



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus*  
แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร

Development of chromogenic enrichment broth for *Vibrio parahaemolyticus* to facilitate early warning  
detection in food industry

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802167

สัญญาเลขที่ 156/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus*  
แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร

Development of chromogenic enrichment broth for *Vibrio parahaemolyticus* to facilitate early warning  
detection in food industry

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2559

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ  
เลขที่สัญญา 156/2559

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

### (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus* แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร (ภาษาอังกฤษ) Development of chromogenic enrichment broth for *Vibrio parahaemolyticus* to facilitate early-warning detection in food industry รหัสโครงการ 2559A10802167 สัญญาเลขที่ 156/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 770,000 บาท (เจ็ดแสนเจ็ดหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2558 – วันที่ 30 กันยายน 2559) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้ทำการบูรณาการ พัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกอาหารทะเลสดแช่เยือกแข็งรายใหญ่ของโลก ทั้งนี้ปัญหาสำคัญของการผลิต และส่งออกอาหารทะเลสดแช่เยือกแข็งคือการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยส่วนใหญ่พบเชื้อชนิดนี้บริเวณชายฝั่งทะเลและปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเล การบริโภคอาหารทะเลที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่เพียงพอ จะทำให้มีโอกาสติดเชื้อสูง โดยปกติการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลใช้วิธีดั้งเดิมหรือวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก และใช้เวลานาน บางครั้งให้ผลที่ได้ไม่ทันต่อการเน่าเสียของอาหารทะเล หรืออาหารทะเลที่มีปัญหาดังกล่าวได้ไปถึงมือผู้บริโภคแล้ว จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่สามารถประหยัดเวลา และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ขึ้นมา เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในการที่จะบริโภคอาหารเหล่านั้นได้อย่างปลอดภัย ดังนั้นในงานวิจัยจึงบูรณาการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้ชนิดใหม่ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาเอสคิวรินไฮโดรไลซิส (Esculin hydrolysis) ร่วมกับการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหารบ่งชี้จำเพาะด้วยเครื่องมือโครมเพลทรีดเดอร์ เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* เบื้องต้นและใช้ในการคัดเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุด จากการเปรียบเทียบปริมาณการเกิด

ปฏิกิริยาของ *V. parahaemolyticus* และแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ สำหรับความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการบ่งชี้ปฏิกิริยา Esculin hydrolysis (ESC) คือที่ 450 (เฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอินดิเคเตอร์) โดยในงานวิจัยนี้มีการศึกษาปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และระดับของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยา Esculin hydrolysis นอกจากนี้ในงานวิจัยยังมีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา Esculin hydrolysis เป็นการเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ (selectivity) ได้ดียิ่งขึ้นด้วยการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของสื่ออาหารเหลวจำเพาะ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมีการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ 96-microwell plate ที่ลดปริมาณการใช้อาหารแต่ยังคงให้ผลสอดคล้องกับวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาก่อนส่งจำหน่าย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ทีละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ในการทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้นำสูตรอาหารเหลว Esculin hydrolysis ที่ได้ปริมาณความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมทำการทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริงพบว่า สูตรอาหารดังกล่าวให้ประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus*

### บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานของ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารประกอบด้วยขั้นตอนการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัวอย่างอาหารเหลวดังกล่าวถูกนำมาคัดแยกเชื้อในอาหารแข็งรวมเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ประมาณ 3 วันจึงจะได้ผลการบ่งบอกการติดเชื้อเบื้องต้น ซึ่งใช้เวลานานและขั้นตอนการดำเนินงานมีความยุ่งยากในการที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก เพื่อความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอาหารทะเล ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางเลือกหนึ่งสำหรับการใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* สำหรับการพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้ชนิดใหม่นั้น ได้อาศัยหลักการของปฏิกิริยา Esculin hydrolysis ซึ่งสามารถบ่งชี้การปนเปื้อนได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเป็นสีดำซึ่งเป็นผลพลอยได้จาก esculin-ferric ammonium citrate การอ่านผลโดยรวมจากอาหารเหลวบ่งชี้ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์และระดับของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมนั้น ทำให้สามารถจำแนกกลุ่ม *V. parahaemolyticus* ที่สามารถใช้ esculin ออกจากกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้ esculin ได้ เมื่อตรวจวัดสมบัติทางแสงของระบบบ่งชี้ในอาหารที่มีการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* โดยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี พบว่าความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมที่สุดในการบ่งชี้ปฏิกิริยา Esculin hydrolysis คือ 450 นาโนเมตร (เฟอรัริกแอมโมเนียมซิเตรทเป็นอินดิเคเตอร์) โดยสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้ภายใน 24 ชั่วโมง และให้ปริมาณเซลล์ที่สูงหลังจากการบ่มที่  $10^6$ - $10^7$  CFU/ml ในการพัฒนาสูตรอาหารเหลวสำหรับบ่งชี้เบื้องต้นของอาหารเหลว Esculin พบว่าส่วนผสมของอาหารที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ระดับความเป็นกรด-ด่างที่ 10 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเพิ่มจำนวน *V. parahaemolyticus* และสามารถคัดเลือกเชื้ออื่นๆ ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาความเข้มข้นของสื่ออาหารเหลวด้วยการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมพบว่า น้ำตาลอะราบิโนส ช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา Esculin hydrolysis ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่า วิธีการใหม่ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* สามารถตอบโจทย์เป้าหมายของงานวิจัย คือ มีความสะดวกในการวิเคราะห์ และให้ผลการทดสอบรวดเร็ว โดยให้ผลเบื้องต้นในอาหารเหลวในวันแรกของการทดสอบ ในขณะที่วิธีการมาตรฐานนั้นจำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 วัน

**คำสำคัญ:** อาหารเหลวจำเพาะ, เอสคิวรินไฮโดรไลซิส, การวิเคราะห์ปนเปื้อนอย่างรวดเร็ว, วิบริโอพาราอีโมไลติคัส

## Abstract

Conventional methods for *V. parahaemolyticus* detection in food samples require a liquid enrichment step followed by agar culture with the total analytical time of 3 days to obtain presumptive results. Such lengthy and complex procedures compromise productivity and food safety of the seafood industry. In this paper, the use of esculin hydrolysis was proposed to provide a primary screening of *V. parahaemolyticus* contamination in industrial samples. This research explored alternative rapid screening strategies of *V. parahaemolyticus* detection by the occurrence of blackened broth as a result of the esculin-ferric ammonium citrate reaction. *V. parahaemolyticus* as well as other Gram-positive competitors and Gram-negative non-*V. parahaemolyticus* bacteria were cultured in these substrates and incubated at 37°C for 24 h. Viable cell count and broth color were monitored using the micro scale cultivation technique and spectrophotometer at discrete wavelengths from 340 to 650 nm, respectively. The results showed that the optimal signal in detecting esculin activity was at 450 nm and detected as early as 18-24 h after incubation. All tested strains grew very well in these broths maintaining high viable cell counts ( $10^6$ - $10^7$  CFU/ml). The esculin activity itself was able to differentiate Gram-negative from – positive due to the lack of  $\beta$ -glucosidase (no dark brown broth for *E. coli*). In this developed esculin based broth, the concentrations of sodium chloride (3, 6, 8 and 10% w/v) and pH values (7, 8, 9, and 10) were varied to determine the most optimal selectivity towards *V. parahaemolyticus* selection. The optimized esculin-ferric ammonium citrate based broth, named EFA (esculin, ferric ammonium citrate, and arabinoe), effectively increased black color and OD<sub>450</sub> of *V. parahaemolyticus* and displayed good selectivity. The modified esculin broth was able to presumptively screen the presence of *V. parahaemolyticus* in industrial food samples within 1 day in contrast to the conventional method.

**Keywords:** selective broth / esculin hydrolysis / rapid screening / *Vibrio parahaemolyticus*

## สารบัญเรื่อง

|                                    | หน้า |
|------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                    | I    |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร              | II   |
| บทคัดย่อ                           | IV   |
| สารบัญเรื่อง                       | VII  |
| สารบัญตาราง                        | VIII |
| สารบัญรูป                          | IX   |
| บทที่                              |      |
| 1 บทนำ                             | 1    |
| 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา   | 7    |
| 3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย | 39   |
| 4 ผลการทดลองและวิจารณ์             | 41   |
| 5 สรุปผลการทดลอง                   | 68   |
| เอกสารอ้างอิง                      | 69   |
| ผลผลิต (output)                    | 75   |
| ประวัติคณะผู้วิจัย                 | 76   |



## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | หน้า |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1      | วิกฤตการณ์ของแบคทีเรียก่อโรค                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 8    |
| 2.2      | ลักษณะการเจริญของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 16   |
| 2.3      | อาหารเลี้ยงเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่แนะนำ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 21   |
| 4.1      | แสดง profile ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้ ESC ที่เวลาการบ่มต่างๆ ของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , และ <i>S. Anatum</i> โดยเป็นการบ่มที่เวลาต่างๆ ในระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมงด้วยระบบไมโครคัลทิเวชัน (Micro cultivation) โดยในแต่ละอาหารจะทำการเติมเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกิริยา (+) และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา (-)                                                                      | 45   |
| 4.2      | แสดงความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการใช้ ESC ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 49   |
| 4.3      | ผลของความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ESC ของเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ในอาหาร ESC ที่มีส่วนประกอบตัวยับยั้งจากอาหารที่มีการใช้ในปัจจุบัน                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 51   |
| 4.4      | แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในอาหารเหลว ESC ที่มีตัวยับยั้งเดี่ยวชนิดต่างๆ                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 54   |
| 4.5      | ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวจำเพาะ ESC (+, ผลบวก, $A_{450}$ ตัวอย่าง $> A_{450}$ ควบคุม; -, ผลลบ, $A_{450}$ ตัวอย่าง $\leq A_{450}$ ควบคุม) สะท้อนให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของ <i>V. parahaemolyticus</i> และที่ไม่ใช่ <i>V. parahaemolyticus</i> (2-3 log CFU/ml) ที่การบ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมตัวยับยั้ง | 55   |
| 4.6      | การทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของอาหารเหลว ESC (ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% และระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ <i>V. parahaemolyticus</i> กับตัวอย่างอาหารจริงโดยเปรียบเทียบผลความถูกต้องกับวิธีมาตรฐาน                                                                                                                                                                             | 66   |

## สารบัญรูป

| รูปที่ |                                                                                                                                                                                                                                                              | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>V. parahaemolyticus</i> (ข) ผลิตภัณฑ์จากทะเลมี<br>โอกาสปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด                                                                                                                                              | 2    |
| 2      | ลักษณะโคโลนีของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar                                                                                                                                                                              | 3    |
| 3      | เชื้อ <i>Vibrio</i> สายพันธุ์ต่างๆบนอาหารแข็ง TCBS                                                                                                                                                                                                           | 22   |
| 4      | โครงสร้าง Bile salt (sodium glycochol)                                                                                                                                                                                                                       | 23   |
| 5      | โครงสร้าง Methyl violet                                                                                                                                                                                                                                      | 24   |
| 6      | โครงสร้าง Polymyxin B sulfate                                                                                                                                                                                                                                | 24   |
| 7      | โครงสร้าง Sodium lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate)                                                                                                                                                                                                     | 25   |
| 8      | โครงสร้าง Tellurite                                                                                                                                                                                                                                          | 25   |
| 9      | แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยามีการใช้ esculin ด้วยเอนไซม์ $\beta$ -glucosidase ที่อยู่ใน<br>แบคทีเรีย                                                                                                                                                             | 28   |
| 3.1    | Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า                                                                                                                                                                                                               | 34   |
| 3.2    | แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA                                                                                                                                                                                                                       | 34   |
| 3.3    | แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA                                                                                                                                                                                                 | 35   |
| 4.1    | กราฟค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร ESC ที่มีการ inoculation ด้วยเชื้อ <i>V.</i><br><i>parahaemolyticus</i> (ให้ผลบวก) กับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ                                                                                                        | 43   |
| 4.2    | กราฟค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร ESC ที่มีการ inoculation ด้วย<br>เชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> (ให้ผลบวก) กับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ                                                                                             | 44   |
| 4.3    | แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจำเพาะ ESC ในระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมงด้วย<br>ระบบไมโครคัลทิเวชัน (Micro cultivation) โดยในแต่ละอาหารจะทำการเติมเชื้อที่<br>สามารถเกิดปฏิกิริยา (+) และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา (-)                                                | 47   |
| 4.4    | กราฟค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรที่ได้รับจากอาหาร<br>ESC โดยอาหารดังกล่าว inoculated ด้วยเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> และ non- <i>V.</i><br><i>parahaemolyticus</i> ที่ปริมาณเชื้อ 2 log CFU/ml ในแต่ละจุดของกราฟเป็นค่าเฉลี่ย 3 | 48   |

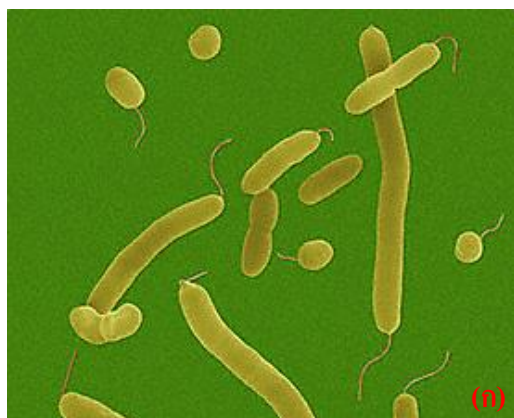
| รูปที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|        | ซ้ำ±SEM ที่วัดจากตัวอย่าง ค่าการเปลี่ยนแปลงของกราฟที่สูงขึ้นไปจาก control ของที่ wavelength 450 เป็นกราฟของแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |      |
| 4.5    | กราฟความสัมพันธ์ของเวลาและปริมาณ โคโลนี (CFU/ml) ที่ระดับของความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 58   |
| 4.6    | กราฟความสัมพันธ์ของเวลาและค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับของความเข้มข้นของ โซเดียม คลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 60   |
| 4.7    | กราฟผลของน้ำตาลจำนวน 19 ชนิด ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของ อาหารเหลว ESC (ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 6% ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 10) ที่ได้มีการพัฒนาเพื่อเพิ่มความสามารถในการ selectivity ของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                 | 62   |
| 4.8    | กราฟ profile แสดงปริมาณเชื้อจำกัด (detection limit) ในอาหารเหลวจำเพาะ ESC ที่ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 สำหรับเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความสามารถในการ detectability อยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงใน $A_{450}$ ของอาหารเหลวที่มี เชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ). +, สามารถตรวจพบ ( $A_{450}$ ตัวอย่าง > $A_{450}$ ควบคุม); -, ไม่สามารถตรวจพบ ( $A_{450}$ ตัวอย่าง = $A_{450}$ ควบคุม) | 64   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

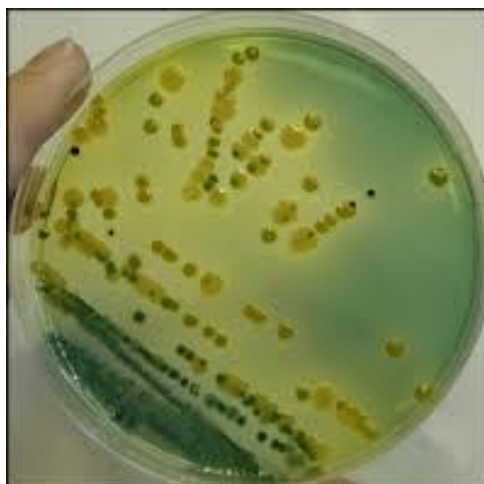
ปัจจุบันประเทศไทยสามารถส่งออกอาหารทะเลแช่เยือกแข็งทำรายได้ให้ประเทศมูลค่าหลายหมื่นล้านบาทต่อปี โดยอาหารทะเลแช่เยือกแข็งที่ส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศประมาณร้อยละ 40 – 60 เป็นกุ้ง รองลงมาคือปลาหมึก ปลา เป็นต้น (กองวิจัยสินค้าและการตลาด กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2556) ถึงแม้ว่าการส่งออกอาหารทะเลแช่เยือกแข็งของไทยจะขยายตัวเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังพบปัญหาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์คือคุณภาพของสินค้าต้องเป็นที่ยอมรับโดยควรมีจำนวนจุลินทรีย์หลงเหลือในผลิตภัณฑ์ในระดับต่ำที่สุด ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในด้านการยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ที่ผลิตให้อยู่ได้นานรวมถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค (Frazier, W.C. and Westhoff, D.C., 1988) โดยแต่ละประเทศต่างก็มีข้อกำหนดคุณภาพและมาตรฐานสินค้านำเข้าอย่างเข้มงวด ทำให้ผู้ส่งออกต้องประสบกับปัญหาการกักกันสินค้า เนื่องจากคุณภาพไม่ได้มาตรฐานไม่เป็นที่ยอมรับของผู้ซื้อ ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อประเทศเป็นอย่างมาก คุณภาพทางจุลินทรีย์นับเป็นดัชนีที่สำคัญในการบ่งชี้คุณภาพของอาหาร โดยเฉพาะเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning bacteria) อันอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคหรือเป็นแหล่งปนเปื้อนไปสู่อาหารอื่น ทั้งนี้ปัญหาสำคัญของการผลิตและส่งออกอาหารทะเลสดแช่เยือกแข็งของไทยคือการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค



## รูปที่ 1 (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *V. parahaemolyticus* (ข) ผลิตภัณฑ์จากทะเลมีโอกาสนปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด

เนื่องจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ชอบอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำเกลือและสามารถเพิ่มจำนวนแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดทั่วโลก (Dileep et al., 2003) โดยมีรายงานวิกฤตการณ์อาหารเป็นพิษจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1951 ขณะนั้นการเกิดโรคนี้น้อยในประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรป แต่พบมากในประเทศแถบทวีปเอเชียซึ่งประชากรบริโภคอาหารทะเลกันเป็นกิจวัตรประจำวัน เช่น สถานการณ์การเกิดโรคอาหารเป็นพิษในประเทศญี่ปุ่น ปี ค.ศ. 1951 จากสถานการณ์ดังกล่าวมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อจำนวน 272 คน และตายอีก 20 คน (Fujino et al., 1953) และในปัจจุบันการบริโภคอาหารทะเลของประชาชนทั่วโลกเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากการระบาดของโรคไวรัสและโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นสาเหตุให้ผู้บริโภคหันมาบริโภคอาหารทะเลแทนเนื้อวัวและเนื้อสุกร โดยอาหารที่เคยพบว่าเป็นพาหะของเชื้อซึ่งทำให้เกิดโรคระบาดคือ ปลาซาร์ดีนกึ่งแห้ง สลัดปู ปูนึ่ง หอยนางรมดิบ ระยะฟักตัวของเชื่อนี้อยู่ในช่วง 3 – 76 ชั่วโมง เฉลี่ย 16.7 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการของโรคเป็นเวลา 1 – 8 วัน เฉลี่ย 4.6 วัน โดยจะมีอาการท้องเสีย เป็นตะกิวที่ท้อง อ่อนเพลีย คลื่นไส้ หนาว ปวดหัวและอาเจียน

ทั้งนี้การที่ผลิตภัณฑ์แปรรูปอาหารทะเลมีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* แล้วยังปล่อยผ่านไปจนถึงมือผู้บริโภค อาจเกิดจากวิธีวิเคราะห์ซึ่งปกติใช้วิธีดั้งเดิมซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ทำให้บางครั้งมีการปล่อยสินค้าไปก่อนที่จะทราบผล ซึ่งมีโอกาสที่ผลิตภัณฑ์ที่มีปัญหาได้ไปถึงมือผู้บริโภคแล้ว นอกจากนี้ยังเกิดจากความไม่แน่นอนของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งบางครั้งให้ผล False Positive ทั้งที่ไม่มีการติดเชื้อและที่สำคัญคือผลที่เป็น False Negative หรือจากการตรวจวิเคราะห์ไม่พบเชื้อเนื่องจากสารยับยั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษสูง (ประกอบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารตัวอย่างมีปริมาณน้อย) ทั้ง ๆ ที่จริงแล้ว ผลิตภัณฑ์อาหารมีการติดเชื่อดังกล่าว ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ผู้บริโภคได้รับอาหารที่ไม่ปลอดภัยไปรับประทานและเกิดปัญหาอาหารเป็นพิษที่พบเห็นได้ทั่วไปในสื่อต่างๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่สามารถประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ เพื่อความปลอดภัยสูงสุดของผู้บริโภคและลดความเสียหายเชิงเศรษฐกิจที่เป็นผลพวงจากปัญหาสุขภาพและการเจ็บไข้ได้ป่วยของประชากรในประเทศ



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

ที่มา : [www.microblog.me.uk/189](http://www.microblog.me.uk/189)

ในปัจจุบันจึงมีความพยายามในการพัฒนาอาหารและปรับปรุงวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารให้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยวิธีการวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* แบบดั้งเดิมตามปกติ (Conventional method, BAM, 2007) มักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสองขั้นตอน คือ การใช้ alkaline peptone water (APW) เป็นอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ thiosulfate citrate bile salts (TCBS) เป็นอาหารแข็งเพื่อตรวจสอบลักษณะเชิงชีวเคมีของเชื้อ (Hara-Kudo et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีอาหาร Salt polymyxin broth (SPB) หรือ glucose teepol (หรือ sodium dodecylsulfate) salt broth (GTSB) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ถูกแนะนำเพิ่มเติม เพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (Donovan และ van Netten, 1995) ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะซึ่งมีสารยับยั้งหรือลดจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่ *V. parahaemolyticus* แต่ในขณะเดียวกันก็เพิ่มจำนวน *V. parahaemolyticus* และในขั้นตอนสุดท้ายคือ นำไปคัดแยกบนอาหารแข็งจำเพาะ โดยโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* จะให้สีจำเพาะแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ขั้นตอนดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญและมีผลต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก โดยปัจจุบันอาหารเหลวจำเพาะในขั้นตอนนี้ มีประสิทธิภาพและความแม่นยำแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการใช้ชนิดของสารยับยั้งและการใช้สารคัดเลือกที่เหมาะสม ซึ่งปัจจุบันความรู้ในการใช้สารยับยั้งสำหรับคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* อย่างมีประสิทธิภาพถูกจำกัด และการคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการปนเปื้อนของแบคทีเรียคู่แข่งยังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก (Bauer et al., 1966;

Twedt และ Novelli, 1971; Zulkifli et al., 2009) และยังไม่มีการพัฒนาใช้งานอินดิเคเตอร์สีในขั้นตอนนี้เพื่อใช้บ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในวิธีการมาตรฐาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงบทบาทของสารคัดเลือกว่าไป ได้แก่ อินดิเคเตอร์สี methyl violet ร่วมกับสารยับยั้งประเภทต่างๆ เช่น sodium lauryl sulfate, polymyxin B sulfate, sodium citrate กับ oxbile, bile salt, tellurite กับ sodium lauryl sulfate และ nystatin ที่มีผลต่อการฟื้นฟูเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยความเข้มข้นของสารคัดเลือกและผลของระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการที่จะกำหนดสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์นำไปสู่การวินิจฉัยถึงความสามารถในการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารรวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็ง ในขั้นตอนดังกล่าวสามารถปรับปรุงความแม่นยำและความรวดเร็วในการตรวจสอบได้เป็นอย่างดี

นวัตกรรมเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ นอกจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลและโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารอื่น ๆ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเสริมศักยภาพการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ การตรวจสอบคุณภาพระหว่างกระบวนการผลิตและการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้ายให้มีความถูกต้องและแม่นยำได้มากยิ่งขึ้น นวัตกรรมเทคโนโลยีดังกล่าวจะสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมากในโรงงานและสามารถวิเคราะห์ตรวจหาเชื้อด้วยเวลาอันสั้น เทคโนโลยีนี้จะช่วยเสริมศักยภาพและความสามารถในการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารทะเลและยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าแปรรูปทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ของประเทศได้เป็นอย่างดี ลดการทำลายสินค้าที่ส่งออกเนื่องจากลูกค้าตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสินค้าที่ถูกค้าปลายทางทำให้สามารถคุ้มครองตัวอย่างสินค้าได้ปริมาณมากและทราบถึงผลการวิเคราะห์ด้วยเวลาที่เหมาะสมทำให้ทราบถึงปัญหาการปนเปื้อนของสินค้าก่อนส่งออกจากคลังสินค้า ซึ่งเทคโนโลยีนี้จะทำให้อุตสาหกรรมอาหารทะเลของประเทศไทยลดความเสี่ยงต่อการทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารซึ่งจะทำให้ประเทศคู่ค้าไม่มีความเชื่อมั่นในนโยบายอาหารที่ปลอดภัยในการบริโภค (Food Safety) ของประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อยุทธศาสตร์ในการเป็นครัวโลก (Kitchen of the World) อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศที่ติดชายฝั่งทะเลทั้ง 2 ด้าน

อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่เยือกแข็งจึงเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศแล้วยังส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศอีกด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทะเลที่แม่นยำและรวดเร็ว นวัตกรรมวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวจัดเป็นนวัตกรรมที่สามารถสร้างบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในการประยุกต์และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่เพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์แบบเดิม ที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อินดิเคเตอร์สีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวร่วมกับการประยุกต์ใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ ของเชื้อในการจำแนกวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย เช่น การใช้ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ (fermentable) ความสามารถในการใช้กรดอะมิโนไลซีน ออนิทีนและไลซีน การย่อยสลาย esculin เป็นต้น ขณะเดียวกันในปัจจุบันพบว่าก็มีประเทศผู้ส่งออกอาหารทะเลแช่เยือกแข็งรายใหม่เกิดขึ้นตลอดเวลา เช่น เวียดนาม มาเลเซีย เข้ามาแข่งขันเพื่อช่วงชิงส่วนแบ่งการตลาดเพิ่มขึ้น ดังนั้นการสร้างฐานการแข่งขันในระดับตลาดโลกจำเป็นต้องมีการยกระดับเทคโนโลยีและกระบวนการผลิตที่ทันสมัยรวมทั้งการรักษามาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อขยายผลผลิตให้เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อใช้ในการส่งออกทั้งในและต่างประเทศ จากที่มาและความสำคัญของการปฏิรูปการวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* จึงเห็นสมควรให้การสนับสนุนเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารดังกล่าว

## 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อนำเสนอวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน
- 1.2.2 เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
- 1.2.3 นำผลงานวิจัยมาประยุกต์ใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกผลิตภัณฑ์ทั้งในและส่งออกต่างประเทศ
- 1.2.4 ได้เทคโนโลยีใหม่ที่สามารถตรวจ *Vibrio parahaemolyticus* ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย



### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารคัดเลือกรจากการตรวจเอกสารจำนวนมากในการเพิ่มจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์คู่แข่ง
- 1.3.2 ศึกษาการรวมกันของสารคัดเลือกรที่ใช้ในการฟื้นฟูและคัดเลือกรการปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากเชื้อจุลินทรีย์คู่แข่งอื่นๆ
- 1.3.3 ศึกษาการใช้อาหารเหลวสีจำเพาะและสารคัดเลือกรเชื้อที่เหมาะสมต่อการฟื้นฟูเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการกำหนดความแตกต่างของสีสำหรับการบ่งบอกการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus*
- 1.3.4 ปรับระดับของปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจหาเชื้อและการตรวจนับที่สามารถทำให้การตรวจหาเป็นไปอย่างแม่นยำ
- 1.3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus*

## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

บทนี้จะแสดงทฤษฎีและรายงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการศึกษานี้ ซึ่งมีเนื้อหาเกี่ยวกับแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และสารคัดเลือกที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

#### 2.1 แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อเกิดขึ้นจากแบคทีเรียก่อโรค ไวรัส หรือปรสิต ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร วิกฤตการณ์ทั่วโลกส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร แม้ว่าสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศให้ความสำคัญกับความปลอดภัยทางอาหารมากที่สุด อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยมากกว่าหนึ่งล้านคนที่เจ็บป่วยจากการรายงานในทุกปี

##### 2.1.1 ประเภท

ความเจ็บป่วยที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ 2 ประเภท คือ โรคติดเชื้อจากอาหาร และโรคอาหารเป็นพิษ โรคติดเชื้อจากอาหารเกิดขึ้นจากการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในร่างกายมนุษย์ ระยะเวลาในการบ่มตัวของอาการ คือ เวลาหลังจากผู้บริโภครับประทานอาหารที่ปนเปื้อนจนกระทั่งผู้บริโภคเกิดการเจ็บป่วย ซึ่งมักเกิดขึ้นบ่อยกว่าโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียสร้างสารพิษขึ้นในร่างกายมนุษย์ (Dack, 1960) โรคการติดเชื้อรุนแรงและโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียสร้างสารพิษขึ้นในร่างกายมนุษย์มักเกิดขึ้นจากกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โรคการติดเชื้อรุนแรงจะเกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของร่างกายมนุษย์โดยไวรัส โปรโตซัว ปรสิต และแบคทีเรียชนิดรุนแรง (e.g., *Salmonella*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia*, enteric-type *Escherichia coli* และอื่นๆ) แบคทีเรียที่ทำให้ติดเชื้อจะสร้างสารพิษบริเวณระบบทางเดินอาหารของมนุษย์รวมทั้ง *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* (diarrheal-type), *C. botulinum*, *C. perfringens* และ verotoxigenic *E. coli* จุลินทรีย์เหล่านี้จะถูกรับเรียกว่าโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียสร้างสารพิษขึ้นในร่างกายมนุษย์ (Dewberry, 1959; Chin, 2000) ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่จำกัดสามารถเจริญและสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์อาหารได้ อาการของผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากแบคทีเรียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าผู้ที่มิ

อาการจากการติดเชื้อ ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคือ *C. botulinum*, *B. cereus* (emetic-type), *Staphylococcus aureus* และอื่นๆ (Schmidt *et al.*, 2003; Cliver *et al.*, 2011)

## 2.1.2 วิกฤตการณ์

วิกฤตการณ์การเจ็บป่วยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแพร่กระจายไปทั่วโลก คนจำนวนมากเจ็บป่วยจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน แบคทีเรียก่อโรคเป็นสาเหตุหลักและทำให้คนตายอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่น เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *Vibrio cholera*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* สถิติของวิกฤตการณ์จากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมีผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของประชาชนอย่างมาก (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 วิกฤตการณ์ของแบคทีเรียก่อโรค

| ประเภท                     | ผู้ป่วย<br>(คน) | ประเภทอาหาร     | ประเทศ       | อ้างอิง                                           |
|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|---------------------------------------------------|
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 3,725           | อาหารทะเล       | ชิลี         | Cabello <i>et al.</i> (2007)                      |
| <i>V. cholera</i>          | 2,591           | อาหารทะเล       | อินเดีย      | Ceccarelli <i>et al.</i> (2011)                   |
| <i>Salmonella</i> sp.      | 500             | ปลาแซลมอนรมควัน | เนเธอร์แลนด์ | Flynn (2012)                                      |
| <i>B. cereus</i>           | 103             | ข้าว            | สหรัฐอเมริกา | Wamnes (2011)                                     |
| <i>S. aureus</i>           | 855             | ไก่ตุ๋น         | สหรัฐอเมริกา | Horwitz and Ganagarosa (1976)                     |
| <i>L. monocytogenes</i>    | 38              | ชีส             | แคนาดา       | Gaulin <i>et al.</i> (2012)                       |
| <i>E. coli</i>             | 33              | ผักกาด          | สหรัฐอเมริกา | Centers for Disease Control and Prevention (2010) |

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ทำให้คนเจ็บป่วย 3,725 คน จากการบริโภคอาหารทะเลในประเทศชิลีปี ค.ศ. 2019 ประเทศอินเดียปี ค.ศ. 2012 เกิดวิกฤตการณ์จากเชื้อ *V. cholera* ทำให้คนตายจำนวน 2,591 คน จากการบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเช่นเดียวกับการติดเชื้อจาก *V. parahaemolyticus* รายงานเหล่านี้เปิดเผยความ

เป็นไปได้ของการเกิดวิกฤตการณ์ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว ประเทศกำลังพัฒนาและประเทศที่ยังไม่ได้พัฒนา ดังนั้น ความเจ็บป่วยของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นที่จดจำไปทั่วโลก

## 2.2 จินัส *Vibrio*

จินัส *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งประกอบด้วย 4 จินัสคือ *Aeromonas* *Photobacterium* *Plesiomonas* และ *Vibrio* เชื้อในจินัส *Vibrio* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 12 สปีชีส์ คือ *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. hollisae*, *V. cincinnatiensis* และ *V. carchariae* โดย *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้ง หลายสปีชีส์เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagellum ในอาหารเหลว แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella ได้ เชื้อในจินัส *Vibrio* ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 – 15 องศาเซลเซียส สามารถเผาผลาญอาหารได้โดยใช้ขบวนการหายใจและขบวนการหมัก เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (halophile) โดยสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคในคนต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1-3% *Vibrio* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส โดยทั่วไปสามารถสร้าง indole catalase และ oxidase สามารถย่อยไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถสร้างเอนไซม์หลั่งออกภายนอกเซลล์ (exoenzyme) ได้แก่ protease amylase lipase lecitinase DNAase และ chitinase เชื้อในจินัส *Vibrio* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งให้ผล oxidase เป็นลบ จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลพบว่า *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีปริมาณ Guanine รวมกับ cytosine (ค่า G+C content) ของดีเอ็นเอ เท่ากับ 39-51 mol % (Lee, 1990)

## 2.3 การก่อโรค

*Vibrio* ที่แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติส่วนใหญ่ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในลำไส้ (intestinal infection) โดยมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อ ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยมีอาการ ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อุจจาระอาจมีมูกเลือดปน การติดเชื้อภายในลำไส้ที่รู้จักกันดี

คือ การติดเชื้อจาก *V. cholerae* เนื่องจากมีความรุนแรงสูงทำให้ผู้ติดเชื้อถ่ายเหลวเป็นน้ำขาวขาว (rice water stool) *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบชนิดรุนแรงแต่ผู้ป่วยสามารถหายได้เอง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. mimicus* และ *V. vulnificus* ทำเกิดอาการท้องเสียได้ นอกจากนี้บางสปีชีส์ ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อภายนอกลำไส้ (extraintestinal infection) เช่น การติดเชื้อทางบาดแผล การติดเชื้อในหู และการติดเชื้อในกระแสเลือด ยกตัวอย่างได้แก่ *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. hollisae*, *V. cincinnatiensis* และ *V. carchariae* ปัจจัยก่อโรค ของเชื้อ *Vibrio* มีหลายชนิด ได้แก่ protease siderophore adhesion factor haemagglutinin enterotoxin cytotoxin และ hemolysin โดย haemolysin เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญใน *Vibrio* หลายสปีชีส์ได้แก่ *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. damsela*.

*Vibrio* สามารถพบได้ในน้ำทะเลทั่วโลก และปนเปื้อนในสัตว์ทะเล ในประเทศไต้หวันได้มีการศึกษาการแยกเชื้อ *Vibrio* จากอาหารทะเลพบว่า *V. alginolyticus*, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* และ *A. sobria* ในประเทศฮ่องกงได้มีการศึกษาแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* อื่น ๆ จากอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาด พบว่าสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. pelagius*, *V. campbellii*, *V. splendidus* และ *V. marinus* ตามลำดับ ในประเทศอิตาลี Baffone และคณะ (2000) ได้ตรวจแยกเชื้อ *Vibrio* ในอาหารทะเลจากทะเล Adriatic พบเชื้อ *V. alginolyticus* (81.48%) มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* (14.8%) และ *V. cholera non-O1* (3.7%) และได้ทำการศึกษา กุ้งทะเลสดแช่แข็ง พบว่า 30% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 129 ตัวอย่าง มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*, *V. cholera non-O1* และ *V. fluvialis* จากการศึกษาของ Lowy และคณะ (1989) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 100% ของจำนวนหอยนางรมดิบปนเปื้อนด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ 67% ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* และจากการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Vibrio* ในหอยนางรมจากชายฝั่งทะเลประเทศบราซิล พบเชื้อ *V. alginolyticus* (81%) *V. parahaemolyticus* (77%) *V. cholera non-O1* (37%) *V. fluvialis* (27%) *V. furnissii* (19%) *V. vulnificus* (12%) และ *V. mimicus* (12%) การก่อโรคลำไส้อักเสบของ *Vibrio* เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือปรุงสุกๆ ดิบๆ นอกจากนี้ น้ำที่ปนเปื้อนยังเป็นสาเหตุ

สำคัญในการติดเชื้อ *V. cholera* (Lee, 1990) จากการศึกษา *Vibrio* ในหอยและน้ำทะเลในประเทศฝรั่งเศส ระหว่างเดือน กรกฎาคม – กันยายน ปี ค.ศ. 1999 จำนวน 189 ตัวอย่าง พบ *V. vulnificus* 20 ตัวอย่าง และ *V. cholera non-O1/non-O139* 3 ตัวอย่าง (Hervio – Health et al., 2002) และจากการศึกษา *Vibrio* ในประเทศออสเตรเลีย สามารถแยกเชื้อ *Vibrio* ได้จาก น้ำ ตะกอน ฟิซและอุจจาระ จากแถบชายฝั่งแม่น้ำ 8 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของรัฐควีนแลนด์พบเชื้อส่วนใหญ่เป็น *V. cholera*, *V. fluvialis* และ *Aeromonas* spp. (Myatt และ Davis, 1989) ในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1981 – 1994 มีรายงานการติดเชื้อ *Vibrio* ในรัฐฟลอริดาสูงมาก ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* รองลงมาคือ *V. vulnificus*, *V. cholerae non-O1*, *V. hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* และ *V. mimicus* (Hlady, 1997) การติดเชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ โดยปี ค.ศ. 1988 – 1997 ในรัฐแถบชายฝั่งทะเลจำนวน 4 รัฐ คือ Alabama, Florida, Louisiana และ Texas มีผู้ป่วยลำไส้อักเสบอันเนื่องมาจากเชื้อ *Vibrio* จำนวน 234 คน (53%) จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 445 คน โดยมีสาเหตุมาจากการรับประทานหอยนางรมดิบ (Altekruse et al., 2000)

ในประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ. 1980 – 1981 พบผู้ป่วย 660 ราย มีอาการท้องร่วง ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Shigella* 27% *V. parahaemolyticus* 19% *E. coli* 5% *Salmonella* spp. 3% *V. cholera non-O1* 3% *Campylobacter jejuni* 1% และ *Vibrio* อื่นๆ น้อยกว่า 1% (Echeverria et al., 1983) และได้มีการศึกษาแยกเชื้อ *Vibrio* จากเลือดของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระหว่างเดือน มกราคม ค.ศ. 1983 – มีนาคม ค.ศ. 1988 พบ *V. cholera non-O1* 13 สายพันธุ์ *V. vulnificus* 3 สายพันธุ์ และ *Vibrio* สปีชีส์อื่น อีก 10 สายพันธุ์ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชายมีประวัติการเป็นโรคตับแข็ง ผู้ป่วยมีอาการ ปวดเกร็งในช่องท้อง ท้องเสีย เชื้อบูท้องอักเสบ ซีดและมีบาดแผลที่ผิวหนัง ผู้ป่วยบางรายมีประวัติการรับประทานอาหารทะเลหรือสัมผัสกับน้ำทะเลก่อนที่จะเกิดอาการดังกล่าว 50% ของผู้ป่วยเสียชีวิตถึงแม้จะได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Thamlikitkul, 1990) ในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลส่งออกจำนวน 686 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม พบ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 45.9% โดยส่วนใหญ่พบเชื้อในตัวอย่างที่มาจากฮ่องกงและประเทศไทยสูงกว่าตัวอย่างที่มาจากอินโดนีเซียและเวียดนามมาก ซึ่งตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่เป็น กุ้ง ปลาและหอย (Wong et al., 1999) และในเดือนมิถุนายนปี ค.ศ. 1998 ได้มีกระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในโรงเรียนกินนอนในประเทศไทย จากการตรวจแยกเชื้อในลูกชิ้นปลา น้ำ

และอุปกรณ์ การปรุงอาหารเพื่อหาสาเหตุของโรค พบ *V. parahaemolyticus* จากลูกชิ้นปลาเป็นสาเหตุของการระบาดดังกล่าว นอกจากนี้ในเดือนธันวาคมปี 1988 ถึง มกราคม ปี ค.ศ. 1999 ได้มีการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 114 ตัวอย่าง แบ่งเป็น หอย 54 ตัวอย่าง กุ้ง 30 ตัวอย่างและปลา 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากหอย 51 ตัวอย่าง (94%) กุ้ง 25 ตัวอย่าง (83%) และปลา 22 ตัวอย่าง (73%) โดยพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียื่นสร้างสารพิษในตัวอย่างหอย 1 ตัวอย่าง

## 2.4 *Vibrio parahaemolyticus*

ถูกพบครั้งแรกโดย Fujino และคณะ ในปี ค.ศ. 1950 โดยขณะนั้นเชื่อดังกล่าวเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในเมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น มีผู้ป่วยที่แสดงอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงจำนวน 272 ราย และเสียชีวิต 20 ราย เนื่องจากการรับประทานชิราสุ ซึ่งเป็นปลาซาร์ดีน (*Engraulis japonica* Hottuyn) ตัวเล็กกึ่งตากแห้ง โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระยะฟักตัวของโรค 2-6 ชั่วโมง อาการโดยทั่วไปประกอบไปด้วย ปวดเกร็งในช่องท้อง อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ แต่บางรายอาจจะมีมูกเลือดปน ปวดศีรษะ หนาวสั่น Fujino ตั้งชื่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุว่า *Pasteurella parahaemolyticus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 ได้มีการศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่า เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนปลายมนยาว 1-3  $\mu\text{m}$  หมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้เกิดแก๊ส เคลื่อนที่ได้โดยใช้ single polar flagellum ให้ผลบวกในการทดสอบ indole และในปี ค.ศ. 1955 Takikawa พบว่า *P. parahaemolytica* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3% ในปี ค.ศ. 1963 Sakazaki และคณะ ได้ศึกษาลักษณะรูปร่าง การเพาะเลี้ยงเชื้อ และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *P. parahaemolyticus* จึงเปลี่ยนจากจีสต์ *Pasteurella* เป็นจีสต์ *Vibrio* (Miwatani และ Takeda, 1979)

ในประเทศญี่ปุ่นพบ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ ในปี ค.ศ. 1961 – 1974 มีผู้ป่วยจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ประมาณ 50-70% ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย (Miwatani และ Takeda, 1976) และเช่นเดียวกันในปี ค.ศ. 1987 – 1996 พบผู้ป่วยจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ประมาณ 70% ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อจากอาหารทะเลโดยตรงและโดยอ้อม การติดเชื้อโดยตรงเกิดจากวัฒนธรรมการ

รับประทานอาหารแบบดิบ ส่วนการติดเชื้อโดยอ้อมเกิดจากการปนเปื้อนของอาหารภายหลังการปรุง (Farmer et al., 1985)

ในสหรัฐอเมริกา การระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งสำคัญครั้งแรกเกิดในรัฐ Maryland ปี ค.ศ. 1971 ทำให้มีผู้ป่วย 320 ราย ซึ่งสาเหตุเกิดจากการรับประทานปูหนึ่ง และต่อมาเกิดการระบาดขึ้นตลอดชายฝั่งของสหรัฐอเมริกาและเกาะฮาวาย การระบาดครั้งใหญ่ที่สุดเกิดในช่วงหน้าร้อนปี ค.ศ. 1978 มีผู้ป่วย 1,133 ราย จากทั้งหมด 1,700 ราย ที่รับประทานกุ้งต้มเป็นอาหารเย็นใน Port Allen La. จากการตรวจแยกเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วยพบว่า เป็น *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP<sup>+</sup> (Oliver และ Kaper, 1997) และปี ค.ศ. 1988 – 1997 พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคลำไส้อักเสบ 59% การติดเชื้อในบาดแผล 34% ติดเชื้อในกระแสโลหิต 5% และติดเชื้อบริเวณอื่น 2% ซึ่งสาเหตุหลักในการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานหอยนางรมดิบ โดยพบว่า 88% ของผู้ป่วยที่มีอาการลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ 91% ของผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อในกระแสโลหิต มีประวัติการรับประทานหอยนางรมดิบก่อนเกิดอาการ (Daniels et al., 2000) และจากการศึกษาพบว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่ก่อให้เกิดโรค (infective dose) เท่ากับ  $10^5 - 10^7$  เซลล์ (Sanyal et al., 1974)

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 ครั้งนั้น *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงสูงถึงร้อยละ 25 ของสาเหตุทั้งหมด ซึ่งสูงกว่า *Salmonella* และ *Shigella* และจากรายงานการสำรวจ *V. parahaemolyticus* ในผู้ป่วยโรงพยาบาลโรคติดต่อ กรมควบคุมโรคติดต่อ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 1970 – มิถุนายน ค.ศ. 1973 มีผู้ป่วย 2.9 – 22.6% และในปี ค.ศ. 1978 Maruyama และคณะ พบว่าสาเหตุของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในจังหวัดจันทบุรี มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* 39.9% จากการศึกษาอุบัติการณ์ของโรคร่วมกับชนิดของอาหารที่รับประทานพบว่า สาเหตุเกิดจากการรับประทานปูแสม (ปูเค็ม) ปลาทะเล กุ้งทะเล ลูกชิ้นปลาทะเล และหอยแมลงภู่ อย่างไรก็ตาม การศึกษาการระบาดของ *V. parahaemolyticus* ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลบาราसनราคร จังหวัดนันทบุรี ระหว่างปี ค.ศ. 1990 – 1991 พบว่าอัตราการป่วยซึ่งมีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* ลดลงเหลือไม่ถึงร้อยละ 10 แต่จากรายงานการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ผู้ป่วยจังหวัดอุบลราชธานี เดือนเมษายน ค.ศ. 2000 – มีนาคม ค.ศ. 2001 พบการระบาดของโรคลำไส้อักเสบในจังหวัดอุบลราชธานีมีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* สูงถึง 49% การเกิดโรคพบในผู้ป่วยทุก



กลุ่มอายุ พบมากในเดือนกรกฎาคม และกระจายในทุกเดือน จากการสำรวจผู้ที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 450 คน พบ 3.8% (17 คน) เป็นพาหะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และมีผู้ป่วย 3 ราย ที่มีอาการท้องเดินไม่รุนแรง ดังนั้นถ้าบุคคลเหล่านี้เป็นผู้ประกอบอาหารอาจเป็นพาหะทำให้เกิดการระบาดของเชื้อได้

#### 2.4.1 ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป

*V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยขนาด  $0.5 - 0.8 \times 1.4-2.6 \mu\text{m}$  สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน *V. parahaemolyticus* สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ ไม่สามารถหมักน้ำตาล sucrose แต่หมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้เกิด ดังนั้นลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS จึงมีสีเขียวอมน้ำเงินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร *V. parahemolyticus* สามารถหมักน้ำตาล mannitol และ mannose แต่ไม่สามารถหมัก salicin และ cellulose สามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส (mesophile) อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 44 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30 – 35 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ที่ pH ค่อนข้างกว้างคือ 4.8 – 11 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 7.6 – 8.6 นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์ ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5 – 8% ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2-3 % เมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone water ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะมี generation time สั้นประมาณ 11 นาที

ในธรรมชาติพบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญได้ มีการศึกษาเลี้ยงเชื้อในน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ heart infusion agar และ TCBS แต่เชื้อยังมีขบวนการ metabolism และ เซลล์เมมเบรนยังมีสภาพสมบูรณ์ แต่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากรูปแท่งเป็นรูปกลม แต่เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้หาก

มีการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำทะเลก่อนการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Johnston และ Brown, 2002) ส่วนการอยู่รอดในอาหารต่างๆ พบว่า เมื่อนำกุ้งทั้งตัวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3, 7, 10 หรือ -18 องศาเซลเซียส ปริมาณ *V. parahaemolyticus* จะลดลงแต่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน ในหอยนางรมที่วางบนชั้นจำหน่ายอาหารอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ อย่างน้อย 3 อาทิตย์ และสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็น 2-3 วัน และเช่นเดียวกัน *V. parahemolyticus* ในซูริมิ (surimi) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อลดลงแต่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีกเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Wong et al., 1994) สำหรับผลของความร้อนต่อการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* พบว่า ที่อุณหภูมิ 60, 80, และ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที สามารถทำลายเชื้อจำนวน  $5 \times 10^2$  เซลล์ได้ แต่หากเชื้อมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องใช้เวลาในการทำลายเชื้อเพิ่มมากขึ้น เช่น ปริมาณเชื้อ  $2 \times 10^5$  เซลล์ ถูกทำลายด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเชื้อสามารถถูกทำลายได้ในน้ำเดือดที่เวลา 1 นาที (Vanderzant และ Nickelson, 1972)

#### 2.4.2 แหล่งที่อยู่

*V. parahaemolyticus* พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเลในน้ำทะเล ทั่วโลก ในตะกอนดิน สัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา แพลงก์ตอน และสาหร่าย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นกับฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนพบเชื้อมากกว่าฤดูหนาว จากการศึกษาปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่จำหน่ายในร้านค้าปลีกช่วงปี ค.ศ. 1998 – 1999 ในสหรัฐอเมริกาโดยวิธี Most Probable Number พบว่าปริมาณของ *V. parahaemolyticus* เพิ่มขึ้นสูงมากในช่วงฤดูร้อน (Cook et al., 2002) ในช่วงฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและปนเปื้อนในน้ำทะเลมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ในแพลงก์ตอนสัตว์ โดยเชื้อดูดซับสารโคตินบนแพลงก์ตอนเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะย่อยผนังเซลล์ของแพลงก์ตอน และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในน้ำทะเล จากการศึกษาพบว่า ไม่สามารถแยกเชื้อในน้ำทะเลที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส แต่สามารถแยกเชื้อจากตะกอนดินได้แม้ว่าอุณหภูมิของตะกอนดินจะต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส

ประเทศไทยมีอุณหภูมิตลอดปีไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นการระบาดของเชื้อจึงพบได้ทุกเดือน แต่พบผู้ป่วยมากที่สุดในเดือนมิถุนายน และพบน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม จากการสำรวจเชื้อบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน และอ่าวไทย โดยเก็บตัวอย่างน้ำทะเลทั้งหมด 234 ตัวอย่าง จากระดับผิวหน้า ระดับกลาง และระดับผิว

ดิน จากตะกอนดิน 78 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณฝั่งอ่าวไทยตอนบนมีเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน โดยบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีเชื้อในน้ำทะเล 54% ตะกอนดิน 72% ฝั่งทะเลอันดามันมีเชื้อในน้ำทะเล 8% ตะกอนดิน 44% ผลดังกล่าวอาจเกิดจากบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีสภาพที่เหมาะสมต่อการกระจายของเชื้อกล่าวคือ เป็นบริเวณที่ประชากรหนาแน่น มีสารอินทรีย์และสิ่งปฏิกูลจากคนและสัตว์ไหลจากพื้นดินสู่อ่าวไทยจำนวนมาก จึงทำให้สภาพเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนและการกระจายของเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน

#### 2.4.3 ลักษณะทางกายภาพ

*V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ชอบเกลือ เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้จะมี flagellum ที่มีขั้วทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ และจะเจริญในอาหารเหลว (Twedt และคณะ, 1969; Baumann และ Schubert, 1984)

ตารางที่ 2.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (แหล่งที่มา: Swanson, 1996)

| ปัจจัย                  | สภาวะที่เหมาะสม | ช่วงที่สามารถเจริญได้ |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 37              | 5 – 43                |
| พีเอช                   | 7.8 – 8.6       | 4.8 – 11              |
| เกลือ (ร้อยละ)          | 1.5 – 3.0       | 0.5 – 10              |
| Water activity (Aw)     | 0.981           | 0.940 – 0.996         |
| Atmosphere              | Aerobic         | Aerobic – anaerobic   |

#### 2.4.4 วิฤตการณ์

เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคลำไส้อักเสบในประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่นิยมรับประทานหอยหรือปูสดๆดิบๆ การเจ็บป่วยที่เป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนมีรายงานบ่อยครั้งในแถบเอเชีย อย่างไรก็ตามสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วก็เริ่มเผชิญกับปัญหาเหล่านี้ การระบาดครั้งแรกของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ถูกบันทึกไว้ในประเทศญี่ปุ่นปี ค.ศ. 1950 มีผู้ติดเชื้อ 272 ราย และเสียชีวิต

(Yeung และ Boor, 2004; Nair et al., 2007) ประเทศชิลีเกิดท้องร่วงอย่างรุนแรงในฤดูร้อนปี ค.ศ. 2005 ซึ่งร้อยละ 75 มาจากการบริโภคอาหารทะเล (Cabello et al., 2007) การระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ในช่วงฤดูร้อนเมื่อไม่นานมานี้ทำให้คนเจ็บป่วย 177 คน จากการรับประทานหอยนางรมที่ปนเปื้อนในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดาในปี ค.ศ.2006 (Centers for Disease Control and Prevention, 2006) นอกจากนี้สถานการณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวยังแพร่กระจายไปทั่วโลก

#### 2.4.5 โรคที่เกิดขึ้น

โรคระบบทางเดินอาหารจากสายพันธุ์ชนิดนี้มักเกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อน (Doyle, 1989) ความเจ็บป่วยจะเกิดขึ้นอย่างรุนแรง โดยมีอาการท้องเสีย ปวดหัว อาเจียน วิงเวียน ปวดท้องแบบเกร็ง และมีไข้ต่ำ หลังจากบริโภคอาหารที่ติดเชื้อในช่วง 48 ถึง 72 ชั่วโมง เวลาที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยทั่วไปประมาณ 18 ชั่วโมง (Lund et al., 2000).

### 2.5 ปัญหาโรคกึ่งตายด่วน (Early Mortality Syndrome: EMS)

โรค EMS เริ่มมีการระบาดครั้งแรกในประเทศจีน ในปี พ.ศ. 2552 และมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วสู่ประเทศเวียดนามในปี พ.ศ. 2553 ในมาเลเซียปี พ.ศ. 2554 และไทยปลายปี พ.ศ. 2554 ตามลำดับ และสร้างความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมกุ้งของไทยอย่างรุนแรงตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2556 เป็นต้นมา ทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนกุ้งอย่างหนัก และราคากุ้งปรับตัวเพิ่มขึ้นเป็นประวัติการณ์ จากตัวอย่างกุ้งตายด่วนที่ทำการศึกษพบว่า มี ตัวอย่างที่มีโรคของตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease: AHPND) เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งมักจะเกิดขึ้นหลังการปล่อยลูกกุ้งลงบ่อดินไม่เกิน 35 วัน

ในต้นปี พ.ศ. 2556 พบว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนี้คือแบคทีเรียในกลุ่ม วิกิริโอ พาราฮีโมไลทิกัส (*Vibrio parahaemolyticus*) ในขณะนั้นถึงแม้จะทราบสาเหตุของโรค แต่การควบคุมและป้องกันแบคทีเรียนี้ เป็นไปได้ยาก เนื่องจากยังขาดวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคที่มีความจำเพาะและรวดเร็ว ที่สามารถจะนำไปใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคในพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ และคัดกรองลูกกุ้งก่อนปล่อยลงบ่อดินได้ ผู้เกี่ยวข้องกับผู้เพาะเลี้ยงกุ้งได้พยายามแก้ปัญหา ตั้งแต่กระบวนการผลิตลูกกุ้ง รวมทั้งมี การตรวจเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด EMS ตั้งแต่ลูกกุ้ง ก่อนนำไปเลี้ยงในบ่อดิน รวมทั้งการจัดการ คุณภาพน้ำ และหลากหลายวิธีตามความเหมาะสม แต่ก็ยังไม่สามารถนำไปปฏิบัติได้ผลสม่ำเสมอ ไม่ใช่วิธีตายตัว ที่บอกได้ว่า ทำแบบนี้แล้วจะประสบความสำเร็จ เพราะบางที่เลี้ยงรอบนี้ได้ผลดี เลี้ยงรอบหน้ากลับไม่ได้ผลผลดี เช่นเดิม ทั้งๆที่นำวิธีการเลี้ยงและการจัดการเช่นเดิมมาใช้ บางฟาร์มเลี้ยงกุ้งแล้วได้ผลผลดี บาง

ฟาร์มนำไปใช้ กลับไม่ได้ผล ทั้งนี้อาจเพราะคุณภาพของลูกกุ้งในแต่ละรอบการเลี้ยงแตกต่างกัน จากปัญหาต่าง ๆ นั้น แม้ว่าจะมีการนำเสนอแนวทางการเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ หลายรูปแบบ แต่ละรูปแบบมีความเหมาะสมกับลักษณะภูมิประเทศแล้ว แต่ก็ต้องยอมรับว่าในขณะนี้ การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมี ข้อจำกัดที่ คุณภาพของลูกกุ้ง และความไม่สม่ำเสมอของคุณภาพลูกกุ้ง ที่บางครั้งโตดี มีภูมิต้านทาน บางครั้งโตดี แต่ไม่มีภูมิต้านทาน ตายง่าย หรือโตช้าแต่ทนทาน รวมทั้งโตช้าแต่ยังเป็น EMS อีกด้วย ลักษณะอาการของโรค โรค EMS มักเกิดโรครภายใน 20 - 30 วันหลังการปล่อยลูกกุ้งลงบ่อ ในช่วงแรกกุ้งในบ่อไม่แสดงอาการ ผิดปกติอย่างเด่นชัด แต่จะเริ่มพบกุ้งตายในบ่อและตายที่ก้นบ่อ หลังจากนั้นจะพบซากกุ้งลอยขึ้นมา กุ้งทยอยตายและอาจมีการตายสูงถึง 100% ภายในเวลาประมาณ 30 วัน ในบ่อที่มีการตายมากพบกุ้งมีอาการว่ายน้ำ เฉื่อย เชื่อง ชึม กินอาหารลดลง เปลือกนูนและมีสีเข้มขึ้น ตับลึบ นุ่ม ซีดหรือสีคล้ำ ปัจจุบันพบว่าโรค EMS ที่เกิด ในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวมีลักษณะพยาธิสภาพของโรค EMS ที่เหมือนกัน โดยตัวอย่างกุ้งที่เก็บมาศึกษาทาง เนื้อเยื่อแสดงให้เห็นความผิดปกติที่ บริเวณตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เริ่มจาก epithelial cell ของ ตับและตับอ่อนถูกทำลาย การสะสมของไขมันในตับอ่อนลดลงทั้งในรูปของ fat storage cell vesicle และ oil droplet รวมทั้งมีการทำงานที่ลดลงของเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งสาร ในกุ้งที่มีอาการรุนแรงมากพบว่า ไขมัน เซลล์ ของ ตับและตับอ่อน และเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งสารถูกทำลายมากขึ้นและหลุดร่วงของท่อตับ ในระยะท้ายของโรคจะมีการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection) อย่างรุนแรงโดยเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งในที่สุดกุ้ง ที่ติดเชื้อจะตายจากการที่ตับและตับอ่อนไม่สามารถทำงานได้ และการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในช่วงท้ายของโรค ซึ่งพบว่าพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนที่ถูกทำลายน่าจะเกิดจากสารพิษ โดยพบลักษณะที่คล้ายคลึงกับในกุ้งที่ ได้รับ aflatoxin B1 และ benomyl จึงได้มีการศึกษาการติดเชื้อโดยใช้อาหารสำเร็จรูปที่เก็บจากฟาร์มกุ้งที่พบ โรค รวมทั้งยาและสารเคมีที่ใช้กันมากในพื้นที่ที่เกิดโรคเพื่อฆ่าพาหะของโรคตัวแดงดวงขาว ในการเตรียมบ่อก่อน ลงลูกกุ้ง อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรค EMS ได้ในห้องปฏิบัติการ จึงยังไม่ สามารถยืนยันสาเหตุของโรคนี้ตามลำดับ แนวทางการป้องกันโรค EMS อย่างที่ทราบกันดีว่าโรค EMS ไม่มียารักษาใดๆ สามารถรักษาโรคนี้ได้ ทำได้เพียงป้องกันให้ดีที่สุด เท่านั้น เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรคนี้ มาดูแนวทางการป้องกันโรค EMS ดังนี้

1. เตรียมบ่อให้ดีก่อนลงเลี้ยงกุ้ง เดิมคลอรีน เพื่อฆ่าเชื้อในบ่อทิ้งไว้ประมาณ 20 วันขึ้นไป จึงค่อยปล่อยน้ำออกจากบ่อเลี้ยง จากนั้นทำการล้างบ่อ กำจัดสารอินทรีย์ก้นบ่อ และตากบ่อให้แห้งทิ้งไว้ประมาณ 1 - 1.5 เดือน แล้วจึงเอน้ำเข้าสู่บ่อเลี้ยง และ เดิมคลอรีนในน้ำก่อนลงเลี้ยง
2. คัดเลือกลูกกุ้งที่สุขภาพดี แข็งแรง มาจากแหล่งผลิตลูกกุ้งที่เชื่อถือได้ ลูกกุ้งที่นำมาปล่อยต้องผ่านการตรวจสอบตัว และเซลล์ไขมันก่อน ตัวต้องมีความสมบูรณ์ มีเม็ดไขมันมาก และตรวจไม่พบแบคทีเรียในตับ
3. ทดสอบความแข็งแรง จากการใช้น้ำความเค็มเป็นศูนย์ หรือน้ำจืด ถ้ามีกุ้งตายมากกว่า 10% ในเวลา 30 นาที ถือว่าไม่ผ่าน
4. ลงกุ้งไม่หนาแน่นจนเกินไป เพราะจะทำให้ควบคุมและจัดการบ่อได้ยาก เป็นเหตุให้กุ้งเกิด ความเครียด อ่อนแอ และเกิดโรคได้ง่าย
5. ควรมีการจัดการอาหารที่ดี ใช้อาหารที่มีคุณภาพดี และไม่ควรให้อาหารปริมาณมากเกินไป
6. ควบคุมคุณภาพน้ำให้ดีเสมอและควบคุมอุณหภูมิของน้ำไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน พร้อมทั้งดูแลพื้นบ่อไม่ให้เกิดการเน่าเสีย
7. กรณีเกิดโรคหรือมีอาการที่น่าสงสัย ควรรีบส่งตัวอย่างกุ้งให้หน่วยงานของกรมประมงตรวจวินิจฉัย เพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาได้ทันทั่วทั้ง หากเป็นโรคต้องทำการฆ่าเชื้อกุ้งและน้ำในบ่อ โดยใส่คลอรีน เพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้อย่างน้อย 14 วัน ก่อนปล่อยน้ำทิ้งออกสู่แหล่งน้ำภายนอก เพื่อควบคุมการแพร่กระจายของโรคไปยังพื้นที่อื่น

## 2.6 แหล่งที่มา

แบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งจะเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมทางน้ำและบ่อยครั้งจะแยกเชื้อได้จากอาหารทะเลที่หลากหลายรวมทั้งปลาสด, ปลาซาร์ดีน, ปลาทู, หอย, ปลาหมึก, กุ้ง, ปู, และหอยนางรม (Liston, 1990) การบริโภคอาหารทะเลทั้งสดและอาหารทะเลดิบ โดยเฉพาะในหอยที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* อาจนำไปสู่การพัฒนาของโรคทางเดินอาหารที่รุนแรง ซึ่งเกิดขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกาและกระจายไปทั่วโลก (DePaola et al., 1990) การเฝ้าระวังควบคุมอุณหภูมิหลังการเก็บเกี่ยว

ของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ในระหว่างการผลิต กระบวนการผลิตและการจัดเก็บผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญที่จะลดความเสี่ยงของการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus*

## 2.7 วิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม

วิธีการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีขั้นตอนหลักๆ 6 ขั้นตอน คือ non-selective enrichment, selective enrichment, selective plating, purification, biochemical screening และ serological identification ตามลำดับ (ISO, 2007) โดย 3 ขั้นตอนแรก เป็นขั้นตอนเบื้องต้น ส่วนอีก 3 ขั้นตอนหลัง เป็นขั้นตอนในการยืนยันผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ วิธีการตรวจสอบแบบนี้มีทั้งข้อดีและข้อเสีย สำหรับข้อดีคือมีความน่าเชื่อถือและความแม่นยำมากอย่างเห็นได้ชัด และได้รับการยอมรับจากมาตรฐานอาหารทั้งหมดทั่วโลก การทดสอบทางชีวเคมีสำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มี 12 ขั้นตอน (Elliot et al., 1992) Miles et al. (1997) และ Abdeldaim and Herrmann (2013) รายงานถึงข้อเสียของการตรวจเชื้อด้วยวิธีแบบดั้งเดิมว่าใช้เวลาในการเตรียมอาหารแข็งค่อนข้างมาก ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อก็มากเกินไปจนความจำเป็น ใช้จำนวนคนงานในการตรวจสอบจำนวนมาก และแปลความผิดเนื่องจากการแทรกซ้อนของเชื้อแบคทีเรียคู่แข่ง การตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีนี้จะเสร็จสิ้นภายใน 4 ถึง 5 วัน ซึ่งถือว่าเป็นระยะเวลาที่นานถึงจะทราบว่าอาหารทะเลนั้นเสียหรือไม่ (Chen และ Chang, 1996)

อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่ใช้กัน โรงงานส่วนใหญ่กล่าวว่าวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แต่ยังปรากฏข้อเสียบางประการ วิธีการเหล่านี้ต้องการเงินลงทุนสำหรับอุปกรณ์จำนวนมากและจำเป็นต้องใช้การยืนยันในขั้นตอนสุดท้ายด้วยอาหารแข็งตามวิธีแบบดั้งเดิมเพื่อให้อาหารได้รับการยอมรับตามมาตรฐาน นอกจากนี้ นักวิจัยที่ทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญเป็นอย่างมาก เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์มีความไวสูงโดยเฉพาะเรื่องความสะอาด (Mandal et al., 2011).

วิธีการตรวจสอบแบบดั้งเดิมในมุมมองของอุตสาหกรรมอาหารควรจะถูกปรับปรุงและพัฒนาพร้อมกับวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งจะนำไปสู่ค่าใช้จ่ายที่ลดลง นอกจากนี้การวิเคราะห์ในระดับไมโครจะถูกนำมาใช้ในการลดปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และได้รับการยอมรับจากมาตรฐานอาหารในขั้นตอนสุดท้าย

### 2.7.1 Media in conventional methods

ข้อมูลของอาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของมาตรฐานและรายงานที่ตีพิมพ์แสดงดังตารางที่ 2.3 Australian/New Zealand Standard (AS/NZS), U.S. Food and Drug Administration, International Organization for Standardization (USFDA), Bacteriological Analytical Manual (BAM) และ Chatterjee et al. (1977) ไม่ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในทางกลับกัน *World Health Organization* (WHO) แนะนำให้เพิ่มขั้นตอนในการคัดเลือกเชื้อแต่ข้ามขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยการใช้ GSTB ซึ่งก็คือ Glucose Salt Teepol Broth Donovan and Netten (1995) แนะนำ SPB หรือ GSTB หลังจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ แต่ไม่คัดเลือกเชื้อ ได้แก่ APW ที่ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าว อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง TCBS ถูกแนะนำให้ใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อจากหลายมาตรฐาน อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้จะใช้ในการคัดเลือกระหว่างแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสและแบคทีเรียที่ไม่หมักน้ำตาลกลูโคสโดยจะปรากฏโคโลนีที่มีสีแตกต่างกัน

ตารางที่ 2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แนะนำ

| ผู้แนะนำ                  | อาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวน |               | อาหารแข็งที่คัดเลือกเชื้อ |
|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
|                           | ไม่คัดเลือกเชื้อ          | คัดเลือกเชื้อ |                           |
| AS/NZS                    | APW                       | -             | TCBS                      |
| USFDA                     | APW                       | -             | TCBS                      |
| ISO                       | APW                       | -             | TCBS                      |
| BAM                       | APW                       | -             | TCBS, VPSA                |
| WHO                       | -                         | GSTB          | TCBS                      |
| Donovan and Netten (1995) | APW                       | GSTB, SPB     | TCBS                      |
| Chatterjee et al. (1977)  | -                         | -             | STT                       |

\*APW = Alkaline Peptone Water, GSTB = Glucose Salt Teepol Broth, SPB = Salt Polymyxin Broth

\*\*TCBS = Thiosulfate Citrate Blie-salt Sucrose agar, VPSA = *Vibrio parahaemolyticus* Sucrose Agar, STT = Sucrose Tellurite Teepol agar



(a) *V. parahaemolyticus*(b) *V. cholerae*

### รูปที่ 3 เชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์ต่างๆบนอาหารแข็ง TCBS

#### 2.7.2 สารสำหรับคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

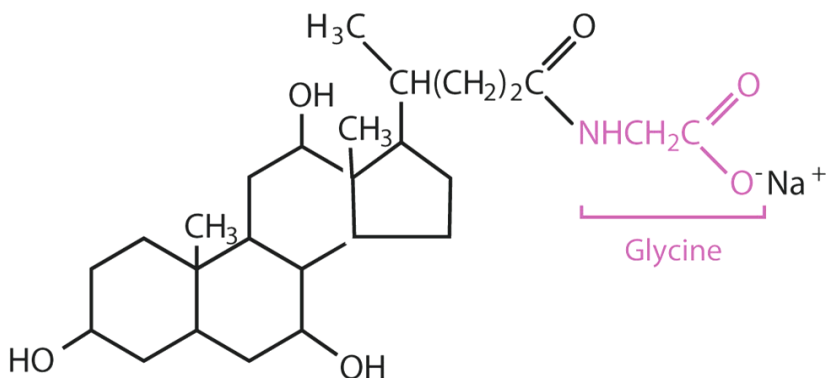
สารคัดเลือกเชื้อในทางจุลชีววิทยาถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ระบบคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ถูกนำมาใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมตรงข้ามกับแบคทีเรียที่ต้องการคัดเลือกจะถูกยับยั้งด้วยสารคัดเลือก อาหารที่คัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามที่อธิบายไว้ข้างต้นมี 5 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะมีชนิดและความเข้มข้นของสารคัดเลือกที่ต่างกัน ได้แก่ อาหาร GSTB มี methyl violet ปริมาณ 2 mg/L และ sodium lauryl sulfate ร้อยละ 0.1 ปริมาณ 4 mL/L อาหาร SPB มี polymyxin B sulfate ปริมาณ 6 mg/L อาหาร TCBS มี sodium citrate and ปริมาณ 10 g/L และ oxbile ปริมาณ 8 g/L อาหาร VPSA มี bile salt ปริมาณ 1.5 g/L และ อาหาร STT มี tellurite ร้อยละ 0.05 ปริมาณ 2.5 mL/L และ sodium lauryl sulfate ร้อยละ ปริมาณ 0.2 mL/L

#### - Bile salt และ oxbile

สาร bile salts ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยส่วนมากจะถูกนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยการทำลายผนังเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบสามารถทนต่อการกระทำดังกล่าวได้ (Entis, 2002) แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด (*E. coli*, *V. cholerae* และ *Campylobacter jejuni*)

สามารถกำจัดสาร bile salts จากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Thanassi et al., 1997; Lin et al., 2003; Chatterjee et al., 2004)

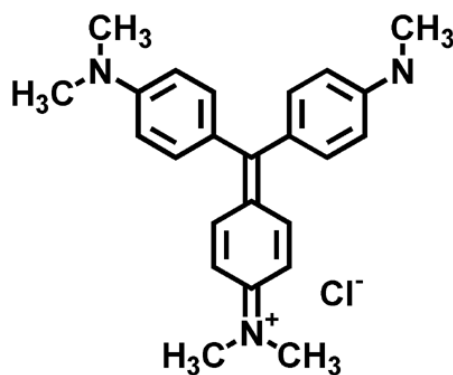
King และ Metzger (1968) รายงานว่า *E. coli* และ *Proteus mirabilis* สามารถยับยั้ง bile salts ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ได้ทั้งหมด และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Citrobacter* สามารถยับยั้ง bile salts ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เชื้อ *E. coli* จะถูกแยกออกมาจากถุงน้ำดีและน้ำดีของสัตว์และมนุษย์ (Onyekaba และ Njoku, 1986; Brook, 1989; Flores et al., 2003) เชื้อ *Salmonellae* มีประสิทธิภาพในการต่อต้านความเข้มข้นของน้ำดีได้ค่อนข้างสูง ความเข้มข้นของ oxbile หรือ oxgall ในระดับต่ำมีผลต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella typhi* ในช่วง stationary phase ประมาณร้อยละ 18 และ ร้อยละ 12 ตามลำดับ (Velkinburgh และ Gunn, 1999) อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารจะมีส่วนประกอบของ peptone เพื่อทดแทนผลของการยับยั้งจาก bile salts



รูปที่ 4 โครงสร้าง Bile salt (sodium glycochol) (ที่มา: Ball et al., 2013)

#### - Methyl violet

สาร methyl violet หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า crystal violet มักนำมาใช้ในการย้อมแกรม สารนี้จะทะลุผ่านผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ กลไกของสารนี้จะไปยับยั้งเซลล์ในระหว่างการแบ่งตัว (Walker et al., 1971) นอกจากนี้ Fry (1957) พบว่าการกระทำของสาร crystal violet ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการปรับเปลี่ยนการสังเคราะห์กรดอะมิโน ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญต่อได้

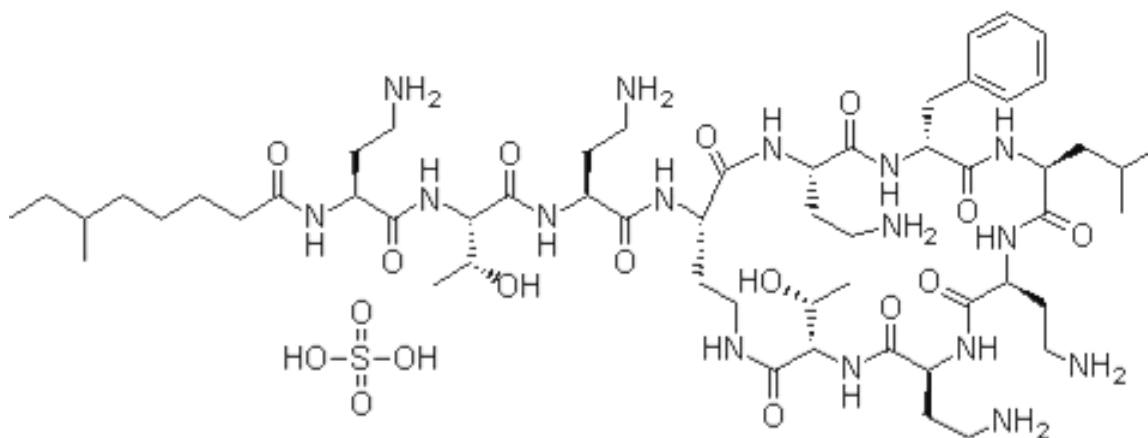


รูปที่ 5 โครงสร้าง Methyl violet (ที่มา: Frick, 2009)

#### - Polymyxin B sulfate

สาร Polymyxin เป็นกลุ่มของสาร antibiotic ซึ่งพบในปี ค.ศ.1940 โดยการผลิตเชื้อ *Bacillus polymyxa* (Arnold et al., 2007) บทบาทของสาร polymyxin B sulfate ต่อแบคทีเรียแกรมลบจะเชื่อมต่อกับ cytoplasm โดยเกิดปฏิกิริยาของ polymyxin B sulfate กับ lipo-polysaccharide (Alipour et al., 2008)

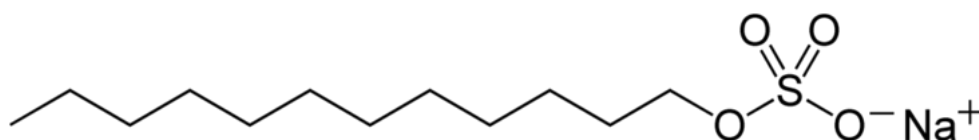
การรวมกันของสาร polymyxin B sulfate กับยาชนิดอื่นถูกค้นพบว่าเกิดผลกระทบกับแบคทีเรียก่อโรคร้อยย่มาก (Evans et al., 1999) สาร Polymyxin ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Vibrio* spp. และใช้เป็นสารในการคัดเลือกเชื้อจากอาหารทะเล (Oliver et al., 1992) การใช้สาร polymyxin ถูกแนะนำให้ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Hagen et al., 1994)



รูปที่ 6 โครงสร้าง Polymyxin B sulfate (ที่มา: Anonymous, 2009)

### - Sodium lauryl sulfate (teepol)

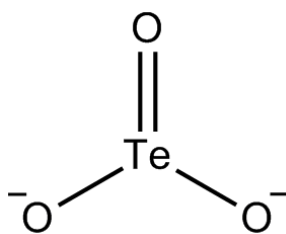
สาร Sodium Lauryl Sulfate มักเรียกชื่อในทางการค้าว่า teepol เป็นสารลดแรงตึงผิว แม้ว่าสารนี้จะใช้เป็นสารสำหรับทำความสะอาด แต่ยังถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อ Chun et al. (1974) เป็นคนแรกที่ใช้ teepol ในการพัฒนาการพิจารณาเชื้อ *V. parahaemolyticus*



รูปที่ 7 โครงสร้าง Sodium lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate) (ที่มา: Mills, 2013)

### - Tellurite

สาร Tellurite ( $\text{TeO}_3^{2-}$ ) เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียอย่างมาก เนื่องจากมีอำนาจในการเกิดปฏิกิริยา oxidation อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถต่อต้านสารดังกล่าวได้ แบคทีเรียก่อโรคจำนวนมากสามารถอยู่รอดจากสารนี้ได้โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง cellular thiols เช่น glutathione, หรือ methyltransferase-catalyzed reaction (Taylor, 1999).



รูปที่ 8 โครงสร้าง Tellurite (ที่มา: Wells, 2013)

## 2.8 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิค (PCR)

โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลสามารถทำได้โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อชนิดคัดเลือก (selective media) Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar และยืนยันผลด้วยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีหลายชนิด ซึ่งการทดสอบหรือแยกชนิด

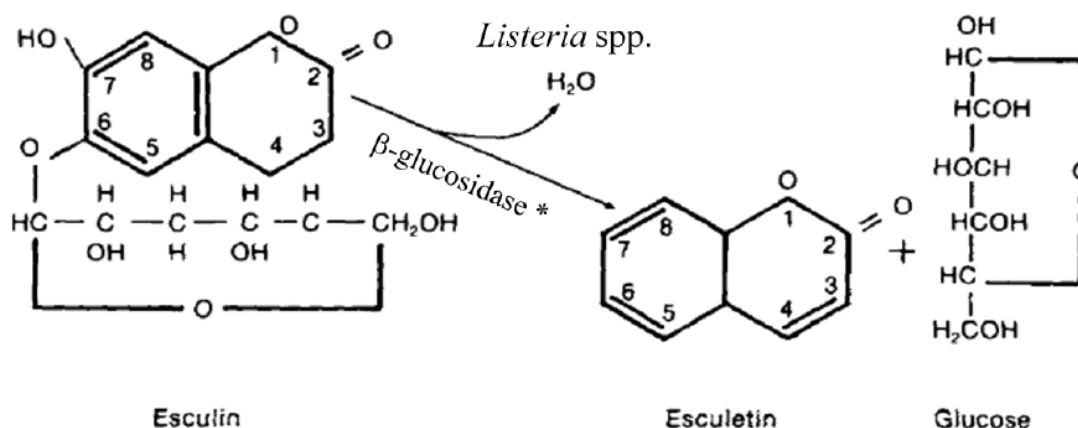
แบคทีเรียชนิดนี้ต้องใช้ระยะเวลา 3-5 วัน ในการทำปฏิกิริยาชีวเคมีและการรายงานผล (ISO/TS 21872) อย่างไรก็ตามนอกจาก *V. parahaemolyticus* ยังมีแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาที่คล้ายกัน จึงทำให้การตรวจสอบด้วยวิธีการดังกล่าวมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดได้ ในปัจจุบันจึงมีความสนใจหาวิธีการแก้ไขข้อผิดพลาดนี้โดยการนำวิธีทางด้านอนุพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจสอบ โดยเฉพาะการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและมีความจำเพาะสูง ซึ่งยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ตรวจและบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ ได้แก่ *toxR* (นาร์หัสการสร้าง transmembrane regulatory protein) (Kim et al., 1999) และ *tl* (thermolabile hemolysin gene) สำหรับยับยั้งความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้ยีน *tdh* (thermostable direct hemolysin gene) (Bej et al., 1999) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* กำหนดให้สร้าง thermostable direct hemolysin (TDH) เป็นโปรตีนก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxic) เกิดภาวะเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น เกิดภาวะเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร (enterotoxicity) และสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) (Humada et al., 2007) และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ O3:K6 เป็นสาเหตุการเกิดโรคจากการรับประทานอาหารทะเล ซึ่งเคยพบการระบาดไปทั่วโลกในปี พ.ศ. 2516-2541 เป็นสายพันธุ์ที่มียีน *tdh+* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วย (Okuda et al., 1997) แต่อย่างไรก็ตามด้วยเทคนิค PCR มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาแพง บางชิ้นส่วนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจระดับหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมขนาดกลางหรือเล็กอาจไม่สามารถดำเนินการดังกล่าวได้

## 2.9 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับ *V. parahaemolyticus*

ในปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ยังคงเป็นวิธีการวิเคราะห์แบบ conventional method ที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปลงในอาหาร selective agar เพื่อคัดแยกโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งโคโลนีที่เป็น *V. parahaemolyticus* จะมีสีเขียว ในการวิเคราะห์ผลเบื้องต้นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 วัน ทำให้ไม่สามารถแก้ปัญหาเชื้อที่มีโอกาสปนเปื้อนที่จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และสินค้าอาจถูกตีกลับเนื่องจากการปนเปื้อนเชื่อดังกล่าว ทำให้ต้องทำลายสินค้า lot ดังกล่าว เกิดการสูญเสียรายได้มูลค่าหลายล้านบาท ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการพัฒนาเทคนิคการ

วิเคราะห์ที่เป็นการใช้วิธีทางด้านอนุพันธุศาสตร์ (PCR) มาใช้ในการตรวจสอบ แต่เทคโนโลยีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องมืออุปกรณ์ที่มีความเฉพาะทาง และผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญระดับหนึ่งอีกทั้งอุตสาหกรรมในประเทศไทยในระดับกลางและเล็ก ตลอดจน SME อาจจะยังไม่สามารถที่จะมีเครื่องมือดังกล่าวได้ ดังนั้นผู้วิจัยนำเสนอวิธีการวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในรูปแบบใหม่ โดยเป็นการพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่มีการใช้อาหารเหลวจำเพาะเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเบื้องต้น ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น *Salmonella* spp. มีสูตรอาหารเหลวจำเพาะหลากหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกเซลล์โมเนลลาที่ดีขึ้นและยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆที่ไม่ใช่เซลล์โมเนลลาลง อาหารดังกล่าวแยกตัวอย่างแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่มหลัก ตามบทบาทของสารยับยั้ง (inhibitor) ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง คือกลุ่มที่มีสารยับยั้งคือ Malachite green และ  $MgCl_2$  ตัวอย่างเช่น อาหาร RappaportVassiliadis soy broth (RVS) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มี Selenite เป็นสารยับยั้ง เช่น selenite cystine broth (SC) และ MüllerKauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTn) (Taskila et al., 2012) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความจำเพาะและถูกต้องมากขึ้น แต่ยังคงกลุ่มสารยับยั้งหลักๆ ไว้ในสูตร อย่างไรก็ตามหลังจากบ่มในอาหารดังกล่าวแล้วจะต้องนำตัวอย่างไปเขียนบนอาหารแข็งจำเพาะ เพื่ออ่านผลการทดสอบในอีก 1 วันถัดมา ดังนั้นในการพัฒนาอาหารในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยอาศัยการวัดการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรานั้นๆ โดยวัดออกมาเป็นค่าต่างๆ อาทิเช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความขุ่น ค่าสี เป็นต้น (Shelef และ Firstenberg-Eden, 1997)

จากแนวคิดการใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปฏิกิริยาหนึ่งที่สำคัญในแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ซึ่งส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ก็คือปฏิกิริยาการใช้ esculin โดยปฏิกิริยาเกิดจากอาหารเหลวจำเพาะที่มีส่วนประกอบของ esculatin, ferric ammonium citrate, peptone ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของอาหารเหลวจำเพาะจากสีของอาหารเหลืองใสเป็นสีดำ เกิดจากการที่แบคทีเรียที่สามารถใช้ esculin ไปเป็น  $\beta$ -D-6, 7- dihydroxycoumarin (esculetin) และ glucose จากนั้น esculetin ทำปฏิกิริยากับ ferric ions ในอาหารเหลวจำเพาะเป็นผลให้เกิดเป็นสีดำ (van Netten, Perales, van de Moosdijk, Curtis, & Mossel, 1989) ดังแสดงการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีการใช้ esculin ด้วยเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่อยู่ในแบคทีเรีย

โดยปฏิกิริยานี้เกิดจากการเปลี่ยน esculin เป็น esculetin โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ทำให้อาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์ ferric ammonium citrate เปลี่ยนสี การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม ดังเช่นจากการวิจัยของ Shelef et al., (1998) ได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ ไลซีน อาร์จินีน และอนิทีน ของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียอื่นๆ ในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยอาศัยเครื่อง BioSys สำหรับวัดค่า Transmittance ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร โดยพบว่าสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงค่า Transmittance

## 2.10 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Hagen et al., 1994 ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Enrichment Broths 2 ชนิด สำหรับเลี้ยงเชื้อ *V.parahaemolyticus* คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Salt-polymyxin B Broth และ Alkaline Peptone Water สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V.parahaemolyticus* ในเนื้อปู หอยนางรม กุ้ง กุ้งก้ามกรามและหูลาหม พบว่า อาหารเลี้ยง

เชื้อ Alkaline Peptone Water มีประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์ *V.parahaemolyticus* ที่บาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปอาหารให้กลับคืนสู่สภาพปกติได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Salt – Polymyxin B Broth

Hara-Kudo et al., 2001 ได้ตรวจนับเชื้อ *V.parahaemolyticus* ในอาหารทะเล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic Agar พบว่าการนำอาหารทะเลมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ก่อนนำไปใส่ใน Selective medium เช่น Alkaline Peptone Salt หรือ Salt Polymyxin Broth จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจนับ และเป็นการซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บได้ดี

Abul Monsur (1961) ได้มีการนำสาร Tellurite มาใช้ในการพิจารณาเชื้อ *Vibrio* spp. เนื่องจากมียีนที่สามารถทนทานได้จากการค้นพบถัดมา (O'Brien และ Colwell, 1985; Jensen et al., 2013)

Entis, 2002 พบว่าสาร bile salts สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยการทำลายผนังเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรีย แกรมลบสามารถทนต่อการกระทำดังกล่าวได้

Oliver et al., 1992 ใช้สาร Polymyxin ในการตรวจสอบเชื้อ *Vibrio* spp. และใช้เป็นสารในการคัดเลือกเชื้อ จากอาหารทะเล



### บทที่ 3

#### วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพื่อให้ได้ชุดวิเคราะห์ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และลดเวลาการดำเนินงานจากวิธีการปกติ (conventional method) ซึ่งใช้เวลานาน 2 - 3 วัน ให้เหลือเพียง 1 วัน ทั้งนี้ขั้นตอนที่พัฒนาศึกษาเป็นขั้นตอนการบ่งชี้จำเพาะการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารสี Esculin hydrolysis โดยอาหารสีดังกล่าวมีการศึกษา wavelength ที่เหมาะสมในการตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีที่เป็นการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ร่วมกับอุปกรณ์ 96-well ไมโครเพลท นอกจากนี้ยังมีการศึกษาชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ โดยตัวยับยั้งที่ใช้ได้จากส่วนประกอบพื้นฐานในอาหารมาตรฐานที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบันเพื่อให้ได้สูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้แล้วอาหารสีที่ได้มีการพัฒนามีการนำไปทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์กับตัวอย่างอาหารจริง โดยรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานแสดงดังต่อไปนี้

### 3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

#### 3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

| Group                  | Organisms                      | Culture collection number |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Gram-negative bacteria | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | DMST 15285                |
|                        | <i>Vibrio cholerae</i>         | DMST 4279                 |
|                        | <i>Vibrio vulnificus</i>       | DMST 21245                |
|                        | <i>Vibrio fluvialis</i>        | DMST 19347                |
|                        | <i>Vibrio furnissii</i>        | DMST 21247                |
|                        | <i>Vibrio mimicus</i>          | DMST 29396                |
|                        | <i>Aerogenes hydrophila</i>    | DMST 21250                |
|                        | <i>Vibrio alginolyticus</i>    | DMST 14800                |
|                        | <i>Yersinia enterocolitica</i> | DMST 8012                 |

|                           |                               |            |
|---------------------------|-------------------------------|------------|
|                           | <i>Krebsiella pneumoniae</i>  | DMST 8216  |
|                           | <i>Proteus mirabilis</i>      | TISTR 100  |
|                           | <i>Providencia rettgeri</i>   | DMST 17137 |
|                           | <i>Serratia marcescens</i>    | DMST 8845  |
|                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | DMST 4739  |
|                           | <i>Enterobacter cloacae</i>   | DMST 19719 |
|                           | <i>Enterobacter aerogenes</i> | DMST 8216  |
|                           | <i>Escherichia coli</i>       | DMST 4609  |
| Gram-positive competitors | <i>Listeria monocytogenes</i> | DMST 17303 |
|                           | <i>Enterococcus faecalis</i>  | ATCC 29212 |
|                           | <i>Enterococcus avium</i>     | DMST 4159  |
|                           | <i>Staphylococcus aureus</i>  | TISTR 808  |
|                           | <i>Enterococcus faecium</i>   | DMST 4743  |
|                           | <i>Listeria innocua</i>       | DMST 9011  |
|                           | <i>Bacillus cereus</i>        | DMST 12126 |

### 3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 0.0001 g (Mettler Toledo Model AG204, Switzerland)
- เครื่องชั่ง 0.01 g (Mettler Toledo Model GG4002 - S, Switzerland)
- ตู้ปลอดเชื้อ (DWYER Series 0325, USA)
- ตู้เขย่าเชื้อ (New Brunswick Scientific, Enfield, CT)
- ตู้เย็น 4°C (Hitachi 35S I, Japan)
- ตู้บ่ม (Mettmert Model ULM500, Japan)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Becthai and Hirayama Model HA300D, Japan)
- Microplate reader (M965, Metertech, Taiwan)
- พีเอชมิเตอร์ (S220 SevenCompact™, Mettler Toledo)
- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)

- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Nylon syringe filter membrane (13 mm diameter, 0.45  $\mu$ m pore size, Filtrex, Thailand)
- Mechanical stepper (Biohit, Bohemia, NY, USA)

### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB, Lab M, UK)
- Trypticase soy agar (TSA, Lab M, UK)
- Peptic digest of animal tissue (USbiological, Salem, MA)
- Yeast extract (USbiological, Salem, MA)
- Esculin
- Ammonium ferric citrate
- D-glucose

### 3.1.4 น้ำตาลชนิดต่างๆ

- adonitol (Ourchem, China)
- arabinose (Ourchem, China)
- cellobiose (SCR, China)
- D-dextrose (Merck, Germany)
- Ducitol (Ourchem, China)
- D-(-)-fructose (Sigma-Aldrich, Singapore)
- D-(+)-galactose (SCR, China)
- Inositol (SCR, China)
- alpha-D-lactose (Acros Organics, Fair Lawn, NJ)
- maltose monohydrate (SCR, China)
- mannitol (USbiological, Salem, MA)
- mannose (SCR, China)

- D-(+)-melibiose (Aladdin, China)
- rhamnose (SCR, China)
- D-(-)-salicin (Acros Organics, Fair Lawn, NJ)
- D-sorbitol (Sigma-Aldrich, Singapore)
- sucrose (Merck, Germany)
- trehalose (Ourchem, China)
- D-(+)-xylose (Acros Organics, Fair Lawn, NJ)

### 3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

#### 3.2.1 การทำ frozen stocks

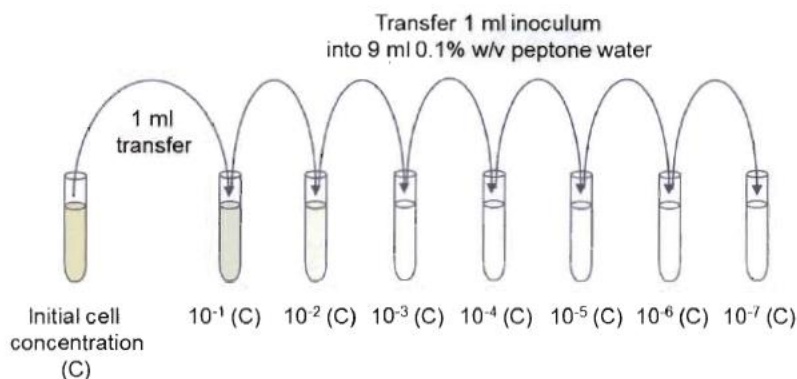
เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Thailand) ถูก streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเชื้อเดี่ยวดังกล่าวจะถูกถ่ายลงด้วยลูปในอาหาร tryptic soy broth (TSB) ปริมาณ 100 ml และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนทำการแช่แข็ง เชื้อ inoculum ถูกผสมอย่างดีกับกลีเซอรอลจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 – 15% (v/v) ปริมาณ 1.5 ml ของส่วนผสมเชื้อและกลีเซอรอลถูกบรรจุลงใน Eppendorf และเก็บรักษาที่ -20°C

#### 3.2.2 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จาก frozen stock ถูกทำให้เพิ่มจำนวนใน 100 ml ของ TSB ในขวดลูกผสมพูนขนาด 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 preparation

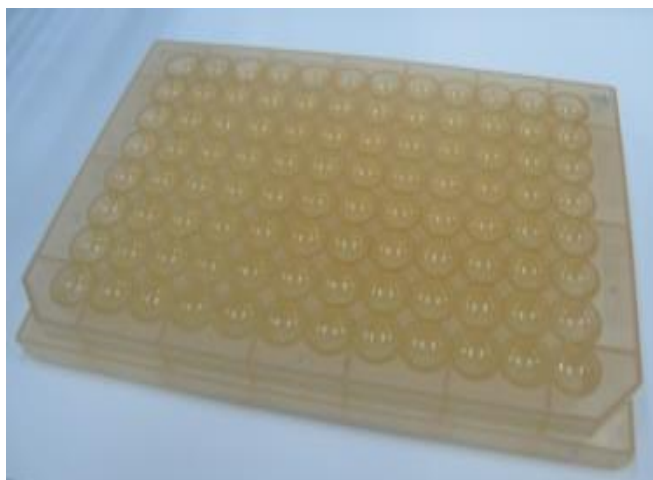
1 ลูบของแต่ละโคโลนีที่อยู่บนอาหาร TSA ถูกนำไปใส่ในอาหาร TSB ปริมาตร 10 ml ที่บรรจุในหลอดทนความร้อนสามารถฆ่าเชื้อได้และทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการ ทำการเจือจางเชื้อที่ 10 เท่า ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% w/v ปริมาณเชื้อถูกวัดด้วยเทคนิค spread plate



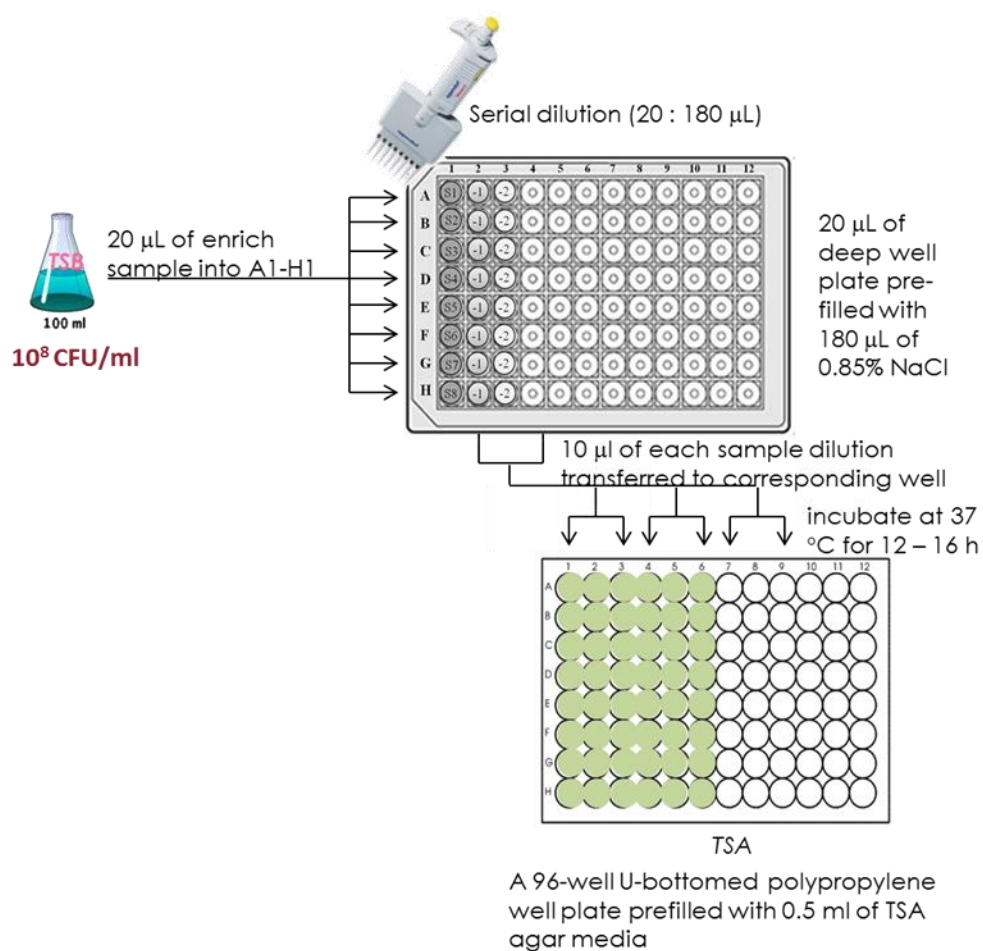
รูปที่ 3.1 Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า

### 3.2.4 เทคนิคการหาปริมาณเชื้อ

ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค MDPT ที่ปริมาณเชื้อ  $8 - 9 \log \text{CFU/ml}$  ถูกทำการเจือจาง ( $10^{-1} - 10^{-5}$ ) โดยปิเปตตัวอย่าง  $20 \mu\text{l}$  ลงใน 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ในแต่ละ well มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% สำหรับเชื้อแบคทีเรียทั่วไป (i.e., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*) และน้ำเกลือความเข้มข้น 3% สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอาหารทะเลจำนวน  $180 \mu\text{l}$  จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วย Multichannel pipette สำหรับการเตรียมเพลทอาหาร TSA โดยใช้แผ่น 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ได้มีการฆ่าเชื้อแล้วถูกเติมด้วยอาหาร TSA ซึ่งในแต่ละ well ของเพลทมีปริมาตรของ TSA ประมาณ 0.5 ml (รูปที่ 3.1) ปริมาตรเชื้อของแต่ละ dilution ที่  $10 \mu\text{l}$  ถูก drop ลงบนอาหาร TSA เพลทดังกล่าวถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีถูกนับในรูปแบบ  $\log \text{CFU/ml}$



รูปที่ 3.2 แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA

### 3.3 การศึกษาพัฒนาอาหาร ESC ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry)

#### 3.3.1 การเตรียมอาหาร

อาหารเหลวเอสคิวรินไฮโรไลซิสที่ใช้ในการทดลอง พัฒนามาจากสูตรอาหารพื้นฐาน Palcam broth ซึ่งเป็นสูตรอาหารเพิ่มจำนวนที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย *L. monocytogenes* โดยองค์ประกอบของสูตรอาหารประกอบด้วย Peptic digest of animal tissue 20 g/l, yeast extract 5 g/l, D-glucose 1 g/l, esculin 0.8 g/l, ferric ammonium citrate 0.5 g/l อาหารถูกปรับเป็นที่กลาง (pH 7) โดยการใช้ 1 N ของ HCl โดยการใช้ pH/Ion meter กับ pH electrode อาหารที่ pH 7 ปราศจาก inoculation ของเชื้อเป็น blank โดยอาหารทั้งหมดถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter เมมเบรนที่เป็นไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และมี pore size ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  ก่อนการใช้งาน

#### 3.3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร

ปริมาณของอาหาร ESC ที่มีการปรับ pH ที่แตกต่างกันปริมาณ 180  $\mu\text{l}$  ถูกบรรจุลงใน 96 – well flat bottom microplate โดยการใช้ multi - channel pipette ทำการเติมสารละลาย suspension ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปริมาณ  $10^2$  -  $10^3$  CFU/ml ลงในอาหารเหลวดังกล่าว จากนั้นนำไปบ่มด้วยตุ้มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตัวอย่างทั้งหมดจะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ wavelength ดังต่อไปนี้ 340, 405, 450, 490, 550, 590, 600, และ 650 นาโนเมตร ค่าการสแกนที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของอาหารเหลวที่มีการ inoculation ของเชื้อจะถูกลบออกจากค่าการสแกนที่ reference (pH 7) ที่เป็นตัวอย่างควบคุมไม่มีการเติมเชื้อ เพื่อให้ได้ผลต่างค่าการดูดกลืนแสง สำหรับที่ค่าการดูดกลืนที่ให้ค่าความแตกต่างของตัวอย่างที่เป็น positive (+) กับตัวอย่างควบคุมสูงที่สุด ที่ wavelength ดังกล่าวจะถูกเลือกให้เป็น wavelength ที่จะถูกใช้ในการทดลองตลอดการศึกษาของอาหาร ESC ต่อไป

### 3.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลว ESC ที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และเชื้อแบคทีเรียแข่งขันอื่น ๆ

อาหารเหลว ESC ที่ใช้ในการทดลอง ถูกเตรียมด้วย Peptic digest of animal tissue 20 g/l, yeast extract 5 g/l, D-glucose 1 g/l, esculin 0.8 g/l, ferric ammonium citrate 0.5 g/l จากนั้นอาหารถูกปรับเป็นกลางที่ (pH 7) โดยการใช้ 1 N ของ HCl และ 1 N ของ NaOH โดยการใช้ pH/Ion meter กับ pH electrode อาหารทั้งหมด

ถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter เมมเบรนที่เป็นไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และมี pore size ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  ก่อนการใช้งาน โดยในแต่ละ well ของ 96-microwell plate ถูกเติมด้วย 180  $\mu\text{l}$  ของอาหารเหลว ESC ปริมาณเชื้อ 20  $\mu\text{l}$  ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 2 log CFU/ml ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือเชื้อแข่งขันอื่นถูก inoculation ลงในไมโครเพลทดังกล่าว นำเพลทไปทำการบ่มภายใต้อุณหภูมิ stationary ที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ในระหว่างการบ่มเพลทดังกล่าวถูกนำออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 3 ชั่วโมงที่ wavelength 450 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อใดๆ

### 3.5 การประเมินอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *V. parahaemolyticus*

#### 3.5.1 การศึกษาผลของตัวยับยั้งมาตรฐานที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองจำนวน 24 ชนิดที่ความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้น  $10^2 - 10^3$  CFU/ml ในแต่ละเชื้อปริมาณ 0.2 ml ถูกใส่เชื้อลงใน 1.8 ml ของอาหารเหลวจำเพาะ ESC มาตรฐาน 5 ชนิด ดังนี้ Glucose Salt Teepol Broth (GSTB), Salt Polymyxin Broth (SPB), Thiosulfate Citrate Blie-salt Sucrose agar (TCBS), *Vibrio parahaemolyticus* Sucrose Agar (VPSA), และ Sucrose Tellurite Teepol agar (STT) การบ่มของตัวอย่างถูกดำเนินการใน 96-well microplate ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุมเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมตัวยับยั้งใดๆ การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 450 นาโนเมตร และตัวอย่างควบคุมถูกวัดโดยไมโครเพลทรีดเดอร์ที่มีการใช้น้ำกลั่นเป็น blank การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ถูกอธิบายเป็นผลบวก (+),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $> A_{450}$  ควบคุม; ผลลบ (-),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $\leq A_{450}$  ควบคุม

#### 3.5.2 การศึกษาผลของตัวยับยั้งเดี่ยวที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

อาหาร ESC ร่วมกับสารยับยั้งเดี่ยวที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น laurylsulfate, 0.5x, 0.75x, 1x; colistin, 0.5x, 0.75x, 1x; oxbile, 0.5x, 0.75x, 1x; bile, 0.5x, 0.75x, 1x; tellurite, 0.5x, 0.75x, 1x; citrate; 0.5x, 0.75x, 1x; Polymyxin B, 0.5x, 0.75x, 1x ถูกเตรียมและปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเป็น pH 7 และเมื่อนั้นทำการนำเชื้อก่อนการใช้งาน โดยในแต่ละ well ของ 96-microwell plate ถูกเติมด้วย 180  $\mu\text{l}$  ของอาหารที่มีตัวยับยั้งที่แตกต่างกันและในแต่ละปริมาณเชื้อที่ใช้ 20  $\mu\text{l}$  ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU/ml ของเชื้อ *V.*



*parahaemolyticus* หรือเชื้อแข่งขันอื่น ไมโครเพลทถูกทำการบ่มภายใต้อุณหภูมิ stationary ที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุมเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมตัวยับยั้งใดๆ หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 450 นาโนเมตรและตัวอย่างควบคุมถูกวัดโดยไมโครเพลทรีดเดอร์ที่มีการใช้น้ำกลั่นเป็น blank การเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกอธิบายเป็นผลบวก (+),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $> A_{450}$  ควบคุม; ผลลบ (-),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $\leq A_{450}$  ควบคุม

### 3.5.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ESC ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ

อาหาร ESC ถูกเตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 3, 6, 8, และ 10 %w/v และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ESC ที่ระดับ 7, 8, 9, และ 10 โดยใช้ 1 N ของ HCl และ 1 N ของ NaOH โดยใช้ pH/Ion meter กับ pH electrode อาหารทั้งหมดถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter เมมเบรนที่เป็นไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และมี pore size ขนาด 0.22  $\mu$ m ก่อนการใช้งาน โดยในแต่ละ well ของ 96-microwell plate ถูกเติมด้วย 180  $\mu$ l ของอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน และในแต่ละปริมาณเชื้อที่ใช้ 20  $\mu$ l ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU/ml ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือเชื้อแข่งขันอื่น ไมโครเพลทถูกทำการบ่มภายใต้อุณหภูมิ stationary ที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุมเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมตัวยับยั้งใดๆ หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 450 นาโนเมตรและตัวอย่างควบคุมถูกวัดโดยไมโครเพลทรีดเดอร์ที่มีการใช้น้ำกลั่นเป็น blank การเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกอธิบายเป็นผลบวก (+),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $> A_{450}$  ควบคุม; ผลลบ (-),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $\leq A_{450}$  ควบคุม

### 3.6 การพัฒนาอาหารเหลวจำเพาะ ESC เพื่อเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

อาหารเหลว ESC ถูกเตรียมด้วยการผสม 0.8 g/L ของ esculin กับส่วนประกอบอื่นๆ เช่น peptic digest of animal tissue 20 g/L, D-glucose 1 g/L, yeast extract 5 g/L, และเฟอรัริกแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 g/L การทดลองเดียวกันถูกดำเนินการด้วยการแทนที่น้ำตาล D-glucose ด้วยคาร์โบไฮเดรตต่างชนิดกันจำนวน 18 ชนิด เช่น อะโดนิทอล, อะราบีโนส, เซลโลไบโอส, เด็กซ์โตรส, ดูซิทอล, ฟรุคโตส, กาแลคโตส, อินโนซิทอล, แลคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แมนโนส, เมลิไบโอส, แรมโนส, ซาลิซิน, ซอร์บิทอล, ซูโครส, ทรี

ฮาโลสและไซโลส โดยปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ใช้แต่ละชนิดเป็น 1 g/L สำหรับอาหารที่ควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมคาร์โบไฮเดรต ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ESC ที่ระดับ 7 โดยการ ใช้ 1 N ของ HCl และ 1 N ของ NaOH โดยการใช้ pH/Ion meter กับ pH electrode อาหารทั้งหมดถูกทำให้ ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter เมมเบรนที่เป็นไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และมี pore size ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  ก่อนการใช้งาน โดยในแต่ละ well ของ 96-microwell plate ถูกเติมด้วย 180  $\mu\text{l}$  ของ อาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกันและปริมาณเชื้อ 20  $\mu\text{l}$  ของ *V. parahaemolyticus* ที่ความหนาแน่นของเซลล์ เริ่มต้น 2 log CFU/ml ถูก inoculation ลงในอาหารที่เตรียม จากนั้นเพลทถูกนำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ stationary ที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุมเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมตัวยับยั้ง ใดๆ หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 450 นาโนเมตรและตัวอย่างควบคุม ถูกวัดโดยไมโครเพลทรีดเดอร์ที่มีการใช้น้ำกลั่นเป็น blank การเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกอธิบายเป็น ผลบวก (+),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $> A_{450}$  ควบคุม; ผลลบ (-),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $\leq A_{450}$  ควบคุม

### 3.7 การศึกษา detection limit ของอาหารเหลวจำเพาะ ESC

ปริมาณเซลล์ 20  $\mu\text{l}$  ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* 0.01-8 log CFU/ml ถูกบ่มใน 180  $\mu\text{l}$  ของอาหารเหลว บ่งชี้เบื้องต้น ESC ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 ที่ได้จากการศึกษาใน หัวข้อ 3.5.3 ใน 96-well microplate การใส่เชื้อลงในอาหารเหลวจำเพาะ ESC ถูกประเมินประสิทธิภาพด้วย การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงด้วย ( $A_{450}$ ) ในระหว่างการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  ตัวอย่างควบคุมเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อใดๆ หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง การวัดค่าการ ดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 450 นาโนเมตรและตัวอย่างควบคุมถูกวัดโดยไมโครเพลทรีดเดอร์ที่มีการใช้น้ำ กลั่นเป็น blank การเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกอธิบายเป็นผลบวก (+),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $> A_{450}$  ควบคุม; ผล ลบ (-),  $A_{450}$  ตัวอย่าง  $\leq A_{450}$  ควบคุม

### 3.8 การทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเหลว จำเพาะกับตัวอย่างอาหารทะเล

ในการทดลองตัวอย่างกุ้ง ปู หอยนางรมและน้ำทะเล ถูกนำมาใช้ในการศึกษาประเมินประสิทธิภาพ ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์ด้วย

วิธีการที่เป็นมาตรฐานตาม BAM, 2002 เพื่อให้ได้ผลที่เป็น reference นอกจากนี้ตัวอย่างอาหารจริงยังได้ถูกนำไปทดสอบกับอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* ซึ่งเป็นอาหาร Chromogenic ที่ได้รับความนิยมในการนำมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และมีรายงานพบว่าอาหารดังกล่าวให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องน่าเชื่อถือกว่าการใช้อาหาร TCBS ที่เป็น selective agar จากเทคนิควิธีการที่เป็นมาตรฐาน (Di Pinto et al., 2011) ในการทดลองตัวอย่างอาหาร 25 กรัมที่มีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติจะมีการ spiked ด้วย 1 ml ของ *V. parahaemolyticus* ที่ 1 log CFU/ml

### 3.8.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร (Food sample)

อาหารเหลวไม่จำเพาะที่เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง Alkaline Peptone Water (APW) ปริมาณ 225 ml ถูกเติมลงในตัวอย่างปริมาณ 25 กรัมแล้วจึง homogenized ด้วย stomacher (Interscience, 400 VM, Saint Nom, France) เป็นเวลา 10 วินาทีที่ high speed

### 3.8.2 การดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะ

ตัวอย่างที่ pre-enriched ด้วย APW ปริมาณ 20  $\mu$ l ถูกนำมาใส่ในอาหารที่พัฒนาปริมาณ 180  $\mu$ l ของอาหารเหลว ESC ที่อยู่ใน sterile 96-deep well microplate ตัวอย่างทั้งหมดถูกบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะทำการวัดด้วยไมโครเพลทโดยก่อนวัดตัวอย่างจะถูกเขย่าที่ความถี่ 14 Hz เป็นเวลา 5 วินาทีเพื่อที่จะ disperse เซลล์ในตัวอย่างก่อนทำการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร และใช้น้ำกลั่นเป็น blank ทุกการทดลองถูกดำเนินการ 3 ซ้ำ

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

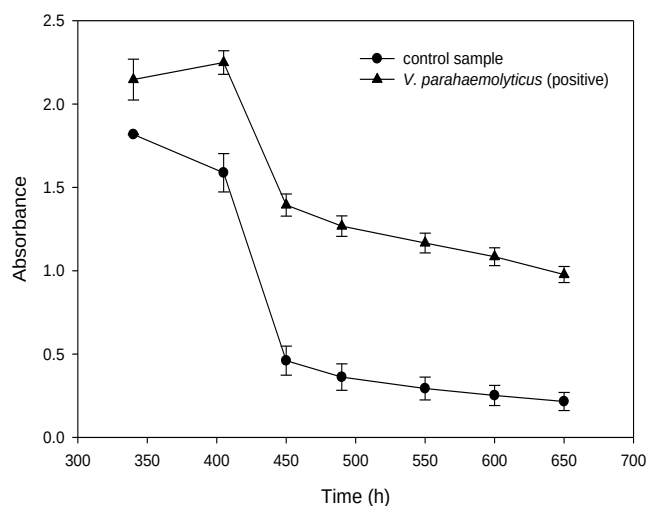
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective pre-enrichment) ที่เป็นการประยุกต์ใช้อาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนาจากการใช้ esculin เพื่อคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่เดียวกันมีการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวได้ โดยปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนของตัวอย่างที่เป็น positive (+) กับตัวอย่างควบคุมสูงที่สุดด้วยการเพาะเชื้อระดับเล็ก (micro-scale) โดยการใช้อุปกรณ์ 96-microplate ทั้งนี้อาหารเหลวจำเพาะ ESC ได้มีการศึกษาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันของ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เหมาะสม ที่สามารถจำแนก *V. parahaemolyticus* และแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ได้โดยอาศัยการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนสีของอาหารและพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยการแทนที่ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ นอกจากนี้ อาหารเหลวจำเพาะ ESC ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจ detection ด้วยการนำไปทดสอบกับตัวอย่างจริง ดังแสดงผลต่อไปนี้

#### 4.1 การศึกษาพัฒนาอาหาร ESC ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry)

ในอดีตที่ผ่านมาการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ประกอบด้วยขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลว APW เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัวอย่างอาหารดังกล่าวจะถูกนำไป streak บนอาหารแข็งที่เป็น TCBS แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้านบนเพลทอาหารแข็งปรากฏโคโลนีสีเขียว แสดงว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *V. parahaemolyticus* การวิเคราะห์ดังกล่าวใช้เวลาอย่างน้อย 2 วัน ซึ่งใช้เวลานาน (Kaysner และ DePaola, 2004; Ministry of Health, Labor และ Welfare, 2004) ไม่ทันกับความต้องการของโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องการผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว เพื่อใช้ในการตัดสินใจปล่อยสินค้าให้กับลูกค้าและนอกจากนี้ในการใช้เวลานานจากการรอผลการวิเคราะห์ทำให้โรงงานอุตสาหกรรมต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บสินค้าคงคลัง ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเสนอรูปแบบการวิเคราะห์แบบใหม่โดยในขั้นตอนแรกเป็นการ

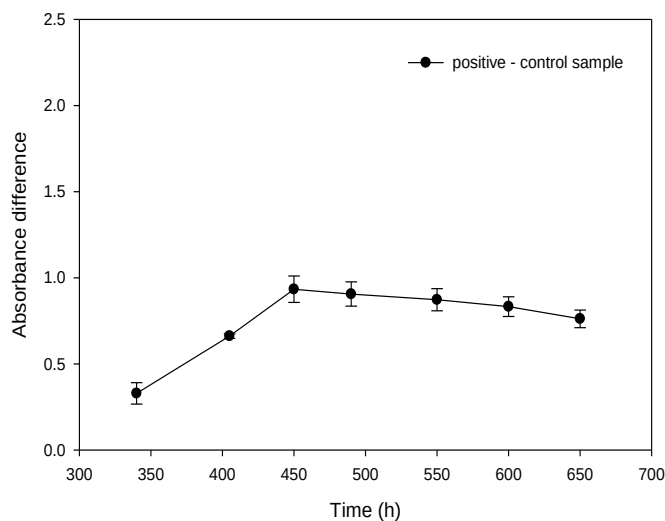
เพิ่มจำนวนเซลล์ของตัวอย่างอาหารในอาหารเหลวบ่งชี้สี ซึ่งอาหารเหลวบ่งชี้ที่ใช้ในการทดลองเป็นสูตรอาหารบ่งชี้จากปฏิกิริยาเคมี Esculin hydrolysis (ESC) โดยปกติปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่อยู่ในขั้นตอนการยืนยันผล (confirmation) ของการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ทั้งนี้ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงประยุกต์นำปฏิกิริยาที่มีเบสส่วนผสมอาหารในการเพิ่มจำนวนเช่นเดียวกับสูตรส่วนผสมของ APW มาใช้ในขั้นตอนแรกที่เป็นการเพิ่มจำนวนซึ่งถ้าอาหารเหลวจำเพาะมีการเปลี่ยนสีสามารถบ่งบอกมีความเป็นไปได้ที่จะมีการปนเปื้อนของเชื้อ งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาการวิเคราะห์ขนาดเล็กระดับ microscale แต่ให้ผลวิเคราะห์ที่เร็ว ชัดเจน และค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ในขั้นตอน enrichment step โดยมีการตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวระหว่างการเกิดปฏิกิริยา ESC โดยเป็นการใช้ micro-cultivation (200  $\mu$ l broth ใน 96-well microplate) และกิจกรรมของปฏิกิริยา ESC มีการติดตามด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader) ซึ่งในระหว่างที่ทำการวัดตัวอย่าง ตัวอย่างจะมีการเขย่าภายในเครื่องด้วยระบบ shaker เพื่อให้ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (uniform) ระหว่างที่ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง

การหาค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม สำหรับการตรวจติดตามปฏิกิริยา ESC บนพื้นฐานของการใช้สับสเตรท esculin เป็น esculatin เมื่อนั้น esculatin ทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate อาหารเหลวบ่งชี้จะกลายเป็นสีดำ ในการศึกษา ESC ถูกขยายการศึกษาโดยใช้ microplate assay ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้ microplate reader ในการทดลองเลือก wavelength ที่เหมาะสม ปริมาณสารที่เตรียมจำนวน 200  $\mu$ l ถูกบรรจุลงในแต่ละ well ของ 96-well flat bottom microplate ค่าการดูดกลืนแสงของ media ที่ wavelength 340, 405, 450, 490, 550, 590, 600, และ 650 nm ได้จากเครื่อง microplate reader ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารที่มีการ inoculation ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* หักออกกับค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการ inoculation เพื่อให้ได้ค่าความแตกต่าง โดยการใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 7



รูปที่ 4.1 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร ESC ที่มีการ inoculation ด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ให้ผลบวก) กับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

จากกราฟรูปที่ 4.1 จะเห็นว่าอาหารเหลว ESC ที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่แต่ละ wavelength ต่างๆ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน ทั้งนี้กราฟของตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเชื้อก็แสดงผลในลักษณะเช่นเดียวกัน โดยตัวอย่างที่มีเชื้อหลังจาก 24 ชั่วโมงสีของอาหารจะเป็นสีดำของ ferric ammonium citrate ในขณะที่สีของตัวอย่างอาหารควบคุมมีลักษณะเป็นสีเหลืองใส ดังนั้นลักษณะกราฟที่ได้ในรูปที่ 4.1 จึงแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยทั้งนี้จากกราฟในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 450 – 650 นาโนเมตร แสดงช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างแตกต่างกันอย่างชัดเจน เทคนิคการตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วยการใช้หลักการสเปกโตรโฟโตเมทรีมีปรากฏให้เห็นในงานวิจัยที่หลากหลาย ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมาก แทนที่จะตรวจติดตามด้วยการใช้สายตาแต่เปลี่ยนมาเป็นการตรวจติดตามด้วยเครื่องมือวัดไมโครเพลทรีดเดอร์ซึ่งจำเป็นต้องทราบค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการใช้วัดปฏิกิริยาดังกล่าว โดย criteria ในการเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจติดตามปฏิกิริยา ค่าความแตกต่างของตัวอย่างที่เป็น positive (ตัวอย่างที่มีการ inoculation ของเชื้อ) กับตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างไม่มีการ inoculation) ควรจะให้ค่าสูงที่สุด ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการพล็อตกราฟข้อมูลดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 4.2



**รูปที่ 4.2** กราฟค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร ESC ที่มีการ inoculation ด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ให้ผลบวก) กับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

จากกราฟรูปที่ 4.2 เราใช้ค่าความแตกต่างเป็น criterion เพื่อตัดสินใจเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจติดตามปฏิกิริยา จากกราฟรูปที่ 4.2 พบว่าที่ความยาวคลื่น 450 nm ให้ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คุณสมบัตินี้เป็นประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์และแยกความแตกต่างของเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเหลวและสามารถใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวได้ และผลการทดลองของปฏิกิริยา ESC ให้ผลเป็น positive ดังนั้นค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร  $A_{450}$  ของตัวอย่างที่มีเชื้อ – ตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ inoculation ของเชื้อซึ่งมี pH 7 ถูกใช้ในการติดตามปฏิกิริยาของ ESC ในแบคทีเรียกับการลดขนาดการวิเคราะห์ในระดับ microscale ที่ได้ทำการวัด optical measurement บนพื้นฐานของ pH changes ที่เหมือนกัน Onal และ Frigi (2013) ใช้ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ล้ำสมัยในการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometric assay (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm) สำหรับปฏิกิริยาการใช้ยูเรียในแบคทีเรีย วิธีเหล่านี้มีความถูกต้องในการตัดสินใจปฏิกิริยาของการใช้ยูเรียที่เป็น positive และ negative ในชนิดของตัวอย่างที่แตกต่างกันกว่าการใช้ Nessler method

## 4.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลว ESC ที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และเชื้อแบคทีเรียแข่งขันอื่น ๆ

### 4.2.1 รูปภาพ microwell ของอาหาร ESC ที่เวลาการบ่มต่าง ๆ

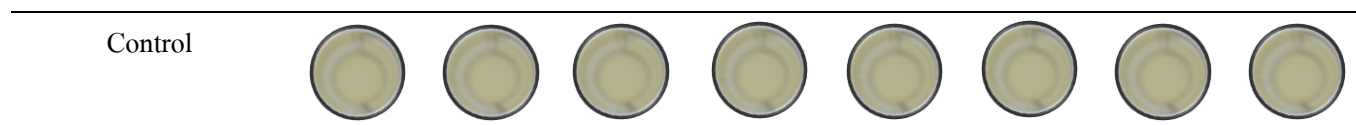
การตรวจวัดด้วยสายตาของปฏิกิริยา ESC ใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์เป้าหมายที่ต้องการศึกษา โดยแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแข่งขันที่สามารถใช้สาร esculin ได้เช่นกัน ในขณะที่ *Salmonella* Anatum ไม่สามารถใช้ esculin ได้ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาอยู่ที่  $10^2$  CFU/ml โดยการติดตามของปฏิกิริยาดังกล่าว ดำเนินการภายใต้ modified media 96 – microwell plate ในการทดลองเราใช้ 200  $\mu$ l ของ culture broth ในแต่ละ microwell และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เราสามารถ detect กิจกรรมความสามารถในการใช้ esculin ได้ภายใน 8 ชั่วโมง หลังจากทำการบ่ม esculin ถูกลดลงเป็น esculetin ก่อนเกิดปฏิกิริยาร่วมกับ ferric ammonium citrate (Swan, 1954; Wasilauskas, 1971) ดังนั้นใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมง เพื่อแสดงให้เห็นสีที่เปลี่ยนไปอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.3) ที่เวลาการบ่มต่าง ๆ ตัวอย่างถูกนำออกมาถ่ายภาพด้วยกล้องกำลังขยาย Dino ในแต่ละ well เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.3) โดยการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาดังกล่าวจะพิจารณาควบคู่กับกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่าง ๆ เพื่อให้เห็นความสัมพันธ์ควบคู่กัน

### ตารางที่ 4.1 แสดง profile ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้ ESC ที่เวลาการบ่มต่างๆ ของเชื้อ *V.*

*parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, และ *S. Anatum* โดยเป็นการบ่มที่เวลาต่างๆ ในระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมงด้วยระบบไมโครคัลทิเวชัน (Micro cultivation) โดยในแต่ละอาหาร จะทำการเติมเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกิริยา (+) และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา (-)

| Test strains                      | เวลา (ชั่วโมง)                                                                      |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |                                                                                       |                                                                                       |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | 0                                                                                   | 8                                                                                   | 12                                                                                  | 16                                                                                  | 20                                                                                    | 24                                                                                    | 36                                                                                    | 48                                                                                    |
| <i>V. parahaemolyticus</i><br>(+) |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>L. monocytogenes</i><br>(+)    |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>S. Anatum</i><br>(-)           |  |  |  |  |  |  |  |  |

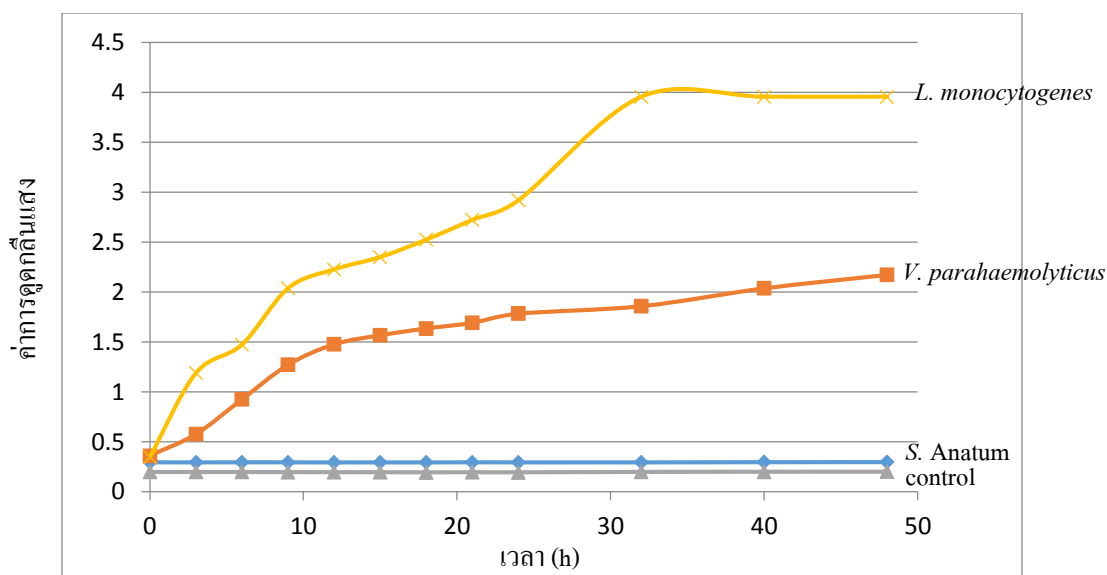




จากตารางที่ 4.1 แสดงสีของอาหารเหลวที่มีเชื้อใน microwells ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากทำการบ่มด้วยเชื้อที่สามารถ metabolise ซับสเตรท esculin ได้ (*V. parahaemolyticus* และ *L. monocytogenes*) และไม่สามารถใช้ esculin ได้ เช่น *S. Anatum* โดยจะเห็นว่า microwell ของเชื้อ *L. monocytogenes* จะให้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้ signal ของอาหารเหลวสีจางมากที่สุด ซึ่งโดยปกติแล้วอาหารเหลวจำเพาะ ESC ถูกใช้ในการตรวจ detect เชื้อก่อโรค *L. monocytogenes* ซึ่งเชื่อดังกล่าวมีความจำเพาะกับปฏิกิริยาค่อนข้างสูง ซึ่งจะเห็นว่าที่เวลา 8 ชั่วโมง สามารถเห็นสีของอาหารได้อย่างชัดเจนและสีของอาหารเริ่มที่จะคงที่ที่เวลา 16 – 24 ชั่วโมง สำหรับการเกิดปฏิกิริยา ESC ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อเวลาการบ่มผ่านไป จะปรากฏการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาโดยที่เวลาที่ 0 ชั่วโมง ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารจำเพาะ เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมงถึงเริ่มที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นอาหารเหลวจำเพาะดังกล่าวยังต้องมีการปรับปรุงพัฒนาเพื่อเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อ *S. Anatum* อาหารเหลวสียังคงเป็นสีเดิมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา ดังนั้นอาหารเหลวจึงยังคงมีสีใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้มีการ inoculation ของเชื้อ จากปฏิกิริยา ESC ที่นำเสนอแสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแยกแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ (ESC-positive) ออกจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ (ESC-negative)

#### 4.2.2 กราฟ profile ของการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงอาหาร ESC ที่เวลาการบ่มต่าง ๆ

ในการติดตามปฏิกิริยาของการเกิด ESC นอกจากเป็นการตรวจ detect ด้วยการใส่ยาตาแล้ว ยังมีการตรวจติดตามด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคการวัดสเปกโตรโฟโตเมตรี ดังแสดงในรูปที่ 4.3

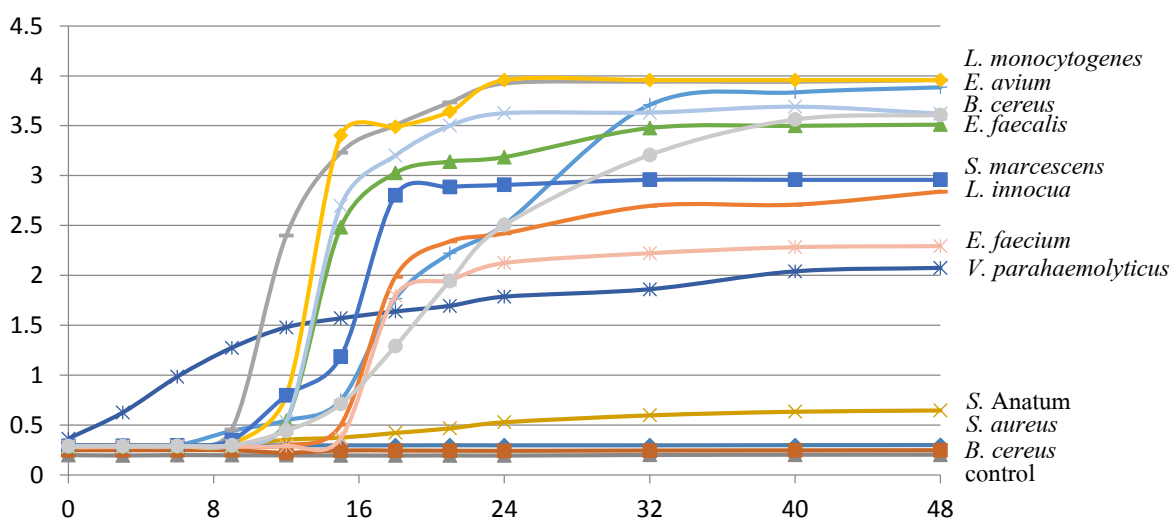


**รูปที่ 4.3** แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจำเพาะ ESC ในระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมงด้วยระบบไมโครคัลทิเวชัน (Micro cultivation) โดยในแต่ละอาหารจะทำการเติมเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกิริยา (+) และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา (-)

จากกราฟรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่มีการ inoculation ของเชื้อ *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, และ *S. Anatum* จากกราฟจะเห็นว่า เชื้อ *L. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* ให้แนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้นเมื่อเวลาการบ่มผ่านไป โดยเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่อาหารเหลวที่มีการ inoculation ด้วยเชื้อ *S. Anatum* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้มีการ inoculation ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อทั้ง 3 ดังกล่าว สอดคล้องกับรูป profile การเกิดปฏิกิริยา ESC ที่ปรากฏใน microwell ที่เวลาการบ่มต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนั้นการตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการดำเนินงานวิจัยต่อไปในการศึกษาปฏิกิริยาที่พารามิเตอร์ต่างๆ

#### 4.2.3 การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลว ESC ที่มีต่อเชื้อ *V.parahaemolyticus* และเชื้อแบคทีเรียแข่งขันอื่น ๆ

การตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีของปฏิกิริยา ESC ใน *V. parahaemolyticus* และ non - *V. parahaemolyticus* ใน modified media 96 – microwell plate ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย microplate ปฏิกิริยา ESC ของ *V. parahaemolyticus* และ 23 non – *V. parahaemolyticus* (16 แกรมลบ, และ 7 แกรมบวก แบคทีเรีย) ถูกนำมาทดสอบโดยการใช้ ESC broth ในการทดลองเราใช้ 200  $\mu$ l ของ culture broth ในแต่ละ microwell และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ซึ่งในการทดลองสามารถที่จะตรวจกิจกรรมของปฏิกิริยาได้ภายใน 8 ชั่วโมง หลังจากทำการบ่ม esculin ถูก metabolize เป็น esculetin ก่อน esculetin ทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate ได้ by product ที่ทำให้อาหารเหลวเป็นสีดำ (Swan, 1954; Wasilauskas, 1971) ดังนั้นใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมง เพื่อแสดงให้เห็นสีที่เปลี่ยนไปอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.4)



**รูปที่ 4.4** กราฟค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรที่ได้รับจากอาหาร ESC โดยอาหารดังกล่าว inoculated ด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ non- *V. parahaemolyticus* ที่ปริมาณเชื้อ 2 log CFU/ml ในแต่ละจุดของกราฟเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ  $\pm$  SEM ที่วัดจากตัวอย่าง ค่าการเปลี่ยนแปลงของกราฟที่สูงขึ้นไปจาก control ของที่ wavelength 450 เป็นกราฟของแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

อาหาร ESC ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับเชื้อที่เป็น *V. parahaemolyticus* และเชื้ออื่น ๆ ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา ESC และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา ESC โดยเชื้อที่ใช้จำนวน 7 Strains เป็นแกรมบวก (i.e., *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. aureus*, *B. cereus*) และ 17 แกรมลบ (i.e., *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*) จากกราฟจะเห็นว่าเชื้อโดยส่วนใหญ่สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยา ESC ได้ โดยลักษณะกราฟที่ให้ผลเป็นบวกจะมีแนวโน้มสูงขึ้นแตกต่างจากกราฟของตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อ ( $A_{450}$  1.8 nm) จากกราฟรูปที่ 4.4 สามารถสรุปผลของความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ESC ได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการใช้ ESC ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

| เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ                  | ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา |
|----------------------------------------|------------------------------|
| <b>กลุ่มเชื้อ Vibrio</b>               |                              |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>         | +                            |
| <i>Vibrio cholerae</i>                 | -                            |
| <i>Vibrio vulnificus</i>               | +                            |
| <i>Vibrio fluvialis</i>                | +                            |
| <i>Vibrio furnissii</i>                | -                            |
| <i>Vibrio mimicus</i>                  | -                            |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>            | +                            |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>            | +                            |
| <b>แบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช่ Vibrio</b> |                              |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>         | -                            |
| <i>Providentia regetti</i>             | -                            |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | +                            |
| <i>Proteus mirabilis</i>               | -                            |
| <i>Serratia marcescens</i>             | +                            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          | -                            |
| <i>Enterobacter cloacae</i>            | -                            |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>          | +                            |

|                                                |   |
|------------------------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i>                        | - |
| <b>แบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่ <i>Vibrio</i></b> |   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                   | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                  | + |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                   | + |
| <i>Enterococcus avium</i>                      | + |
| <i>Enterococcus faecium</i>                    | + |
| <i>Listeria innocua</i>                        | + |
| <i>Bacillus cereus</i>                         | + |

โดยจากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ESC โดยเชื้อโดยส่วนใหญ่สามารถที่จะใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวได้ โดยแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นเชื้อแข่งขันสามารถเกิดปฏิกิริยาได้มีจำนวน 7 ชนิด (*V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus*, *K. pneumonia*, *S. marcescens*, และ *E. aerogenes*) สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นเชื้อแข่งขันเช่นเดียวกันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้มีจำนวน 6 ชนิด (*L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. faecium*, *L. innocua*, และ *B. cereus*) สำหรับแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวอาหารเหลวจะยังคงสีเดิม สำหรับแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยา ESC ได้เนื่องจากในอาหาร ESC เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของ esculin เป็น substrate เมื่อเซลล์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย esculin เป็น esculetin กับ กลูโคส ซึ่งกลูโคสที่เกิดเป็น by product จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานให้กับเซลล์ต่อไป ในส่วนของ esculetin ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อกับ ferric ammonium citrate ได้อาหารเหลวที่มีลักษณะเป็นสีดำ ซึ่งจะมีเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดังที่ได้กล่าวก่อนหน้านี้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มความสามารถในการ selectivity ในการคัดแยกเชื้อที่เป็น *V. parahaemolyticus* โดยยอมให้เพียงแค่ 1 strains ของเชื้อเป้าหมายที่เป็น *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญเติบโตได้ โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เป็นเชื้อแข่งขัน เชื้อเหล่านี้ต้องถูก selected out ออกไป

### 4.3 การประเมินอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *V. parahaemolyticus*

ในขั้นตอนการพัฒนาสูตรอาหาร ESC การเลือกสารยับยั้งที่ใช้ในการทดลองได้นำสารยับยั้งที่มีใช้กันอยู่ในสูตรอาหารมาตรฐานมาประยุกต์ใช้ในอาหารเหลว เพื่อศึกษาชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันในขณะเดียวกันยังคงสามารถที่จะ recovery เชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อเป้าหมายที่ต้องการศึกษา ทั้งนี้ในปัจจุบันสูตรอาหารทั้งที่เป็นอาหารแข็งและอาหารเหลวมีความหลากหลายในการใช้สารยับยั้งที่แตกต่างกัน และเพื่อป้องกันผล false negative คือการที่อาหารเหลวให้ผลเป็นลบแต่ความเป็นจริงแล้วมีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว การคัดเลือกชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญในการพัฒนาอาหาร ESC ที่ต้องการผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำน่าเชื่อถือ โดยผลความสามารถในการยับยั้งเชื้อแข่งขันในอาหาร ESC ที่ใช้ตัวยับยั้งจากสูตรอาหารมาตรฐานแสดงดังตารางที่ 4.3

#### 4.3.1 การศึกษาผลของตัวยับยั้งมาตรฐานที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

จากการนำตัวยับยั้งที่มีใช้กันอยู่ในสูตรอาหารมาตรฐานทั่วไปมาเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหาร ESC เพื่อศึกษาชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมในการที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสูตรอาหาร 5 ชนิดที่เป็น GSTB, SPB, TCBS, VPSA, และ STT ถูกนำมาใช้ในการศึกษาชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสม โดยอาหารมีการ inoculation ของเชื้อทั้งที่เป็น *V. parahaemolyticus* และ non- *V. parahaemolyticus* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2-3 log CFU/ml ถูกนำมาดำเนินการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าว

### ตารางที่ 4.3 ผลของความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ESC ของเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ในอาหาร ESC ที่มี

ส่วนประกอบตัวยับยั้งจากอาหารที่มีการใช้ในปัจจุบัน

| เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ      | No inhibitor | อาหาร ESC        |                      |                               |                     |                             |
|----------------------------|--------------|------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|
|                            |              | GSTB<br>(Teepol) | SPB<br>(Polymyxin B) | TCBS<br>(Bile+Sodium citrate) | VPSA<br>(Bile salt) | STT<br>(Tellurite + Teepol) |
| กลุ่มเชื้อ <i>Vibrio</i>   |              |                  |                      |                               |                     |                             |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | +            | +                | +                    | -                             | -                   | +                           |
| <i>V. cholerae</i>         | -            | -                | -                    | -                             | -                   | -                           |
| <i>V. vulnificus</i>       | +            | +                | +                    | -                             | -                   | +                           |
| <i>V. fluvialis</i>        | +            | +                | -                    | -                             | -                   | +                           |
| <i>V. furnissii</i>        | -            | -                | -                    | -                             | -                   | -                           |
| <i>V. mimicus</i>          | -            | -                | -                    | -                             | -                   | -                           |

|                                  |   |   |       |       |       |       |
|----------------------------------|---|---|-------|-------|-------|-------|
| <i>A. hydrophila</i>             | + | + | -     | +     | +     | -     |
| <i>V. alginolyticus</i>          | + | + | +     | -     | -     | +     |
| <b>แบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช่</b>  |   |   |       |       |       |       |
| <b>Vibrio</b>                    |   |   |       |       |       |       |
| <i>Y. enterocolitica</i>         | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <i>K. pneumoniae</i>             | + | + | +     | -     | +     | +     |
| <i>P. rettgeri</i>               | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <i>P. mirabilis</i>              | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <i>S. marcescens</i>             | + | + | +     | -     | -     | -     |
| <i>P. aeruginosa</i>             | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <i>E. cloacae</i>                | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <i>E. aerogenes</i>              | + | + | +     | -     | +     | +     |
| <i>E. coli</i>                   | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <b>แบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่</b> |   |   |       |       |       |       |
| <b>Vibrio</b>                    |   |   |       |       |       |       |
| <i>S. aureus</i>                 | - | - | -     | -     | -     | -     |
| <i>L. monocytogenes</i>          | + | + | +     | +     | -     | +     |
| <i>E. faecalis</i>               | + | + | +     | +     | -     | +     |
| <i>E. avium</i>                  | + | + | +     | +     | -     | +     |
| <i>E. faecium</i>                | + | + | +     | -     | -     | +     |
| <i>L. innocua</i>                | + | + | +     | +     | -     | +     |
| <i>B. cereus</i>                 | + | + | +     | -     | -     | -     |
| % การยับยั้ง                     |   | 0 | 15.38 | 61.53 | 76.92 | 23.07 |

จากตารางที่ 4.3 แสดงผลความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการใช้ esculin ในอาหารเหลวที่มีการเติมส่วนผสมของตัวยับยั้งที่ได้จากสูตรอาหาร 5 ชนิดที่เป็น GSTB, SPB, TCBS, VPSA, และ STT จากการทดลองจะเห็นว่าอาหารเหลว ESC ที่มีส่วนผสมของตัวยับยั้งที่ได้จาก VPSA มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแข่งขันได้ดีที่สุดเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนเชื้อที่สามารถยับยั้งได้เทียบกับปริมาณเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้คิดเป็น 76.92 % แต่อย่างไรก็ตามอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของตัวยับยั้งดังกล่าวมีผลต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มเป้าหมาย ดังนั้นที่สภาวะดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาสูตรอาหารเหลว ESC ทั้งนี้อาหารเหลวที่มีส่วนผสมของตัวยับยั้งจาก TCBS ให้ผลในลักษณะเดียวกันคือมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่ดี แต่ในทางกลับกันกลับมีผลยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารยับยั้งที่ใช้มีปริมาณ dose ที่เข้มข้นเกินไปซึ่งปกติแล้ว สารดังกล่าวใช้ในอาหารแข็งเพื่อการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* หลังจากที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง (enrichment step) เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ดังนั้นเชื้อจึงแข็งแรงสามารถที่จะเจริญเติบโตบนอาหารแข็งปรากฏเป็นโคโลนีสีเขียวได้ในกรณีที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V.*

*parahaemolyticus* สำหรับอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของ GSTB พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันได้เลย ทั้งนี้ส่วนผสมหลัก Teepol อาจไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจึงทำให้ผลที่ออกมา เชื้อแข่งขันดังกล่าวยังคงสามารถเกิดปฏิกิริยาการใช้ esculin ได้ ในส่วนของอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของตัวยับยั้งจาก SPB และ STT พบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง 15.38 และ 23.07 % โดยที่สภาวะการใช้ตัวยับยั้งดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันกลุ่มเป้าหมายได้หมด ซึ่งเมื่อนำไปประยุกต์ใช้จริงอาจทำให้เกิดผล false positive ได้ คือให้ผลเป็นบวกแต่ความเป็นจริง ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองศึกษาทางเลือกตัวยับยั้งชนิดอื่นที่มีแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเป็นอาหารเหลว ESC ที่เหมาะสม



### 4.3.2 การศึกษาผลของตัวยับยั้งเดี่ยวที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ในการทดลองตัวยับยั้งเดี่ยวในสูตรมาตรฐานแต่ละชนิดถูกนำมาศึกษาที่ปริมาณความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพความสามารถในการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาการใช้ ESC เช่นเดียวกัน

**ตารางที่ 4.4** แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในอาหารเหลว ESC ที่มีตัวยับยั้งเดี่ยวชนิดต่างๆ

| เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ                   | No inhibitor | Laurylsulfate |       |    | Colistin |       |    | Ox bile |       |    | Bile salt |       |    | Tellurite |       |    | Citrate |       |    | Polymyxin B |       |    |
|-----------------------------------------|--------------|---------------|-------|----|----------|-------|----|---------|-------|----|-----------|-------|----|-----------|-------|----|---------|-------|----|-------------|-------|----|
|                                         |              | 0.5x          | 0.75x | 1x | 0.5x     | 0.75x | 1x | 0.5x    | 0.75x | 1x | 0.5x      | 0.75x | 1x | 0.5x      | 0.75x | 1x | 0.5x    | 0.75x | 1x | 0.5x        | 0.75x | 1x |
| กลุ่มเชื้อ <i>Vibrio</i>                |              |               |       |    |          |       |    |         |       |    |           |       |    |           |       |    |         |       |    |             |       |    |
| <i>V. parahaemolyticus</i>              | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>V. cholerae</i>                      | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| <i>V. vulnificus</i>                    | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | +       | +     | -  | +         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>V. fluvialis</i>                     | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | +       | +     | +  | -           | -     | -  |
| <i>V. furnissii</i>                     | +            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | +  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| <i>V. mimicus</i>                       | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | +  | -       | -     | -  | +           | -     | -  |
| <i>A. hydrophila</i>                    | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | +       | +     | +  | +         | -     | +  | -         | -     | -  | +       | +     | +  | -           | -     | +  |
| <i>V. alginolyticus</i>                 | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| แบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช่ <i>Vibrio</i>  |              |               |       |    |          |       |    |         |       |    |           |       |    |           |       |    |         |       |    |             |       |    |
| <i>Y. enterocolitica</i>                | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| <i>K. pneumoniae</i>                    | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | +       | +     | +  | +         | +     | +  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | -           | -     | -  |
| <i>P. mirabilis</i>                     | +            | +             | +     | +  | +        | +     | +  | +       | -     | -  | +         | +     | +  | +         | +     | -  | -       | -     | -  | +           | +     | +  |
| <i>P. rettgeri</i>                      | +            | -             | -     | -  | +        | +     | +  | -       | -     | -  | +         | +     | +  | -         | -     | -  | +       | +     | -  | +           | +     | +  |
| <i>S. marcescens</i>                    | +            | +             | +     | +  | +        | +     | +  | +       | +     | +  | +         | +     | +  | +         | +     | -  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>P. aeruginosa</i>                    | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| <i>E. cloacae</i>                       | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| <i>E. aerogenes</i>                     | +            | +             | +     | +  | -        | -     | -  | +       | +     | +  | +         | +     | +  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | -           | -     | -  |
| <i>E. coli</i>                          | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| แบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่ <i>Vibrio</i> |              |               |       |    |          |       |    |         |       |    |           |       |    |           |       |    |         |       |    |             |       |    |
| <i>S. aureus</i>                        | -            | -             | -     | -  | -        | -     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | -         | -     | -  | -       | -     | -  | -           | -     | -  |
| <i>L. monocytogenes</i>                 | +            | +             | +     | +  | +        | +     | +  | +       | +     | +  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>E. faecalis</i>                      | +            | +             | +     | +  | +        | +     | +  | +       | +     | +  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>E. avium</i>                         | +            | +             | +     | +  | +        | +     | +  | +       | +     | +  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>E. faecium</i>                       | +            | +             | +     | +  | +        | +     | +  | +       | +     | +  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>L. innocua</i>                       | +            | +             | +     | +  | +        | -     | -  | +       | +     | +  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | +       | +     | +  | +           | +     | +  |
| <i>B. cereus</i>                        | +            | +             | +     | +  | +        | +     | -  | -       | -     | -  | -         | -     | -  | +         | +     | +  | -       | -     | -  | +           | +     | +  |

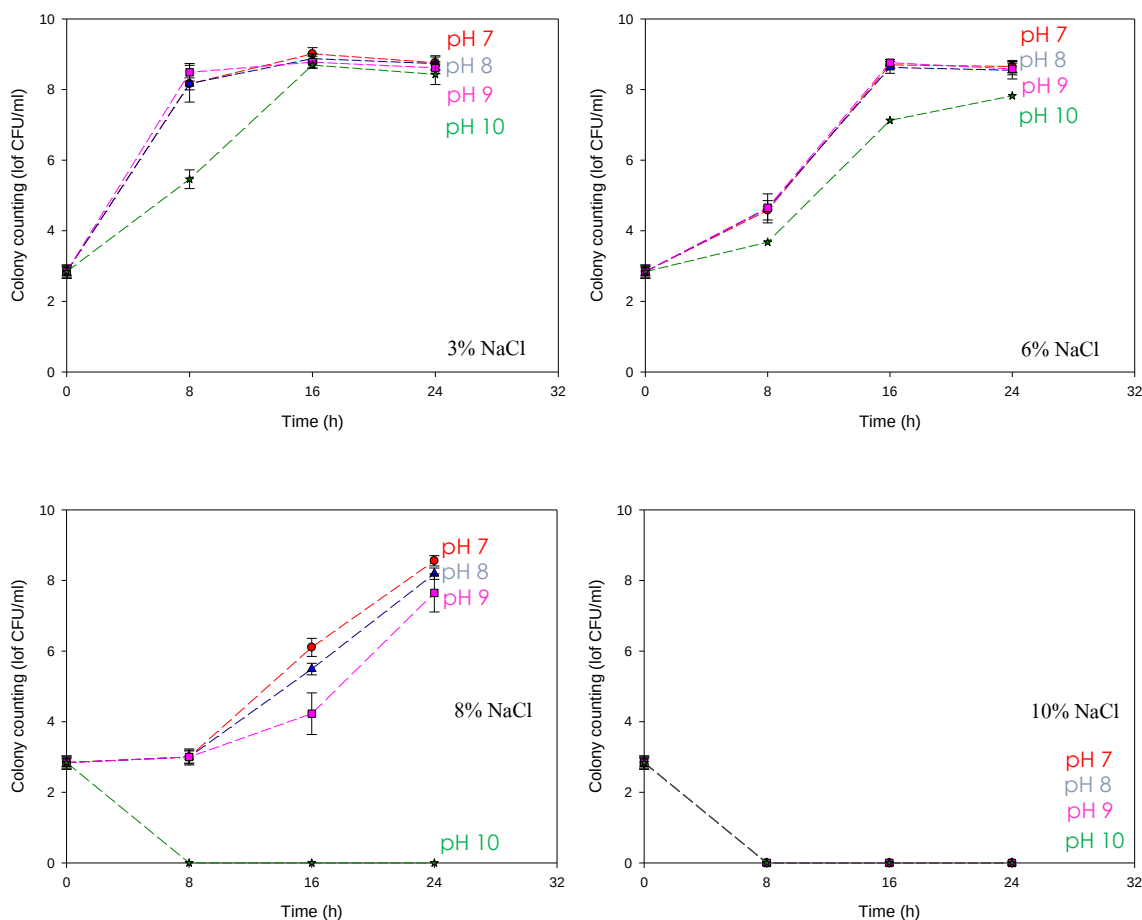
ในการศึกษาตัวยับยั้งเดี่ยวที่เหมาะสมในอาหารเหลวบ่งสี ESC เพื่อยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* นอกจากจะศึกษาประสิทธิภาพในรูปแบบของตัวยับยั้งผสมที่ได้จากส่วนประกอบที่เป็นสูตรมาตรฐานซึ่งได้แสดงผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสูตรอาหารดังกล่าวยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองศึกษาผลของตัวยับยั้งเดี่ยวที่มีต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus* โดย criteria ของการศึกษานิคของตัวยับยั้งที่เหมาะสม ควรสามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่เดียวกันที่ความเข้มข้นของสารดังกล่าวควรที่จะสามารถ recovery เชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีเช่นกัน ทั้งนี้เห็นว่าอาหารเหลว ESC บ่งชี้ที่มีส่วนผสมของ colistin, oxbile, และ bile salt ที่ความเข้มข้น 0.5x, 0.75x และ 1x มีผลในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดังนั้นที่สภาวะดังกล่าวจึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบสูตรอาหารเพื่อการ recovery เชื้อและตรวจสอบการปนเปื้อน ดังนั้นจึงเหลือเพียงอาหารเหลวบ่งชี้ที่มีส่วนประกอบของตัวยับยั้งของ laurylsulfate, tellurite, citrate, และ polymyxin B แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นอาหารเหลว laurylsulfate ที่ทุกความเข้มข้น สามารถที่จะยับยั้งเชื้อได้เพียง *V. furnissii* และ *P. rettgeri* ในขณะเดียวกันสำหรับอาหารเหลวบ่งชี้ที่มีส่วนประกอบของตัวยับยั้งของ tellurite ที่ความเข้มข้น 1x สามารถที่จะยับยั้ง *V. fluvialis*, *A. hydrophilia*, *P. mirabilis*, และ *P. rettgeri* ซึ่งยังมีเชื้อแข่งขันอื่นๆ ที่ไม่สามารถยับยั้งได้อีก เช่น *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, *K. pneumonia*, *E. aerogenes*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. faecium*, *L. innocua*, และ *B. cereus* เช่นเดียวกับอาหารเหลวบ่งชี้ที่มีส่วนประกอบของ citrate และ Polymyxin B ที่ความเข้มข้น 1x สามารถที่จะยับยั้งเชื้อได้เพียง *V. furnissii*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, และ *B. cereus* และในส่วนของ Polymyxin B เป็นเชื้อ *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *K. pneumonia*, และเชื้อ *E. aerogenes* ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าอาหารเหลวบ่งสีที่มีตัวยับยั้งเดี่ยวของแต่ละสูตรอาหาร ยังไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแข่งขันได้ทั้งหมด ซึ่งอาหารเหลวบ่งสีที่มีตัวยับยั้งต่างชนิดกัน ก็จะให้ผลประสิทธิภาพความสามารถในการยับยั้งที่แตกต่างกันออกไป จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าอาหารเหลวบ่งสีที่มีตัวยับยั้งของ tellurite มีแนวโน้มสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดเนื่องจากมีเชื้อแข่งขันหลายชนิดที่สามารถยับยั้งได้ด้วย tellurite แต่ก็ยังมีเชื้อแข่งขันที่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งเป้าหมายของงานวิจัยการพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus* แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร โดยอาหารบ่งสีดังกล่าวสามารถที่จะตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ให้ผลของ false positive ในปริมาณน้อย นั้นหมายความว่าตัวอย่างที่



จากการศึกษาใช้ตัวบ่งชี้ที่เป็นสูตรส่วนผสมจากอาหารมาตรฐานและการศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวบ่งชี้พบว่ายังไม่สามารถที่จะคัดแยกหรือคัดเลือกเฉพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus* ออกจากเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกันได้ โดยยังมีเชื้อส่วนใหญ่ที่ยังคงสามารถเจริญเติบโตและให้ผลเป็น false positive เพื่อเป็นการคัดเลือกว่าตัวบ่งชี้ที่เหมาะสม และเนื่องจากโดยธรรมชาติแล้วเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะปริมาณโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างสูง ทั้งนี้โซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างจัดได้ว่าเป็นกลุ่มของตัวบ่งชี้ชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นในการทดลองพัฒนาสูตรอาหาร ESC จึงได้ปรับปรุงสูตรด้วยการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5 โดยในการทดลองได้นำอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3, 6, 8, และ 10% ที่แต่ละค่าความเป็นกรด-ด่าง 7, 8, 9, และ 10 มาทำการ inoculation ของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ตัว โดยเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 8 strains (i.e., *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *K. pneumonia*, *S. marcescens*) และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 6 strains (i.e., *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *B. cereus*) จำนวนของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองประมาณ 2-3 log CFU/ml โดยปริมาณเซลล์ suspension ที่ 20  $\mu$ l ถูก inoculation ลงในอาหารเหลวจำเพาะ 180  $\mu$ l จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองเมื่อพิจารณาที่อาหารเป็นกลางคืออาหารเหลวความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 3% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 พบว่าไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแข่งขันได้ โดยเชื้อแบคทีเรียยังคงสามารถเจริญเติบโตให้การเปลี่ยนแปลงของสี ถึงแม้จะมีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 8 และ 9 ก็ยังพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ ในขณะที่อาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 10 สามารถที่จะยับยั้งเชื้อ *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, และ *B. cereus* อาหารเหลวที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 6% ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7, 8, 9, และ 10 พบว่าสามารถที่จะยับยั้ง *V. vulnificus* และ *B. cereus* ได้เพียงแค่ 2 strains เมื่ออาหารเหลว ESC ใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงที่ 10% พบว่าที่ทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดเป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเงื่อนไขที่ไม่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นอาหารเหลว มีเพียงที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ที่เชื้อ *L. monocytogenes* ยังสามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นสภาวะของอาหาร ESC ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% pH ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 เป็นสภาวะอาหารเหลวที่เหมาะสมเนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันได้ทั้งหมดโดยที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดี

#### 4.3.4 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ESC ที่มีต่อปริมาณเซลล์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

อาหารเหลว ESC ที่ได้มีการพัฒนาเพื่อการคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์และระดับค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ได้ถูกนำมาศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ของเวลาและปริมาณโคโลนี (CFU/ml) ที่ระดับของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน

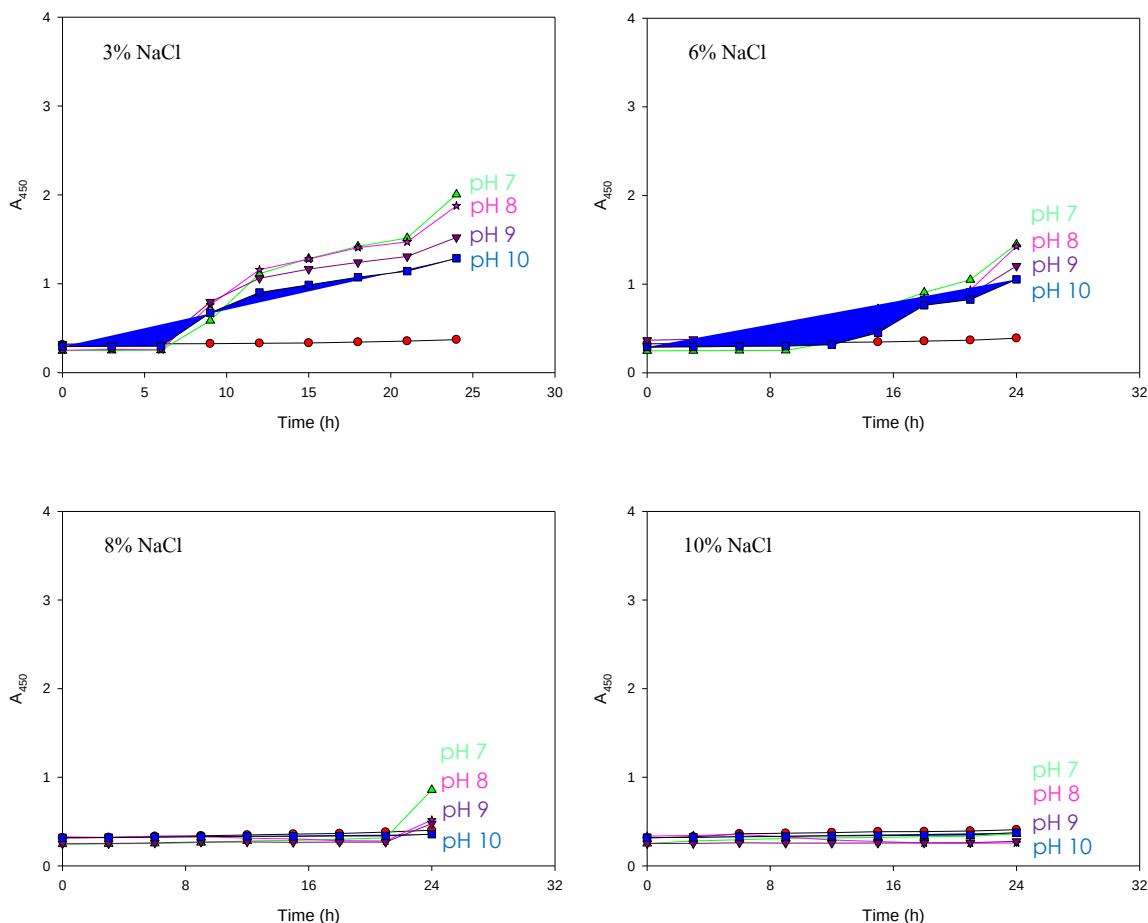
เชื้อ *V. parahaemolyticus* จัดได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย halophile ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อย่างน้อย 2% ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 3% ของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7, 8, 9, และ 10 เมื่อเวลาการบ่มผ่านไป ปริมาณเซลล์ยังคงเพิ่มขึ้นโดยมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่เป็นที่น่าสนใจว่าอาหารที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 10 ที่เวลาการบ่ม 8 ชั่วโมง

ให้ค่าความสามารถในการเจริญเติบโตที่น้อย ทั้งนี้เนื่องจากที่ pH ดังกล่าวค่อนข้างสูง ทำให้ในช่วงแรก เชลล์ *V. parahaemolyticus* จำเป็นต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมแต่หลังจากนั้นที่เวลา 16 ชั่วโมง ปริมาณเชลล์จึงเพิ่มสูงขึ้น และนอกจากนี้ อาหารเหลว ESC ที่ปริมาณความเข้มข้น 6% กราฟแนวโน้มการเจริญเติบโตพบว่ามีความใกล้เคียงกับอาหารเหลวที่ความเข้มข้น 3% สำหรับอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ 8% พบว่าที่ pH 10 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่ pH 7, 8, และ 9 พบว่าปริมาณของโคโลนี ยังคงมีการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สำหรับอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% พบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นอย่างมาก โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ดังกล่าว ถึงแม้ว่าอาหารเหลว ดังกล่าวจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 ซึ่งจัดได้ว่าเป็นกลางแต่ผลของโซเดียมคลอไรด์ก็มีผลเป็นอย่างมาก โดยทำให้เชื้อไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ของทุกค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ทั้งนี้สำหรับอาหารเหลวในสภาวะที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 เชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีและที่เงื่อนไขดังกล่าวก็สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* กราฟความสัมพันธ์ของเวลาในการบ่มกับปริมาณเชื้อที่ปริมาณโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันชี้ให้เห็นว่าที่เงื่อนไขเหมาะสมคืออาหารเหลวความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 6% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 สามารถที่จะ recovery เชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้เป็นอย่างดี ในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเหลวนอกจากพิจารณาจากความสามารถในการเจริญเติบโตของโคโลนีแล้ว ยังคำนึงถึงเรื่องของความเข้มข้นของสื่ออาหารเหลวซึ่งควรที่จะสัมพันธ์สอดคล้องกัน โดยแสดงรายละเอียดผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.5

#### 4.3.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ESC ที่มีต่อการดูดกลืนแสงของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ในการตรวจติดตามปฏิกิริยาของ ESC นอกจากพิจารณาด้วย visual แล้วยังมีการตรวจติดตามด้วยเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงสเปกโตรโฟเมตรีเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำในการ detect ปฏิกิริยา ในการทดลองอาหารเหลว ESC ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ และที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ กันปริมาณ 200  $\mu$ l ถูกนำไปวัดด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ค่าความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดย

ตัวอย่างถูกนำออกมาวัดทุกๆ 3 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ถูกนำมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ของเวลาและค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน

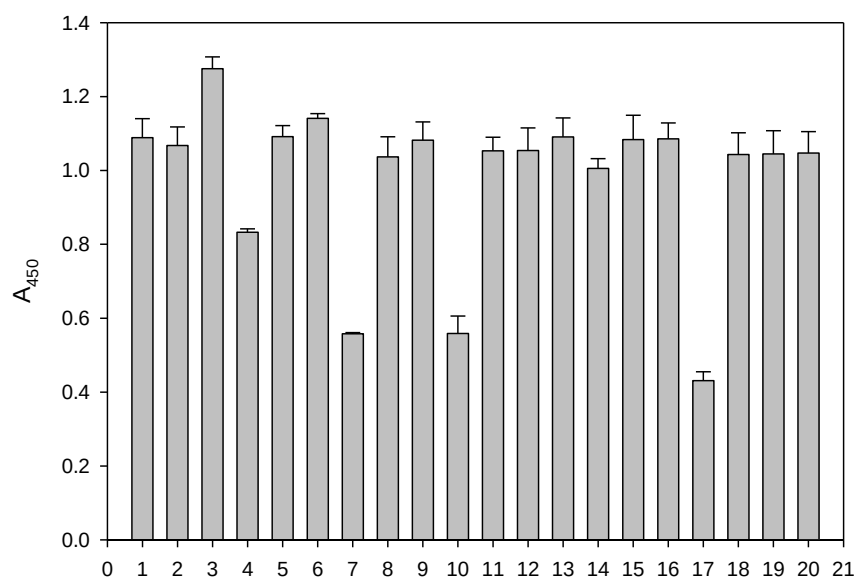
อาหารเหลว ESC ที่ได้มีการพัฒนาเพื่อการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารดังกล่าวมีความสำคัญในการ selectivity เพื่อการคัดเลือกเชื้อเป้าหมายโดยอาหารเหลว ESC เมื่อเกิดปฏิกิริยา ต้องสามารถที่จะเปลี่ยนสีของอาหารจากของเหลวใสเป็นสีดำ เป็นการบ่งบอกการเกิดปฏิกิริยา ถึงแม้ว่าที่สภาวะดังกล่าวจะสามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันได้ดี แต่มีผลกระทบกับการเปลี่ยนแปลงของสีโดยไม่ปรากฏสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นให้เห็น ดังนั้นอาหารบ่งชี้การปนเปื้อนของเชื้อ *V.*

*parahaemolyticus* ที่เหมาะสมนั้น ปริมาณเซลล์ในอาหารบ่งชี้ควรพิจารณาควบคู่กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ โดยจากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.3 เรื่องการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ESC ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ พบว่าอาหารเหลวบ่งชี้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ความเป็นกรด-ด่าง 10 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแข่งขัน ในขณะที่เดียวกันสามารถตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวเมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงพบว่าการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาจะปรากฏที่เวลา 18 – 24 ชั่วโมง ซึ่งยังคงให้ signal ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของสี ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% ความเป็นกรด-ด่าง 7, 8, 9, และ 10 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีของปฏิกิริยาโดยที่เงื่อนไขเหล่านี้ถูกนำมาพิจารณาควบคู่กับสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแข่งขัน

#### 4.4 การพัฒนาอาหารเหลวจำเพาะ ESC เพื่อเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

อาหารเหลว ESC ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 6% และค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 อาหารเหลวสีที่สภาวะดังกล่าวได้มีการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มความสามารถในการ selectivity โดยเป็นการเตรียมอาหารด้วยการแทนที่น้ำตาลเดกซ์โตรสด้วยการใช้น้ำตาลชนิดอีก 18 ชนิด ซึ่งเป็นน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลดูซิทอล น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลเซลโลไบโอส น้ำตาลอะราบินอส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรีฮาโลส น้ำตาลเมลิไบโอส น้ำตาลอินโนซิทอล น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลอะโดนิทอล น้ำตาลซาลิซิน จากนั้นอาหารถูกผสมและเตรียมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนการใช้งานมีการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter sterilize ที่ 0.22 ไมครอน ในการทดลองจะใช้เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 2 log CFU/ml ปริมาณ 20  $\mu$ L ทำการ inoculation ลงในตัวอย่างอาหารเหลวที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ปริมาณอาหารเหลว 180  $\mu$ L ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปทำการพล็อตกราฟแท่งเพื่อศึกษาผลของการแทนที่น้ำตาลที่มีต่อความเข้มข้นของอาหาร สีดังแสดงกราฟแท่งในรูปที่ 4.7





**รูปที่ 4.7** กราฟผลของน้ำตาลจำนวน 19 ชนิด ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของอาหารเหลว ESC (ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 6% ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 10) ที่ได้มีการพัฒนาเพื่อเพิ่มความสามารถในการ selectivity ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เหตุผลความจำเป็นในการพัฒนาปรับปรุงสูตรอาหาร ESC ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากเมื่อพิจารณาสูตรอาหารเดิมที่เป็นน้ำตาลเด็คซ์โตรส พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นสมมติฐานที่ว่าในส่วนประกอบของสูตรอาหารมี esculin ซึ่ง esculin เป็น substrate เมื่อเซลล์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย esculin เป็น esculetin กับ กลูโคส ซึ่งกลูโคสที่เกิดเป็น by product จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานให้กับเซลล์ต่อไปด้วยการ metabolize ทั้งนี้ในการ metabolize น้ำตาลเด็คซ์โตรสดังกล่าว จะทำให้อาหารเหลวมีสภาพเป็นกรด อีกทั้งในอาหารเหลวก็ยังมีส่วนประกอบที่เป็นเด็คซ์โตรสซึ่งการ metabolize น้ำตาลจะทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรด ทำให้เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา สีของอาหารเหลวให้ค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยทั้งนี้ในขณะที่อาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาลเป็นส่วนประกอบพบว่าอาหารดังกล่าวให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงทั้งนี้เนื่องจากมีเพียง by product ที่เกิดจากการ metabolize ของซับสเตรท esculin เท่านั้น ดังนั้นอาหารเหลวจำเพาะที่ไม่มี การแทนที่น้ำตาลเป็นองค์ประกอบจึงยังคงให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง แต่อย่างไรก็ตามอาหารเหลวสีดังกล่าวก็ยังปรากฏค่าการดูดกลืนแสงหรือ signal ของความเข้มข้นสีที่ยังต้องมีการพัฒนา โดยจะเห็นว่า



**รูปที่ 4.8** กราฟ profile แสดงปริมาณเชื้อจำกัด (detection limit) ในอาหารเหลวจำเพาะ ESC ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความสามารถในการ detectability อยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงใน  $A_{450}$  ของอาหารเหลวที่มีเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ). +, สามารถตรวจพบ ( $A_{450}$  ตัวอย่าง >  $A_{450}$  ควบคุม); -, ไม่สามารถตรวจพบ ( $A_{450}$  ตัวอย่าง =  $A_{450}$  ควบคุม)

จากกราฟรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสีของอาหารที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10 CFU/ml ในอาหาร ESC ที่ได้มีการพัฒนา ดังนั้นในการใช้งานอาหารเหลวจำเพาะตัวอย่างควรที่จะมีการ pre-enriched เพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ให้ได้อย่างน้อย 10 CFU/ml และเพื่อเป็นการ resuscitate เซลล์ที่บาดเจ็บ โดยตัวอย่างอาจจะต้องมีการเพิ่มจำนวนอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสามารถต้านทานในอาหารเหลวจำเพาะที่มีโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างระดับหนึ่ง (Chen et al., 1993; Hammack et al., 2003) ท่ามกลางอาหารมาตรฐานที่เป็นอาหารเหลวไม่จำเพาะ (non-selective pre-enrichment) อัลคาไลน์เปปโตโนวอเตอร์ (APW) เป็นอาหารเหลวไม่จำเพาะที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับ *V. parahaemolyticus* ในการฟื้นตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารที่หลากหลายชนิด (de Boer, 1998; Baylis et al., 2000) และนอกจากนี้ยังมีอาหารมาตรฐานเหลวไม่จำเพาะที่มีการพัฒนาที่เป็น universal pre-enrichment broth (UPB) ได้มีการพัฒนาสำหรับการฟื้นเซลล์หรือเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในการเพิ่มจำนวน (ISO, 2002; Taskila et al., 2012) Pre-enrichment ของ UPB ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ *Salmonella* ที่บาดเจ็บด้วยความร้อน ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่น้อยเพื่อให้ได้เซลล์เพิ่มจำนวนถึง 6 log CFU/ml ในเวลา 24 ชั่วโมง (Bailey และ Cox, 1992; Jiang et al., 1998; Hammack et al., 2003) โดยอาหารดังกล่าวเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ได้ การตรวจสอบ screening เบื้องต้นของ *V. parahaemolyticus* โดยการใช้อาหาร selective enrichment media ที่นำเสนอเหล่านี้สามารถที่จะดำเนินการได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและให้ผลที่ถูกต้องด้วยปริมาณของสารตัวอย่างที่เหมาะสม การให้ผลที่เป็นลบแต่ตัวอย่างมีการติดเชื้อจริงสามารถที่จะลดปริมาณได้เพราะ *V. parahaemolyticus* มีแนวโน้มที่สูง

ที่สามารถฟื้นตัวได้สูงในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างระดับหนึ่งเนื่องจากเป็นสภาวะโดยธรรมชาติที่เชื้อดังกล่าวสามารถที่เจริญเติบโตได้ดี

#### 4.6 การทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของอาหารเหลวจำเพาะในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* กับตัวอย่างอาหารจริง

เพื่อที่จะสำรวจประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* อาหาร ESC ที่ได้มีการพัฒนาจะถูกนำไปทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริง การปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติในอาหารและการเติมเชื้อลงไปในการถูกสร้างขึ้นมา โดยตัวอย่างอาหารที่ใช้เป็น กุ้ง ปู หอยนางรม น้ำทะเล นอกจากนี้ในการทดลองยังได้มีการ spiked เชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างอาหารซึ่งถูกนำมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของรูปแบบการวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนา (Peng และ Shelef, 2001) คณะผู้วิจัยใช้ตัวอย่างอาหารที่เหมือนกันในการ spiked เชื้อลงไปเพื่อที่จะนำไปสู่การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเหลวด้วยเทคนิคไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ให้ผลรวดเร็ว ตัวอย่างอาหารทั้งหมดถูกวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามมาตรฐาน BAM, 2002 เพื่อให้ได้ผลที่เป็นอ้างอิง ตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัมที่มีการปนเปื้อนธรรมชาติ (naturally) และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อธรรมชาติมีการ spiked เชื้อ *V. parahaemolyticus* ปริมาตร 1 mL ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/mL เมื่อเตรียมอาหารตาม protocol ควบคู่กับวิธีการวิเคราะห์ที่เป็น standard method จากนั้นตัวอย่างอาหารดังกล่าวจะถูกนำไปทดสอบกับอาหาร ESC ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 จากนั้นบ่มที่  $37 \pm 1$  °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 ถูกอธิบายตีความควบคู่กับการพิจารณาด้วยสายตาโดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก สีของอาหารเหลวจะเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีดำ โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเหลวด้วยตัวอย่างอาหารจริงแสดงดังตารางที่ 4.6

**ตารางที่ 4.6** การทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของอาหารเหลว ESC (ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6% และระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* กับตัวอย่างอาหารจริงโดยเปรียบเทียบผลความถูกต้องกับวิธีมาตรฐาน

|                                                                      | ตัวอย่างอาหาร | ผลการทดสอบ<br>ในอาหาร ESC | วิธีการมาตรฐาน<br>(TCBS) | วิธีการอาหารโครโมเจนิก<br>(CHROMagar™ <i>Vibrio</i> ) |
|----------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|
| ตัวอย่างที่มีการฆ่าเชื้อ<br>(Sterilized products)                    | กุ้ง          | -                         | -                        | -                                                     |
|                                                                      | ปู            | -                         | -                        | -                                                     |
|                                                                      | หอย           | -                         | -                        | -                                                     |
|                                                                      | น้ำทะเล       | -                         | -                        | -                                                     |
| ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนโดย<br>ธรรมชาติ (Naturally<br>contamination) | กุ้ง          | +                         | -                        | +                                                     |
|                                                                      | ปู            | +                         | +                        | +                                                     |
|                                                                      | หอย           | +                         | -                        | +                                                     |
|                                                                      | น้ำทะเล       | -                         | -                        | -                                                     |

ในการทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเหลว ESC ที่ได้มีการพัฒนาด้วยการใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6% และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 10 และมีการปรับปรุงสีของอาหารด้วยการใช้น้ำตาลอะราบิโนสเพื่อเพิ่มความเป็น selectivity ของตัวอย่าง จากการทดสอบกับตัวอย่างที่มีการฆ่าเชื้อ (sterilized product) พบว่าอาหารเหลวจำเพาะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ให้ผลเป็น negative ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาหารเหลวจำเพาะมีความสามารถในการบ่งบอกการปนเปื้อน ซึ่งตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ อาหารเหลวจำเพาะจะไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของสี สำหรับตัวอย่างอาหารที่มีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติเช่น ตัวอย่างกุ้ง ปู หอยให้ผลการทดสอบในอาหารเหลวเป็น positive ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์กับวิธีการที่เป็นมาตรฐานพบว่าตัวอย่างปูให้ผลทดสอบในตัวอย่างอาหารจำเพาะ ESC ตรงกับทั้งของวิธีการที่เป็นมาตรฐานและการใช้อาหารโครโมเจนิก (CHROMagar™ *Vibrio*) สำหรับในการทดสอบตัวอย่างกุ้งและหอยพบว่าให้ผลเป็น positive ในอาหารจำเพาะ ESC ด้วยเช่นกัน แต่ทั้งนี้ตัวอย่างดังกล่าวให้ผลเป็น negative ในเทคนิควิธีการที่เป็นมาตรฐาน แต่ในขณะทำการทดสอบด้วยอาหารโครโมเจนิกให้ผลเป็นบวก ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผล (confirmation test) ในการทดลองได้นำโคโลนีสีม่วงที่ปรากฏบนอาหารโครโมเจนิกดังกล่าวไปทดสอบ

ทางด้านชีวเคมีด้วยการใช้ชุดทดสอบ API 20 พบว่าโคโลนีดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดังนั้นจากผลการทดสอบตัวอย่างชี้ให้เห็นว่าการใช้อาหารโครโมเจนิก ให้ผลที่ถูกต้อง และมีความน่าเชื่อถือกว่าการใช้อาหาร TCBS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Di Pinto และคณะ (2011) พบว่าในการทดสอบตัวอย่างกับอาหารโครโมเจนิกให้ผลที่ถูกต้องกว่า จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอาหารเหลวจำเพาะ ESC ที่ได้พัฒนามีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และนอกจากนี้แล้วชุดทดสอบอาหารดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการทดสอบคุณภาพของน้ำทะเลที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง โดยจะเห็นว่าน้ำทะเลที่ไม่มีการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* จะให้ผล negative ในตัวอย่างอาหารเหลวจำเพาะ ESC อีกทั้งยังให้ผลสอดคล้องกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและการใช้อาหารโครโมเจนิกซึ่งให้ผลเป็น negative เช่นกัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพัฒนาอาหารเหลวสีจำเพาะ ESC ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในขณะเดียวกันเป็นการคัดแยกเชื้อแข่งขันด้วยการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และการใช้ระดับของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเพื่อเป็นการบ่งชี้การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และเป็นแนวทางเลือกใหม่ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในขั้นตอน non-selective enrichment ในงานวิจัยมีการตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ โดยรายละเอียดผลการทดลองสรุปได้ดังนี้ การใช้กิจกรรมของ esculin จัดได้ว่าเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ที่ดี มีการติดตามปฏิกิริยาด้วยการใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการบ่งชี้ที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยใช้ ferric ammonium citrate เป็นอินดิเคเตอร์ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวัดการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ได้ถูกนำเสนอเพื่อการวัดปริมาณการเกิดปฏิกิริยาในการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับ microscale เพื่อการ screening อย่างรวดเร็วต่อการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* เพื่อที่จะคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยา ESC และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา ESC จากการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากอาหารเหลว ESC สอดคล้องกับสีของอาหารที่ติดตามปฏิกิริยาด้วยการดูด้วยสายตา และนอกจากนี้เทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ใช้เป็นการนำเสนอวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วในการประเมินความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา สำหรับตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมพบว่า อาหารเหลว ESC ที่มีการพัฒนาสูตรด้วยการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่ 6% และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 10 ถูกพบว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่ดีและให้ความสามารถในการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สูง และนอกจากนี้เพื่อเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ การแทนที่น้ำตาลเดกซ์โตรสด้วยอะราบิโนส พบว่าช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสีอาหารเหลว โดยสูตรอาหารเหลวดังกล่าวมีแนวโน้มที่สูงในการที่จะเป็นอาหารเหลวจำเพาะบ่งบอกสีในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้อาหารเหลวจำเพาะ ESC ที่ได้มีการพัฒนาพบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างที่ดีโดยให้ผลการวิเคราะห์ สอดคล้องกับวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ใช้เวลาการวิเคราะห์น้อยกว่า 2 วันเหลือเพียง 1 วัน

## เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2538, รายงานประจำปี 2537, โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, หน้า 177
2. กองวิจัยสินค้าและการตลาด กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2534, รายงานการค้าทะเลแช่แข็งเพื่อการส่งออก, หน้า 1
3. Abdeldaim, G.M. and Herrmann, B., 2013, "Pcr Detection of Haemophilus Influenzae from Respiratory Specimens", **Methods Mol Biol**, Vol. 943, No., pp. 115-23.
4. Alipour, M., Halwani, M., Omri, A. and Suntres, Z.E., 2008, "Antimicrobial Effectiveness of Liposomal Polymyxin B against Resistant Gram-Negative Bacterial Strains", **Int J Pharm**, Vol. 355, No. 1-2, pp. 293-8.
5. Anonymous, 2009, **Polymyxin B Sulfate**, [online], Available: [http://www.lookchem.com/product\\_593/Polymyxin-B-sulfate-price.html](http://www.lookchem.com/product_593/Polymyxin-B-sulfate-price.html) [3 March 2013].
6. Arnold, T.M., Forrest, G.N. and Messmer, K.J., 2007, "Polymyxin Antibiotics for Gram-Negative Infections", **Am J Health Syst Pharm**, Vol. 64, No. 8, pp. 819-26.
7. Ball, D.W., Hill, J.W. and Scott, R.J., 2013, **The Basic of General Organic and Biological Chemistry**, [online], Available: [http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/2547?e=gob-ch17\\_s04](http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/2547?e=gob-ch17_s04) [3 March 2013].
8. Baumann, P. and Schubert, R.H.W., 1984, "Family Ii. *Vibrionaceae*", In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N.R. and JG, J.G.H., Williams & Wilkins Co. , Baltimore, London, pp 516-550.
9. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods 1999;36:215-25.
10. Brook, I., 1989, "Aerobic and Anaerobic Microbiology of Biliary Tract Disease", **J Clin Microbiol**, Vol. 27, No. 10, pp. 2373-5.
11. Cabello, F.C., Espejo, R.T., Hernandez, M.C., Rioseco, M.L., Ulloa, J. and Vergara, J.A., 2007, "*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Epidemic Diarrhea, Chile, 2005", **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 13, No. 4, p. 656.



12. Ceccarelli, D., Spagnoletti, M., Cappuccinelli, P., Burrus, V. and Colombo, M.M., 2011, "Origin of *Vibrio cholerae* in Haiti", **The Lancet Infectious Diseases**, Vol. 11, No. 4, p. 262.
13. Centers for Disease Control and Prevention, 2006, ***Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish**, [online], Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5531a5.htm> [19 January 2013].
14. Chatterjee, A., Chaudhuri, S., Saha, G., Gupta, S. and Chowdhury, R., 2004, "Effect of Bile on the Cell Surface Permeability Barrier and Efflux System of *Vibrio cholerae*", **J Bacteriol**, Vol. 186, No. 20, pp. 6809-14.
15. Chen, H.C. and Chang, T.C., 1996, "Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters by Immunofluorescence Microscopy", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 29, No. 2–3, pp. 311-319.
16. Chin, J., 2000, "Control of Communicable Diseases Manual: An Official Report of the American Public Health Association", American Public Health Association, pp 624.
17. Cliver, D.O., Potter, M. and Riemann, H.P., 2011, "Foodborne Infections and Intoxications", Elsevier Science, Spain, pp.
18. Chun, D., Chung, J.K. and Seol, S.Y., 1974, "Enrichment of *Vibrio parahaemolyticus* in a Simple Medium", **Appl Microbiol**, Vol. 27, No. 6, pp. 1124-6.
19. Dack, G.M., 1960, "Food Poisoning: Food-Borne Infection and Intoxication", **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, Vol. 50, No. 6/1, p. 906.
20. Dewberry, E.B., 1959, "Food Poisoning; Food-Borne Infection and Intoxication, Nature, History, and Causation: Measures for Prevention and Control", Leonard Hill Books Limited, pp 411.
21. DePaola, A., Hopkins, L.H., Peeler, J., Wentz, B. and McPhearson, R.M., 1990, "Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal Waters and Oysters", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 56, No. 8.
22. Doyle, P., 1989, "Foodborne Bacterial Pathogens", In ***Vibrio parahaemolyticus***, Marcel Dekker Incorporated, pp 796.

23. Elliot, E.L., Kaysner, C.A. and M.L.Tamplin, 1992, "*V. Cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp.", In **Bacteriological Analytical Manual**, 7, Association of Official Analytical Chemists International, Virginia, pp 111-141.
24. Entis, P., 2002, **Food Microbiology: The Laboratory**, Food Processors Institute, USA, Pages.
25. Evans, M.E., Feola, D.J. and Rapp, R.P., 1999, "Polymyxin B Sulfate and Colistin: Old Antibiotics for Emerging Multiresistant Gram-Negative Bacteria", **Ann Pharmacother**, Vol. 33, No. 9, pp. 960-7.
26. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988, Food Microbiology, 4<sup>th</sup>, (eds.), Mc Graw – Hill, Singapore. p. 484
27. Fry, B.A., 1957, "Basic Triphenylmethane Dyes and the Inhibition of Glutamine Synthesis by *Staphylococcus aureus*", **J Gen Microbiol**, Vol. 16, No. 2, pp. 341-9.
28. Flores, C., Maguilnik, I., Hadlich, E. and Goldani, L.Z., 2003, "Microbiology of Choledochal Bile in Patients with Choledocholithiasis Admitted to a Tertiary Hospital", **J Gastroenterol Hepatol**, Vol. 18, No. 3, pp. 333-6.
29. Frick, O.T., 2009, **Standard Ultramarine and Color Company Huntington, West Virginia**, [online], Available: <http://www.colorantshistory.org/StandardUltramarine.html> [3 March 2013].
30. Fry, B.A., 1957, "Basic Triphenylmethane Dyes and the Inhibition of Glutamine Synthesis by *Staphylococcus aureus*", **J Gen Microbiol**, Vol. 16, No. 2, pp. 341-9.
31. Gaulin, C., Ramsay, D. and Bekal, S., 2012, "Widespread Listeriosis Outbreak Attributed to Pasteurized Cheese, Which Led to Extensive Cross-Contamination Affecting Cheese Retailers, Quebec, Canada, 2008", **J Food Prot**, Vol. 75, No. 1, pp. 71-8.
32. Hagen, C.J., Sloan, E.M., Lancette, G.A., Peeler, J.T. and Sofos, J.N., 1994, "Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Various Seafoods with Two Enrichment Broths", **Journal of Food Protection**, Vol. 57, No. 5, pp. 403-409.
33. Hara-Kura, Y., Nishina, T., Hiroshi Nakgawa, Hirotaka Konuma, Junko Hasegawa and Susumu Kumagai, 2001, "Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67. No. 12, pp. 5819 – 5823.

34. Horwitz, M.A. and Ganagarosa, E.J., 1976, "Foodborne Disease Outbreaks Traced to Poultry", **Journal of Milk Food Technology**, Vol. 39, No., pp. 859-63.
35. Humada D, Higurashi T, Mayanagi K, Miyata T, Fukui T, Lida T, et al. Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle X-ray scattering and electron microscopy. *J Mol Biol* 2007;365:187-95.
36. ISO, 2007, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of Potentially Enteropathogenic *Vibrio* Spp. **Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae***. the International Organization for Standardization, Switzerland, Vol. ISO/TS 21872-1:2007(E).
37. ISO/TS 21872. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. 2007.
38. Jensen, R.V., Depasquale, S.M., Harbolick, E.A., Hong, T., Kernell, A.L., Kruchko, D.H., Modise, T., Smith, C.E., McCarter, L.L. and Stevens, A.M., 2013, "Complete Genome Sequence of Prepandemic *Vibrio parahaemolyticus* Bb22op", **Genome Announc**, Vol. 1, No. 1.
39. Kaysner, C.A. & DePaola, A. (2004). *Vibrio. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 9*. Arlington, VA: U.S. Food and Drug Administration.
40. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol* 1999;37:1173-7.
41. Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O. and Zhang, Q., 2003, "Critical Role of Multidrug Efflux Pump CmeABC in Bile Resistance and in Vivo Colonization of *Campylobacter jejuni*", **Infect Immun**, Vol. 71, No. 8, pp. 4250-9.
42. Liston, J., 1990, "Microbial Hazards of Seafood Consumption", **Food technology**, Vol. 44, No. 12, pp. 58-62.
43. Lund, B., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W., 2000, **Microbiological Safety and Quality of Food**, Aspen, USA., Pages.

44. Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K. and Pal, U.K., 2011, "Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview", **Am J Food Technol**, Vol. 6, No., pp. 87-102.
45. Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. and McMeekin, T.A., 1997, "Development and Evaluation of a Predictive Model for the Effect of Temperature and Water Activity on the Growth Rate of *Vibrio parahaemolyticus*", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 38, No. 2–3, pp. 133-142.
46. Ministry of Health, Labor and Welfare. (2004). Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation (Microbe Edition, 2004). Japan Food Hygiene Association, Tokyo, 201–224, 637-639, (in Japanese).
47. Mills, B., 2013, **Sodium Dodecyl Sulfate**, [online], Available: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---S/Sodium-Dodecyl-Sulfate.htm> [19 March 2013].
48. O'Brien, M. and Colwell, R., 1985, "Modified Taurocholate-Tellurite-Gelatin Agar for Improved Differentiation of *Vibrio* Species", **J Clin Microbiol**, Vol. 22, No. 6, pp. 1011-3.
49. Okuda J, Ishbashi M, Abbott SL, Janda JM, Nishibushi M. Analysis of the thermostable direct hemolysis (*tdh*) genes and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* 1997;35:1965-77.
50. Onyekaba, C.O. and Njoku, H.O., 1986, "Bacteria and Helminth Isolates from Bile and Faeces of Zebu Cattle Slaughtered for Human Consumption in the Niger Delta Areas of Nigeria", **Ann Trop Med Parasitol**, Vol. 80, No. 4, pp. 421-4.
51. Oliver, J.D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L.M., Siebeling, R. and Morris, J.G., Jr., 1992, "Use of Colistin-Polymyxin B-Cellobiose Agar for Isolation of *Vibrio vulnificus* from the Environment", **Appl Environ Microbiol**, Vol. 58, No. 2, pp. 737-9.
52. Oliver, J.D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L.M., Siebeling, R. and Morris,
53. Schmidt, R.H., Goodrich, R.M., Archer, D.L. and Schneider, K.R., 2003, General Overview of the Causative Agents of Foodborne Illness. **Food Science and Human Nutrition Department, Florida Cooperative Extension Service**. University of Florida, USA., Vol. 33.

54. Swanson, K.M.J., 1996, "*Vibrio parahaemolyticus*", In **Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens**. (ICMSF), I.C.o.M.S.f.F., Springer, London, pp 426-435.
55. Taylor, D.E., 1999, "Bacterial Tellurite Resistance", **Trends Microbiol**, Vol. 7, No. 3, pp. 111-5.
56. Thanassi, D.G., Cheng, L.W. and Nikaido, H., 1997, "Active Efflux of Bile Salts by *Escherichia coli*", **J Bacteriol**, Vol. 179, No. 8, pp. 2512-8.
57. Twedt, R.M., Spaulding, P.L. and Hall, H.E., 1969, "Morphological, Cultural, Biochemical, and Serological Comparison of Japanese Strains of *Vibrio parahemolyticus* with Related Cultures Isolated in the United States", **Journal of bacteriology**, Vol. 98, No. 2, pp. 511-518.
58. Velkinburgh, J.C. and Gunn, J.S., 1999, "Phop-Phoq-Regulated Loci Are Required for Enhanced Bile Resistance in *Salmonella* spp.", **Infect Immun**, Vol. 67, No. 4, pp. 1614-22.
59. Walker, J.R., Shafiq, N.A. and Allen, R.G., 1971, "Bacterial Cell Division Regulation: Physiological Effects of Crystal Violet on *Escherichia coli* Lon + and Lon - Strains", **J Bacteriol**, Vol. 108, No. 3, pp. 1296-303.
60. Wamnes, J., 2011, Outbreak at the Okeechobee Correctional Institution Lyda, S. Food and Waterborne Disease Program, USA., Vol. February 2011.
61. Wells, A.F., 2013, **Tellurate**, [online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tellurate> [2 March 2013].

## ผลผลิต (Output)

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

1.1 Sangadkit, W, Deepatana, A, and Thipayarat, A., 2017, “Development of selective esculin hydrolysis broth for rapid screening of *Vibrio parahaemolyticus*”, Proceedings of the International Food Research Conference, pp. 69 - 72, July 25 – 27, Venue:Complex of the Deputy Vice Chancellor (Research and Innovation), University Putra, Malaysia.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาครัฐกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* มีการนำผลงานไปประยุกต์ใช้โดยภาครัฐกิจ เกี่ยวกับอุตสาหกรรมโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และนอกจากนี้นำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบคุณภาพของลูกกุ้ง ลูกปลาที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นการควบคุมคุณภาพก่อนที่จะส่งให้ลูกค้าเพื่อนำไปเลี้ยง เป็นแนวทางเลือกใหม่ของการวิเคราะห์ของโรงงาน ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โรงงานสามารถที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ อีกทั้งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยเมื่อเทียบกับวิธีการในปัจจุบันที่โรงงานใช้อยู่

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย สามารถเป็นแนวทางต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคชนิดอื่นที่ช่วยลดต้นทุนการนำเข้าชุดทดสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ เป็นการส่งเสริมศักยภาพความสามารถนักวิทยาศาสตร์ไทย และเป็นความท้าทายที่จะนำผลงานดังกล่าวไปประยุกต์ใช้จริงในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐต่างๆ

## ประวัติคณะผู้วิจัย

|                     |                                                                                                                                                                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| หัวหน้าโครงการวิจัย | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์                                                                                                                                                     |
| ประวัติการศึกษา     | Ph.D. (Chemical Engineering), Syracuse University<br>วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี<br>วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี                 |
| หน่วยงานที่สังกัด   | สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา                                                                                                                                        |
| ผู้ร่วมโครงการวิจัย | ดร.อานัติ ดีพัฒนา                                                                                                                                                                             |
| ประวัติการศึกษา     | Ph.D. (Chemical Engineering), The University of Sydney, Australia<br>วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี<br>วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี |
| หน่วยงานที่สังกัด   | ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา<br>169 ถ. ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131                                                                                  |