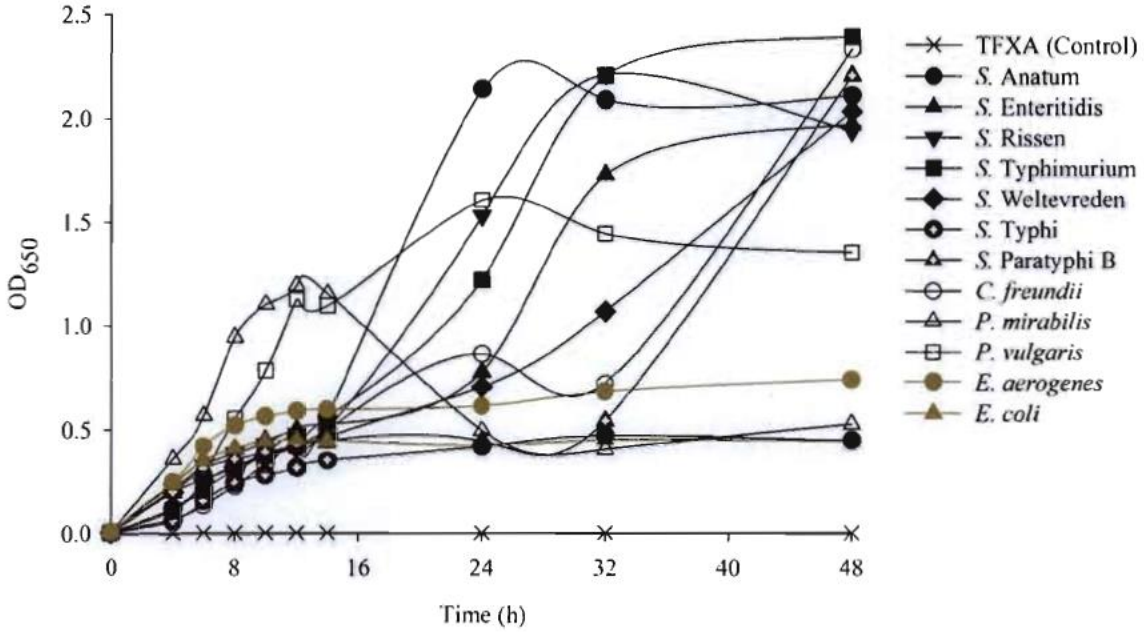
(b) TFXL

รูปที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่เวลาต่างๆ ของไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่งของกลุ่มเชื้อ *Salmonella* ไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง และที่ไม่ใช่ไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งซึ่งไม่ใช่เชื้อกลุ่มเชื้อ Salmonellae (7 log

CFU/mL) ในอาหาร TFX (a), มีส่วนผสมไลซีน (b), ออร์นิธิน (c), และอาร์จินิน (d) อาหารเหลวบรรจุในเพลท microwell ภายใต้การเพาะบ่มที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



(c) TFXO



(d) TFXA

รูปที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่เวลาต่างๆ ของไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่งของกลุ่มเชื้อ *Salmonella* ไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง และที่ไม่ใช่ไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่งซึ่งไม่ใช่เชื้อกลุ่มเชื้อ Salmonellae (7 log CFU/mL) ในอาหาร TFX (a), มีส่วนผสมไลซีน (b), ออร์นิธิน (c), และอาร์จินิน (d) อาหาร

เหลวบรรจุในเพลท microwell ภายใต้การเพาะบ่มที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ต่อ)

ตารางที่ 4.1 สรุปความสามารถในการคัดเลือกในอาหารเหลวไธโอซัลเฟต-เฟอร์ริก แอมโมเนียมซิเตรท (TFX) ที่ได้มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O), และอาร์จินิน (A) ทดสอบด้วยเชื้อ Salmonellae หรือที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ที่ 7 log CFU/mL ทำการบ่มที่ 37°C (ผลที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม)

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	**การเกิด H_2S จากการรีดักชั่นของไธโอซัลเฟต**	**อาหารเหลวบ่งชี้**			
		TFX	**TFXL**	**TFXO**	**TFXA**
เชื้อ Salmonella					
<u>เชื้อในกลุ่ม Typical serovars</u>					
S. Enteritidis	+	-	+	+	+
S. Rissen	+	-	+	+	+
S. Typhimurium	+	-	+	+	+
S. Weltevreden	+	-	+	+	+
S. Paratyphi B	+	-	+	+	-
<u>เชื้อในกลุ่ม Atypical serovars</u>					
S. Anatum	+	+	+	-	+
S. Typhi	+	-	-	+	-
แบคทีเรียแกรมลบ					
ที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella					
Citrobacter freundii	+	+	-	-	+
Proteus mirabilis	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+
Escherichia coli	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-	-	-
Serratia marcescens	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	-	-	-	-	-

Yersinia enterocolitica	-	-	-	-	-
แบคทีเรียแกรมบวก					
ที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella					
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-
Listeria innocua	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-

*ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของ OD_{650} ของอาหารเหลวที่ได้เพาะบ่มเชื้อ สำหรับ blank สอดคล้องกับอาหารเหลวที่ไม่มีเชื้อ และอธิบายเป็นผลบวก positive H_2S (+) สะท้อนการเจริญเติบโตของเซลล์ และผลลบ H_2S (-) สะท้อนการไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์. +, OD_{650} ของตัวอย่าง $>$ OD_{650} ของตัวอย่างที่เกิดจากความขุ่นเชื้อโดยส่วนใหญ่ที่ไม่ได้เกิดจาก H_2S (-); -, OD_{650} ของตัวอย่าง $\leq$ OD_{650} ของตัวอย่างที่เกิดจากความขุ่นเชื้อโดยส่วนใหญ่ที่ไม่ได้เกิดจาก H_2S (-)

4.4.2 ผลของการรวมกันของไลซีน, ออร์นิธิน, หรืออาร์จินินดีคาร์บอกซีเลชั่นที่มีต่อการเกิด H_2S production

ตามที่ผลของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น ออร์นิธินได้ทำให้เกิดตะกอนสีดำของ FeS โดยเชื้อส่วนใหญ่ของ Salmonella แต่ให้ผลในระดับปานกลางใน *S.* Paratyphi B และเล็กน้อยมากใน *S.* Anatum และ *S.* Typhi อาร์จินินถูกพบว่าให้ผลที่ดีมากสำหรับ *S.* Anatum แต่ไม่ค่อยดีในเชื้ออื่นๆ ดังนั้นเราได้สมมติการผสมกรดอะมิโนอาจจะทำให้เกิด H_2S production มากที่สุด และเกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ จากผลของกรดอะมิโนเดี่ยว การรวมกันของออร์นิธินและอาร์จินินได้ถูกนำเสนอ อย่างไรก็ตามเราได้ศึกษาแบบ double และ triple ของการรวมกันทั้ง 3 กรดอะมิโนในเซ็ทของการทดลองต่อไป โดยอาหารเหลว, TFX ได้ถูกเตรียมและเติมด้วย (1) ไลซีน (L) และ ออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และอาร์จินิน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A) เพื่อให้ได้อาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ตามลำดับ เชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกิดไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่งและที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae (7 log CFU/mL) ได้ถูกนำมาทดสอบในการศึกษาอาหารดังกล่าว เพื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นของการเกิดตะกอนสีดำ ในขณะคัดเลือกเชื้อที่เป็นเชื้อแข่งขันของ Salmonella สำหรับอาหารที่เป็นตัวควบคุมมีส่วนประกอบกรดกรดอะมิโนเป็น TFX ที่มีไลซีนหรือ TFXL

รูปที่ 4.15 และ 4.16 ได้แสดงให้เห็นการตกตะกอนสีดำที่เป็นผลมาจาก Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ตามลำดับ ในอาหาร TFX ที่มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนแบบ double และ triple หลังจาก 24 ชั่วโมงของการบ่มได้ถูกประเมินด้วยสายตา การตกตะกอนสีดำปรากฏมากใน LO, OA, LA, และ LOA

กว่าอาหารเหลวที่เป็น TFXL ด้วยเชื้อ typical Salmonella ทั้งหมดและ *S.* Anatum สภาวะโดยส่วนใหญ่ที่เหมาะสมของการเสริมร่วมกันด้วยกรดอะมิโน สำหรับ *S.* Anatum มีแนวโน้มเป็น LA ไม่มีการพัฒนาของการเกิดตะกอนดำถูกสังเกตใน *S.* Typhi ในทุกอาหารเหลวทั้งหมดที่มีกรดอะมิโน 2 ตัวหรือ 3 ตัวในการสนับสนุนการเกิด H_2S production และการเกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ จากการสังเกตด้วยสายตา มันยากในการตัดสินซึ่งการใช้กรดอะมิโนในการเสริมร่วมกันเป็นส่วนใหญ่ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นเราใช้ OD_{650} ในการวัดปริมาณของการเกิดตะกอนสีดำ เราได้พล็อตค่า OD_{650} ที่เวลาต่างๆ ของแต่ละเชื้อในแต่ละอาหาร เพื่อตัดสินใจคัดเลือกกรดอะมิโนที่เหมาะสมซึ่งให้การเกิดตะกอนสีดำของอาหารเหลว

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	บนพื้นฐานอาหาร TFX				
	L	LO	OA	LA	LOA
Salmonellae					
Typical					
S. Enteritidis					
S. Rissen					
S. Typhimurium					
S. Weltevreden					
S. Paratyphi B					
Atypical					
S. Anatum					
S. Typhi					

รูปที่ 4.15 การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ *Salmonella* ชนิดต่างๆ (ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/mL) ในอาหารเหลวไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท เบสอาหารเหลว (TFX) ที่มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; (1) ไลซีน (L) และออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และอาร์จินิน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินีน (A) เพื่อให้ได้อาหารเหลว

TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ภายใต้การบ่มเพาะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหารที่เป็นสภาวะควบคุมเป็น TFX ที่มีไลซีน, TFXL อาหารเหลว

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	บนพื้นฐานอาหาร TFX				
	L	LO	OA	LA	LOA
ไม่ใช่เชื้อ Salmonella, แกรมลบ					
Citrobacter freundii					
Proteus mirabilis					
Proteus vulgaris					
Enterobacter aerogenes					
Escherichia coli					
Klebsiella pneumoniae					
Serratia marcescens					
Shigella flexneri					
Shigella sonnei					
Yersinia enterocolitica					

รูปที่ 4.16 การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ non-salmonellae (7 log CFU/mL) ในไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทบนเบสอาหารเหลว (TFX) ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; (1) ไลซีน (L) และ ออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และอาร์จินิน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A) เพื่อให้ได้อาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ภายใต้การบ่มเพาะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ medium ที่เป็นสภาวะควบคุมเป็น TFX ที่มีไลซีน, TFXL อาหารเหลว

ตารางที่ 4.2 ได้สรุปผลของการเกิด H_2S production ในทุกแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบบนพื้นฐานของการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} ที่เวลาต่าง ๆ ผลบวกและผลลบจากการอ่านค่า OD_{650} ได้ถูกบ่งชี้เพื่อการสังเกตจากการดูด้วยสายตา

ตารางที่ 4.2 สรุปความสามารถในการคัดเลือกจากอาหารเหลวไธโอซัลเฟต-เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานอาหารเหลว (TFX) ที่มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน; (1) ไลซีน (L) และ ออร์นิธิน (O), (2) ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A), (3) ไลซีน (L) และ อาร์จินีน (A), (4) ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O) และอาร์จินิน (A) เป็นอาหารเหลว TFXLO, TFXOA, TFXLA, และ TFXLOA ภายใต้การบ่มเพาะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารที่สภาวะ control เป็น TFX ที่มีไลซีน, TFXL

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์จากไธโอซัลเฟตรีดักชั่น	อาหารเหลว TFX				
		L	LO	OA	LA	LOA
Salmonellae						
Typical serovars						
S. Enteritidis	+	+	+	+	+	+
S. Rissen	+	+	+	+	+	+
S. Typhimurium	+	+	+	+	+	+
S. Weltevreden	+	+	+	+	+	+
S. Paratyphi B	+	+	+	+	+	+
Atypical serovars						
S. Anatum	+	+	+	+	+	+
S. Typhi	+	-	-	-	-	-
Non-salmonellae, Gram-negative						
Citrobacter freundii	+	-	+	+	+	+
Proteus mirabilis	+	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-	-	-	-
Serratia marcescens	-	-	-	-	-	-

Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	-	-	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	-	-	-	-	-
Non-salmonellae, Gram-positive						
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	-
Listeria innocua	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-

*ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ของอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญเติบโต สัมพันธ์กับ blank ที่เป็น control (สอดคล้องกับอาหารเหลวที่ไม่ได้มีการเพาะบ่ม) และอธิบายเป็นผลบวก H_2S (+) สะท้อนการเกิดปฏิกริยาและเป็นผลลบ H_2S (-) สะท้อนการไม่เกิดปฏิกริยา H_2S (+), OD_{650} ของตัวอย่าง $>$ OD_{650} ของเชื้อแบคทีเรียที่ให้ความขุ่น - H_2S (-) bacterium; -, OD_{650} ของตัวอย่าง $\leq$ OD_{650} ของเชื้อแบคทีเรียโดนส่วนใหญ่ที่ให้ความขุ่น-H_2S (-) bacterium

ในตารางที่ 4.3 เราได้เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่ 24 ชั่วโมงของอาหารที่มีการใช้กรดอะมิโนเดี่ยวและ double/triple amino acids ท่ามกลางการใช้เชื้อ Salmonella สายพันธุ์ที่แตกต่างกันเพื่อคัดเลือก กรดอะมิโนที่มีประสิทธิภาพในการนำไปผสมสำหรับการเกิด H_2S production สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} ของ typical Salmonella ได้พัฒนาปรับปรุงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อการเปลี่ยนไลซีนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ กรดอะมิโนที่แตกต่างกันได้ส่งผลให้ค่า OD_{650} ที่สูง โดยให้ค่าที่แตกต่างกันขึ้นกับ Salmonella ซีโรวาร์ สำหรับตัวอย่างออร์นิธิน (*S.* Enteritidis) และออร์นิธินบวกกับอาร์จินิน (*S.* Rissen) ไม่สามารถให้ค่า OD_{650} สูงที่สุดในทุก Typical Salmonella, สูตรโดยส่วนใหญ่; OA ได้ถูกคัดเลือกเพราะสามารถให้ค่า OD_{650} มากกว่า 1.7 เป้าหมายหลักโดยส่วนใหญ่สำหรับอาหารที่เสริมด้วย double หรือ triple กรดอะมิโนที่เหมาะสมได้ถูกพัฒนาสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงใน atypical *S.* Anatum และ *S.* Typhi อย่างไรก็ตาม ไม่มี double หรือ triple ของกรดอะมิโน ที่เมื่อมีการใช้ร่วมกันสามารถเพิ่มค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ของเชื้อ *S.* Anatum สัมพันธ์สอดคล้องกับอาร์จินินเพียงอย่างเดียว (OD_{650} = 2.147) ในการเสริมด้วยกรดอะมิโนทั้งหมดเป็นผลให้เกิดตะกอนที่น้อยและให้ค่า OD_{650} ที่ต่ำใน *S.* Typhi (OD_{650} = 0.425-0.796) ค่าสูงที่สุด OD_{650} ของ *S.* Typhi เป็นจากสูตรที่มีการเสริมด้วยออร์นิธิน (OD_{650} = 0.796) การสรุปการใช้ร่วมกันของกรดอะมิโนไม่สามารถที่จะพัฒนาการเกิด

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน atypical Salmonella ซีโรวาร์ (*S.* Anatum และ *S.* Typhi) แต่เป็นที่โชคดี การใช้ร่วมกันของออร์นิธินและอาร์จินินได้พัฒนาการเกิดตะกอนสีดำเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่ทดสอบ ดังนั้นเราได้เลือกออร์นิธินและอาร์จินินเป็นเบสสารอาหาร สำหรับการพัฒนาต่อไป เพราะน้ำตาลมีผลอย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดไธโอซัลเฟตรีดักชั่นและการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในแบคทีเรีย เราได้ศึกษาผลของไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน Salmonella และเชื้อแข่งขันที่มีการใช้น้ำตาลที่หลากหลายในการเติมลงในอาหาร TFOA โดยได้ตรวจติดตามการตกตะกอนและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650}

ตารางที่ 4.3 ค่า OD_{650} ของอาหารที่มีการบ่มเพาะเชื้อ Salmonella ซีโรวาร์ในการใช้กรดอะมิโนเดี่ยว, แบบคู่, และแบบผสม 3 ชนิดในอาหารเหลว TFX ภายใต้อุณหภูมิการบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Salmonellae	**เบสของอาหาร TFX**							
	control	L	O	A	LO	OA	LA	LOA
Typical serovars								
S. Enteritidis	0.631±0.011	1.235±0.042	2.637±0.020	0.781±0.039	2.421±0.002	2.460±0.013	1.561±0.006	2.023±0.009
S. Rissen	0.570±0.022	1.887±0.040	1.745±0.051	1.533±0.017	1.406±0.028	1.986±0.010	1.612±0.014	1.478±0.049
S. Typhimurium	0.511±0.037	1.481±0.011	1.284±0.032	1.228±0.062	1.468±0.006	1.720±0.003	1.468±0.006	1.895±0.002
S. Weltevreden	0.518±0.022	1.540±0.020	2.143±0.046	0.706±0.020	1.368±0.005	2.178±0.012	1.256±0.003	1.290±0.001
S. Paratyphi A	0.523±0.021	1.078±0.039	1.066±0.034	0.446±0.026	2.397±0.008	1.783±0.006	1.740±0.001	2.232±0.001
Atypical serovars								
S. Anatum	1.199±0.007	0.912±0.005	0.319±0.009	2.147±0.013	0.360±0.004	0.875±0.013	1.611±0.004	0.603±0.011
S. Typhi	0.384±0.012	0.663±0.017	0.796±0.103	0.425±0.043	0.672±0.008	0.455±0.007	0.628±0.010	0.633±0.011

4.4.3 การศึกษาน้ำตาล (Fermentable carbohydrate) ในอาหาร TFOA ของการเกิด H_2S production

การเกิดกรดที่เกิดจากผลของการใช้คาร์โบไฮเดรตอาจส่งผลกระทบกับการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ Veron และ Gasser (1963) ได้รายงานที่สภาวะเงื่อนไขภายใต้กรด แบคทีเรียที่สามารถเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ไม่สามารถเกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ได้ ในการศึกษาปัจจุบัน ความสามารถในการ fermentation ของคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella (โดยเฉพาะเป็นพิเศษ *Citrobacter* และ *Proteus* spp.) ได้ถูกคัดแยกสำหรับการเติมแหล่งของคาร์โบไฮเดรตเพื่อที่จะเพิ่มการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน *Salmonella* แต่ไม่ใน *Citrobacter* และ *Proteus* spp. น้ำตาลทั้ง 19 ชนิด โดยแต่ละชนิดได้ถูกเติมลงในอาหารเหลว TFOA จากผลการทดลองไธโอซัลเฟตรีดิวซ์ซิ่ง Salmonella และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella เชื้อแต่ละตัวได้ถูกบ่มเพาะลงในแต่ละ well ที่ได้มีการเติมอาหารเหลวที่ต้องการทดสอบ

และเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง อาหารเหลวในสภาวะควบคุมที่เป็น TFOA ซึ่งมี xylose ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} ถูกใช้วัดปริมาณการตกตะกอนของไอรอนซัลไฟด์

เกณฑ์ในการเลือกแหล่งของคาร์โบไฮเดรตพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูงของ OD_{650} จากการทดสอบของเชื้อ Salmonellae โดยเฉพาะเป็นพิเศษสำหรับ *S.* Anatum และ *S.* Typhi ในขณะที่การยับยั้งการเกิดตะกอนสีดำในเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonellae ท่ามกลางน้ำตาลที่ใช้ทดสอบทั้งหมดได้คัดเลือกน้ำตาลทรีฮาโลสเติมลงในอาหารเหลว TFOA เพราะน้ำตาลดังกล่าวให้ค่า OD_{650} ที่สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ สำหรับเชื้อ Salmonella โดยส่วนใหญ่รวมถึง *S.* Anatum และ *S.* Typhi (ตารางที่ 4.4) การใช้น้ำตาลที่ช้าของทรีฮาโลสในเชื้อ *S.* Anatum ที่ได้คงไว้ของค่าความเป็นกรด - ด่างที่ 7 โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิด pH ที่เพิ่มขึ้นจากอาร์จินินดีคาร์บอกซีเลชั่นและส่งผลให้เกิดการตกตะกอนสีดำ (Goldschmidt และ Lockhart, 1971)

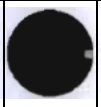
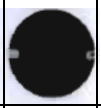
S. Typhi ได้รายงานความสามารถในการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่อ่อนในอาหารแข็งที่หลากหลายและโดยปกติให้โคโลนีที่เป็นสีดำเล็กกว่าเชื้อ Salmonella สายพันธุ์อื่นๆ หรือบางทีอาจเกิดความผิดพลาดโดยสิ้นเชิง (Janda, 2008; Park et. al., 2012) ความผิดพลาดในการตรวจสอบไฮโดรเจนซัลไฟด์อาจเป็นไปได้เนื่องจากสภาวะความเป็นกรดของอาหารตามด้วยการเกิด fermentation ของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่เหมาะสม (Kolmos และ Schmidt, 1987) คำถามเป็น ถ้าการเกิดกรดจากกระบวนการใช้คาร์โบไฮเดรตลดการเกิดซัลไฟด์ การ fermentation สามารถที่จะถูกกำจัดได้ โดยมีการกล่าวถึงว่าอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นในแบคทีเรียส่วนใหญ่รวมถึง Salmonella จำเป็นต้องใช้น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้เกิดกรดที่จะไปสนับสนุนการเกิดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นที่เร็ว (Bearson et. al., 1998; Viala et. al., 2011) ตามที่เห็นในอาหารเหลว ภายใต้การไม่มีคาร์โบไฮเดรตหรือ TFOA ใน *Salmonella* (ตารางที่ 4.4) ให้ค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ที่น้อยกว่าและการตกตะกอนสีดำที่ให้ผลความแตกต่างอย่างชัดเจน เชื้อ Salmonella ทั้งหมดได้ถูกสังเกต *S.* Typhi ได้แสดงให้เห็นไม่มีการตกตะกอนที่ 24 หรือ 48 ชั่วโมงของการบ่ม แต่การตกตะกอนสีดำถูกเห็นได้ใน TFOA ที่มีไซโลส (สภาวะควบคุม) ที่ 48 ชั่วโมง ในกรณีของ *S.* Typhi มันเป็น negative – ODC แต่เป็น positive-ADC ดังนั้น ADC กลายเป็นอัลคาไลน์ในระดับช้าและอย่างสุดท้ายการเกิด H_2S ที่ช้า ทรีฮาโลสอาจจะเป็นคาร์โบไฮเดรตโดยส่วนใหญ่ที่ต้องการสำหรับการเกิดกรดที่จะไปเร่งการเกิดของ ADC ดังนั้นทรีฮาโลสจะไปเร่งการเกิดไฮโดรเจน H_2S production และให้ผลบวกภายใน 24 ชั่วโมงเร็วกว่าการใช้ xylose (48 ชั่วโมง)

Salmonella อื่นๆ (ไม่รวม *S.* Anatum และ *S.* Typhi) เห็นด้วยกับการใช้ไซโลสสำหรับการสนับสนุนการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์มากกว่าทรีฮาโลส (ตารางที่ 4.4) การใช้ไซโลสได้ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า OD_{650} และเกิดตะกอนสีดำกว่าการใช้ทรีฮาโลส สำหรับเชื้อ Typical Salmonella ทั้งทรีฮาโลสและหรือไซโลสบนเบสสูตรอาหารอาจจะถูกใช้ควบคู่สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella ทั้งที่เป็น typical และ atypical ซีโรวาร์

การคัดเลือกอาหารเหลว, TFOA ที่มีทรีฮาโลส *C. freundii* และ *P. vulgalis* ได้แสดงให้เห็นการปรับปรุงพัฒนาความสามารถในการ selectivity เปรียบเทียบกับการใช้ xylose อย่างไรก็ตามมันยังคงแสดงผลเป็นบวกด้วย *P. mirabilis* (ตารางที่ 4.5) เนื่องจากการ fermentation ของทรีฮาโลสในเชื้อแข่งขันเหล่านี้ เชื้อเหล่านี้ได้ทำให้เกิดกรดเริ่มต้นในอาหารมากเกินพอ ซึ่งส่งผลให้เกิดการช้าของปฏิกิริยาทางอัลคาไลน์โดยเชื้อเหล่านี้ และการเกิดสีดำของอาหารเหลวของเชื้อเหล่านี้ไม่ได้ปรากฏถึงแม้จะใช้เวลาในการบ่มที่นานถึง 48 ชั่วโมง (Park et. al., 2012) Park และคณะ (2012) ได้รายงานถึงผลของชนิดคาร์โบไฮเดรตและความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อที่จะขัดขวาง *C. freundii* และ *P. mirabilis* และประสบความสำเร็จในการออกแบบอาหารแข็งจำเพาะใหม่, XA, ด้วยความเข้มข้นของอะราบิโนสที่เหมาะสม ทรีฮาโลสหรืออะราบิโนสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (ยกเว้นฟรุคโตสและมอลโทส) ที่เป็นส่วนผสมในอาหารเหลว สามารถที่จะหยุดการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน *C. freundii* และ *P. vulgaris* แต่ไม่สำหรับใน *P. mirabilis* การพัฒนาต่อไปเพื่อคัดแยกเชื้อ *P. mirabilis* อาจจะจำเป็นกับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้ตั้งไว้ของคาร์โบไฮเดรต อีกวิธีเป็นการใช้ AADC สำหรับการบ่งชี้ควบคู่กันไปของเชื้อแข่งขั้นทั้ง 3 ตัว ซึ่งเป็น LDC-negative

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสง OD_{650} ของเชื้อ *Salmonella* (7 log CFU/mL) ที่ได้บ่มเพาะเจริญในอาหารเหลว TFOA ที่มี xylose/ไม่มี xylose หรือทรีฮาโลส (คัดเลือกจาก 19 น้ำตาล) ที่ได้ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อ Salmonella	H_2S production from thiosulfate reduction	**อาหารเหลวเบสของ TFOA**					
		-		**Xylose**		**Trehalose**	
Typical serovars		**OD650**	Eye	**OD650**	Eye	**OD650**	Eye
S. Enteritidis	+	0.826±0.004		1.705±0.005		1.273±0.003	
S. Rissen	+	0.435±0.026		2.085±0.004		1.209±0.006	

S. Typhimurium	+	1.337±0.005		1.796±0.003		1.613±0.003	
S. Weltevreden	+	0.880±0.022		1.989±0.002		1.551±0.005	
S. Paratyphi B	+	0.714±0.005		2.063±0.005		2.028±0.005	
Atypical serovars							
S. Anatum	+	0.978±0.003		1.052±0.003		1.379±0.004	
S. Typhi	+	0.177±0.000		0.496±0.004		1.503±0.007	

ตารางที่ 4.5 สรุปความสามารถในการ selectivity ไธโอซัลเฟตเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทของอาหารเหลว (TFOA) ที่ได้มีการเสริมด้วยทรีฮาโลสเป็นแหล่งของคาร์บอนโดยมีการ inoculated ด้วยเชื้อ Salmonellae และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ที่ 7 log CFU/mL, ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} และการสังเกตด้วยตาภายใน 24 ชั่วโมงหลังการบ่ม

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	การเกิดไฮโดรเจน production จากไธโอซัลเฟตรีดักชั่น	TFOA+ไซโลส (TFTOA)	TFOA+ทรีฮาโลส (TFTOA)
Salmonellae			
Typical serovars			
S. Enteritidis	+	+	+
S. Rissen	+	+	+
S. Typhimurium	+	+	+
S. Weltevreden	+	+	+
S. Paratyphi B	+	+	+
Atypical serovars			
S. Anatum	+	+	+
S. Typhi	+	-	+
ไม่ใช่เชื้อ Salmonella			

แบคทีเรียแกรมลบ			
C. freundii	+	+	-
P. mirabilis	+	+	+
P. vulgaris	+	+	-
E. aerogenes	-	-	-
E. coli	-	-	-
K. pneumoniae	-	-	-
S. marcescens	-	-	-
P. aeruginosa	-	-	-
S. flexneri	-	-	-
S. sonnei	-	-	-
Y. enterocolitica	-	-	-
ไม่ใช่เชื้อ Salmonella แบคทีเรียแกรมบวก			
E. faecalis	-	-	-
L. innocua	-	-	-
S. aureus	-	-	-

เราได้แนะนำการใช้อาหารเหลวบ่งชี้ด้วยปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยาคือ AADC และ H_2S พาราเรลควบคู่กันไป เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ Salmonella ได้ดีที่สุด จากการศึกษาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ได้มีการพัฒนาสูตรที่มีประสิทธิภาพเป็น 7 AADC (mLDB-PR, LRVS, LMC, mODB-PR, ORVS, OMC, และ ONB) และ 2 H_2S (TFTOA และ TFXOA) เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ Salmonella เบื้องต้น เราควรที่จะประเมินประสิทธิภาพสูตรอาหารในตัวอย่างอาหารจริง ประสิทธิภาพของอาหารในแต่ละชนิดถูกใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการช่วยเลือกสูตรที่มีประสิทธิภาพโดยส่วนใหญ่สำหรับในแต่ละปฏิกริยา (LDC, ODC, และ H_2S) เพื่อที่จะตรวจสอบความถูกต้องในการสรุปเป็นโปรโตคอลการวิเคราะห์ต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวบ่งชี้จำเพาะของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์เพื่อที่จะตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนได้ถูกศึกษาในตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ การทำให้เพิ่มจำนวนในอาหารเหลวปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถที่จะตรวจวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* การวิเคราะห์ตรวจสอบโดยการใช้ไมโครเพลทสามารถที่จะถูกนำมาใช้กับอาหารหลายชนิดโดยปราศจากสิ่งรบกวนของความขุ่น ความไวและความจำเพาะของอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ของไธโอซัลเฟตรีดิวซิ่งถูกพัฒนาโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลือกใช้กรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่สามารถเกิดการเฟอร์เมนเตชั่นได้ *S.* Typhi และ *S.* Anatum ซึ่งปกติให้อัตราการเกิดไธโอซัลเฟตรีดักชั่นที่น้อย ในงานวิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจนสามารถให้การตกตะกอนสีดำที่มากในการพัฒนาเป็นอาหารเหลว โดยสูตรอาหารเหลว H_2S ที่มีประสิทธิภาพถูกพัฒนาเป็นอาหารเหลว 2 ชนิดคือ TFTOA และ TFXOA (ไธโอซัลเฟต, เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท, ออร์นิธิน, และอาร์จินินร่วมกับทรีฮาโลสหรือไซโลส ตามลำดับ) TFTOA มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการตกตะกอนสีดำและให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 สูง (OD_{650}) ของ *S.* Typhi และ *S.* Anatum และแสดงความไวที่ดีในการบ่งชี้เชื้อ *Salmonella* ที่สามารถใช้ไธโอซัลเฟต-รีดิวซิ่งได้ ในขณะที่อาหารเหลว TFXOA ภายใน 24 ชั่วโมง ให้ผลที่มีความไวที่สูงสำหรับเชื้อ typical *Salmonella* แต่น้อยสำหรับ *S.* Typhi และ *S.* Anatum วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยการวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เพื่อวัดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ในไมโครเวล มีความประสบความสำเร็จใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับอาหารเหลวในการทดสอบกับเชื้อบริสุทธิ์

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

1.1 Khueankhancharoen, J., Deepatana, A. and Thipayarat, A., 2019, "Combined effect of amino acid decarboxylation on the improvement of hydrogen sulfide enrichment media for presumptive screening of thiosulfate-reducing Salmonella", Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology), TCI-Tier 1, submitted.

2. การจดสิทธิบัตร

อาหารเหลวบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์สำหรับตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลา

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป

เทคนิคการเพาะเลี้ยงขนาดจุลภาคร่วมกับอาหารเหลวบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีการนำผลงานไปเสนอการใช้ประโยชน์ที่บริษัท ซีพีแรม จำกัดโดยโรงงานดังกล่าวดำเนินธุรกิจแปรรูปผลิตภัณฑ์จากไก่ ทางคณะผู้วิจัยได้นำชุดทดสอบไปทดลองสาธิตตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์ไก่ ตรวจสอบความสะอาดของวัสดุ อุปกรณ์เครื่องจักร ด้วยการ swab testing ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับวิธีการวิเคราะห์ของโรงงานด้วยเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่น้อยกว่า สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก เทคนิคดังกล่าวอยู่ในระหว่างการพิจารณาที่จะเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจสอบสุขลักษณะที่ดีในการผลิตของโรงงาน

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ Salmonella ด้วยราคาที่ไม่แพง อุตสาหกรรมขนาดเล็กตลอดจน SME สามารถจัดหาหรือจัดซื้อได้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ซึ่งเทคนิคดังกล่าวให้ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นที่รวดเร็ว สามารถตัดสินใจในการปล่อยสินค้าได้อย่างมั่นใจ ลดการเก็บของสินค้าคงคลัง ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากซ้ำ ทำให้ลดความผิดพลาดที่เกิดจากวิเคราะห์ ช่วยแก้ปัญหาจากการที่สินค้าถูกตีกลับเนื่องจากมีการตรวจพบเชื้อที่ปลายทาง นอกจากยังเป็นการช่วยลดดุลการค้าจากการนำเข้าชุดทดสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ เป็นการส่งเสริมศักยภาพความสามารถนักวิทยาศาสตร์ไทย

เอกสารอ้างอิง

1. อรุณ บ่างตระกูลนนท์, สุมณฑา วัฒนสินธุ์และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์, 2555, โรคซัลโมเนลโลซิส (*Salmonellosis*), ค้นเมื่อ 9 กันยายน 2555, จาก http://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=ลักษณะSalmonellawebdb.dmsc.moph.go.th
2. 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.
3. Barrett, E.L. and Clark, M.A., 1987, "Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate", Microbiological Reviews, Vol. 51, No. 2, pp. 192-205.
4. Bearson, B.L., Wilson, L. and Foster, J.W., 1998, "A Low pH – Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella* Typhimurium against Inorganic Acid Stress", Journal of Bacteriology, Vol. 180, No. 9, pp. 2409-2417.
5. Bibek, R., 1989, Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Food, Water and Feeds, CRC Press.
6. 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, No. 2, pp. 211-216.
7. Bulmash, J.M. and Fulton, M., 1964, "Discrepant tests for hydrogen sulfide", Journal of Bacteriology, Vol. 88, No.6, pp. 1813.
8. Chen, H., Fraser, A.D.E., and Yamazaki, H., 1993, "Evaluation of the toxicity of Salmonella select media for shortening the enrichment period", International Journal of Food Microbiology, Vol. 18, No. 2, pp. 151-159.
9. Clark, M.A. and Barrett, E.L., 1987, "Catabolite repression of thiosulfate reduction by *Salmonella typhimurium*", Current Microbiology, Vol. 16, No. 1, pp. 27-31.
10. Clark, M.A. and Barrett, E.L., 1987, "The phs gene and hydrogen sulfide production by *Salmonella typhimurium*", Journal of Bacteriology, Vol. 169, No. 6, pp. 2391-2397.

11. 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, No. 8, pp. 2602 – 2606.

12. 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, No. 1, pp. 41-50.

13. de Boer, E., 1998, "Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods", International Journal of Food Microbiology, Vol. 45, No. 1, pp. 43-53.

14. Ewing, W.H., 1986, "Biochemical identification of Salmonella", In Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae (4th ed., p. 187). Elsevier Science Publishing Co., Inc.

15. Fricker, C.R., 1987, "The Isolation of Salmonellas and Campylobacters", Journal of Applied Bacteriology, Vol. 63, No. 2, pp. 99-116.

16. Goldschmidt, M.C. and Lockhart, B.M., 1971, "Rapid methods for determining decarboxylase activity: arginine decarboxylase", Applied Microbiology, Vol. 22, No. 3, pp. 350-357.

17. Hobben, D.A., Ashton, D.H. and Peterson, A.C., 1973, "Some observation on the incorporation of novobiocin into Hektoen Enteric Agar for improved Salmonella isolation", Applied Microbiology, Vol. 26, No. 1, pp. 126 - 127

18. Janda, J.M. (Ed.), 2008, The Enterobacteria, 2nd ed., ASM Press, Washington, pp. 1-411.

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

20. June, G.A., Sherrod, P.S., Hammack, T.S., Amaguana, R.M. and Andrews, W.H., 1995, "Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of Salmonella from raw flesh and other highly contaminated foods: precollaborative study", Journal of AOAC International, Vol. 78, No. 2, pp. 375-380.

21. Kolmos, H.J. and Schmidt, J., 1987, "Failure to detect hydrogen-sulphide production in lactose/sucrose-fermenting Enterobacteriaceae, using triple sugar iron agar", Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. Section B, Microbilogy, Vol. 95, No. 1, pp. 85 – 87.

22. Kuester, E. and Williams, S.T., 1964, "Production of hydrogen sulfide by Streptomycetes and methods for its detection", Applied Microbiology, Vol. 12, No. 3, pp. 46-52.

23. Maijala, R., Johansson, T. and Hirn, J., 1992, "Growth of Salmonella and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)-media", International Journal of Food Microbiology, Vol. 17, No. 1, pp. 1-8.

24. McLaughlin, M.R., 2006, "Factors affecting iron sulfide-enhanced bacteriophage plaque assays in *Salmonella*", Journal of Microbiological Methods, Vol. 67, No. 3, pp. 611-615.

25. McLaughlin, M.R., 2007, "Simple colorimetric microplate test of phage lysis in Salmonella enterica", Journal of Microbiological Methods, Vol. 69, No. 2, pp. 394-398.

26. Midorikawa, Y., Nakamura, S., Phetsouvanh, R. and Midorikawa, K., 2014, "Detection of non-Typhoidal *Salmonella* using a mechanism for controlling hydrogen sulfide production", Open Journal of Medical Microbiology, Vol. 4, No. 1, pp. 90-95.

27. Miller, R.G., Tate, C.R., Mallinson, E.T. and Scherrer, J.A., 1991, "Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*", Poultry Science, Vol. 70, No. 12, pp. 2429 – 2432.

28. 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, No. 10, pp. 3222-3226.

29. Peng, H. and Shelef, L.A., 2001, "Automated simultaneous detection of low levels of Listeriae and Salmonellae in foods", International Journal of Food Microbiology, Vol. 63, No. 3, pp. 225-233.

30. Rambach, A., 1990, "New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 1, pp. 301-303.

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

32. Shelef, L.A. and Tan, W., 1998, "Automated detection of hydrogen sulfide release from thiosulfate by *Salmonella* spp", Journal of Food Protection. Vol. 61, No. 5, pp. 620-622.

33. Sutton, S., 2011, “Measurement of microbial cells by optical density”, Journal of Validation Technology, Vol. 17, No. 1, pp. 46-49.

34. Tan, W. and Shelef, L.A., 1999, “Automated detection of *Salmonella* spp. in foods”, Journal of Microbiological Methods, Vol. 37, No. 1, pp. 87-91.

35. Taskila, S., Tuomola, M. and Ojamo, H., 2012, “Enrichment cultivationin detection of food-borne *Salmonella*”, Food Control, Vol. 26, pp. 369-377.

36. Taylor, W.I., 1965, “Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of Enteric pathogens”, American Journal of Clinical Pathology, Vol. 44, No. 4, pp. 471-475.

37. Veron, M. and Gasser, F., 1963, “Sur la detection de l'hydrogene sulfure produit par certains enterobacteriacees dans les milieux dits de diagnostic rapide”, Ann Inst Pasteur (Paris), Vol. 105, pp. 524–534.

38. Viala, J.P., Meresse, S., Pocachard, B., Guilhon, A.A., Aussel, L. and Barras, F., 2011, “Sensing and adaptation to low pH mediated by inducible amino acid decarboxylases in *Salmonella*”, Plos One, Vol. 6, No. 7, p. e22397

39. Waltman, W.D., 2003, “Method for the cultural isolation of Salmonella”, In *Salmonella* in Domestic Animals, CABI Publishing.