การปนเปื้อนและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อปูม้าต้มสุก

พัชรี คุ้มหอม

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
เมษายน 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ พัชรี คุ้มหอม ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์เทพ วิไลพันธ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมรรถชัย สารถวัลย์แพศย์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประทุม ม่วงมี)
วันที่ 30 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2550

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ทางจุลชีววิทยาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งได้ให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัยเรื่องนี้ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องและให้การสนับสนุนในด้านต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จอย่างเรียบร้อยและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรดี ปิลันธนภาคย์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์เรียบร้อยยิ่งขึ้น รวมทั้งอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ประสาทวิชา ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญอย่างยิ่งในการจัดทำงานวิจัยทางจุลชีววิทยา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์เทพ วิไลพันธ์ อาจารย์ประจำภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมรรถชัย สารถวัลย์แพศย์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการปฏิบัติการทดลอง ขอบคุณ คุณวรนาฏ จงโยธา คุณอภิลักษณ์ ลอยล่อง คุณหลิม ชะอุ่มใบ และคุณจิราพันธ์ แป้นดี เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกเอื้อเฟื้อเครื่องมือปฏิบัติงาน แนะนำวิธีการใช้เครื่องมือ ทำให้งานวิจัยรวดเร็วและสะดวกยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อสละ คุณแม่แสงมณี คุ้มหอม พระครูศรีกิตติวงศ์ น้องสาว และเพื่อน ๆ ที่เป็นกำลังใจให้ความรัก สนับสนุนด้านการศึกษา และให้คำแนะนำที่ดีเสมอมา ขอบคุณ คุณศิริกมล นิยมวรรณ์ ที่คอยเป็นเพื่อนและให้กำลังใจในการปฏิบัติงาน

คุณประโยชน์และความดีของวิทยานิพนธ์ทางจุลชีววิทยาฉบับนี้ จึงขอมอบแด่ทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยครั้งนี้

พัชรี คุ้มหอม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

46912057: สาขาวิชา: จุลชีววิทยา; วท.ม. (จุลชีววิทยา)
คำสำคัญ: *Staphylococcus aureus*/ เอนเทอโรทอกซิน/ เนื้อปูม้าต้มสุก

พัชรี คุ้มหอม: การปนเปื้อนและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อปูม้าต้มสุก (CONTAMINATION AND ENTEROTOXIN PRODUCTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN COOKED BLUE SWIMMING CRAB MEAT)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศิริโฉม ทุ่งเก้า, Ph.D., พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล, วท.ม. 117 หน้า. ปี พ.ศ. 2550

การสำรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียและ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อปูม้าต้มสุกแช่เย็นจากตลาดจำหน่ายปลีก จำนวน 50 ตัวอย่าง พบตัวอย่างร้อยละ 82 มีแบคทีเรียอยู่ในช่วง $>10^6$-10^7 cfu/ g และพบ *S. aureus* ในตัวอย่างร้อยละ 48 โดยพบปริมาณ $2.0x10^3$-$3.5x10^5$ cfu/ g เมื่อทดสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ที่แยกได้ พบว่าร้อยละ 33.33 ผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ และจากการจำแนกชนิดเอนเทอโรทอกซิน พบว่า *S. aureus* ร้อยละ 62.5 ผลิตชนิด A และ ร้อยละ 25 และ 12.5 ผลิตชนิด B และ C ตามลำดับ สำหรับการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซิน ของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุก ที่อุณหภูมิ 7, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เมื่อมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^3 และ 10^5 cfu/ g พบว่า *S. aureus* ไม่เจริญและไม่ผลิตเอนเทอโรทอกซินทุกชนิดที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส *S. aureus* เจริญได้ดี และพบการผลิตเอนเทอโรทอกซินชนิด A และ B ซึ่งชนิด A ผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชนิด B ผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจพบชนิด A และชนิด B หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการผลิตเอนเทอโรทอกซินชนิด A น้อยลงแต่มีการผลิตชนิด B เพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าการผลิตเอนเทอโรทอกซินเกิดเร็วขึ้นเมื่อมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

46912057: MAJOR: MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEYWORDS: *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*/ ENTEROTOXIN/ COOKED BLUE SWIMMING CRAB MEAT

PHATCHAREE KUMHORM: CONTAMINATION AND ENTEROTOXIN PRODUCTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN COOKED BLUE SWIMMING CRAB MEAT. ADVISORY COMMITTEE: SIRICHOM THUNGKAO, Ph.D., PUNNIPA SIRIPERMPOOL, M.Sc., 117 P. 2007.

The contamination of bacteria and *Staphylococcus aureus* in 50 samples of chilled cooked blue swimming crab meat from retail markets was investigated. The results showed that 82% of samples containing $>10^6$-10^7 cfu/ g total bacteria while 48% of samples were contaminated with *S. aureus* at $2.0x10^3$-$3.5x10^5$ cfu/ g. Moreover, enterotoxin production was confirmed in 33.33% of *S. aureus* isolates. Three types of enterotoxin were identified among *S. aureus* isolates with type A showing the most prevalence of 62.5% incidence, followed by type B (25%) and type C (12.5%), respectively. The growth and production of three types of *S. aureus* enterotoxin (SE) in cooked crab meat were then investigated at 7, 30 and 40°C with 10^3 and 10^5 cfu/ g initial cell density. The results revealed no growth and production in all SEs at 7°C while rapid growth and production of SEA and SEB was confirmed at 30°C and 40°C. The preferable temperature of production of SEA was 30°C while that of SEB was 40°C. In this regard, the production of SEA and SEB at 30°C was detected after 12 hours and 18 hours, respectively. At 40°C, SEA production had declined but the production had improved for SEB. It was also found that SE production was profound when high initial load of *S. aureus* was present in the cooked crab meat.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

Staphylococcus. aureus..... 4

ลักษณะทั่วไป..... 4

การจำแนก *Staphylococcus*..... 6

การแยกเพาะ *S. aureus*..... 7

องค์ประกอบที่เกี่ยวกับการเกิดโรค..... 9

การรอดชีวิตของ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 12

การรอดชีวิตของ *S. aureus* ในอาหาร..... 14

เอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus*..... 17

การจำแนกเอนเทอโรทอกซิน..... 20

การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus*..... 21

การระบาด..... 24

ลักษณะทางชีววิทยาที่ทำให้เกิดโรค..... 27

การตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหาร..... 28

การปนเปื้อนและการควบคุม..... 33

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	ปูม้า	34
	รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	37
3	วิธีดำเนินการวิจัย	46
	วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง	46
4	ผลการวิจัย	52
5	อภิปรายและสรุปผล	65
	อภิปรายผล	65
	สรุปผล	72
	ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม		74
ภาคผนวก		81
	ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	82
	ภาคผนวก ข การเตรียมเซลล์ *S. aureus* แขวนลอย	87
	ภาคผนวก ค การทดสอบโคแอกกูเลส	89
	ภาคผนวก ง ผลการทดลอง	93
	ภาคผนวก จ ภาพผลการทดสอบ	100
	ภาคผนวก ฉ การหาค่าการเจริญของ *S. aureus*	105
	ภาคผนวก ช ลักษณะตัวอย่าง	113
ประวัติย่อของผู้วิจัย		117

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลจำกัดการเจริญของ *S. aureus*	5
2	ลักษณะของ *Staphylococcus* แต่ละชนิด	7
3	คุณสมบัติเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus*	17
4	*Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	20
5	ตัวอย่างชุดทดสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Stahpylococcus* สำเร็จรูป	33
6	ปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดการกระจายของ *Staphylococcus* ที่ทำให้อาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1988-1992	34
7	จำนวนและการกระจายของแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างเนื้อปูม้าต้มสุกจากแหล่งต่าง ๆ	52
8	การกระจายระดับขั้นของแบคทีเรียทั้งหมด (cfu/ g) ในตัวอย่างเนื้อปูต้มสุก	53
9	จำนวนและการกระจายของ *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อปูม้าต้มสุกจากแหล่งต่าง ๆ	53
10	การกระจายระดับขั้นของ *S. aureus* (cfu/ g) ในตัวอย่างเนื้อปูต้มสุก	54
11	อัตราการพบ *S. aureus* และ *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน	56
12	จำนวนของเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิด	57
13	การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุกที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 เซลล์ต่อกรัม	58
14	การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุกที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อกรัม	58
15	การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 เซลล์ต่อกรัม	59
16	การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อกรัม	60
17	การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 เซลล์ต่อกรัม	61
18	การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มสุกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อกรัม	62

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและระยะแล็กของ *S. aureus* เซลล์เริ่มต้น 10^3 เซลล์ต่อกรัม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	63
20	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและระยะแล็กของ *S. aureus* เซลล์เริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อกรัม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	63
21	แสดงจำนวนเซลล์ที่ค่าการเจือจางต่าง ๆ	88
22	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *S. aureus* จากตัวอย่างตลาดหนองมน	94
23	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *S. aureus* จากตัวอย่างตลาดชลบุรี	95
24	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *S. aureus* จากตัวอย่างตลาดอ่างศิลา	96
25	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *S. aureus* จากตัวอย่างตลาดศรีราชา	97
26	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียทั้งหมดในแต่ละแหล่ง	98
27	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียทั้งหมดในแต่ละแหล่ง	99
28	ลักษณะสัมผัสของเนื้อปูที่เก็บจากตลาดชลบุรี	114
29	ลักษณะสัมผัสของเนื้อปูที่เก็บจากตลาดหนองมน	115
30	ลักษณะสัมผัสของเนื้อปูที่เก็บจากตลาดศรีราชา	115
31	ลักษณะสัมผัสของเนื้อปูที่เก็บจากตลาดอ่างศิลา	116

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus*	5
2	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสที่ระดับต่าง ๆ	9
3	จำนวนผู้ป่วยอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *Staphylococcus*	25
4	แอนติบอดี้ที่ติดด้วยเอนไซม์จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน	32
5	ปูม้า	34
6	ส่วนต่างๆ ของเนื้อปูแกะ	36
7	Microtitre Plate ที่มีตัวอย่าง และ Antibody	49
8	อัตราที่พบ *S. aureus* ต่อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างแหล่งต่าง ๆ	55
9	ผลการทดสอบ *S. aureus* ด้วยชุดทดสอบ API	90
10	เครื่อง Mini VIDAS	91
11	ขั้นตอนการใช้เครื่อง	92
12	ลักษณะโคโลนี *S. aureus* บนจานอาหาร Baird Parker Agar ที่แตกต่างจากแบคทีเรียอื่น ๆ	101
13	ผลการเกิดตาข่ายระหว่าง SEA กับแอนติซีรั่มในแถวที่ 1 ของ 5 ไอโซเลทที่แยกได้ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป SET-RPLA	101
14	ผลการเกิดตาข่ายระหว่าง SEB กับแอนติซีรั่มในแถวที่ 2 ของ 2 ไอโซเลทที่แยกได้ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป SET-RPLA	102
15	ผลการเกิดตาข่ายระหว่าง SEC กับแอนติซีรั่มในแถวที่ 3 ของ 1 ไอโซเลทที่แยกได้ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป SET-RPLA	102
16	การเกิดตาข่ายระหว่าง SEs กับแอนติซีรั่มที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	103
17	การเจริญของ *S. aureus* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในเนื้อปูต้มสุก	106
18	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและระยะแล็กที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส	107
19	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและระยะแล็กที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ g	109
20	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและระยะแล็กที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเริ่มต้น 10^5 cfu/ g	111
21	เนื้อปูที่วางจำหน่ายในตลาดจำหน่ายปลีก	116

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University