



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของบาซิลลัสรูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูง

โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กร่วมกับอาหารบ่งชี้ที่มีสี

Novel method for *Bacillus cereus* detection using microscale cultivation and presumptive indicator media

ผศ.ดร.อลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080006

สัญญาเลขที่ 25/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของบาซิลลัสรูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูง

โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กร่วมกับอาหารบ่งชี้ที่มีสี

Novel method for *Bacillus cereus* detection using microscale cultivation and presumptive indicator media

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา
25/2561

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ศศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของบาซิลลัสรูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูงโดยอาศัย การเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กร่วมกับอาหารบ่งชี้ที่มีสี (ภาษาอังกฤษ) Novel method for *Bacillus cereus* detection using microscale cultivation and presumptive indicator media รหัสโครงการ 256101A1080006 / สัญญาเลขที่ 25/2561 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,000,000 บาท (หนึ่งล้านบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 6 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2560 – วันที่ 31 มีนาคม 2562) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้ทำการบูรณาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* เนื่องจากเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อที่ถูกนับว่าเป็นตัวสำคัญในการก่อให้เกิดโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อในมนุษย์ ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการต่อร่างกายของผู้ที่ได้รับเชื้อ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพถูกต้องและรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จำเป็นต้องเร่งพัฒนา ทั้งนี้ตามปกติแล้ววิธีปกติที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* จะใช้อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อชนิด Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) ตามด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีเพียงเท่านั้น ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการวิเคราะห์แบบนี้จะเกิดความผิดพลาดขึ้นได้เนื่องจากการเจริญของเชื้อชนิดอื่นๆที่มักพบอยู่ด้วยกันในตัวอย่างอาหาร เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus* สปีชีส์อื่นที่ไม่ก่อโรค ทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้สารยับยั้งแบคทีเรียตัวอื่นที่ไม่ต้องการอันได้แก่ polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหาร อาจยังไม่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อชนิดอื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus cereus* ร่วมกับการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแข่งขันประเภทต่างๆ เช่น polymyxin B, trimethoprim, amoxicillin, ceftriaxone, และ novobiocin ที่มีผลต่อการฟื้นฟูเชื้อ *Bacillus cereus* โดยความเข้มข้นของสารคัดเลือกและผลของระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการที่จะกำหนดสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเพิ่มความจำเพาะของอาหารต่อการตรวจสอบบาซิลลัส และบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยพีเอชอินดิเคเตอร์ การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจติดตามได้โดยอาศัยเครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหารด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) อาหารเหลวจำเพาะที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถบ่งชี้การปนเปื้อนของบาซิลลัส

เบื้องต้นได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งปกติการใช้อาหารแข็ง (MEYPA) ในปัจจุบันต้องใช้เวลานาน 1 – 2 วัน เพื่อให้ได้ผลทำให้บางครั้งมีการปล่อยสินค้าไปก่อนที่จะทราบผล ซึ่งมีโอกาสที่ผลิตภัณฑ์ที่มีปัญหาได้ไปถึงมือผู้บริโภคแล้ว ดังนั้นการใช้อาหารเหลวที่มีความจำเพาะสำหรับ *Bacillus cereus* ร่วมกับอินดิเคเตอร์สีจึงนับเป็นวิธีการที่จะปฏิรูปการวิเคราะห์ *Bacillus cereus* รูปแบบใหม่ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค โดยให้ผลทดสอบได้อย่างรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก

บทคัดย่อ

โดยปกติแล้วกระบวนการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* จะใช้เพียง polymyxin B sulfate เข้มข้น 10 mg/L เท่านั้น ที่ความเข้มข้นระดับนี้เชื้อ *B. cereus* จะเจริญได้ตามปกติแต่เชื้อแข่งขันกลุ่มแกรมบวกอื่นๆ ก็สามารถเจริญได้เช่นกัน ส่งผลให้เกิดความลำบากในการวิเคราะห์ผล โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่ต้องการความถูกต้องและรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการคัดเลือกชนิดเหลว สารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ceftriaxone, polymyxin B sulfate, trimethoprim, novobiocin, และ amoxicillin ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ตามมาตรฐาน (10 mg/L) ครึ่งหนึ่งของมาตรฐาน (5 mg/L) และสูงกว่ามาตรฐานหนึ่งเท่า (20 mg/L) ความเข้มข้นของเชื้อ *B. cereus* ที่ศึกษาได้แก่ 10^1 , 10^3 , และ 10^5 CFU/mL โดยทำการศึกษาในอาหารเหลวชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) และทำการนับจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Agar (TSA) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า ceftriaxone, polymyxin B sulfate, และ trimethoprim เป็นสารยับยั้งที่ให้ผลดีที่สุดซึ่งไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. cereus* อย่างไรก็ตาม trimethoprim ไม่ส่งผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เช่นกัน สำหรับ novobiocin และ amoxicillin ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* อย่างรุนแรงที่ความเข้มข้นเชื้อต่ำในทุกๆ ความเข้มข้นของสารยับยั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *B. cereus* คือ pyruvate polymyxin egg yolk mannitol bromothymol blue agar (PEMBA) ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ยกเว้น *B. cereus* สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลชนิดนี้ได้ นอกจากนี้การใช้อินดิเคเตอร์ชนิด bromothymol blue ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *B. cereus* มากกว่าการใช้อินดิเคเตอร์ neutral red ดังนั้นการใช้น้ำตาลแมนนิทอลและ bromothymol blue จึงไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาอาหารคัดเลือกชนิดเหลว

คำสำคัญ: *Bacillus cereus*/ อาหารคัดเลือกชนิดเหลว/ ความเข้มข้นของสารยับยั้ง/ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์

Abstract

Conventionally, the selectivity of *Bacillus cereus* in the enrichment step is only limited to the addition of 10 mg/L polymyxin B sulfate. At this concentration, the growth of *B. cereus* is compromised and its selectiveness against other competing Gram-positive bacteria for industrial food samples is disputable. This research was aimed to study the effects of initial cell concentration and concentration of selective inhibitors on the recovery of *B. cereus* in selective enrichment step. The inhibitory effect of five conventional and alternative inhibitors (i.e., ceftriaxone, polymyxin B sulfate, trimethoprim, novobiocin, and amoxicillin) was evaluated at different initial cell densities (10 , 10^3 , and 10^5 CFU/mL) to determine the optimal *B. cereus* inhibitors and their suitable dosage. These selective inhibitors were added to Tryptic Soy Broth (TSB) and the recovery of *B. cereus* was evaluated using viable cell count on Tryptic Soy Agar (TSA). The concentrations of these selected inhibitors were formulated by doubling the suggested strength (recommended by most standard enrichment protocols) and reducing the standard concentration by half. Hence, the treatment of inhibitors was varied at 5, 10, and 20 mg/L. The cell recovery was performed at 30 °C for 24 h. The only promising candidates of selective inhibitors for *B. cereus* recovery were ceftriaxone, polymyxin B sulfate, and trimethoprim. Trimethoprim did neither promote the growth of *B. cereus* nor suppress the growth of *E. coli* and *S. aureus*. At low initial cell concentrations, no viable *B. cereus* cell was detected in all novobiocin and amoxicillin treatments. Mannitol was the standard carbon source in pyruvate polymyxin egg yolk mannitol bromothymol blue agar (PEMBA) and utilizable by *E. coli* and *S. aureus* but did not promote the growth of *B. cereus*. Bromothymol blue was more toxic and produced poorer recovery of *B. cereus* than neutral red. Hence, both mannitol and bromothymol blue in PEMBA are poor choices as a carbonaceous source and an indicator for *B. cereus* selective broth, respectively.

Keywords: *Bacillus cereus*/ Selective Enrichment Media/ Inhibitor Concentration/ Initial Cell Concentration

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	IV
สารบัญเรื่อง	VI
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	X
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	6
3 วัตถุประสงค์และการดำเนินงานวิจัย	15
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
5 สรุปผลการทดลอง	45
ผลผลิต (output)	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก (Appendix)	53
ประวัติคณะผู้วิจัย	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะของโรคที่เกิดเนื่องจาก <i>B. cereus</i> 2 สายพันธุ์	7
2.2	รายชื่ออาหารที่ใช้สำหรับคัดแยกเชื้อ <i>B. cereus</i>	12
3.1	ส่วนประกอบของอาหาร PEMBA ต่อ 110.0 mL	17
A.1	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่แตกต่างกันของการเจริญเติบโตในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (log CFU/mL)	54
A.2	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	55
A.3	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	55
A.4	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	56
A.5	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	56
A.6	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	57
A.7	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	57
A.8	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Amoxicillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	58
A.9	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Amoxicillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	58
A.10	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	59
A.11	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	59
A.12	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	60
A.13	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	60

ตารางที่	หน้า
A.14 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	61
A.15 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	61
A.16 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	62
A.17 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	62
A.18 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	63
A.19 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	63
A.20 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^1 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	64
A.21 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	64
A.22 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^1 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	65
A.23 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	65
A.24 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>B. cereus</i> ที่ 10^1 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	66
A.25 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของ <i>B. cereus</i> ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	66
A.26 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ Polymyxin B sulfate	67
A.27 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ Trimethoprim	68
A.28 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ Novobiocin	69
A.29 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ Amoxicillin	70

ตารางที่	หน้า
A.30	71

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่าง
ของ Ceftriaxone

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโคโลนีของ <i>Bacillus cereus</i> ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MEYPA)	2
2.1	ลักษณะการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย <i>B. cereus</i> จากดินสู่อาหาร-คน	11
2.2	ลักษณะของอาหาร PEMBA a) อาหารเปล่า, b) การเจริญของ <i>B. cereus</i> c) <i>B. cereus</i> กับเชื้อคู่แข่งอื่นๆ	13
4.1	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อแตกต่างกัน (10^1 , 10^3 , และ 10^5 CFU/mL)	22
4.2	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารที่มีการผสม Polymyxin B sulfate ในความเข้มข้นต่างๆ (a) 10^5 CFU/mL (b) 10^3 CFU/mL (c) 10^1 CFU/mL	23
4.3	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Polymyxin B sulfate ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ <i>B. cereus</i> (a) 10 CFU/mL, b) 10^3 CFU/mL, และ c) 10^5 CFU/mL	25
4.4	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Polymyxin B sulfate ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L (b) 10 mg/L (c) 20 mg/L	26
4.5	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+ Polymyxin B sulfate หลังจากบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง	26
4.6	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารที่มีการผสม Trimethoprim ในความเข้มข้นต่างๆ (a) 10^5 CFU/mL (b) 10^3 CFU/mL (c) 10^1 CFU/mL	28
4.7	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Trimethoprim ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ <i>B. cereus</i> (a) 10 CFU/mL, b) 10^3 CFU/mL, and c) 10^5 CFU/mL	29
4.8	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Trimethoprim ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L (b) 10 mg/L (c) 20 mg/L	30
4.9	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Trimethoprim หลังจากบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง	31
4.10	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารที่มีการผสม novobiocin ในความเข้มข้นต่างๆ (a) 10^5 CFU/mL (b) 10^3 CFU/mL (c) 10^1 CFU/mL	33
4.11	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Trimethoprim ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ <i>B. cereus</i> (a) 10 CFU/mL, b) 10^3 CFU/mL	33
4.12	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Novobiocin ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L (b) 10 mg/L (c) 20 mg/L	35

รูปที่	หน้า	
4.13	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Novobiocin หลังจากบ่มเป็น เวลานาน 24 ชั่วโมง	35
4.14	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารที่มีการผสม Amoxicillin ที่ความเข้มข้น เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5 CFU/mL	36
4.15	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Amoxicillin ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L (b) 10 mg/L (c) 20 mg/L	37
4.16	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Amoxicillin หลังจากบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง	38
4.17	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารที่มีการผสม Ceftriaxone ในความเข้มข้น ต่างๆ (a) 10^5 CFU/mL (b) 10^3 CFU/mL (c) 10^1 CFU/mL	39
4.18	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Ceftriaxone ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ <i>B. cereus</i> (a) 10^5 CFU/mL, b) 10^3 CFU/mL, and c) 10 CFU/mL	40
4.19	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Ceftriaxone ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L (b) 10 mg/L (c) 20 mg/L	42
4.20	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Ceftriaxone หลังจากบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง	42
4.21	การเจริญของแบคทีเรีย a) <i>B. cereus</i> b) <i>E. coli</i> และ c) <i>S. aureus</i> ในอาหาร PEMBA ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	44
4.22	การเจริญของแบคทีเรีย a) <i>B. cereus</i> b) <i>E. coli</i> และ c) <i>S. aureus</i> ในอาหาร PEMBA ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน	45
4.23	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงแรกของการลงเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรีย ในแต่ละแถวคือ a) <i>B. cereus</i> b) <i>E. coli</i> และ c) <i>S. aureus</i> และแหล่งคาร์บอน	46
4.24	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 24 ของการลงเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในแต่ละแถวคือ a) <i>B. cereus</i> , b) <i>E. coli</i> และ c) <i>S. aureus</i> และแหล่งคาร์บอน	46
4.25	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการลงเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในแต่ละแถวคือ a) <i>B. cereus</i> , b) <i>E. coli</i> และ c) <i>S. aureus</i> และแหล่งคาร์บอน	47
4.26	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> ในอาหารที่มีสารอินดิเคเตอร์แตกต่างกัน	49
4.27	สีของอาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์ที่แตกต่างกัน	49

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันมีคุณลักษณะหลายชนิดที่เป็นที่สนใจของผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและผู้บริโภค เช่น คุณภาพทางรสสัมผัส คุณภาพทางเคมีกายภาพรวมถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยา คุณลักษณะและ/หรือคุณภาพทาง จุลชีววิทยาของอาหารนั้นเป็นที่กล่าวถึงกันอย่างกว้างขวางในวงการอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคที่มีอาหารเป็นแหล่งพาหะอยู่บ่อยครั้ง ในระยะเวลาที่ผ่านมาไม่นานนักโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ (Food borne illness) เกิดขึ้นได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งให้ความรุนแรงและลักษณะอาการแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับแหล่งของอาหารที่พบและมีจำนวนครั้งที่พบมากขึ้นในระยะเวลาที่ผ่านมา ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ.2010 เหล่าผู้ต้องขังจำนวน 103 คนในมลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ถูกนำส่งโรงพยาบาลด้วยอาการคลื่นไส้รุนแรง อาเจียน ท้องร่วง บางคนมีอาการหมดสติ หลังจากการรับประทานอาหารมื้อเย็น ซึ่งสืบทราบภายหลังพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (Wamnes, 2011)

แบคทีเรีย *Bacillus cereus* เป็นเชื้อที่ถูกนับว่าเป็นตัวสำคัญอีกชนิดในการก่อให้เกิดโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อในมนุษย์ (Ehling-Schulz et. al., 2004) หลังจากที่แบคทีเรียชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายมนุษย์แล้ว *B. cereus* จะผลิตสารพิษออกมา 2 ชนิดคือ emetic toxin และ diarrheal toxin ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการต่อร่างกายของผู้ที่ได้รับสารพิษที่ต่างกัน (Bottone, 2010) จากการสำรวจตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่วางขายทั่วไปในท้องตลาดสาธารณรัฐเช็กปี 2008 พบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้มากถึงร้อยละ 31 ในผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนม และร้อยละ 28 ในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อสัตว์ (Schlegelova et. al., 2008) ในปี 2009 ผลิตภัณฑ์นมแคลอรีต่ำพร้อมดื่ม Slim-FastR ในประเทศสหรัฐอเมริกาถูกเรียกคืนเป็นจำนวนมากเนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้กลับมาเป็นที่สนใจอีกครั้งในวงการอาหาร (USFDA, 2009)

ตามปกติแล้ววิธีปกติที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่บังคับใช้โดยหน่วยงานทางอาหารของประเทศต่างๆ เช่น Food and Drug Administration, BAM, ISO, และ AOAC สำหรับการปนเปื้อนของ *B. cereus* จะใช้อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อชนิด Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ตามด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีเพียงเท่านั้น (Tallent et. al., 2012)



รูปที่ 1.1 ลักษณะ โคลนินของ *Bacillus cereus* ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MEYPA)

ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการวิเคราะห์แบบนี้จะเกิดความผิดพลาดขึ้นได้เนื่องจากการเจริญของเชื้อชนิดอื่นๆ ที่มักพบอยู่ด้วยกันในตัวอย่างอาหาร เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus* สปีชีส์อื่นที่ไม่ก่อโรค ซึ่งส่งผลให้การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์ phospholipase C ในการทำปฏิกิริยากับไขแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อกระทำด้วยความลำบากและอาจทำให้การแปรผลผิดพลาดได้ดังที่เคยมีการรายงานโดย Tallent และคณะ (2012) และ Peng และคณะ (2001) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้สารยับยั้งแบคทีเรียตัวอื่นที่ไม่ต้องการ อันได้แก่ polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจยังไม่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อชนิดอื่นๆ โดยปัจจุบันอาหารแข็งจำเพาะในขั้นตอนนี้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของสารยับยั้งและการใช้สารคัดเลือกที่เหมาะสม ซึ่งปัจจุบันความรู้ในการใช้สารยับยั้งสำหรับคัดเลือกเชื้อ *Bacillus cereus* อย่างมีประสิทธิภาพถูกจำกัด และการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus cereus* จากการปนเปื้อนของแบคทีเรียคู่แข่งยังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก ทำให้ในปัจจุบันมีการศึกษาหาเกลือและสารเคมีหลายชนิดมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก *B. cereus* ในตัวอย่างอาหารกันอย่างแพร่หลาย เช่น การนำสาร trimethoprim มาใช้ร่วมกับอาหาร MYP ซึ่งพบว่าสามารถใช้ในการคัดเลือก *B. cereus* ออกจากเชื้ออื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chon et al., 2012) รวมไปถึงการรายงานของประสิทธิภาพของสาร novobiocin ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ในระหว่างกระบวนการสร้างสารพันธุกรรม (Gottfried et al., 1979) นอกจากนี้ยังมีการรายงานของการต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporin (Abd et al., 2012) และ amoxicillin (Fazlani et al., 2011) ของแบคทีเรีย *B. cereus* โดยจากการสืบค้นข้อมูลยังไม่ปรากฏมีการพัฒนาใช้งานอินดิเคเตอร์สีในขั้นตอน presumptive result เพื่อใช้บ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อบาซิลลัสในวิธีการมาตรฐาน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus cereus* ร่วมกับการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแข่งขันประเภทต่างๆ เช่น polymyxin B, trimethoprim, amoxicillin, ceftriaxone, และ novobiocin ที่มีผลต่อการฟื้นฟูเชื้อ *Bacillus cereus* โดยความเข้มข้นของสารคัดเลือกและผลของระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการที่จะกำหนดสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเพิ่มความจำเพาะของอาหารต่อการตรวจสอบบาซิลลัสและบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยพีเอชอินดิเคเตอร์ การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจติดตามได้โดยอาศัยเครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหารด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) อาหารเหลวจำเพาะที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถบ่งชี้การปนเปื้อนของบาซิลลัสเบื้องต้นได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งปกติการใช้อาหารแข็ง (MEYPA) ในปัจจุบันต้องใช้เวลานาน 1 – 2 วัน เพื่อให้ได้ผล ทำให้บางครั้งมีการปล่อยสินค้าไปก่อนที่จะทราบผล ซึ่งมีโอกาสที่ผลิตภัณฑ์ที่มีปัญหาได้ไปถึงมือผู้บริโภคแล้ว ดังนั้นการใช้อาหารเหลวที่มีความจำเพาะสำหรับ *Bacillus cereus* ร่วมกับอินดิเคเตอร์สีจึงนับเป็นวิธีการที่จะปฏิรูปการวิเคราะห์ *Bacillus cereus* รูปแบบใหม่ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค โดยให้ผลทดสอบได้อย่างรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก

นวัตกรรมเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ โรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารต่างๆ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ การตรวจสอบคุณภาพระหว่างกระบวนการผลิตและการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้ายให้มีความถูกต้องและแม่นยำได้มากยิ่งขึ้น เทคโนโลยีนี้จะช่วยเสริมศักยภาพและความสามารถในการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและสินค้าแปรรูปทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ของประเทศได้เป็นอย่างดี ลดการทำลายสินค้าที่ส่งออกเนื่องจากลูกค้าตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* ในสินค้าที่ลูกค้าปลายทาง ทำให้สามารถคุ้มครองตัวอย่างสินค้าได้ปริมาณมากและทราบถึงผลการวิเคราะห์ด้วยเวลาที่เหมาะสมทำให้ทราบถึงปัญหาการปนเปื้อนของสินค้าก่อนส่งออกจากคลังสินค้า ซึ่งเทคโนโลยีนี้จะทำให้อุตสาหกรรมอาหารแปรรูปของประเทศไทยลดความเสี่ยงต่อการทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารซึ่งจะทำให้ประเทศคู่ค้าไม่มีความเชื่อมั่นในนโยบายอาหารที่ปลอดภัยในการบริโภค (Food Safety) ของประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อยุทธศาสตร์ในการเป็นครัวโลก (Kitchen of the World) อีกทั้งประเทศไทยอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารต่างๆ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว นอกจากการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศแล้วยังส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศอีกด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อ

โรคในอาหารที่แม่นยำและรวดเร็ว นวัตกรรมวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวจัดเป็นนวัตกรรมที่สามารถสร้างบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในการประยุกต์และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่เพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์แบบเดิม ที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อินดิเคเตอร์สีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวร่วมกับการประยุกต์ใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ ของเชื้อในการจำแนกวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย เช่น การใช้ความสามารถในการใช้น้ำตาล (fermentable) เป็นต้น ขณะเดียวกันในปัจจุบันพบว่าก็มีประเทศผู้ส่งออกอาหารแปรรูปรายใหม่เกิดขึ้นตลอดเวลา เช่น เวียดนาม มาเลเซีย เข้ามาแข่งขันเพื่อช่วงชิงส่วนแบ่งการตลาดเพิ่มขึ้น ดังนั้นการสร้างฐานการแข่งขันในระดับตลาดโลกจำเป็นต้องมีการยกระดับเทคโนโลยีและกระบวนการผลิตที่ทันสมัยรวมทั้งการรักษามาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อขยายผลผลิตให้เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อใช้ในการส่งออกทั้งในและต่างประเทศ จากที่มาและความสำคัญของการปฏิรูปการวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* จึงเห็นสมควรให้การสนับสนุนเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อนำเสนอกระบวนการและวิธีการวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* ที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานอุตสาหกรรมได้
- 1.2.2 เพื่อปรับปรุงและพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการคัดเลือกการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus*
- 1.2.3 พัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ *Bacillus cereus* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment) ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหาร โดยเครื่องมือไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วและเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่มีจำนวนมากและรวดเร็ว
- 1.2.4 ปรับชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในปริมาณมากโดยการประยุกต์ใช้ 96 – well microplate และให้ผลวิเคราะห์ภายในเวลา 24 ชั่วโมงโดยให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำเทียบเท่าวิธีการมาตรฐาน
- 1.2.5 เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* สำหรับอุตสาหกรรมของไทยทำให้สามารถลดการนำเข้าชุดวิเคราะห์เชื้อสำเร็จรูปที่มีราคาแพงและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาหาชนิดของฟิเอซอินดิเคเตอร์และความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สามารถจำแนกความแตกต่างของสีที่เปลี่ยนแปลงไปตามการปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลและสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงสีกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้
- 1.3.2 ใช้ระบบอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมกับการบ่งชี้การเจริญของ *Bacillus cereus* ที่สามารถแยกการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ออกจากเชื้อคู่แข่งชนิดอื่นได้
- 1.3.3 ศึกษาผลของชนิดสารยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันของ *Bacillus cereus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เหมาะสมที่สามารถจำแนก *Bacillus cereus* และแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ได้ โดยอาศัยการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนสีของอาหาร
- 1.3.4 ทดสอบการใช้อาหารเหลวจำเพาะที่มีการพัฒนาโดยใช้ระบบการเกิดสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลกับตัวอย่างอาหารจากท้องตลาดและอุตสาหกรรมอาหาร โดยสอบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะร่วมกับวิธีการใหม่ที่อาศัยหลักการการลดขนาดของอาหารและตัวอย่าง (Miniaturization) ผ่านการประยุกต์ใช้ 96 – well microplate กับวิธีการมาตรฐานในการวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในปัจจุบัน โดยอาศัยค่าการคำนวณทางสถิติช่วยในการวิเคราะห์ผล
- 1.3.5 นำเสนอรูปแบบวิธีการวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* เพื่อให้เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ครอบคลุมทั้งกระบวนการผลิต เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อ

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

2.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในวงศ์ *Bacillaceae* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น facultative anaerobic microorganisms และสามารถสร้างสปอร์ได้นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อก่อโรครุนแรงเช่น *Bacillus anthracis* (Ash et. al., 1991)

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นท่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0 -1.2 ไมโครเมตร และยาว 3 – 5 ไมโครเมตร เราสามารถพบ *B. cereus* ได้ 2 รูปแบบ คือ vegetative cells และสปอร์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 4-50 องศาเซลเซียส (Chorin et. al., 1997; Choma et. al., 2000) แต่จะเจริญได้ดีในช่วง 25-37°C บางสายพันธุ์พบว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C (Baker และ Griffiths, 1993) โคโลนีที่พบในอาหารที่มีส่วนผสมของ Sheep blood ร้อยละ 5 มีลักษณะไม่คงรูปและมีขนาดของปฏิกิริยา β -haemolysis ที่แตกต่างกันออกไป ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 4.3-9.3 นอกจากนี้ *B. cereus* สามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดเช่น กลูโคส ฟรักโตส แมนโนส มอลโตส ซูโครส แลคโตส หรือแม้แต่กลีเซอรอล แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้ (Niall และ Vos, 2009)

2.1.2 การเจริญและการสร้าง Endospore

แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในกลุ่ม *Bacillaceae* สามารถสร้างสปอร์ได้ แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่พบว่าสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน (heat tolerant spore) (Harwood, 1990) ผนังชั้นนอกสุดของสปอร์ทำหน้าที่เป็นผนังป้องกันจากอันตรายทั้งทางกายภาพและทางเคมีอีกทั้งยังควบคุมการงอกของสปอร์นั้นอีกด้วย (Kailas et. al., 2011) สปอร์ของ *B. cereus* เป็นตัวการหลักที่ก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมันสามารถทนต่อความร้อนในระดับ pasteurization และรังสีแกมมา (Parry และ Gilbert, 1980; DeMet และ Grecz, 1981) สปอร์ของ *B. cereus* สามารถงอกและเจริญได้ดีในสภาวะที่มีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีข้าวเป็นองค์ประกอบหลักเมื่อเปรียบเทียบกับกรเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ (Trypticase Soy Broth) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°C (Johnson et. al., 1983) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการงอกและเจริญของสปอร์ของ

B. cereus เช่น การกระจายความร้อน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยรวมถึงพีเอช ปริมาณเกลือ ปริมาณอาหาร และความเข้มข้นของสารต้านแบคทีเรียและ/หรือ bacteriostatic agents ตามการรายงานของ Shaheen (2009)

2.1.3 ลักษณะการก่อโรคของ *B. cereus*

B. cereus ก่อให้เกิดโรค *B. cereus* gastroenteritis แบ่งเป็น 2 ประเภทตามอาการของโรค คือ อาหารท้องร่วง (diarrhea type) และอาหารอาเจียน (emetic type) สาเหตุของโรคเกิดจากสารพิษที่สร้างขึ้นระหว่างเชื้อเจริญในอาหาร ลักษณะของโรคที่เกิดเนื่องจาก *B. cereus* ทั้งสองสายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 2.1 *B. cereus* ชนิดก่อให้เกิดอาหารท้องร่วง (diarrhea type) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากการสร้างสารพิษเอนเทอโร ทอกซิน (enterotoxin) ชนิดไม่ทนร้อน (heat-labile toxins) พบได้ในทั้งทางเดินอาหารและอาหารที่เป็นพาหะ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง เวียนศีรษะและปวดท้อง อาการของโรคคล้ายกับการติดเชื้อเนื่องจาก *Clostridium perfringens* ส่วน *B. cereus* ชนิดก่อให้เกิดอาการอาเจียน (emetic type) ทำให้เกิดโรคโดยสร้างสารพิษชนิดทนความร้อน (heat-stable toxins) ในอาหาร เมื่อได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อชนิดนี้เพียงไม่เกิน 5 ชั่วโมง จะเกิดอาการอาเจียนรุนแรง เวียนศีรษะ อาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย คล้ายกับการติดเชื้อจาก *S. aureus* หายได้เองภายในเวลา 6-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของโรคที่เกิดเนื่องจาก *B. cereus* 2 สายพันธุ์

คุณลักษณะ	อาการท้องร่วง (diarrheal)	อาการอาเจียน (emetic)
ปริมาณติดเชื้อ (infective dose)	$10^5 - 10^7$	$10^5 - 10^8$ (ต่อกรัม)
แหล่งผลิตสารพิษ (toxin produced)	ในลำไส้เล็กของโฮสต์	ในอาหาร
ชนิดของสารพิษ (type of toxin)	โปรตีน	ไซคลิกเปปไทด์
ระยะฟักตัว (incubation period)	8 – 16 ชม. (อาจมากกว่า 24 ชม.)	0.5 – 5 ชม.
ระยะเวลาป่วย (duration of illness)	12 – 24 ชม. (อาจหลายวัน)	6 – 24 ชม.
อาการ (symptoms)	ถ่ายเป็นน้ำ ปวดท้อง อาจเกิดอาการคลื่นไส้	คลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ

อาหารที่มักพบการปนเปื้อน	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ชุป ผัก ซอส นมและผลิตภัณฑ์นม	ข้าวผัด พาสต้า พาสตรี (pastry) ก๋วยเตี๋ยว
--------------------------	---	--

ที่มา: คัดแปลงจาก Granum (1977)

2.1.4 การปนเปื้อนในอาหารและการระบาดของโรค

มีรายงานว่า *B. cereus* มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด ได้แก่ ข้าว เครื่องเทศ นมและผลิตภัณฑ์อาหารพร้อมบริโภค เป็นต้น จากการสำรวจการปนเปื้อน *B. cereus* ในอาหารพร้อมบริโภคในประเทศเดนมาร์กระหว่างปี ค.ศ. 2000-2003 โดยแยกเป็นอาหารพร้อมบริโภค 3 ประเภท ได้แก่ อาหารสด (ผักและผลไม้ รวม 199 ตัวอย่าง) อาหารที่ผ่านความร้อน (เช่น ขนมอบัง พาสต้า ไส้กรอก ซอส ชุป เป็นต้น รวม 30,581 ตัวอย่าง) และอาหารที่ผ่านความร้อนบางส่วน (เช่น แชนวิช สลัด เด็ก คัสตาร์ด ไอศกรีม เป็นต้น รวม 13,873 ตัวอย่าง) พบว่ามีการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ (not acceptable) หรือมากกว่า 10^4 CFU/g เป็นจำนวน 2(0.2%) 122(0.4%) และ 83(0.6%) ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่ง *B. cereus* ที่แยกได้นั้นส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินและพบสายพันธุ์ที่สร้าง emetic toxin เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น (Rosenquist et. al., 2005) เมื่อเร็ว ๆ นี้ ในปี 2006 Meldrum และคณะ ได้สำรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารพร้อมบริโภคในประเทศเวลส์ระหว่างปี ค.ศ. 2003-2005 ตรวจพบการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ($\geq 10^5$ CFU/g) ในอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ แล็กคริมและพาสตรีเนื้อ โดยตรวจพบเป็นจำนวน 2(0.5%) และ 2(0.4%) ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 433 และ 515 ตัวอย่าง ตามลำดับ และในเวลาใกล้เคียงกัน Wijnands และคณะ (2006) ทำการตรวจสอบ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบว่ามีอาหารที่มีการปนเปื้อน *B. cereus* ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ($\geq 10^5$ CFU/g) หลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป นมและผลิตภัณฑ์นม อาหารพร้อมบริโภค ผักและผลิตภัณฑ์ผัก และพาสตรี คิดเป็นร้อยละ 0.14 0.19 0.29 0.16 และ 0.04 จากจำนวนทั้งหมด 1,384 5,943 22,744 637 และ 2,637 ตัวอย่าง

การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *B. cereus* เกิดขึ้นหลายครั้งในหลายประเทศ มีรายงานว่าในช่วงปี ค.ศ. 1973 – 1987 เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *B. cereus* ในประเทศสหรัฐอเมริกา รวม 58 ครั้ง จากอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารจีน อาหารเม็กซิกัน เนื้อวัว ผักผลไม้ และสัตว์น้ำจำพวกหมีเปลือก (shellfish) เป็นจำนวน 24 5 3 3 และ 2 ครั้ง ตามลำดับ ในเนื้อไก่ ปลากระดุกแข็ง ไอศกรีมและไก่กวาง พบการระบาดอย่างละ 1 ครั้ง ส่วนการระบาดอีก 17 ครั้ง พบในอาหารอื่นๆ และไม่ทราบสาเหตุชัดเจน (Schultz และ Smith, 1994) ในประเทศเนเธอร์แลนด์ระหว่างปี ค.ศ.1991-1994

พบว่า *B. cereus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 19 ของการระบาดทั้งหมด (Simone et. al., 1997) ในประเทศไต้หวันในปี ค.ศ.1986-1995 พบว่าการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อชนิดนี้จัดเป็นอันดับสามรองจากการระบาดเนื่องจาก *Vibrio parahaemolyticus* และ *S. aureus* (Schoeni และ Wong, 2005) ส่วนในประเทศอื่น Kotriranta และคณะ (2000) ได้รวบรวมการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *B. cereus* ระหว่างปี ค.ศ. 1973-1985 พบการระบาดเกิดขึ้นในประเทศฟินแลนด์ เนเธอร์แลนด์ แคนาดา สกอตแลนด์ อังกฤษและเวลส์ รวมถึงประเทศญี่ปุ่น คิดเป็นร้อยละ 17.8 11.5 2.2 0.8 0.7 และ 0.7 ของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากแบคทีเรียทั้งหมด

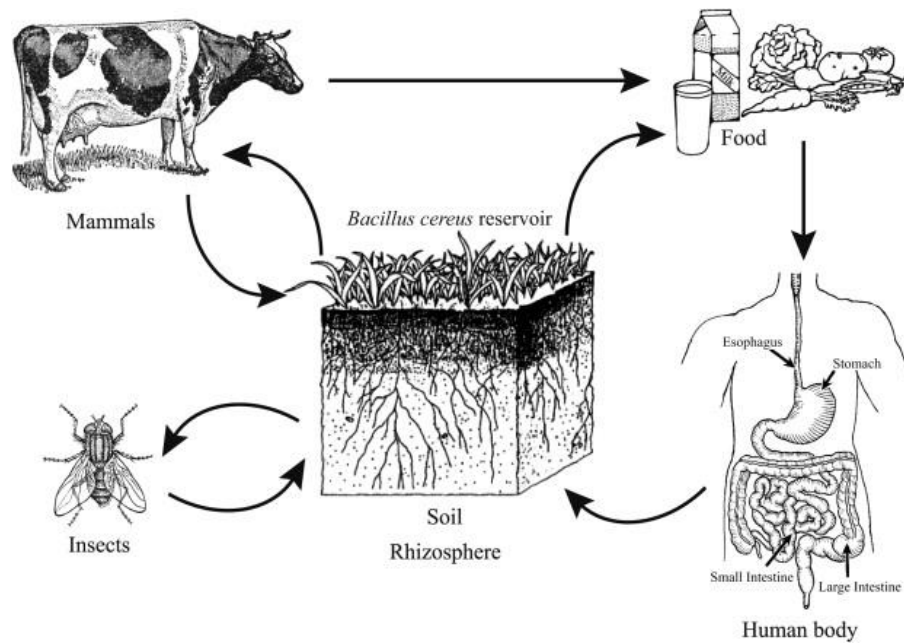
นอกจากการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในอาหารแล้ว เชลล์ *B. cereus* ยังสามารถเกาะติดบนพื้นผิวต่างๆ เช่น สแตนเลสสตีล ซึ่งเป็นวัสดุหลักของอุปกรณ์และเครื่องมือในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ (Peng et. al., 2001) เมื่อเชลล์นั้นเกิดการเกาะติดบนพื้นผิวในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชลล์เหล่านั้นอาจพัฒนาเป็นฟิล์มชีวภาพได้ Peng และคณะ (2002) พบว่าการเกิดฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* มีผลทำให้เชลล์ของ *B. cereus* ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเชลล์แขวนลอย (planktonic cells) และเชลล์เกาะติด (attached cells) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกาะติดของเชลล์และสปอร์พบว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้ดีกว่าเชลล์หลายเท่าเนื่องจากมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง (Peng et. al., 2001) และสปอร์ของ *B. cereus* ที่เกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีล จะมีผลทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของสปอร์นั้นเพิ่มขึ้นด้วย (Simmonds et. al., 2003)

B. cereus ถูกจัดเป็นเชื้อก่อโรคในอาหารเนื่องจากลักษณะการบริโภคของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์อาหารในปัจจุบันนั้นเอื้อต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *B. cereus* ทั้งนี้ เนื่องจากเมื่อเวลาที่เชลล์ที่มีชีวิตของ *B. cereus* เจริญอยู่ในอาหารมันจะสร้างสารพิษเช่น hemolysins, phospholipase enzyme, และ emetic toxins โดย emetic toxin เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมทาบอลิซึมในระหว่างการเจริญของ *B. cereus* ซึ่งส่งผลต่อมนุษย์โดยทำให้เกิดอาการอาเจียนและคลื่นไส้ในช่วงระหว่าง 5 ชั่วโมงแรกหลังจากได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายผ่านทางอาหารที่มีการปนเปื้อน (Ehling-Schulz et. al., 2004; Bottone, 2010) นอกจาก emetic toxin แล้ว สารพิษอีกชนิดที่สร้างจากเชลล์ที่มีชีวิตของ *B. cereus* คือ diarrheal toxin ซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหารและระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของสารพิษชนิดนี้จะยังไม่เป็นที่ปรากฏและถูกศึกษาในมนุษย์ แต่ก็สามารถระบุอาการของผู้ที่ได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายได้ว่ามีอาการปวดท้องเกร็งอย่างรุนแรง มีอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง

ในช่วง 8 ชั่วโมงแรกหลังจากได้รับสารพิษหรือเซลล์ที่มีชีวิตของ *B. cereus* เข้าสู่ร่างกาย (Niall และ Vos, 2009)

2.1.5 การปรากฏของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ตามปกติแล้วแบคทีเรียในวงศ์ *Bacillaceae* มักพบมากในดินในทุกๆ สภาพอากาศและทุกๆ สถานที่ไม่ว่าดินนั้นจะมีค่าพีเอช เป็นกรดหรือด่าง หรือมีปริมาณสารอาหารมากหรือน้อยก็ตาม และเนื่องจากสาเหตุที่แบคทีเรียชนิดนี้มีแหล่งอาศัยอยู่ในดินนี้เอง จึงถูกนำไปใช้เป็นครรชนกำจัดความสะอาดและสุขอนามัยระหว่างการผลิตของผลิตภัณฑ์อาหาร (FSANZ, 2001)



รูปที่ 2.1 ลักษณะการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *B. cereus* จากดินสู่อาหาร-คน (ที่มา : Abee et. al., 2011)

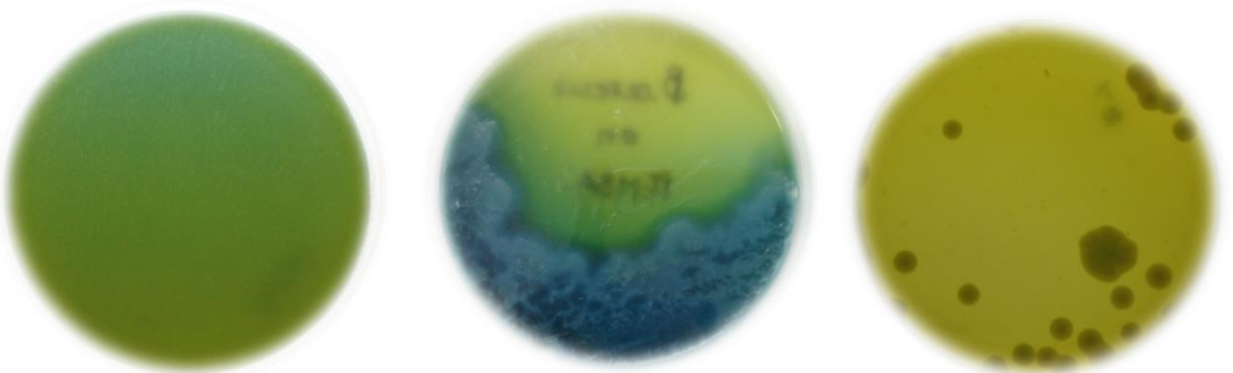
นอกจากจะทำให้เกิดโรคแล้ว เซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ของ *B. cereus* ยังเป็นตัวการที่ทำให้อาหารเน่าเสีย อีกด้วยหลายการศึกษาพบว่าอาหารประเภทนมและผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของนมกว่าร้อยละ 31 ในสาธารณรัฐเช็กมีการปนเปื้อนของ *B. cereus* (Schlegelova et. al., 2008) Martino และคณะ (2010) พบว่า ในตัวอย่างอาหาร 444 ชนิดที่ขายตามท้องตลาดในประเทศบอสวานามีการปนเปื้อนด้วย *B. cereus* มากกว่า 52 สายพันธุ์ (Murindamombe et. al., 2005) นอกจากนี้พบว่า *B. cereus* ปนเปื้อนในอาหารพร้อมรับประทานแล้วยังพบในผักและผลไม้สดที่มีการขนส่งและการดูแลที่ไม่เหมาะสมอีกด้วย ตัวอย่างเช่นใน กระบวนการผลิต zucchini puree ความสะอาดของกระบวนการผลิตในขั้นตอนต่างๆ ถูกตรวจและใช้จำนวนเชื้อ *B. cereus* เป็นตัวชี้วัดพบว่า การใช้ความร้อนในกระบวนการฆ่าเชื้อระดับพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้น สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้จากประมาณ 6.1 log CFU/g เหลือเพียง 0.5 log CFU/g แต่อย่างไรก็ตามหากการขนส่งระหว่างการแช่เย็นไม่เหมาะสมจะทำให้เชื้อกลับมาามีปริมาณ 6.4 log CFU/g

(Guinebretiere et. al., 2003) อีกตัวอย่างหนึ่งของการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหารคือ ผลิตภัณฑ์อาหารทำแห้ง เช่น การเก็บรักษามันฝรั่งบดไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 10°C แต่ต่ำกว่า 60°C จะทำให้เกิดการงอกของสปอร์ของ *B. cereus* ซึ่งเหลือรอดจากการทำลายด้วยความร้อน (King et. al., 2007)

2.1.6 การคัดแยกและวิเคราะห์เชื้อ

International standardization organization (ISO) ได้กำหนดข้อปฏิบัติและวิธีการวิเคราะห์ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนได้แก่ การนับจำนวนและการตรวจหา โดยวิธีนับจำนวนเริ่มจากการใช้วิธี most probable number technique (MPN) ในอาหาร Trypticase Soy Polymyxin B broth (TSPB) โดยทำการบ่มเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมงจากนั้นนำเชื้อในหลอดทดลองที่มีผลเป็นบวกมาทำการเพาะลงในอาหารแข็ง mannitol egg yolk polymyxin B (MYP) หรือ pyruvate polymyxin B egg yolk mannitol bromothymol blue (PEMBA) ตามด้วยการยืนยันผลด้วย Sheep Blood agar เพื่อทดสอบปฏิกิริยา haemolysis ตามด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (ISO, 2006) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวข้างต้นจำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 5 วัน จึงจะสามารถสรุปผลได้ อีกทั้งหากลดขั้นตอนใดลงอาจมีการแปรผลผิดพลาดเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อคู่แข่งอื่นๆ เช่น *Staphylococcus aureus* หรือ non-pathogenic *Bacillus* sp. (Tallent et. al., 2012) ดังนั้นการทดลองเพื่อทดแทนและพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *B. cereus* จึงถูกศึกษาอย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานานซึ่ง Netten และ Kramer (1992) ได้ทำการสรุปและรวบรวมการพัฒนาดังกล่าวไว้ในตารางที่ 2.2

แม้จะมีการพัฒนาอย่างหลากหลายแต่องค์กรความปลอดภัยทางอาหาร International Standardization Organization (ISO), United States Food and Drug Administration (USFDA), และ Association Française de Normalisation (AFNOR) ต่างอนุญาตให้ใช้เพียงอาหารชนิด MYP และ PEMBA ในการวิเคราะห์เท่านั้น



รูปที่ 2.2 ลักษณะของอาหาร PEMBA a) อาหารเปปต้า, b) การเจริญของ *B. cereus*, c) *B. cereus* กับเชื้อคู่แข่งอื่นๆ

ตารางที่ 2.2 รายชื่ออาหารที่ใช้สำหรับคัดแยกเชื้อ *B. cereus*

(ที่มา : Netten และ Kramer, 1992)

Plating medium	Selective system	Indicator system	Reference
Egg yolk agar	None	Egg yolk hydrolysis	McClung <i>et al.</i> (1946)
Horse blood agar	None	Blood haemolysis	Hauge (1955)
Egg yolk Mannitol bromocresol purple agar	None	Egg yolk hydrolysis Mannitol/bromocresol purple	Hood <i>et al.</i> (1990)
Kendall's <i>B. cereus</i> medium	None	Egg yolk hydrolysis Mannitol/bromocresol purple	Gilbert and Taylor (1976)
Mannitol egg yolk polymyxin B agar	Polymyxin B	Egg yolk hydrolysis Mannitol/phenol red	Mossel <i>et al.</i> (1967)
Kim & Goepfert	Polymyxin B	Egg yolk hydrolysis	Kim and Goepfert (1971)
Pyruvate polymyxin B egg yolk Mannitol bromothymol blue agar	Polymyxin B	Egg yolk hydrolysis Mannitol/bromothymol blue	Holbrook and Anderson (1980)

2.1.7 การป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ

บาซิลลัส ซีเรียส เป็นเชื้อชนิดที่ก่อปัญหาเกี่ยวกับอุตสาหกรรมการจัดบริการอาหาร ที่ต้องมีการเตรียมอาหารจำนวนมาก หรือต้องจัดเตรียมอาหารขึ้นล่วงหน้าเป็นเวลานานๆ ก่อนนำไปบริโภค เพราะหากในระหว่างการปรุงและการเก็บรักษามีการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะ หรือไม่สะอาด จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ ชนิดนี้ขึ้น ซึ่งกว่าที่จะนำอาหารไปบริโภค เชื้อชนิดนี้อาจเพิ่มจำนวนในอาหารมากขึ้นเรื่อยๆ ได้ ดังนั้นในขั้นตอนของการจัดเตรียม การเก็บรักษาและการขนส่งอาหาร จึงต้องกระทำอย่างระมัดระวังและรักษาความสะอาด โดยเฉพาะอาหารที่ทำให้สุกแล้ว ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินควร

2.2 สารคัดเลือก

สารคัดเลือกคือสารที่ใช้ผสมลงไปในการเลี้ยงเชื้อและออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการ สารในกลุ่มนี้ได้แก่สารจำพวกยาปฏิชีวนะ สารลดแรงตึงผิว Detergents, Dyes, Sanitizers, และอื่นๆ กลไกของยาปฏิชีวนะนั้นมีหลากหลายขึ้นกับชนิดและการใช้งานแต่โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เชื้อหุ้มเซลล์ หรือแม้แต่ขัดขวางการสร้าง โปรตีนบางชนิดในแบคทีเรียคู่แข่ง (Todar, 2008)

ในงานวิจัยนี้สารคัดเลือกทั้งหมด 5 ชนิดจะถูกวิเคราะห์ถึงความสามารถในการคัดเลือกแบคทีเรีย *B. cereus* ออกจากเชื้อคู่แข่ง

2.2.1 Polymyxin B sulfate

Polymyxin เป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ค้นพบในช่วงทศวรรษที่ 1940s ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus polymyxa* (Arnold et. al., 2007) ซึ่ง Polymyxin B sulfate นั้นออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบซึ่งมีผนังเซลล์ประกอบด้วย Lipo-polysaccharide โดยจะทำให้เซลล์อ่อนแอและแตกตายในที่สุด (Alipour et. al., 2008) สาร polymyxin B sulfate นั้นนิยมใช้ควบคู่กับสารคัดเลือกอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Evans et. al., 1999) Polymyxin B sulfate ถูกนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกในการวิเคราะห์ *B. cereus* โดย Donovan (1958) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกเชื้อในตัวอย่างนม จากวันนั้น polymyxin B sulfate ยังคงถูกใช้เป็นสารคัดเลือกหลักสำหรับ *B. cereus* ตลอดมา อย่างไรก็ตาม polymyxin B นั้นออกฤทธิ์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นและไม่ส่งผลต่อแกรมบวกเลยทำให้หากตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเชื้อหลายชนิดก็จะทำให้การแปรผลที่ผิดพลาดขึ้นได้ ดังนั้นการศึกษาหาสารคัดเลือกชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาเพิ่มความจำเพาะกับ *B. cereus* จึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาเพื่อพัฒนาการวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต

2.2.2 Trimethoprim

Trimethoprim เป็นสารคัดเลือกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้าง tetrahydrofolic acid ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญของกรดอะมิโนและกรดนิวคลีอิก ดังนั้นจึงเป็นสารคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Pidcock et. al., 2010) นอกจากนี้พบว่าการใช้ trimethoprim ควบคู่กับ sulfamethoxazole สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้มากกว่าร้อยละ 98 ในตัวอย่างอาหารในประเทศโคลัมเบีย (Ruiz-Bolivar et.

al., 2011) สำหรับการวิเคราะห์ *B. cereus* trimethoprim ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *B. cereus* ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Oxoid, Thermo Scientific, United Kingdom และ Chon et. al. (2012))

2.2.3 Novobiocin

Novobiocin เป็นสาร aromatic compound ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะ coumarin ซึ่งมีผลรุนแรงต่อแบคทีเรียแกรมบวก โดยออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ gyrase ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA (Donnelly และ Blagg, 2008) นอกจากนี้จากการศึกษาของ (Hitchins และ Slepecky, 1969); Sioud และคณะ (2009) พบว่า Novobiocin ยังสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์และการเจริญของ *Bacillus subtilis* และ *B. megaterium* ได้อีกด้วย

2.2.4 Ceftriaxone

Ceftriaxone เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporin ซึ่งมีการพัฒนาออกมาเป็นรุ่นที่ 3 ซึ่งออกฤทธิ์กว้างในการยับยั้งแบคทีเรียหลากหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Salmonella* spp. (Wong et. al., 2013) จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *Clostridium* sp. แสดงการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้อย่างมากในตัวอย่างที่แยกจากนม (Wagner et. al., 2011)

2.3.5 Amoxicillin

Amoxicillin เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactam ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์โดยขัดขวางการสร้างพันธะระหว่าง peptidoglycan ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียที่พบว่ามี ความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus* spp. (Qadri et. al., 1996) นอกจากนี้ *B. cereus* พบว่าค่อนข้างทนทานต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้ (Fazlani et. al., 2011)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

3.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

Bacillus cereus ATCC 11778 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; DMST, Thailand)

Staphylococcus aureus DMST 4609 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; DMST, Thailand)

Escherichia coli TISTR 808 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; DMST, Thailand)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 ตู้ปลอดเชื้อ, DWYER Series 0325, USA

3.2.2 ตู้บ่ม, Memmert Model ULM500, Japan

3.2.3 96-ไมโครเวลเพลท, Costar, USA.

3.2.4 ถ้วยอลูมิเนียม

3.2.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ, BECTHAI and HIRAYAMA Model HA300D, Japan

3.2.6 Auto pipette ปริมาตร 10 microlitter, Autopipette, USA

3.2.7 Auto pipette ปริมาตร 200 microlitter, Autopipette, USA

3.2.8 Auto pipette ปริมาตร 1000 microlitter, Autopipette, USA

3.2.9 Auto pipette ปริมาตร 5 milliliter, Autopipette, USA

3.2.10 เครื่องชั่ง 0.0001 grams, Metter Toledo Model AG204, Switzerland

3.2.11 เครื่องชั่ง 0.01 grams, Metter Toledo Model GG4002-S, Switzerland

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 อาหารเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะ

3.3.1.1 Tryptone Soy Agar (TSA) , Lab M, Lancashire, UK

3.3.1.2 Trypticase Soy Broth (TSB), Difco, Maryland, USA

3.3.2 สารเคมี

3.3.2.1 Amoxicillin Trihydrate, Amoxil™, London, UK

3.3.2.2 Bromothymol blue, Acros Organics, Geel, Belgium

3.3.2.3 Ceftriaxone, Milimed, Samut Prakan, Thailand

3.3.2.4 D-Glucose, Merck, Germany

D-Mannitol , US biological, Massachusetts, USA

3.3.2.5 MgSO₄.7H₂O , Merck, Berlin, Germany

- 3.3.2.6 Na_2HPO_4 , Carlo Erba, Milano, Italy
- 3.3.2.7 Novobiocin, Bio-Rad, California, USA
- 3.3.2.8 Peptone, Difco, Maryland, USA
- 3.3.2.9 Polymyxin B sulfate, US biological, Massachusetts, USA
- 3.3.2.10 Sodium Chloride, Carlo Erba, Milano, Italy
- 3.3.2.11 Trimethoprim, Toku-E, Washington, USA
- 3.3.2.12 Tryptone, Lab M, Lancashire, UK

3.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ DMST 4609, ซึ่งได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์บนอาหาร Tryptone Soy Broth (TSB) นาน 18 ชั่วโมงที่ 30°C จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการที่ 10^1 , 10^3 , และ 10^5 CFU/mL

3.5 การศึกษาสารคัดเลือก

3.5.1 การเตรียมสารคัดเลือก

สารปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดได้แก่ polymyxin B, trimethoprim, amoxicillin, ceftriaxone, และ novobiocin จะถูกนำมาศึกษาในการทดลองนี้ ซึ่งเตรียมสารต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5, 10, และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นจะถูกพิจารณาว่าเป็นความเข้มข้นตามปกติที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน (ISO, 2006) จากนั้นทำการทดลองด้วยการใช้ microtitre plate แบบ 96 หลุม และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในตู้บ่มร้อน

3.5.2 วิธีการทดลอง

เชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันจะถูกถ่ายลงในอาหารเหลว TSB ที่มีสารคัดเลือกที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี modified method ซึ่งอ้างอิงจาก Khueankhancharoen และ Thipayarat (2011) ณ เวลา ที่ 0, 4, 8, 12, 16, และ 24 ชั่วโมงบนอาหาร TSA ด้วยความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมหลังจากเจือจางด้วย tryptone salt diluents (1 g/L Tryptone, 8.5 g/L NaCl) ซึ่งทำได้โดยการลดปริมาตรของหัวเชื้อในการนับเชื้อจาก 100 มิลลิลิตร เหลือเพียง 10 ไมโครลิตรและทำการนับบนอาหารแข็ง TSA ที่บรรจุในหลุม 96 well plate โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางหัวเชื้อในแต่ละความเข้มข้นที่ 20:180 ไมโครลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการที่ 3.1

$$\text{Percent inhibition} = \frac{(\text{Viable cells in TSB without inhibitors} - \text{Viable cells in TBS with inhibitor})}{\text{Viable cells in TSB without inhibitors}} \times 100$$

..... (สมการ
ที่.3.1)

3.6 การศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่ใช้ในการจำแนก *B. cereus*

3.6.1 อาหารพื้นฐาน

สูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ดัดแปลงมาจากอาหารแข็งชนิด polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue agar (PEMBA) โดยส่วนประกอบต่างๆ ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหาร PEMBA ต่อ 110.0 mL

(ที่มา : Atlas, 2010)

สาร	หน้าที่การทำงาน	ปริมาณ (g) /110 mL
Agar	เป็นตัวทำให้อาหารแข็ง	1.8
D-mannitol	แยกแบคทีเรียแกรมบวกออกจาก <i>B. cereus</i>	1.0
Sodium pyruvate	กระตุ้นการเจริญเติบโตของสปอร์ <i>B. cereus</i>	1.0
Na ₂ HPO ₄	ปรับบัฟเฟอร์ของระบบ	0.25
NaCl	ปรับระบบออสโมติกของระบบ	0.2
Peptone	เป็นแหล่งของไนโตรเจน	0.1
KH ₂ PO ₄	ปรับบัฟเฟอร์ของระบบ	0.025
Bromthymol Blue	อินดิเคเตอร์	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	ปรับบัฟเฟอร์ของระบบ	0.01
Antibiotic inhibitor (Polymyxin B)	ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ	5 mL
Egg yolk emulsion (20 %solution)	ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี	5 mL

pH ของอาหารถูกปรับที่ 7.4 ± 0.2 ที่ 25°C ก่อนที่จะฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารคัดเลือกที่ใช้ในการศึกษานี้จะถูกเติมลงสู่อาหารก่อนการลงเชื้อเนื่องจากความไวต่อความร้อน นอกจากนี้การศึกษานี้จะไม่เติมน้ำและไข่แดงเนื่องจากอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ในระดับการทดลองขนาดเล็ก

3.6.2 วิธีการทดลอง

แหล่งคาร์บอนที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ได้แก่ กลูโคสและแมนนิทอล นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นที่จะใช้ศึกษาอยู่ที่ 10, 20, และ 40 กรัมต่อลิตร โดยสารคัดเลือกที่จะนำมาใช้ในการศึกษานั้นจะได้อาจจากการทดลองก่อนหน้าซึ่งเป็นสารคัดเลือกที่มีระดับความเข้มข้นเหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* และสามารถช่วยคัดเลือกเชื้อชนิดอื่นๆ ออกไปได้ โดยวิธีการทดลองทำได้โดยการนำหัวเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, และ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน แล้วทำการนับเซลล์ทุก ๆ 8 ชั่วโมงควบคู่กับการถ่ายภาพ

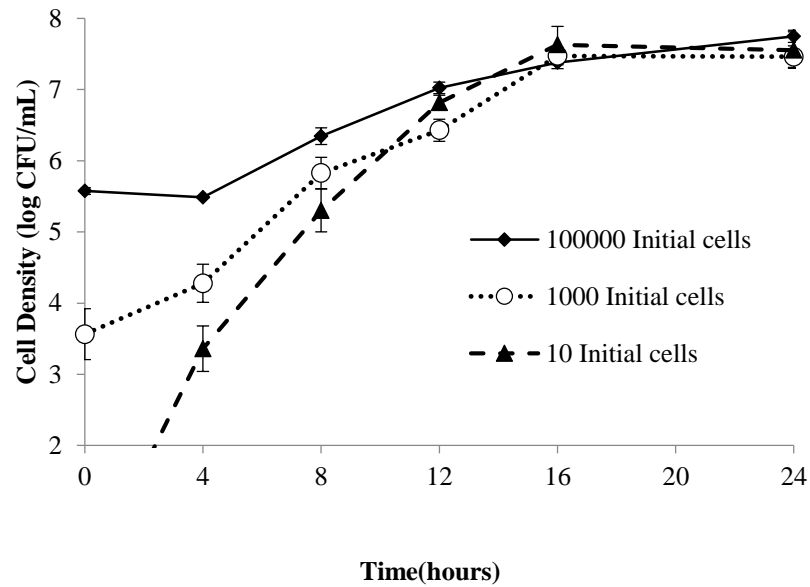
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อจะพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *B. cereus* โดยเซลล์ของ *B. cereus* จะถูกเลี้ยงใน 96 deep well plates เพื่อลดปริมาณของอาหารและสามารถทำการทดลองได้ในหลากหลายสถานะพร้อมๆ กัน จากนั้นจะทำการนับเซลล์ในอาหาร TSA ที่อยู่ในหลุม 96 well plates ดังการทดลองของ Khueankhanchaoen และ Thipayarat (2011) จากนั้นเชื้อจะถูกนำไปแยกบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยสำหรับ *B. cereus* นั้นจะบ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมงก่อนการนำมานับจำนวน ส่วน *S. aureus* และ *E. coli* จะถูกนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมงก่อนทำการนับจำนวนเช่นกัน โดยวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ การหาสารคัดเลือกว่ามีความจำเพาะและเหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus*

4.1 การเจริญของ *Bacillus cereus*

ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน ได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 4.1 โดยทำการวิเคราะห์จากการเลี้ยงเชื้อที่ 30°C ในอาหารที่ไม่มีการเติมสารคัดเลือก เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นต่ำๆ *B. cereus* จะเพิ่มจำนวนรวดเร็วกว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูง ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณจำกัด ทำให้การเจริญของเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูงๆ ทำได้ช้าลง นอกจากนี้ที่ทุกระดับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นพบว่าปริมาณเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่ประมาณ 10^7 - 10^8 CFU/mL หลังจากเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเนื่องจากขอบเขตของการนับเชื้อด้วยวิธีนี้อยู่ที่ 10^2 CFU/mL ดังนั้นที่ความเข้มข้นเชื้อต่ำ อาจมีการเจริญของเชื้อแล้วเพียงแต่อาจจะยังไม่สามารถตรวจนับได้ เนื่องจากมีการรายงานว่า *B. cereus* มี generation time อยู่ที่ประมาณ 45 นาทีจากการศึกษาของ Benedict และคณะ (1993)

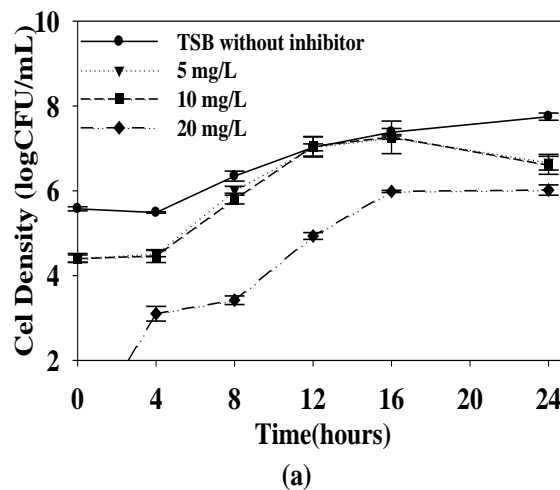


รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อแตกต่างกัน (10^1 , 10^3 , และ 10^5 CFU/mL)

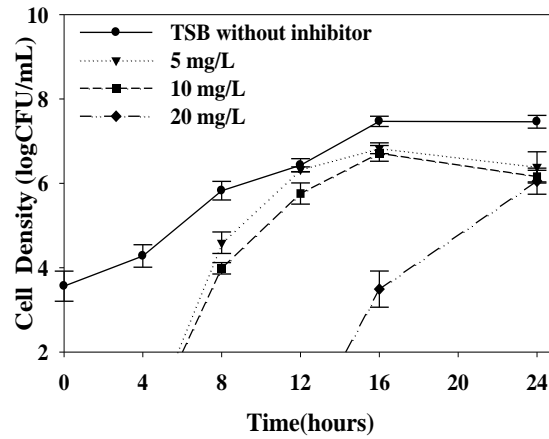
4.2 การศึกษาสารคัดเลือกที่เหมาะสม

4.2.1 Polymyxin B Sulfate

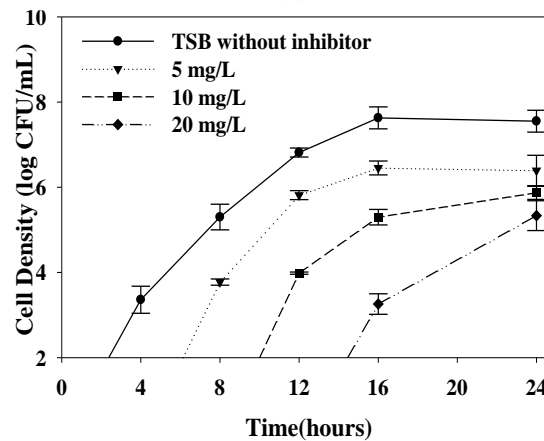
ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆ ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 4.2 ที่เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5 CFU/mL (รูปที่ 4.2a) การใช้ Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้น 20 mg/L ทำให้เกิดการลดลงของเซลล์อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จึงค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามปกติ ในทางกลับกันผลของการใช้ Polymyxin B sulfate ที่ 5 และ 10 mg/L ให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ เมื่อทำการลดจำนวนเซลล์เริ่มต้นลงจนถึงที่ CFU/mL (รูปที่ 4.2b) ความเป็นพิษของ Polymyxin B sulfate แสดงให้เห็นมากขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นลดน้อยลง



(a)



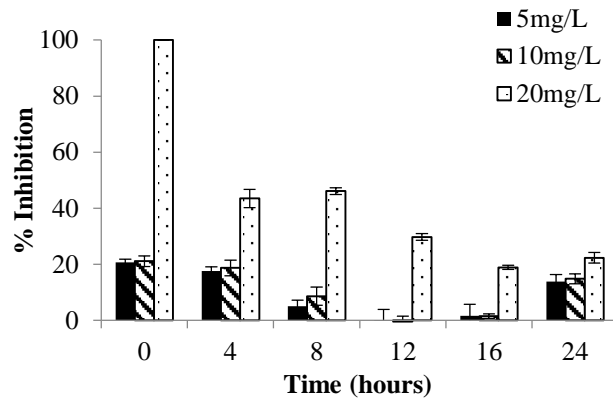
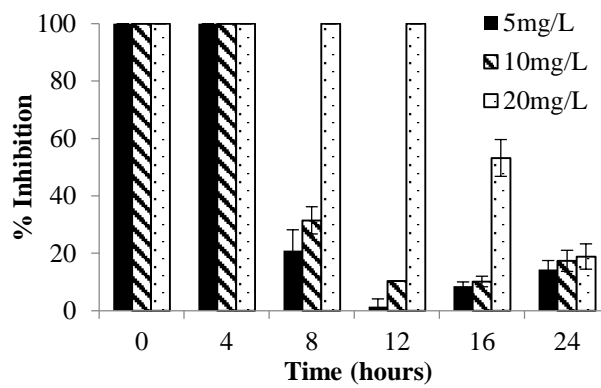
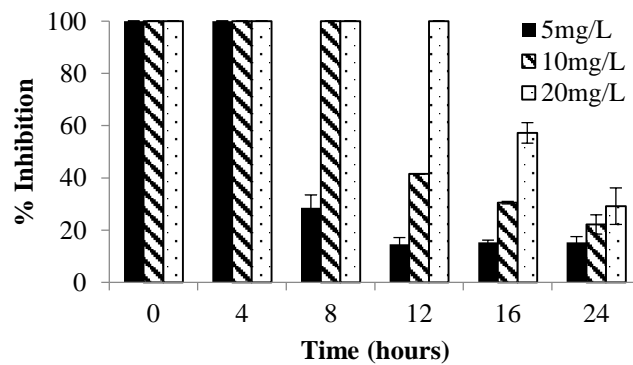
(b)



(c)

รูปที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารที่มีการผสม Polymyxin B sulfate ในความเข้มข้นต่างๆ (a) 10^5 CFU/ML, (b) 10^3 CFU/mL, (c) 10^1 CFU/mL

เมื่อเติม Polymyxin B sulfate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จะทำให้เกิดประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยการแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (ในสมการที่ 3) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ายิ่งความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีมากเท่าใด เปอร์เซ็นต์การยับยั้งกลับมีค่าลดลง โดยเฉพาะกับการใช้สารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นต่ำๆ (รูปที่ 4.2c) การใช้ Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้น 5-10 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำกว่า 20% (รูปที่ 4.2a) แต่เมื่อเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณน้อยลงก็จะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มากขึ้นแม้จะใช้ความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate เท่าเดิม (รูปที่ 4.2b-c) อย่างไรก็ตามไม่ว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นจะมากหรือน้อยเพียงใดก็พบว่าการใช้ Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้น 20 mg/L นั้นส่งผลต่อการเจริญและมีความเป็นพิษต่อ *B. cereus* มากที่สุดแม้ว่าจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปก็ตาม

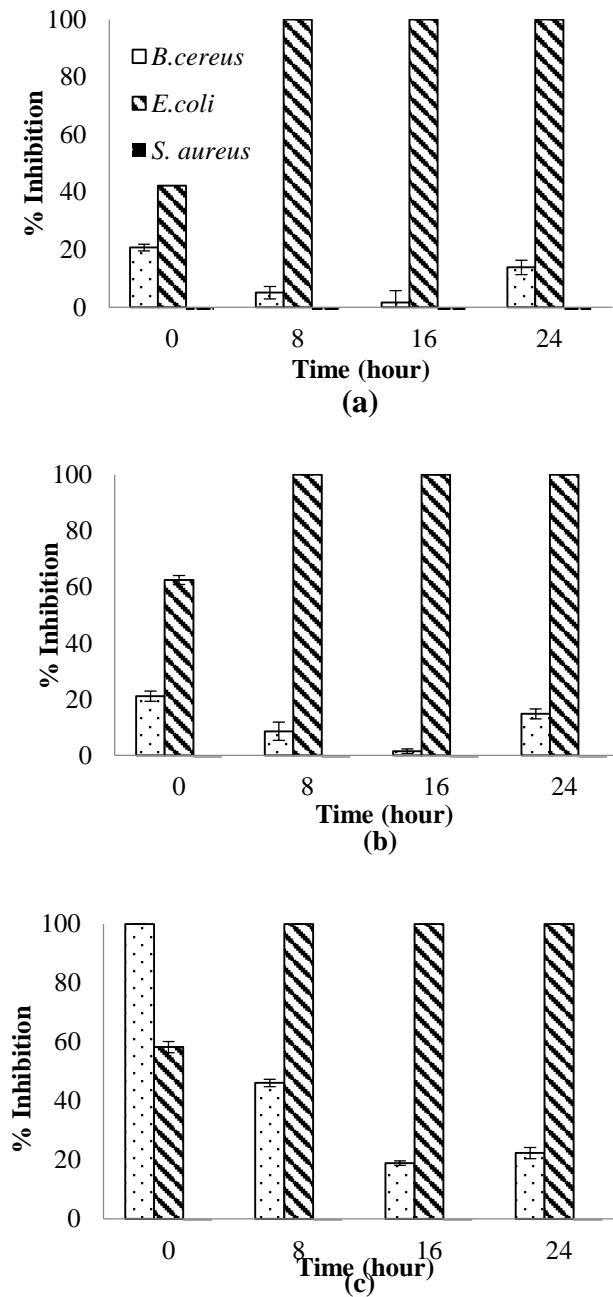
a) Innoculum culture at 10⁵ CFU/mLb) Innoculum culture at 10³ CFU/mLc) Innoculum culture at 10¹ CFU/mL

รูปที่ 4.3 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งของ Polymyxin B sulfate ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ

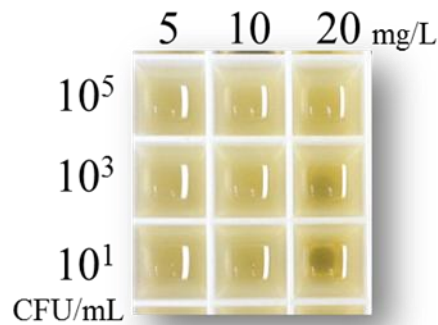
B. cereus (a) 10 CFU/mL, b) 10³ CFU/mL, และ c) 10⁵ CFU/mL

สำหรับผลของการยับยั้งการเจริญของ Polymyxin B sulfate ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* เป็นไปดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.3 ที่ระดับความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate ที่ 5 mg/L พบว่าเชื้อที่มีความไวต่อสารคัดเลือกชนิดนี้มากที่สุดคือ *E. coli* โดยจะไม่สามารถเจริญได้หลังจากเวลาผ่านไปนาน 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม Polymyxin B sulfate กลับไม่แสดงผลในการยับยั้งแก่เชื้อ *S. aureus* เลย ซึ่งแม้จะ

เพิ่มความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate แล้วก็ยังให้ผลในทางเดียวกัน (รูปที่ 4.3b และ c) จากผลการทดลองดังกล่าวจะพบว่า Polymyxin B sulfate ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* มากที่สุดตามมาด้วย *B. cereus* และไม่ส่งผลต่อ *S. aureus*



รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Polymyxin B sulfate ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด
(a) 5 mg/L, (b) 10 mg/L, (c) 20 mg/L



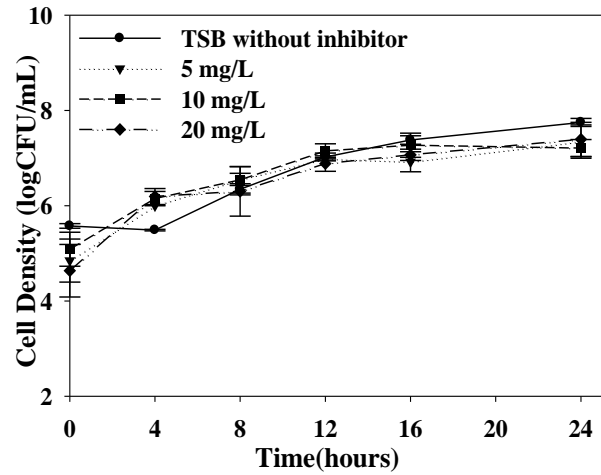
รูปที่ 4.5 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+ Polymyxin B sulfate หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การใช้ Polymyxin B sulfate เป็นสารคัดเลือกในการแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillaceae* ในตัวอย่างอาหารมีการศึกษาอย่างแพร่หลายมาตั้งแต่อดีต (Donovan, 1958) โดยความเข้มข้นที่ใช้จะอยู่ที่ 10 mg/L

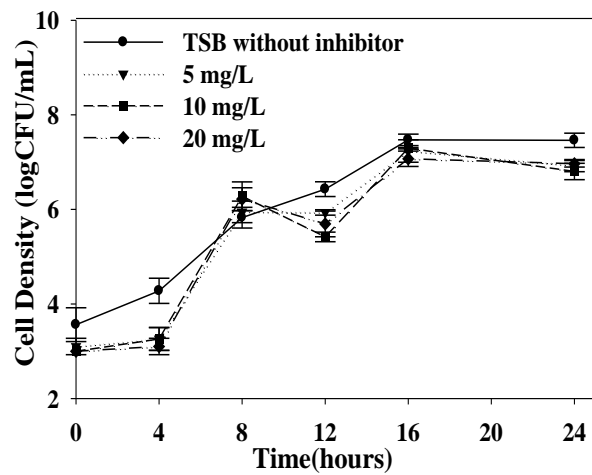
ตามที่ระบุไว้มาตรฐานทางอาหารจากหลากหลายสถาบัน เช่น ISO 21871, BAM, AOAC, และ AFNOR ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่า การใช้ Polymyxin B sulfate ที่ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อการเจริญของ *B. cereus* ที่มีความเข้มข้นเซลล์น้อยๆ ซึ่งอาจนำมาสู่การแปรผลที่ผิดพลาดได้ ดังนั้นการลดปริมาณความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate ให้เหลือเพียงแค่ 5 mg/L อาจเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *B. cereus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารมากกว่า อย่างไรก็ตามการลดปริมาณความเข้มข้นเพียงอย่างเดียวอาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ เนื่องจากสารชนิดนี้ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบเพียงอย่างเดียวเท่านั้น (Evans et. al., 1999; Hermsen et. al., 2003)

4.2.2 Trimethoprim

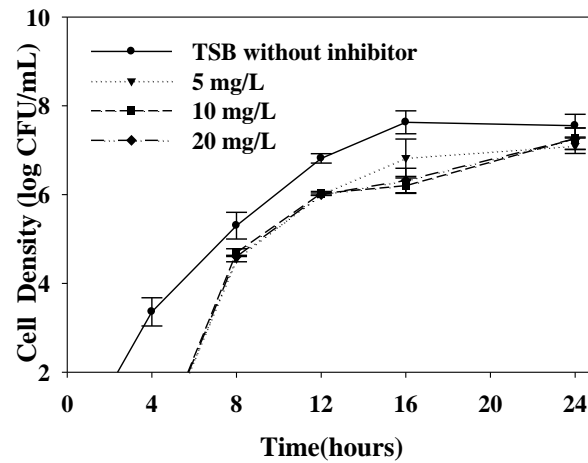
ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* อันเนื่องมาจากผลของ trimethoprim ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 4.6 ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นสูง trimethoprim ไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. cereus* เลยและยังคงให้ผลการทดลองแบบเดียวกันแม้จะลดปริมาณความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นลงก็ตาม (รูปที่ 4.6b และ c)



(a)



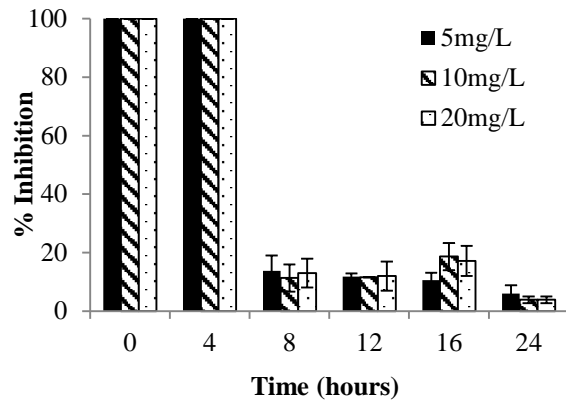
(b)



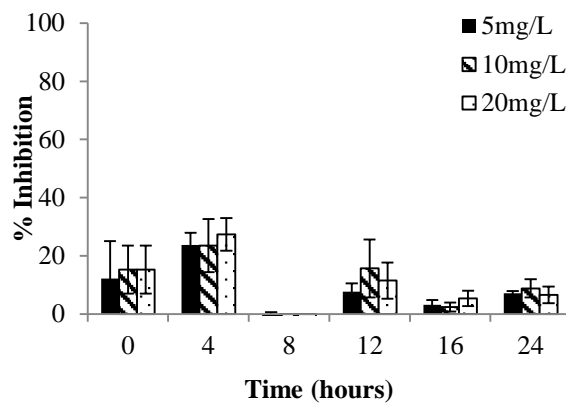
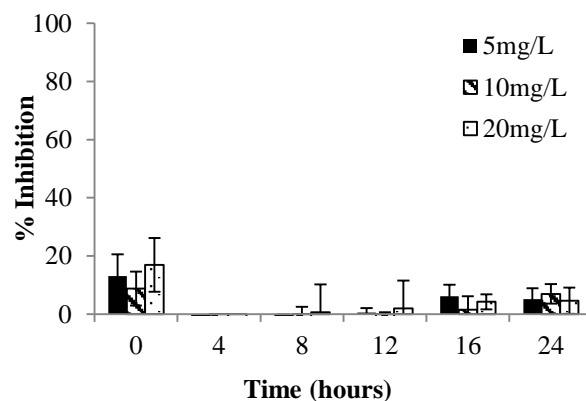
(c)

รูปที่ 4.6 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารที่มีการผสม Trimethoprim ในความเข้มข้นต่างๆ (a) 10^5 CFU/mL, (b) 10^3 CFU/mL, (c) 10^1 CFU/mL

สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งนั้นพบว่า trimethoprim แทบจะไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* เลย ดังรูปที่ 4.7



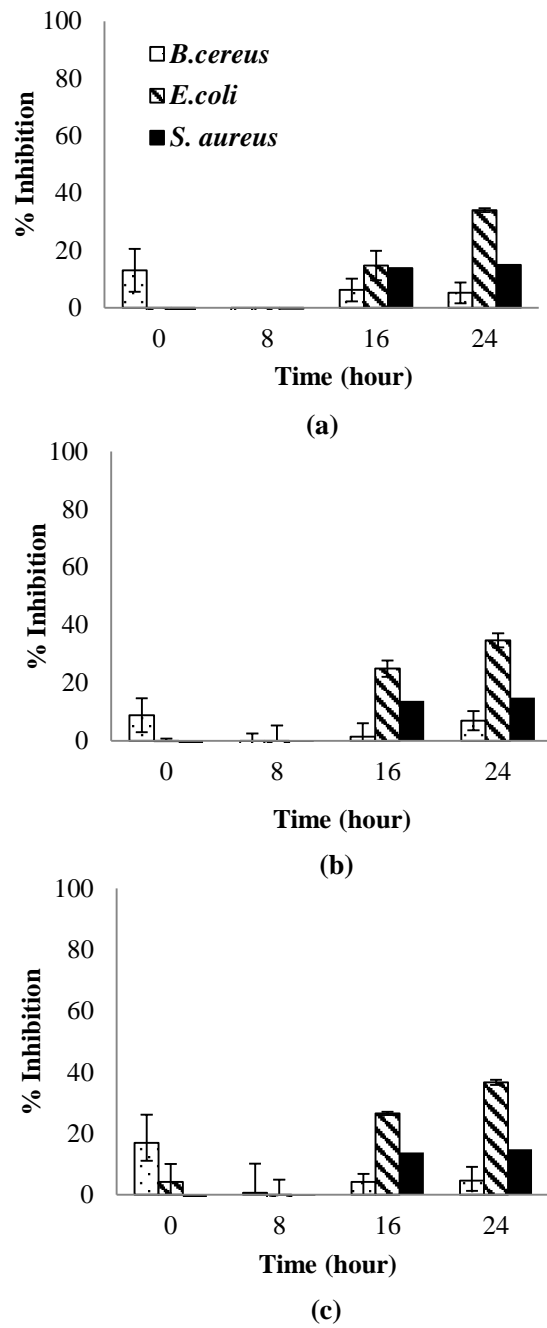
a) Inoculum culture at 10 CFU/mL

b) Inoculum culture at 10³ CFU/mLc) Inoculum culture at 10⁵ CFU/mL

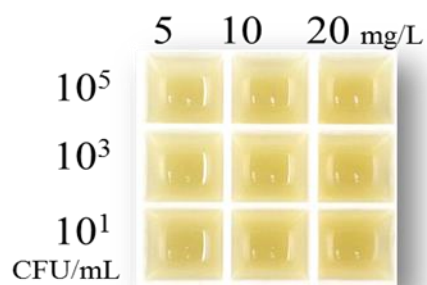
รูปที่ 4.7 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งของ Trimethoprim ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ *B.*

cereus (a) 10 CFU/mL, b) 10³ CFU/mL, c) 10⁵ CFU/mL

สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ trimethoprim ที่มีต่อแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นพบว่าให้ผลน้อยมากดังรูปที่ 4.8 แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของ trimethoprim ไปจนถึง 20 mg/L แล้วก็ตาม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า trimethoprim ไม่เป็นสารคัดเลือกที่ดีในการคัดแยก *B. cereus* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ



รูปที่ 4.8 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Trimethoprim ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L, (b) 10 mg/L, (c) 20 mg/L



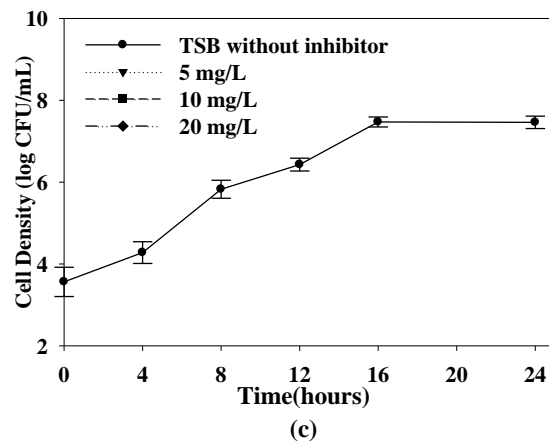
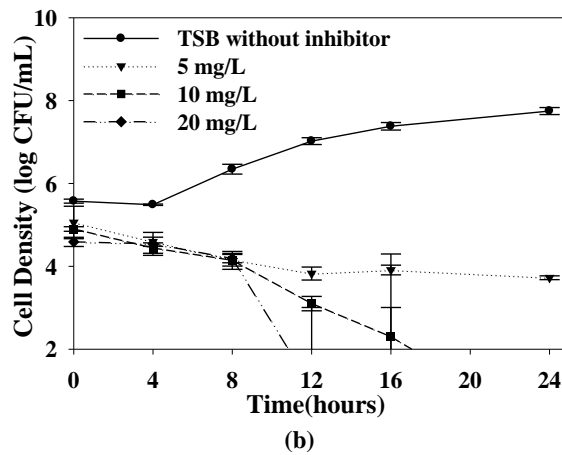
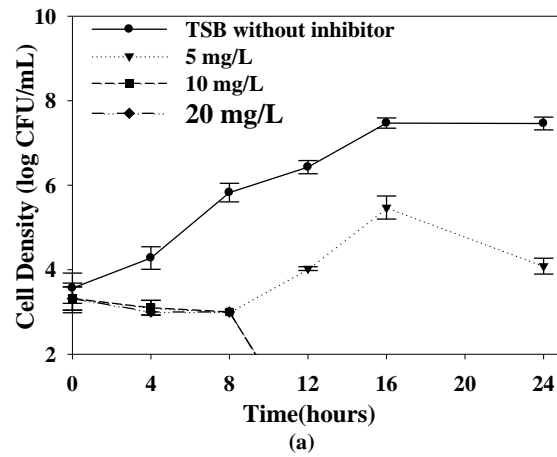
รูปที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Trimethoprim หลังจากบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

แม้ว่าผลการทดลองนี้จะขัดแย้งกับการทดลองของ Dale และคณะ (1993) ที่รายงานถึงความสามารถของ trimethoprim ในการยับยั้ง *S. aureus* แต่อาจเกิดจากการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *S. aureus* เองทำให้สามารถทนต่อการออกฤทธิ์ของ trimethoprim ตามที่รายงานไว้โดย Burdeska และคณะ (1990) ซึ่งพบลักษณะการดื้อยาของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มรวมถึง trimethoprim ในประเทศแถบยุโรปและออสเตรเลีย

Trimethoprim ถูกนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกในการวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ตามการศึกษาของ Chon และคณะ (2012) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า BRILLANCE™ *Bacillus cereus* agar, (Oxoid, Hampshire, UK) ซึ่งรายงานว่าไม่มีผลต่อการเจริญของ *B. cereus* อีกทั้งยังมีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางกลุ่มได้อีกด้วย (Wakil และ Mbah, 2012) รวมถึง *Enterobacteriaceae* (Pidcock et. al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่า trimethoprim ไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. cereus* แต่อย่างไรก็ตามสารชนิดนี้ก็อาจยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียคู่แข่ง เช่น *E. coli* และ *S. aureus* เช่นกัน

4.2.3 Novobiocin

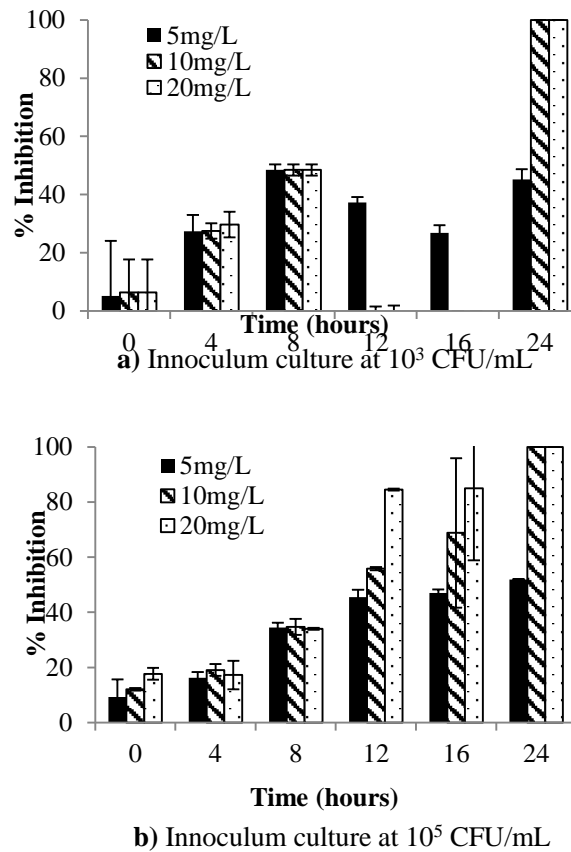
Novobiocin เป็นสารคัดเลือกอีกชนิดที่มีความรุนแรงมากกว่า polymyxin B sulfate และ trimethoprim ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.10 การเจริญของ *B. cereus* นั้นถูกยับยั้งตั้งแต่การใช้ Novobiocin ที่ความเข้มข้น 5 mg/L ที่ระดับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^5 CFU/mL ดังรูปที่ (4.10a) ยิ่งความเข้มข้นของ Novobiocin สูงขึ้นมากเท่าใดกลับทำให้จำนวนของ *B. cereus* มากขึ้นเท่านั้น โดยเฉพาะกับชุดการทดลองที่ใช้เซลล์เริ่มต้นจำนวนน้อยๆ เช่น 10 CFU/mL ส่งผลให้ไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เลยหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารที่มีการผสม novobiocin ในความเข้มข้นต่างๆ (a)

10^5 CFU/mL, (b) 10^3 CFU/mL, (c) 10^1 CFU/mL

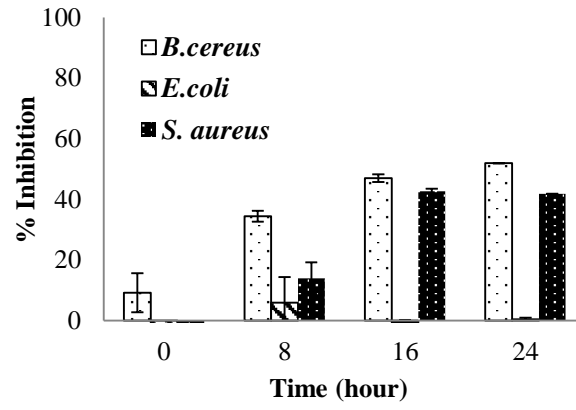
จากผลการทดลองสรุปได้ว่า novobiocin เป็นสารคัดเลือกที่ให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ *B. cereus* มากที่สุด ในจำนวนสารคัดเลือก 5 ชนิดที่ใช้ในงานทดลองนี้เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* มากที่สุด (รูปที่ 4.11)



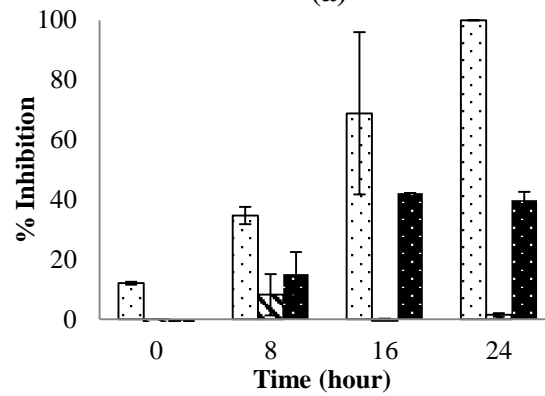
รูปที่ 4.11 เปอร์เซนต์การยับยั้งของ Trimethoprim ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ *B. cereus* (a) 10^3 CFU/mL, b) 10^5 CFU/mL

หมายเหตุ ไม่มีการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารที่ผสม novobiocin เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^1 CFU/mL

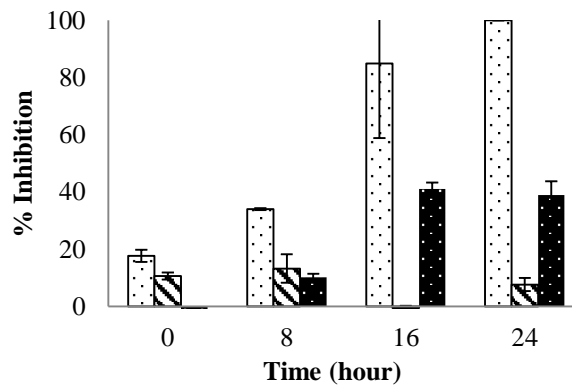
นอกจากนี้ novobiocin ยังออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นเช่นกันดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยพบว่า novobiocin ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *S. aureus* ด้วย แต่ไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *E. coli* เลยดังรูปที่ 4.12 ซึ่งผลการทดลองในส่วนของการนับจำนวนเซลล์นั้นก็สอดคล้องกับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในรูปที่ 4.13 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า novobiocin เป็นสารคัดเลือกที่ออกฤทธิ์รุนแรงต่อ *B. cereus* มากกว่าแบคทีเรียคู่แข่งอื่นๆ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกในการวิเคราะห์ *B. cereus* ในตัวอย่างอาหาร



(a)



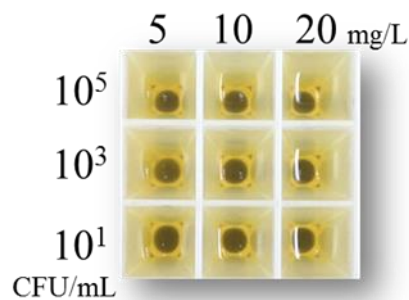
(b)



(c)

รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Novobiocin ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

(a) 5 mg/L, (b) 10 mg/L, (c) 20 mg/L



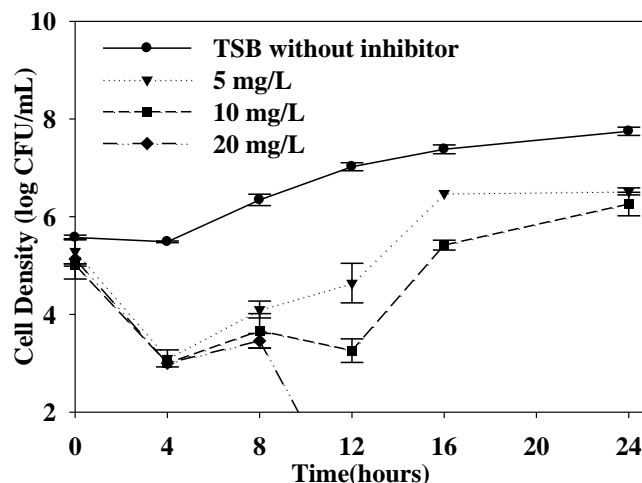
รูปที่ 4.13 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Novobiocin หลังจากบ่มเป็น

เวลานาน 24 ชั่วโมง

ความเป็นพิษของ novobiocin นั้นรุนแรงมาก โดยเฉพาะกับเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำๆ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า novobiocin สามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและการงอกของสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้อย่างสมบูรณ์ (Gottfried et. al., 1979) นอกจากนี้ยังมีการรายงานอีกว่าการใช้ novobiocin ในปริมาณที่มากเพียงพอสามารถทำลายการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้แทบทุกชนิด (Palzkill, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งจาก 5 mg/L เป็น 10 และ 20 mg/L ให้ผลรุนแรงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้นตามลำดับ แต่ในทางกลับกันแบคทีเรียแกรมลบกลับสามารถทนต่อกลไกการยับยั้งการเจริญนี้ได้ดังงานศึกษาของ Sanchez และคณะ, 1997 ที่พบว่า แบคทีเรีย *E. coli* สามารถทนต่อความเป็นพิษของ novobiocin เนื่องจากมีระบบที่สามารถปั๊มเอาสารพิษออกนอกเซลล์ได้ อีกทั้งยังมีการรายงานถึงความทนต่อสารพิษชนิดนี้ในแบคทีเรีย *S. aureus* ดังรายงานของ Fazlina และคณะ, 2012

4.2.4 Amoxicillin

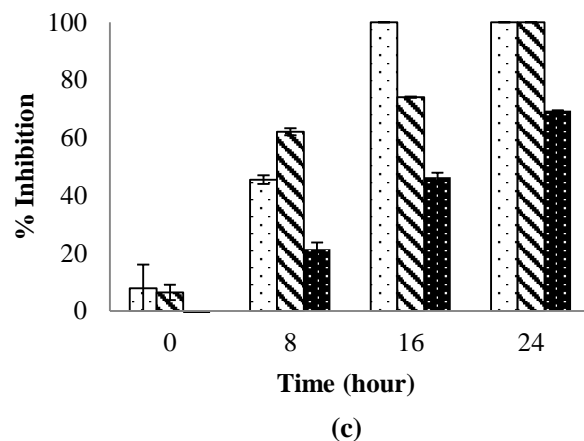
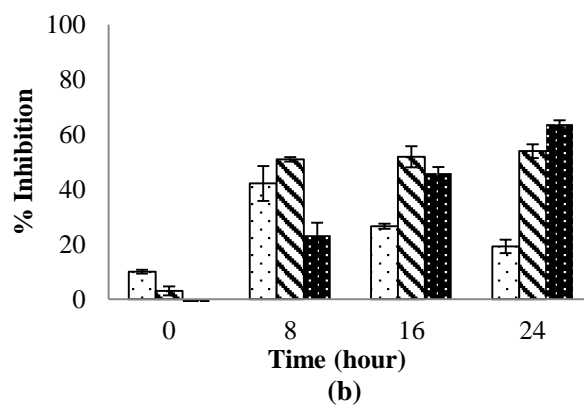
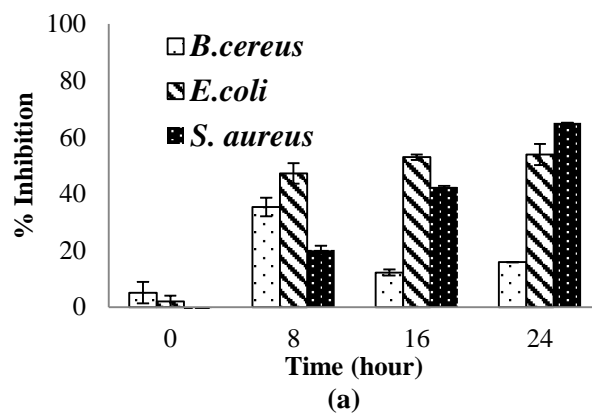
ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีการผสม amoxicillin เป็นไปดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.14 จากผลการทดลองพบว่า amoxicillin เป็นสารยับยั้งอีกชนิดที่ออกฤทธิ์รุนแรงต่อการเจริญของ *B. cereus* ที่ระดับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่ 10^5 CFU/mL การใช้ amoxicillin ที่ความเข้มข้น 20 mg/L สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ในทั้ง 3 ชั่วโมงของการทดลอง รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นต่ำๆ อีกด้วย



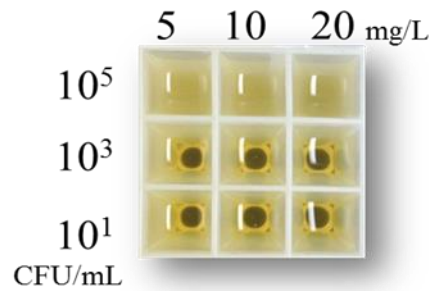
รูปที่ 4.14 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารที่มีการผสม Amoxicillin ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5 CFU/mL

หมายเหตุ : ไม่พบการเจริญของ *B. cereus* เมื่อใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^3 และ 10^1 CFU/mL

นอกจากนี้จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า amoxicillin นอกจากจะยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* แล้วยังไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคู่แข่งอื่นๆ อีกด้วย (ดังรูปที่ 4.15a) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ amoxicillin ไปที่ 20 mg/L พบว่า การเจริญของ *B. cereus* ถูกยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความรุนแรงของการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ที่เกิดจาก amoxicillin



รูปที่ 4.15 เปร็เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Amoxicillin ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (a) 5 mg/L, (b) 10 mg/L, (c) 20 mg/L

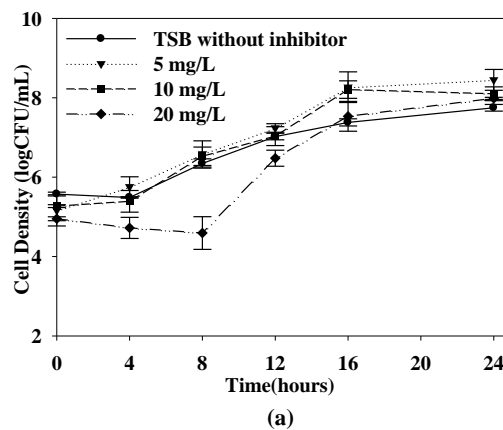


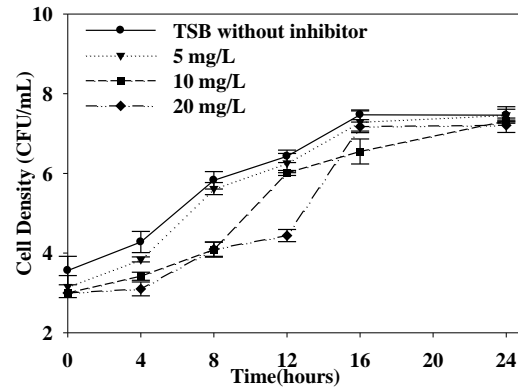
รูปที่ 4.16 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Amoxicillin หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ถึงแม้จะมีการรายงานว่าพบการดื้อยา amoxicillin ในแบคทีเรีย *B. cereus* ดังรายงานของ (Turnbull et. al., 2004; Godic Torkar และ Seme, 2009) แต่จากผลการทดลองกลับพบว่า amoxicillin ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกเนื่องจากออกฤทธิ์รุนแรงต่อ *B. cereus* เอง

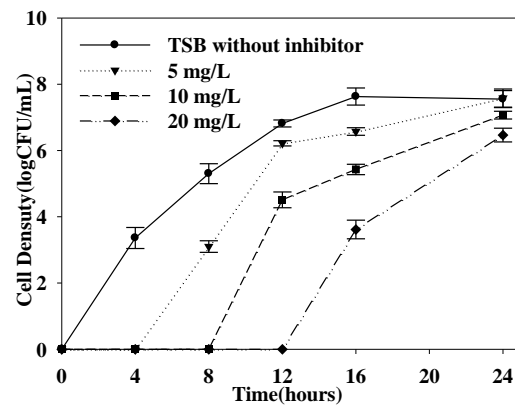
4.2.5 Ceftriaxone

Ceftriaxone ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ก่อนข้างน้อยที่เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^5 CFU/mL ดังรูปที่ 4.17a และเมื่อทำการลดปริมาณเซลล์เริ่มต้นลงเหลือ 10^3 CFU/mL และ 10^1 CFU/mL พบว่า Ceftriaxone ทำได้เพียงการเพิ่มระยะเวลาพักตัว (Lag phase) ของ *B. cereus* เท่านั้น แต่เมื่อเวลาเข้าใกล้ 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์สุดท้ายก็มีค่าเท่าเดิม ดังรูปที่ 4.17b และ c





(b)

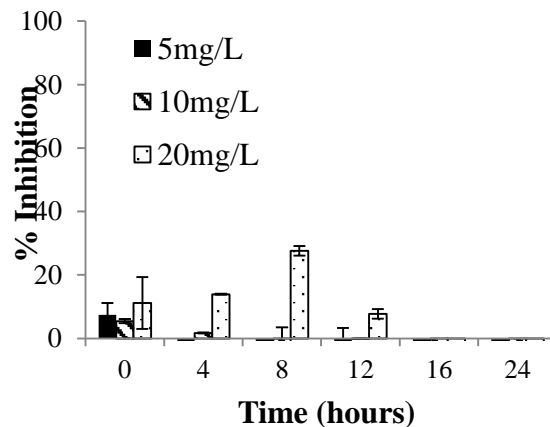


(c)

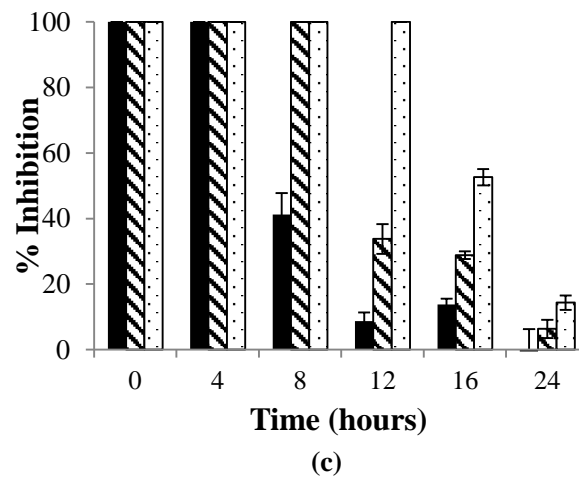
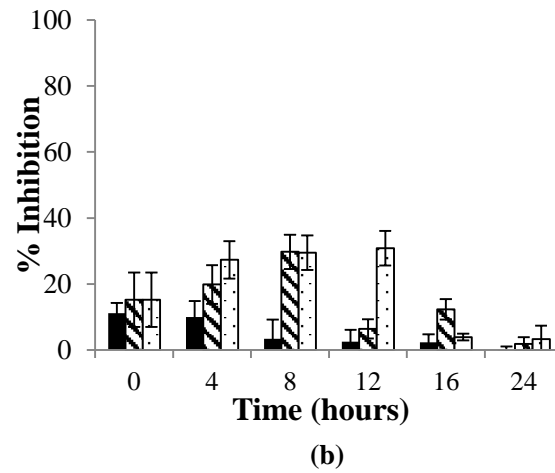
รูปที่ 4.17 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารที่มีการผสม Ceftriaxone ในความเข้มข้นต่าง ๆ

(a) 10^5 CFU/mL, (b) 10^3 CFU/mL, (c) 10^1 CFU/mL

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ Ceftriaxone ที่มีต่อ *B. cereus* ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.18 จากรูปจะพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าต่ำเมื่อเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณสูง (รูปที่ 4.18a และ b) แต่เมื่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นลดลง (รูปที่ 4.18c) ค่าการยับยั้งจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นและเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ stationary phase

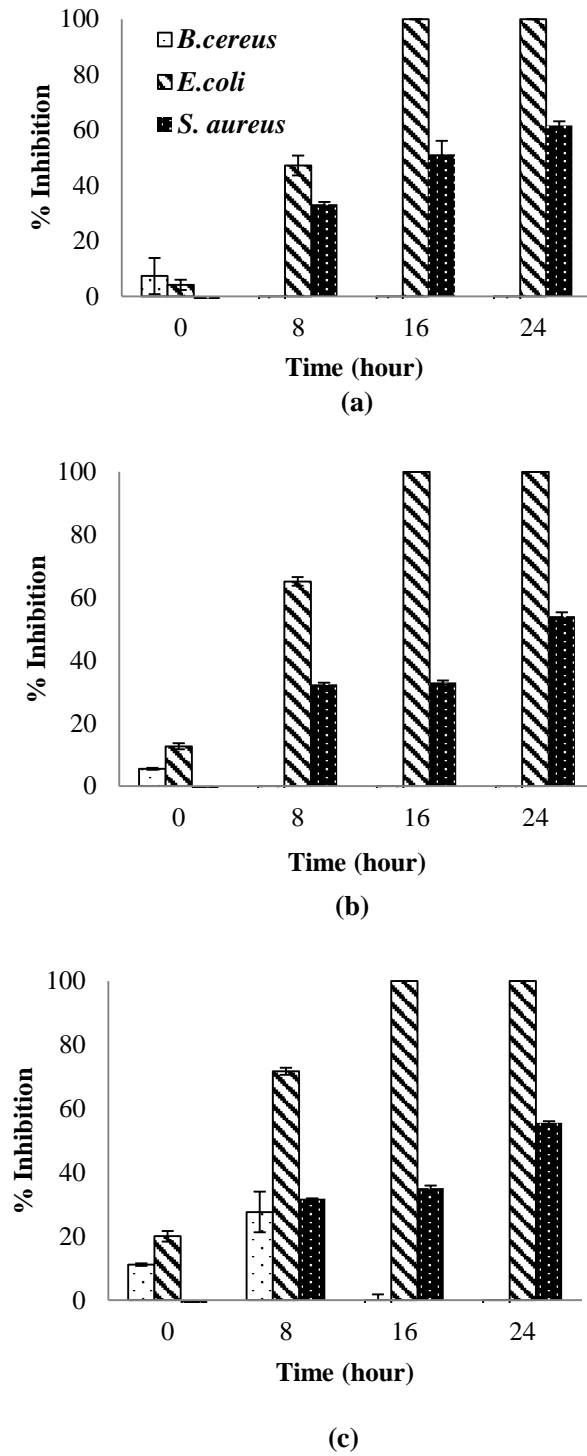


(a)



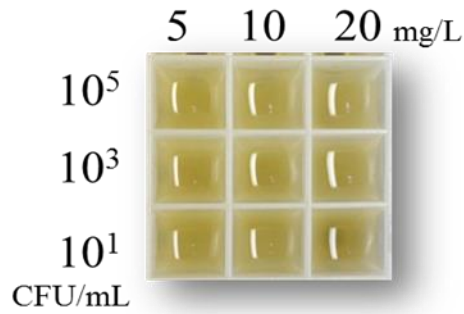
รูปที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Ceftriaxone ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ *B. cereus* (a) 10^5 CFU/mL, b) 10^3 CFU/mL, and c) 10 CFU/mL

ความสามารถในการคัดเลือกเชื้อของสาร Ceftriaxone ได้แสดงออกมาในกราฟแท่งในรูปที่ 4.19 พบว่า Ceftriaxone สามารถลดปริมาณของ *E. coli* ได้มากที่สุด ในขณะที่เดียวกันก็ส่งผลยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* อีกด้วย ด้วยเหตุนี้ทำให้ Ceftriaxone เป็นสารคัดเลือกที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาศึกษาต่อไป เพราะเนื่องจากไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* เอง แล้วแต่ยังช่วยลดปริมาณแบคทีเรียคู่แข่งได้ ซึ่งแตกต่างจากสารคัดเลือกชนิดอื่นๆ ที่มักส่งผลกับแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ Ceftriaxone ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ไม่ส่งผลแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *B. cereus* อีกด้วย ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 เปรี่เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสารยับยั้ง Ceftriaxone ที่มีต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

(a) 5 mg/L, (b) 10 mg/L, (c) 20 mg/L



รูปที่ 4.20 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + Ceftriaxone หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.20 พบว่าความขุ่นของอาหารอันเนื่องมาจากการเจริญของ *B. cereus* ในอาหาร TSB เป็นไปอย่างสม่ำเสมอในทุกความเข้มข้นของ Ceftriaxone แสดงให้เห็นว่า Ceftriaxone แสดงความเป็นพิษต่ำต่อ *B. cereus*

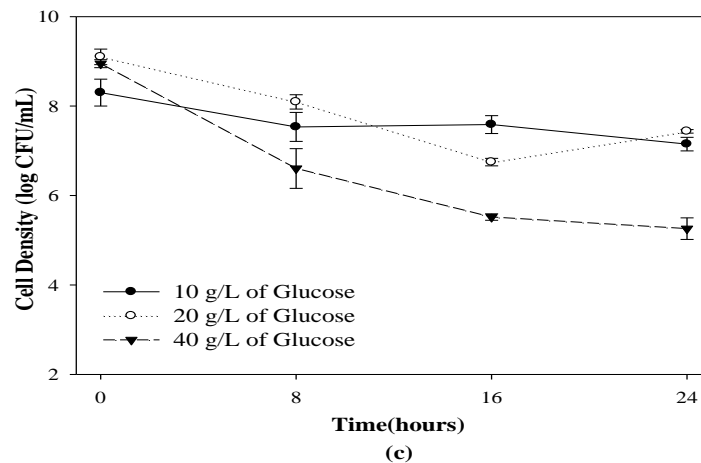
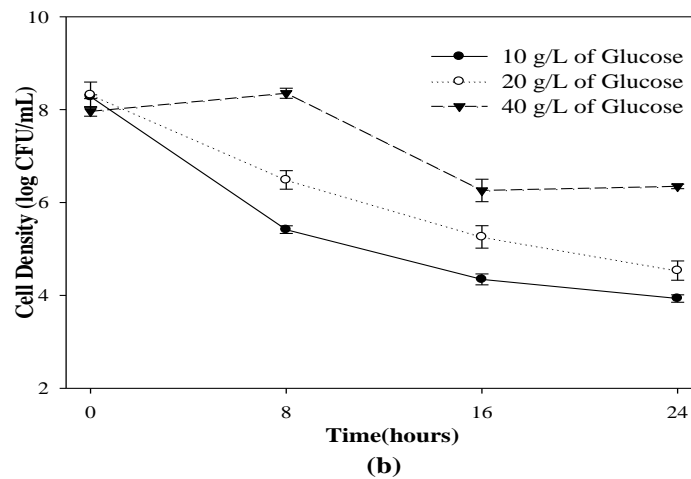
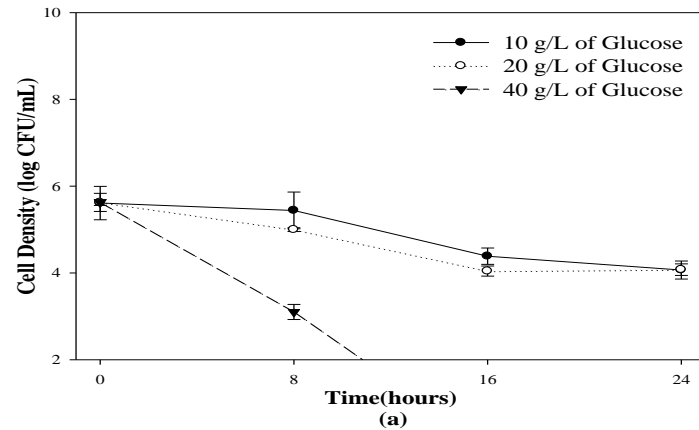
จากการศึกษาในอดีตมีรายงานถึงความสามารถของ *B. cereus* ในการต้านทานต่อฤทธิ์ของ Ceftriaxone (Ko et. al., 2007; Wagner et. al., 2011) นอกจาก Ceftriaxone จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของ *B. cereus* เองแล้ว ตัวสารชนิดนี้ยังจะไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ beta-lactamases ที่มีใน *B. cereus* ด้วย ดังนั้นการใช้ Ceftriaxone จึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกลงในกรณีตัวอย่างอาหารมีเชื้อปนกันอยู่ (Amicosante et. al., 1988) ด้วยข้อดีดังกล่าวข้างต้น Ceftriaxone จึงเหมาะสมที่สุดในการนำมาศึกษาและนำมาปรับปรุงเพื่อเป็นสารคัดเลือกลงเชื้อ *B. cereus* ในการทดลองต่อไป

4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการบ่งชี้การเจริญของ *B. cereus*

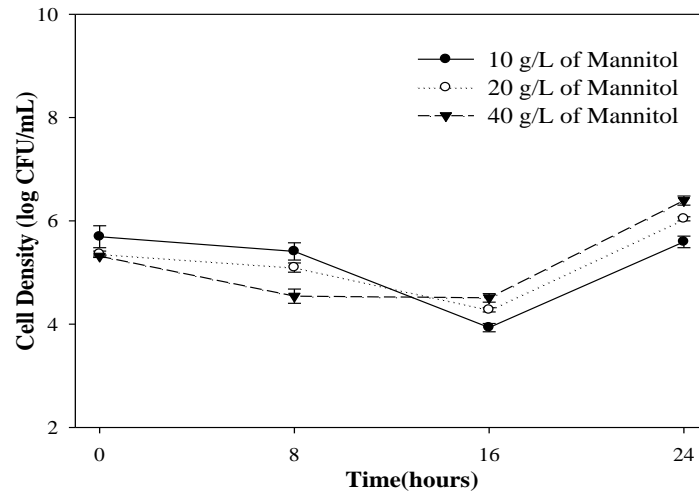
การนำแหล่งคาร์บอนมาประยุกต์ใช้เป็นสารช่วยในการคัดเลือกลงการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น มีการศึกษามากมายหลายโดยมักใช้ร่วมกับสารคัดเลือกลงอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบ่งชี้และคัดเลือกลงการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้องการ

สารเคมีที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในงานวิจัยนี้ได้แก่ กลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาล 6 โมเลกุลที่แบคทีเรียทุกชนิดสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก สำหรับแหล่งคาร์บอนอีกชนิดคือน้ำตาลแมนนิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลที่ *B. cereus* ไม่สามารถนำไปใช้ได้ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มาตรฐานกำหนดให้ใช้ในสูตรอาหารตามปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, และ 40 g/L โดยการใช้ น้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 g/L นั้นเป็นระดับอ้างอิงที่ใช้กันในมาตรฐานดังกล่าว

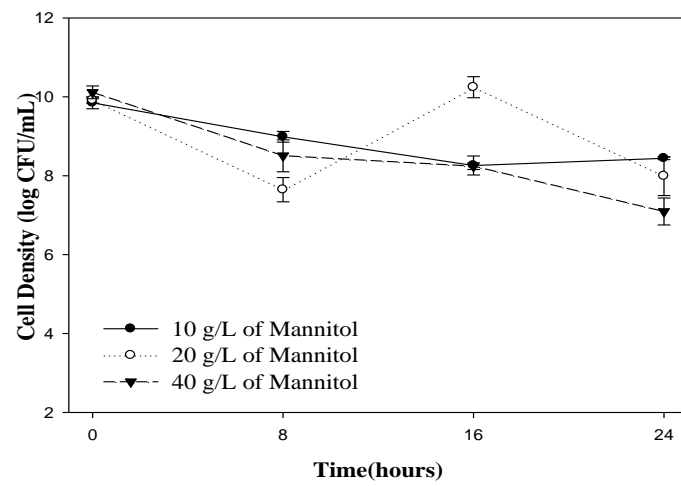
ผลการทดลองส่วนนี้จะรายงานผลด้วยการนับจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* และการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์คือ bromothymol blue ในช่วงระหว่างระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยผลการทดลองดังกล่าวได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 4.21 และ 4.22



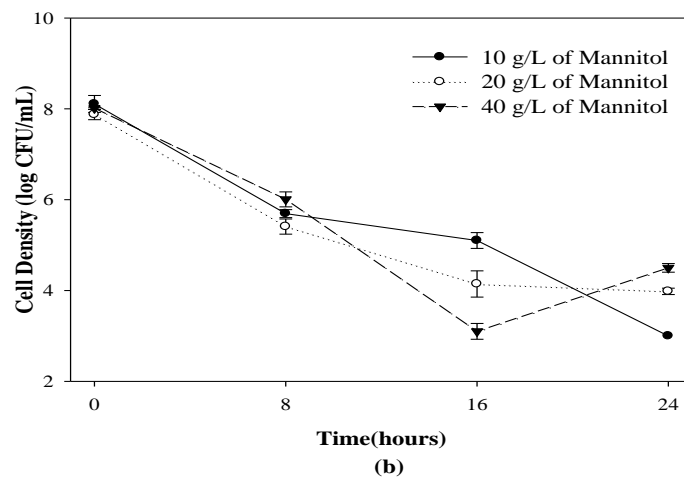
รูปที่ 4.21 การเจริญของแบคทีเรีย a) *B. cereus*, b) *E. coli*, และ c) *S. aureus* ในอาหาร PEMBA ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



(a)

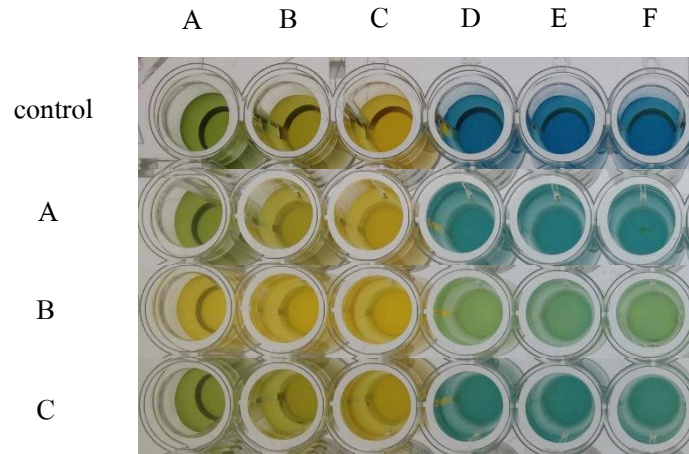


(c)



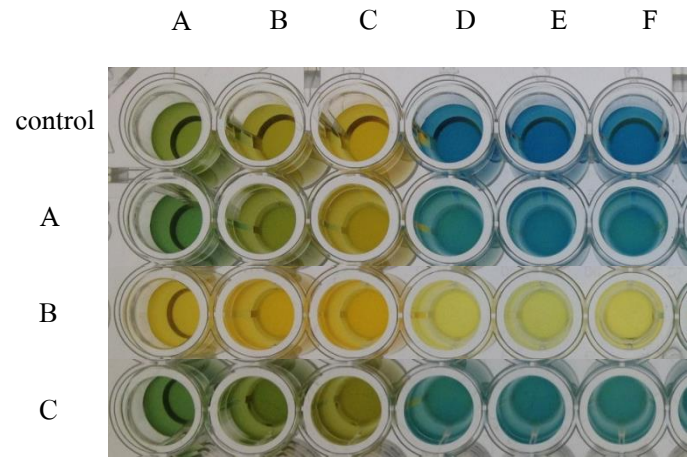
(b)

รูปที่ 4.22 การเจริญของแบคทีเรีย a) *B. cereus*, b) *E. coli*, และ c) *S. aureus* ในอาหาร PEMBA ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน



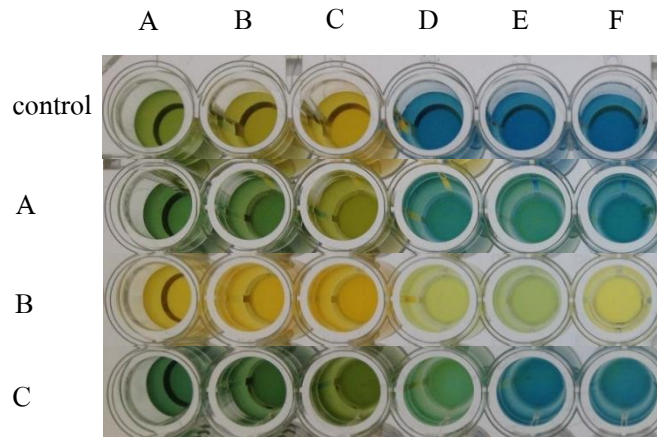
รูปที่ 4.23 การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงแรกของการลงเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในแต่ละแถวคือ a) *B. cereus*, b) *E. coli*, และ c) *S. aureus* และแหล่งคาร์บอนในแต่ละคอลัมน์คือ

- A) 10 g/L B) 20 g/L C) 40 g/L of glucose
 D) 10 g/L E) 20 g/L F) 40 g/L of D-mannitol



รูปที่ 4.24 การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 24 ของการลงเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในแต่ละแถวคือ a) *B. cereus*, b) *E. coli*, และ c) *S. aureus* และแหล่งคาร์บอนในแต่ละคอลัมน์คือ

- A) 10 g/L B) 20 g/L C) 40 g/L of glucose
 D) 10 g/L E) 20 g/L F) 40 g/L of D-mannitol



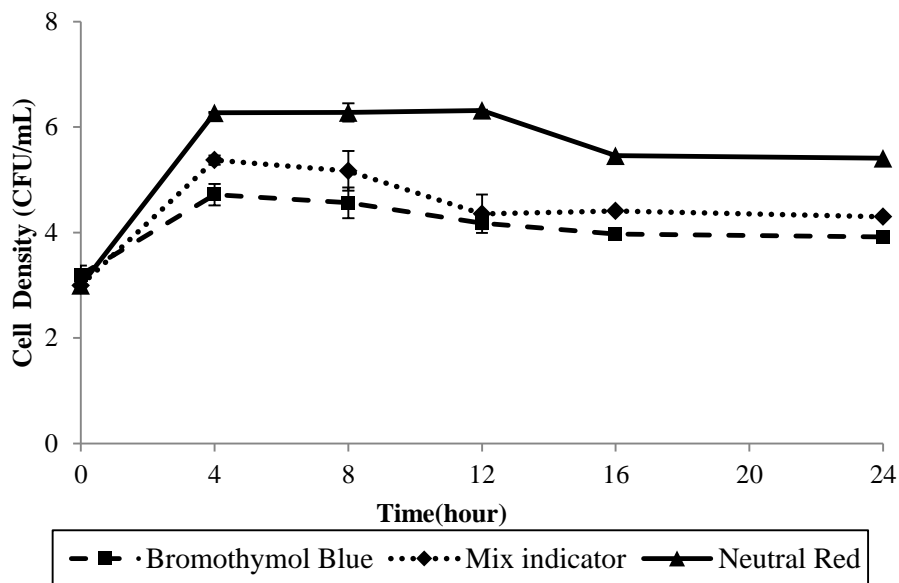
รูปที่ 4.25 การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการลงเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในแต่ละแถวคือ a) *B. cereus*, b) *E. coli*, และ c) *S. aureus* และแหล่งคาร์บอนในแต่ละคอลัมน์คือ

- | | | |
|-----------|-----------|-------------------------|
| A) 10 g/L | B) 20 g/L | C) 40 g/L of glucose |
| D) 10 g/L | E) 20 g/L | F) 40 g/L of D-mannitol |

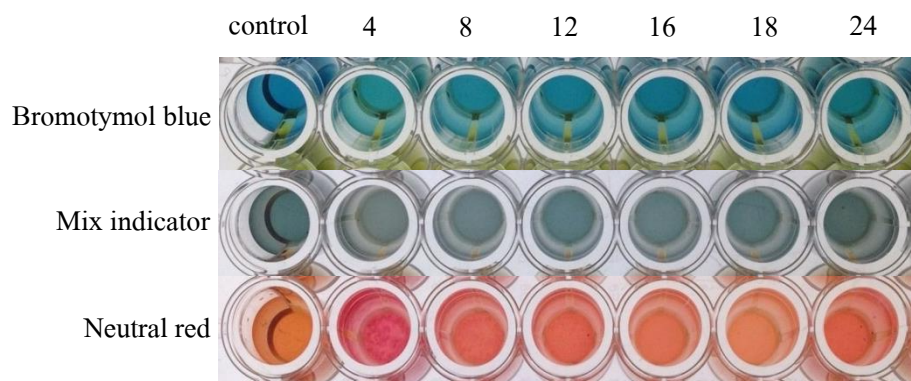
เมื่อใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับต่างๆ ไม่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 4.22) นอกจากนี้แม้ว่าจะทำการเติม ceftriaxone ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วก็ตามพบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ ceftriaxone มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองก่อนหน้าที่ใช้อาหาร TSB ทั้งนี้อาจเกิดจากความจำกัดของอาหาร PEMBA ที่มีปริมาณสารอาหารที่จำกัดกว่าใน TSB การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 24-48 ได้แสดงดังรูปที่ 4.23-4.25 สำหรับ *B. cereus* พบว่าสามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีน้ำเงินเป็นสีน้ำเงินอมเขียวเพียงเท่านั้น อีกทั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล ในขณะที่เชื้อ *E. coli* สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากเดิมสีน้ำเงินเป็นสีเขียวได้อย่างรวดเร็ว ในช่วงแรกของการเพาะเชื้อและกลายเป็นสีเหลืองในเวลาต่อมา ทั้งนี้เกิดจากการที่ *E. coli* สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลแมนนิทอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วแม้ว่าจำนวนเซลล์จะไม่เพิ่มขึ้นก็ตาม (รูปที่ 4.25-b4, b6) สำหรับ *S. aureus* พบว่ามีการเปลี่ยนสีเพียงเล็กน้อยจากน้ำเงินเป็นสีเขียวอ่อนอันเนื่องมาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.25-c4)

หลังจากเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้จากแมนนิทอลเป็นกลูโคสพบว่าลักษณะการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดให้ผลเหมือนกันกับการใช้แมนนิทอลดังรูปที่ 4.21 แต่กลับพบว่าการใช้กลูโคสเข้มข้น 40 g/L ทำให้มีการลดลงของเซลล์ *B. cereus* ตั้งแต่ช่วงการเจริญที่ 16 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH และสีมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินมากขึ้นแสดงถึงความเป็นด่างที่มากขึ้นอีกด้วยดังรูปที่ 4.25:a1-3, c1-3

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า การเจริญของ *B. cereus* ในอาหาร PEMBA เป็นไปอย่างเชื่องช้าและมีแนวโน้มลดลงมากกว่าในอาหาร TSB ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการใช้อินดิเคเตอร์ที่เป็นสารให้สีในอาหาร PEMBA ที่อาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *B. cereus* ดังนั้นในการทดลองต่อไปคือการหาผลของอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* ซึ่งทำได้โดยการศึกษา สารอินดิเคเตอร์ 3 ชนิดคือ bromothymol blue, neutral red, และการผสมกันของอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้จะพิจารณาจากสูตรอาหารปกติที่ใช้สารอินดิเคเตอร์ปริมาณ 0.05 กรัม ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.26 จากผลการทดลองในส่วนนี้พบว่า bromothymol blue มีผลต่อการเจริญของ *B. cereus* โดยจะทำให้เซลล์เติบโตได้น้อยลงซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์และแม้ว่าจะทำการผสม bromothymol blue กับ neutral red ก็พบว่าให้ลักษณะการเปลี่ยนสีที่ไม่ชัดเจนมากเท่าที่ควรดังแสดงในรูปที่ 4.27



รูปที่ 4.26 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารที่มีสารอินดิเคเตอร์แตกต่างกัน



รูปที่ 4.27 สีของอาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์ที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองจะพบว่าในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น สีของอาหารเปล่าจะค่อนข้างเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองมากขึ้นแม้ว่าจะไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ก็ตาม ทั้งนี้เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลกลูโคสอันเนื่องมาจากความร้อนในระหว่างการฆ่าเชื้อ ซึ่งปฏิกิริยานี้มักเกิดขึ้นกับน้ำตาลเฮกโซสที่มีคาร์บอน 6 โมเลกุล จนกลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิกจำนวน 3 โมเลกุลทำให้อาหารมีความเป็นกรดสูงขึ้น (Novotný et. al., 2008) ซึ่งในสถานะที่มีความเป็นกรดสูง การเจริญของ *B. cereus* จึงถูกชะลอให้ช้าลงซึ่งลักษณะการเจริญแบบนี้ก็ถูกรายงาน โดย van Melis และคณะ, 2012 เช่นเดียวกัน นอกจากนี้การเจริญของ *B. cereus* ในสถานะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรดจะส่งผลให้ลักษณะการเจริญในช่วง lag phase ที่ยาวนานมากขึ้นเนื่องจากเชื้อต้องทำการปรับตัวกับสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและอาจมีการเจริญที่น้อยกว่าปกติ (Setlow และ Setlow, 1980; Biesta-Peters et. al., 2011)

จากผลการทดลองดังกล่าวระบบอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ยังไม่เพียงพอในการบ่งชี้การเจริญของ *B. cereus* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่สามารถช่วยบ่งชี้การเจริญของ *B. cereus* ออกจากแบคทีเรียแข่งขันจึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต นอกจากนี้การใช้ ceftriaxone เป็นสารคัดเลือกเพียงชนิดเดียวอาจไม่เพียงพอในการคัดเลือก *B. cereus* ในอาหาร PEMBA ดังนั้นการใช้ ceftriaxone ร่วมกับ polymyxin B แต่ทำการลดปริมาณ polymyxin B ลงอาจเป็นข้อสรุปที่เหมาะสมในการใช้เป็นระบบคัดเลือก *B. cereus* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการคัดเลือกของสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด (อันได้แก่ polymyxin B sulfate, trimethoprim, novobiocin, amoxicillin, และ ceftriaxone) ที่มีต่อแบคทีเรีย *B. cereus* พบว่าการใช้ amoxicillin กับ novobiocin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB นั้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ที่ค่อนข้างรุนแรง โดยเฉพาะกับเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยๆ สารยับยั้งที่เหมาะสมพอจะนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการเจริญของ *B. cereus* ได้แก่ ceftriaxone, polymyxin B sulfate, และ trimethoprim ในจำนวนนี้ ceftriaxone ให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกที่ดีที่สุดเนื่องจากไม่สร้างความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *B. cereus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* อย่างสมบูรณ์ ยับยั้ง *S. aureus* บางส่วนในขณะที่ polymyxin B นั้นยับยั้งเพียงแต่ *E. coli* เท่านั้น สำหรับ trimethoprim นั้นแม้จะไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* แต่ก็ไม่ได้ยับยั้งเชื้อคู่แข่งอื่นๆ เช่นกัน ในอาหาร TSB

ตามปกติแล้วการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งมักจะสร้างความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียทุกชนิด โดยเฉพาะในเซลล์เริ่มต้นน้อยๆ ทำให้เกิดการเจริญที่มีลักษณะ Lag phase ที่ยาวนานรวมไปถึงการแปรผลที่ผิดพลาด (false negative) การใช้สารคัดเลือกและระบบอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมในการบ่งชี้การเจริญของ *B. cereus* จึงมีความจำเป็น ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อค้นหาอินดิเคเตอร์ (bromothymol blue และ neutral red) และแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและแมนนิทอล) ที่เหมาะสมในการใช้บ่งชี้การเจริญของ *B. cereus* จากการทดลองพบว่าสามารถใช้อินดิเคเตอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้ในการบ่งชี้การเจริญ แต่มีเพียง bromothymol blue เท่านั้นที่สร้างความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *B. cereus* นอกจากนี้การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เกิดกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นซึ่งส่งผลกระทบต่อเจริญของ *B. cereus* อีกทั้งยังไม่ช่วยให้แยก *B. cereus* ออกจาก *E. coli* และ *S. aureus* อีกด้วย สำหรับแมนนิทอลพบว่าไม่ช่วยในการบ่งชี้การเจริญของ *B. cereus* ออกจากเชื้อคู่แข่งอื่นๆ เช่นกัน

ผลผลิต (Output)

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

1.1 Sangadkit, W., Deepatana, A., and Thipayarat, A., 2019, "Effect of inhibitors and initial cell concentration on the enrichment *Bacillus cereus*", Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology), TCI-Tier 1, submitted

2. การจดสิทธิบัตร

อาหารเหลวจำเพาะสำหรับตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อบациลลัสซีเรียสด้วยการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล

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

ชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *B. cereus* มีการนำผลงานไปเสนอให้กับทางบริษัท นารา แพคทอรี จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทที่ผลิตดินน้ำมันจากแป้งโด โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นของเล่นเด็กที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของ *B. cereus* ที่อาจจะปนเปื้อนข้ามไปยังเด็กที่เล่นดินน้ำมัน ดังนั้นผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะปล่อยจำหน่ายจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว ชุดตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* ที่นำเสนอเป็นแนวทางเลือกใหม่ของการวิเคราะห์ ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โรงงานสามารถที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ทำให้เกิดความน่าเชื่อถือของข้อมูล ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ อีกทั้งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยเมื่อเทียบกับวิธีการในปัจจุบันที่โรงงานใช้อยู่

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ผลงานวิจัยดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อชุมชนสังคม ลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลจากการติดเชื้อดังกล่าว การมีผลการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาทำให้สร้างความน่าเชื่อถือจากลูกค้า นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย สามารถเป็นแนวทางต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคนิโคอื่น ช่วยลดต้นทุนค่าจากการนำเข้าชุดทดสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ เป็นการส่งเสริมศักยภาพความสามารถนักวิทยาศาสตร์ไทย และเป็นความท้าทายที่จะนำผลงานดังกล่าวไปประยุกต์ใช้จริงในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Abd, A.H.A., Abood, A.S. and AbdelA'Al, N.I., 2012, "Study the Susceptibility of Bacillus Cereus Isolated from Milk and Milk Products to Antibiotics", Journal of Kerbala University, Vol. 10, No. 3, pp. 1-4.
2. Abee, T., Groot, M.N., Tempelaars, M., Zwietering, M., Moezelaar, R. and Voort, M.v.d., 2011, "Germination and Outgrowth of Spores of Bacillus Cereus Group Members: Diversity and Role of Germinant Receptors", Food Microbiology, Vol. 28, No. 2, pp. 199-208.
3. 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.
4. Amicosante, G., Maccarrone, M., Franceschini, N., Oliva, B., Segatore, B. and Oratore, A., 1988, "On the Kinetic Interaction between Ceftriaxone and Some Beta-Lactamases", Drugs Exp Clin Res, Vol. 14, No. 1, pp. 25-30.
5. 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.
6. Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. and Collins, M.D., 1991, "Comparative Analysis of Bacillus Anthracis, Bacillus Cereus, and Related Species on the Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16s Rrna", Int J Syst Bacteriol, Vol. 41, No. 3, pp. 343-346.
7. Atlas, R.M., 2010, "Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar", In Handbook of Microbiological Media, 4, CRC Press-Taylor & Francis Group, Florida, USA., pp.
8. Baker, J.M. and Griffiths, M.W., 1993, "Predictive Modeling of Psychrotrophic Bacillus Cereus", J Food Prot, Vol. 56, No. 8, pp. 684-688.
9. Benedict, R.C., Partridge, T., Wells, D. and Buchanan, R.L., 1993, Bacillus Cereus: Aerobic Growth Kinetics, [online], Available: <http://pmp.arserrc.gov/PMPOne.asp?ModelID=2&Aerobic=True> [19 April 2013].
10. Biesta-Peters, E.G., Mols, M., Reij, M.W. and Abee, T., 2011, "Physiological Parameters of Bacillus Cereus Marking the End of Acid-Induced Lag Phases", International Journal of Food Microbiology, Vol. 148, No. 1, pp. 42-47.
11. Bottone, E.J., 2010, "Bacillus Cereus, a Volatile Human Pathogen", Clinical Microbiology Reviews, Vol. 23, No. 2, pp. 382-398.

12. Burdeska, A., Ott, M., Bannwarth, W. and Then, R.L., 1990, "Identical Genes for Trimethoprim-Resistant Dihydrofolate Reductase from *Staphylococcus Aureus* in Australia and Central Europe", *FEBS Lett*, Vol. 266, No. 1-2, pp. 159-62.
13. Choma, C., Clavel, H., Dominguez, H., Razafindramboa, N., Soumille, H., Nguyen-the, C. and Schmitt, P., 2000, "Effect of Temperature on Growth Characteristics of *Bacillus Cereus* Tz415", *Int J Food Microbiol*, Vol. 55, No. 1-3, pp. 73-7.
14. Chon, J.W., Hyeon, J.Y., Park, J.H., Song, K.Y., Kim, J.H. and Seo, K.H., 2012, "Improvement of Mannitol-Yolk-Polymyxin B Agar by Supplementing with Trimethoprim for Quantitative Detection of *Bacillus Cereus* in Foods", *J Food Prot*, Vol. 75, No. 7, pp. 1342-5.
15. Chorin, E., Thuault, D., Cléret, J.-J. and Bourgeois, C.-M., 1997, "Modelling *Bacillus Cereus* Growth", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 38, No. 2-3, pp. 229-234.
16. Dale, G.E., Then, R.L. and Stuber, D., 1993, "Characterization of the Gene for Chromosomal Trimethoprim-Sensitive Dihydrofolate Reductase of *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923", *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 37, No. 7, pp. 1400-5.
17. DeMet, E. and Grecz, N., 1981, "Radiation Activation of Respiration In*Bacillus Cereus* T Spores", *Current Microbiology*, Vol. 6, No. 3, pp. 151-154.
18. Donnelly, A. and Blagg, B.S., 2008, "Novobiocin and Additional Inhibitors of the Hsp90 C-Terminal Nucleotide-Binding Pocket", *Curr Med Chem*, Vol. 15, No. 26, pp. 2702-17.
19. Donovan, K.O., 1958, "A Selective Medium for *Bacillus Cereus* in Milk", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 21, No. 1, pp. 100-103.
20. Ehling-Schulz, M., Fricker, M. and Scherer, S., 2004, "*Bacillus Cereus*, the Causative Agent of an Emetic Type of Food-Borne Illness", *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol. 48, No. 7, pp. 479-487.
21. 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.
22. Fazlani, S.A., Khan, S.A., Faraz, S. and Awan, M.S., 2011, "Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Species Identified from Mastitic Milk Samples of Camel", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10, No. 15, pp. 2959-2964.
23. Fazlina, F., Al-Sultan, I.I. and Jasbir, S., 2012, "Antibiotic Sensitivity of Pathogenic Bacteria Isolated from Beef Samples Obtained from Kota Bharu and Its Surrounding Provinces", *Journal of Advanced Medical Research*, Vol. 2, No. 1, pp. 8-11.

24. FSANZ, 2001, Guidelines for the Microbiological Examination of Ready-to- Eat Foods, [online], Available:
<http://www.foodstandards.gov.au/scienceandeducation/publications/guidelinesformicrobi1306.cfm>
25. Gilbert, R.J. and Taylor, A.J., 1976, "Bacillus Cereus Food Poisoning", Soc Appl Bacteriol Symp Ser, Vol. 4, No., pp. 197-213.
26. Godic Torkar, K. and Seme, K., 2009, "Antimicrobial Susceptibility, Beta-Lactamase and Enterotoxin Production in Bacillus Cereus Isolates from Clinical and Food Samples", Folia Microbiol (Praha), Vol. 54, No. 3, pp. 233-8.
27. Gottfried, M., Orrego, C., Keynan, A. and Halvorson, H.O., 1979, "Specific Inhibition of Outgrowth of Bacillus Subtilis Spores by Novobiocin.", Journal of Bacteriology, Vol. 138, No. 2, pp. 314-319.
28. Guinebretiere, M.H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F. and Nguyen-The, C., 2003, "Contamination Flows of Bacillus Cereus and Spore-Forming Aerobic Bacteria in a Cooked, Pasteurized and Chilled Zucchini Puree Processing Line", Int J Food Microbiol, Vol. 82, No. 3, pp. 223-32.
29. Harwood, C.R., 1990, "Bacillus. Biotechnology Handbooks", The Quarterly Review of Biology, Vol. 65, No. 3, pp. 359-360.
30. Hauge, S., 1955, "Food Poisoning Caused by Aerobic Spore-Forming Bacilli", Journal of Applied Microbiology, Vol. 18, No. 3, pp. 591-595.
31. Hermsen, E.D., Sullivan, C.J. and Rotschafer, J.C., 2003, "Polymyxins: Pharmacology, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Applications", Infect Dis Clin North Am, Vol. 17, No. 3, pp. 545-62.
32. Hitchins, A.D. and Slepecky, R.A., 1969, "Antibiotic Inhibition of the Septation Stage in Sporulation of Bacillus Megaterium", J Bacteriol, Vol. 97, No. 3, pp. 1513-5.
33. Holbrook, R. and Anderson, J.M., 1980, "An Improved Selective and Diagnostic Medium for the Isolation and Enumeration of Bacillus Cereus in Foods", Canadian Journal of Microbiology, Vol. 26, No. 7, pp. 753-759.
34. Hood, A.M., Tuck, A. and Dane, C.R., 1990, "A Medium for the Isolation, Enumeration and Rapid Presumptive Identification of Injured Clostridium Perfringens and Bacillus Cereus", Journal of Applied Microbiology, Vol. 69, No. 3, pp. 359-372.
35. ISO, 2006, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Determination of Low Numbers of Presumptive *Bacillus Cereus*- Most Propable Number Technique

- and Detection Method. ISO 21871:2006. the International Organization for Standardization Switzerland, Vol. 21871:2006pp. 1-14.
36. Johnson, K.M., Nelson, C.L. and Busta, F.F., 1983, "Influence of Temperature on Germination and Growth of Spores of Emetic and Diarrheal Strains of *Bacillus Cereus* in a Broth Medium and in Rice", *Journal of Food Science*, Vol. 48, No. 1, pp. 286-287.
 37. Kailas, L., Terry, C., Abbott, N., Taylor, R., Mullin, N., Tzokov, S.B., Todd, S.J., Wallace, B.A., Hobbs, J.K., Moir, A. and Bullough, P.A., 2011, "Surface Architecture of Endospores of the *Bacillus Cereus*/Anthraxis/Thuringiensis Family at the Subnanometer Scale", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 108, No. 38, pp. 16014-16019.
 38. Khueankhanchaoen, J. and Thipayarat, A., 2011, "Application of Modified Drop Plate Technique (Mdpt) and Logistic Model to Optimize Non-Selective Substrates for *Salmonella Typhi* Resuscitation", *Asian Journal of Food and Agro-industry*, Vol. 4, No. 6, pp. 349-358.
 39. Kim, H.U. and Goepfert, J.M., 1971, "Enumeration and Identification of *Bacillus Cereus* in Foods", *Applied Microbiology*, Vol. 22, No. 4, pp. 581-587.
 40. King, N.J., Whyte, R. and Hudson, J.A., 2007, "Presence and Significance of *Bacillus Cereus* in Dehydrated Potato Products", *J Food Prot*, Vol. 70, No. 2, pp. 514-520.
 41. Ko, S.Y., Chung, H.J., Sung, H.S. and Kim, M.N., 2007, "[Emergence of Beta-Lactam-Dependent *Bacillus Cereus* Associated with Prolonged Treatment with Cefepime in a Neutropenic Patient]", *Korean J Lab Med*, Vol. 27, No. 3, pp. 216-20.
 42. Martino, T.K., Leyva, V., Puig, Y., Hernández, I., Díaz, T., Reyes, M.d.l. and Camejo, A., 2010, "*Bacillus Cereus* Y Su Implicación En La Inocuidad De Los Alimentos.: Parte Ii", *Revista Cubana de Salud Pública*, Vol. 36, No. 1, pp. 139-148.
 43. McClung, L.S., Heidenreich, P. and Toabe, R., 1946, "A Medium for the Nagler Plate Reactions for the Identification of Certain Clostridia", *J Bacteriol*, Vol. 51, No. 6, pp. 751-2.
 44. Mossel, D.A., Koopman, M.J. and Jongerius, E., 1967, "Enumeration of *Bacillus Cereus* in Foods", *Appl Microbiol*, Vol. 15, No. 3, pp. 650-3.
 45. Murindamombe, G.Y., Collison, E.K., Mpuchane, S.F. and Gashe, B.A., 2005, "Presence of *Bacillus Cereus* in Street Foods in Gaborone, Botswana", *J Food Prot*, Vol. 68, No. 2, pp. 342-6.
 46. Netten, V.P. and Kramer, J.M., 1992, "Media for the Detection and Enumeration of *Bacillus Cereus* in Foods: A Review", *Int J Food Microbiol*, Vol. 17, No. 2, pp. 85-99.
 47. Niall, A.L. and Vos, P.D., 2009, "Bacillus", In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W.B., 2, USA: Springer, New York, NY, USA, pp 21–128.

48. Novotný, O., Cejpek, K. and Velišek, J., 2008, "Formation of Carboxylic Acids During Degradation of Monosaccharides", Czech Journal of Food Science, Vol. 26, No. 2, pp. 117–131.
49. Palzkill, T., 2001, "Impending Doom: Antibiotic Exposure and Bacterial Gene Expression", Genome Research, Vol. 11, No. 1, pp. 1-2.
50. Parry, J.M. and Gilbert, R.J., 1980, "Studies on the Heat Resistance of *Bacillus Cereus* Spores and Growth of the Organism in Boiled Rice", Journal of Hygiene, Vol. 84, No. 1, pp. 77-82.
51. Peng, H., Ford, V., Frampton, E.W., Restaino, L., Shelef, L.A. and Spitz, H., 2001, "Isolation and Enumeration of *Bacillus Cereus* From foods on a Novel Chromogenic Plating Medium", Food Microbiology, Vol. 18, No. 1, pp. 231-238.
52. Piddock, L.J., Garvey, M.I., Rahman, M.M. and Gibbons, S., 2010, "Natural and Synthetic Compounds Such as Trimethoprim Behave as Inhibitors of Efflux in Gram-Negative Bacteria", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 65, No. 6, pp. 1215-1223.
53. Qadri, S.M., Ueno, Y. and Cunha, B.A., 1996, "Susceptibility of Clinical Isolates to Expanded-Spectrum Beta-Lactams Alone and in the Presence of Beta-Lactamase Inhibitors", Chemotherapy, Vol. 42, No. 5, pp. 334-42.
54. Ruiz-Bolivar, Z., Neuque-Rico, M.C., Poutou-Pinales, R.A., Carrascal-Camacho, A.K. and Mattar, S., 2011, "Antimicrobial Susceptibility of *Listeria Monocytogenes* Food Isolates from Different Cities in Colombia", Foodborne Pathog Dis, Vol. 8, No. 8, pp. 913-9.
55. Sanchez, L., Pan, W., Vinas, M. and Nikaido, H., 1997, "The AcrAB Homolog of *Haemophilus Influenzae* Codes for a Functional Multidrug Efflux Pump", Journal of Bacteriology, Vol. 179, No. 21, pp. 6855-6857.
56. Schlegelova, J., Brychta, J., E.Klimova, E.Naprapnikova and V.Babak, 2008, "The Prevalence of and Resistance to Antimicrobial Agents of *Bacillus Cereus* Isolates from Foodstuffs", Veterinarni Medicina, Vol. 48, No. 1, pp. 331-338.
57. Setlow, B. and Setlow, P., 1980, "Measurements of the Ph within Dormant and Germinated Bacterial Spores", Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 77, No. 5, pp. 2474-2476.
58. Shaheen, R., 2009, *Bacillus Cereus* Spores and Cereulide in Food-Borne Illness, Academic Dissertation in Microbiology, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 63.

59. Sioud, M., Boudabous, A. and Cekaite, L., 2009, "Transcriptional Responses of *Bacillus Subtillis* and *Thuringiensis* to Antibiotics and Anti-Tumour Drugs", *Int J Mol Med*, Vol. 23, No. 1, pp. 33-9.
60. Tallent, S.M., Kotewicz, K.M., Strain, E.A. and Bennett, R.W., 2012, "Efficient Isolation and Identification of *Bacillus Cereus* Group", *Journal of AOAC International*, Vol. 95, No. 2, pp. 446-451.
61. Todar, K., 2008, *Control of Microbial Growth*, [online], Available: http://textbookofbacteriology.net/control_5.html [15 April].
62. Turnbull, P.C., Sirianni, N.M., LeBron, C.I., Samaan, M.N., Sutton, F.N., Reyes, A.E. and Peruski, L.F., Jr., 2004, "Mics of Selected Antibiotics for *Bacillus Anthracis*, *Bacillus Cereus*, *Bacillus Thuringiensis*, and *Bacillus Mycoides* from a Range of Clinical and Environmental Sources as Determined by the Etest", *J Clin Microbiol*, Vol. 42, No. 8, pp. 3626-34.
63. USFDA, 2009, Unilever Conducts Nationwide Voluntary Recall of Slim-Fast® Ready-to-Drink Products in Cans Due to Possible Health Risk, [online], Available: www.fda.gov. [02 Jan 2013].
64. van Melis, C.C.J., Almeida, C.B., Kort, R., Groot, M.N.N. and Abee, T., 2012, "Germination Inhibition of *Bacillus Cereus* Spores: Impact of the Lipophilic Character of Inhibiting Compounds", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 160, No. 2, pp. 124-130.
65. Wagner, R.D., Johnson, S.J., Cerniglia, C.E. and Erickson, B.D., 2011, "Bovine Intestinal Bacteria Inactivate and Degrade Ceftiofur and Ceftriaxone with Multiple Beta-Lactamases", *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 55, No. 11, pp. 4990-8.
66. Wamnes, J., 2011, Outbreak at Okeechobee Correctional Institution. *Food for Thought. Food and Waterborne Disease Program, USA.*, Vol. February 2011.

ภาคผนวก
(APPENDIX)

ตารางที่ A.1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่แตกต่างกันของการเจริญเติบโตในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 30 °C (log CFU/mL)

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10⁵ CFU/mL

เวลา (h)	Rep1	Rep2	Rep3	Avg.	SD.
0	5.52	5.60	5.60	5.57	0.05
4	5.51	5.48	5.48	5.49	0.02
8	6.26	6.48	6.30	6.34	0.12
12	7.11	7.00	6.95	7.02	0.08
16	7.30	7.48	7.36	7.38	0.09
24	7.70	7.85	7.70	7.75	0.08

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10³ CFU/mL

เวลา (h)	Rep1	Rep2	Rep3	Avg.	SD.
0	3.26	3.48	3.95	3.56	0.36
4	4.53	4.00	4.30	4.28	0.27
8	6.08	5.70	5.70	5.83	0.22
12	6.38	6.30	6.60	6.43	0.16
16	7.45	7.60	7.36	7.47	0.12
24	7.30	7.60	7.48	7.46	0.15

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 CFU/mL

เวลา (h)	Rep1	Rep2	Rep3	Avg.	SD.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	3.60	3.00	3.48	3.36	0.32
8	5.60	5.00	5.30	5.30	0.30
12	6.90	6.70	6.85	6.82	0.11
16	7.34	7.85	7.70	7.63	0.26
24	7.26	7.70	7.70	7.55	0.26

ตารางที่ A.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	4.30	4.41	0.00	4.48	4.48	0.00	4.48	4.30	0.00
4	4.48	4.48	3.00	4.48	4.60	3.00	4.60	4.30	3.30
8	5.95	5.90	3.30	6.00	5.70	3.48	6.11	5.78	3.48
12	6.85	6.85	4.85	7.30	7.30	5.00	6.95	7.00	4.95
16	7.08	7.20	5.95	7.70	7.30	6.00	7.00	7.30	6.00
24	6.48	6.48	6.15	6.70	6.85	6.00	6.85	6.48	5.90

Table A.3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	22.06	20.00	100.00	20.08	20.08	100.00	20.08	23.22	100.00
4	18.67	18.67	45.51	18.26	15.98	45.23	15.98	21.47	39.73
8	4.81	5.63	47.23	7.37	12.01	46.32	2.97	8.30	44.82
12	3.78	3.78	31.89	0	0	28.57	0.00	0	28.76
16	3.04	1.33	18.45	0	2.36	19.76	4.91	0.82	18.50
24	15.87	15.87	20.17	14.61	12.75	23.52	11.09	15.87	23.33

Table A.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Trimethoprim								
	ซ้้าที่ 1			ซ้้าที่ 2			ซ้้าที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	4.40	4.78	4.00	4.85	5.00	4.90	5.30	5.48	5.00
4	6.00	6.15	6.28	6.00	6.30	6.30	6.00	6.00	6.00
8	6.48	6.48	6.90	6.48	6.30	6.00	6.70	6.85	6.00
12	6.95	7.15	6.95	7.00	7.30	7.00	7.00	7.00	6.70
16	7.11	7.51	7.20	6.70	7.00	7.00	6.95	7.30	7.00
24	7.34	7.32	7.00	7.70	7.00	7.48	7.00	7.30	7.70

Table A.5 เปอร์เซนต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Trimethoprim								
	ซ้้าที่ 1			ซ้้าที่ 2			ซ้้าที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	20.31	13.42	27.52	13.51	10.75	12.48	5.37	2.23	10.75
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	2.72	7.37	0.00	0.00	4.78
12	2.24	0.00	2.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.67
16	2.56	0.00	1.33	10.41	6.38	6.38	5.54	0.82	4.91
24	4.63	4.89	9.08	1.86	10.77	4.69	9.08	5.17	0.00

ตารางที่ A.6 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Novobiocin								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	4.70	4.85	4.59	5.48	4.95	4.70	5.00	4.90	4.48
4	4.60	4.54	4.48	4.48	4.48	4.85	4.70	4.30	4.30
8	4.18	4.20	4.11	4.30	4.32	4.30	4.00	3.90	4.15
12	3.78	3.30	3.30	3.70	3.00	0.00	4.00	3.00	0.00
16	3.78	3.60	3.30	3.95	3.30	0.00	4.00	0.00	0.00
24	3.70	0.00	0.00	3.78	0.00	0.00	3.70	0.00	0.00

ตารางที่ A.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Novobiocin								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	14.85	12.20	16.81	2.23	11.56	16.12	10.75	12.48	20.08
4	16.40	17.46	18.67	18.26	18.26	11.54	14.21	21.47	21.47
8	33.24	32.79	34.23	33.60	33.27	33.60	36.52	38.06	34.20
12	46.89	53.60	53.60	47.16	57.14	100.00	42.48	56.86	100.00
16	48.25	50.66	54.79	47.12	55.85	100.00	45.66	100.00	100.00
24	51.96	100.00	100.00	51.84	100.00	100.00	51.96	100.00	100.00

ตารางที่ A.8 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^5 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Amoxicillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Amoxicillin								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	5.00	5.00	5.60	5.40	5.04	4.95	5.48	5.00	4.85
4	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.30	3.00	3.00
8	4.00	3.70	3.30	4.00	3.30	3.60	4.30	4.00	3.48
12	4.18	3.00	0.00	4.90	3.30	0.00	4.85	3.48	0.00
16	6.48	5.30	0.00	6.48	5.48	0.00	6.48	5.48	0.00
24	6.48	6.30	0.00	6.60	6.48	0.00	6.48	6.00	0.00

ตารางที่ A.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Amoxicillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Amoxicillin								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	9.40	9.40	0.00	3.64	10.01	11.56	2.23	10.75	13.51
4	45.51	45.51	45.51	45.23	45.23	45.23	39.73	45.23	45.23
8	36.05	40.87	47.23	38.24	49.04	44.39	31.74	36.52	44.82
12	41.30	57.83	100.00	29.96	52.84	100.00	30.33	50.00	100.00
16	11.28	27.39	100.00	13.37	26.75	100.00	12.02	25.60	100.00
24	15.87	18.16	100.00	15.84	17.44	100.00	15.87	22.07	100.00

ตารางที่ A.12 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate								
	ซ้้าที่ 1			ซ้้าที่ 2			ซ้้าที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	4.30	3.85	0.00	4.78	4.11	0.00	4.70	4.00	0.00
12	6.40	5.95	0.00	6.30	5.85	0.00	6.30	5.48	0.00
16	6.70	6.53	3.78	6.95	6.90	3.00	6.85	6.70	3.70
24	6.00	6.30	6.18	6.70	6.00	6.28	6.48	6.18	5.70

ตารางที่ A.13 เปอร์เซนต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	Polymyxin B sulfate								
	ซ้้าที่ 1			ซ้้าที่ 2			ซ้้าที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
4	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
8	29.25	36.75	100.00	16.16	27.81	100.00	17.55	29.81	100.00
12	0	6.68	100.00	0.00	7.24	100.00	4.56	17.04	100.00
16	10.05	12.30	49.27	8.52	9.19	60.54	7.02	9.00	49.75
24	17.82	13.70	15.41	11.88	21.07	17.41	13.37	17.40	23.78

ตารางที่ A.14 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Trimethoprim								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	3.30	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
4	3.30	3.30	3.00	3.00	3.48	3.00	3.48	3.00	3.30
8	6.15	6.23	6.18	6.00	6.60	6.48	5.70	6.00	6.00
12	5.90	5.30	5.60	6.00	5.48	5.48	5.90	5.48	6.00
16	7.23	7.28	7.26	7.48	7.30	7.00	7.00	7.30	6.95
24	6.78	6.90	7.04	7.00	6.90	6.90	7.00	6.60	6.95

ตารางที่ A.15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Trimethoprim								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	0.00	7.84	7.84	13.72	13.72	13.72	24.13	24.13	24.13
4	27.15	27.15	33.80	25.00	13.07	25.00	19.16	30.25	23.25
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	7.48	16.91	12.20	4.78	13.08	13.08	10.59	17.04	9.12
16	2.91	2.26	2.58	1.64	3.96	7.92	4.91	0.82	5.54
24	7.16	5.45	3.56	7.92	9.19	9.19	6.38	11.70	6.99

ตารางที่ A.16 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Novobiocin								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	3.70	3.48	3.48	3.30	3.00	3.00	3.00	3.48	3.48
4	3.00	3.30	3.00	3.00	3.00	3.00	3.30	3.00	3.00
8	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
12	4.08	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
16	5.26	0.00	0.00	5.78	0.00	0.00	5.38	0.00	0.00
24	4.30	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	3.95	0.00	0.00

ตารางที่ A.17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Novobiocin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Novobiocin								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	0	0	0	5.06	13.72	13.72	24.13	12.07	12.07
4	33.80	27.15	33.80	25.00	25.00	25.00	23.25	30.25	30.25
8	50.65	50.65	50.65	47.36	47.36	47.36	47.36	47.36	47.36
12	36.07	100.00	100.00	36.52	100.00	100.00	39.41	100.00	100.00
16	29.43	100.00	100.00	23.99	100.00	100.00	26.92	100.00	100.00
24	41.09	100.00	100.00	47.38	100.00	100.00	47.12	100.00	100.00

ตารางที่ A.18 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^3 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Ceftriaxone								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.48	3.00	3.00
4	3.85	3.48	3.00	3.78	3.48	3.00	3.90	3.30	3.30
8	5.48	3.95	3.95	5.78	4.30	4.30	5.60	4.00	4.04
12	6.48	6.08	4.41	6.00	6.00	4.60	6.30	5.95	4.30
16	7.08	6.30	7.08	7.60	6.90	7.30	7.20	6.45	7.15
24	7.30	7.30	7.30	7.70	7.30	7.00	7.40	7.34	7.32

ตารางที่ A.19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Ceftriaxone								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	7.84	7.84	7.84	13.72	13.72	13.72	12.07	24.13	24.13
4	15.15	23.27	33.80	5.55	13.07	25.00	9.25	23.25	23.25
8	9.90	34.95	34.95	0.00	24.53	24.53	1.70	29.81	29.09
12	0.00	4.72	30.80	4.78	4.78	26.96	4.56	9.81	34.85
16	4.94	15.39	4.94	0.00	9.19	3.96	2.14	12.42	2.93
24	0.00	0.00	0.00	0.00	3.96	7.92	1.06	1.80	2.07

ตารางที่ A.20 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^1 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	3.70	0.00	0.00	3.78	0.00	0.00	3.85	0.00	0.00
12	5.85	3.95	0.00	5.90	4.00	0.00	5.70	4.00	0.00
16	6.28	5.11	3.30	6.60	5.48	3.00	6.48	5.30	3.48
24	6.00	5.90	5.70	6.48	6.00	5.30	6.70	5.70	5.00

ตารางที่ A.21 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Polymyxin B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Polymyxin B sulfate								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
4	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
8	33.97	100.00	100.00	24.44	100.00	100.00	27.47	100.00	100.00
12	15.33	42.72	100.00	11.88	40.29	100.00	16.74	41.56	100.00
16	14.49	30.35	55.04	15.84	30.18	61.76	15.87	31.15	54.84
24	17.30	18.64	21.45	15.87	22.07	31.15	12.99	25.98	35.06

ตารางที่ A.22 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^1 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim B sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Trimethoprim B sulfate								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	4.60	4.78	4.60	4.60	4.70	4.60	4.48	4.60	4.60
12	6.04	6.08	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
16	6.36	6.30	6.48	7.18	6.00	6.48	6.95	6.30	6.00
24	7.00	7.00	7.00	7.00	7.48	7.48	7.30	7.30	7.30

Table A.23 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Trimethoprim ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Trimethoprim								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
4	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
8	17.85	14.71	17.85	7.96	6.02	7.96	15.54	13.19	13.19
12	12.48	11.94	13.08	10.43	10.43	10.43	12.35	12.35	12.35
16	13.36	14.18	11.78	8.53	23.52	17.44	9.67	18.16	22.07
24	3.52	3.52	3.52	9.08	2.88	2.88	5.17	5.17	5.17

ตารางที่ A.24 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. cereus* ที่ 10^1 CFU/mL ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Ceftriaxone								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	3.00	0.00	0.00	3.30	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00
12	6.15	4.32	0.00	6.30	4.78	0.00	6.20	4.43	0.00
16	6.48	5.30	3.30	6.70	5.60	3.70	6.54	5.38	3.85
24	7.85	7.00	6.30	7.30	7.00	6.70	7.60	7.20	6.40

ตารางที่ A.25 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *B. cereus* ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSB ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 CFU/mL ซึ่งมีการเสริมด้วย Ceftriaxone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (h)	ความเข้มข้นของ Ceftriaxone								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
0	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100	100.00	100.00
4	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100	100.00	100.00
8	46.45	100.00	100.00	33.98	100.00	100.00	43.41	100.00	100.00
12	10.97	37.39	100.00	5.94	28.67	100.00	9.36	35.26	100.00
16	11.78	27.80	55.04	14.61	28.59	52.85	15.00	30.12	50.06
24	0.00	3.52	13.15	5.17	9.08	12.99	1.26	6.43	16.90

ตารางที่ A.26 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ

Polymyxin B sulfate

เวลา (h)	5.00 mg/L ของ Polymyxin B sulfate					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	20.74	1.14	42.27	0.09	0.00	0.00
8.00	5.05	2.21	100.00	0.00	0.00	0.00
16.00	1.66	4.12	100.00	0.00	0.00	0.00
24.00	13.86	2.48	100.00	0.00	0.00	0.00

เวลา (h)	10.00 mg/L ของ Polymyxin B sulfate					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	21.10	1.84	62.57	1.58	0.00	0.00
8.00	8.65	3.21	100.00	0.00	0.00	0.00
16.00	1.50	0.78	100.00	0.00	0.00	0.00
24.00	14.83	1.80	100.00	0.00	0.00	0.00

เวลา (h)	20.00 mg/L ของ Polymyxin B sulfate					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	100.00	0.00	58.26	1.92	0.00	0.00
8.00	46.12	1.22	100.00	0.00	0.00	0.00
16.00	18.90	0.74	100.00	0.00	0.00	0.00
24.00	22.34	1.88	100.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ A.27 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ

Trimethoprim

เวลา (h)	5.00 mg/L ของ Trimethoprim					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	13.06	7.48	0.00	0.00	0.00	0.00
8.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16.00	6.17	3.96	14.70	5.11	13.79	2.96
24.00	5.19	3.64	34.00	0.68	14.89	2.39

เวลา (h)	10.00 mg/L ของ Trimethoprim					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	8.80	5.84	0.00	0.00	0.00	0.00
8.00	0.00	0.00	0.00	8.82	1.18	0.11
16.00	1.47	4.62	24.93	2.83	19.66	1.61
24.00	6.94	3.32	34.67	2.44	23.16	2.97

เวลา (h)	20.00 mg/L ของ Trimethoprim					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	16.91	9.22	4.14	5.86	0.00	0.00
8.00	0.60	9.57	0.00	0.00	4.69	0.09
16.00	4.21	2.60	26.54	0.56	26.21	3.42
24.00	4.59	4.54	36.68	0.83	36.78	1.62

ตารางที่ A.28 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างของ

Novobiocin

เวลา (h)	5.00 mg/L ของ Novobiocin					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	9.28	6.44	0.00	0.00	0.00	0.00
8.00	34.45	1.80	5.97	8.44	14.00	5.23
16.00	47.01	1.30	0.00	0.00	42.71	0.77
24.00	51.92	0.07	0.41	0.59	41.79	0.00

เวลา (h)	10.00 mg/L ของ Novobiocin					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	12.08	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00
8.00	34.71	2.91	8.22	6.87	15.11	7.42
16.00	68.84	27.11	0.00	0.00	42.16	0.00
24.00	100.00	0.00	1.49	0.58	39.86	2.74

เวลา (h)	20.00 mg/L ของ Novobiocin					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	17.67	2.12	10.57	1.23	0.00	0.00
8.00	34.01	0.36	13.22	4.96	10.15	1.26
16.00	84.93	26.10	0.00	0.00	41.10	2.22
24.00	100.00	0.00	7.60	2.30	38.97	4.72

ตารางที่ A.29 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ

Amoxicillin

เวลา (h)	5.00 mg/L ของ Amoxicillin					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	5.09	3.80	2.00	2.08	0.00	0.00
8.00	35.35	3.31	47.22	3.60	20.24	1.39
16.00	12.23	1.06	52.95	0.95	42.42	0.36
24.00	15.86	0.01	53.92	3.72	65.14	0.00

เวลา (h)	10.00 mg/L ของ Amoxicillin					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	10.05	0.68	3.02	1.62	0.00	0.00
8.00	42.14	6.36	50.90	0.80	23.29	4.60
16.00	26.58	0.91	51.79	3.84	45.85	2.24
24.00	19.22	2.49	53.88	2.50	63.72	1.44

เวลา (h)	20.00 mg/L ของ Amoxicillin					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	7.85	8.17	6.42	2.64	0.00	0.00
8.00	45.48	1.53	62.05	1.25	21.41	2.28
16.00	100.00	0.00	74.00	0.20	46.32	1.58
24.00	100.00	0.00	100.00	0.00	69.34	0.00

ตารางที่ A.30 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ

Ceftriaxone

เวลา (h)	5.00 mg/L ของ Ceftriaxone					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	7.40	6.51	4.20	1.87	0.00	0.00
8.00	0.00	0.00	47.22	3.60	33.24	0.85
16.00	0.00	0.00	100.00	0.00	51.25	4.82
24.00	0.00	0.00	100.00	0.00	61.62	1.54

เวลา (h)	10.00 mg/L ของ Ceftriaxone					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	5.45	0.28	12.64	1.00	0.00	0.00
8.00	0.00	0.00	65.08	1.40	32.31	0.59
16.00	0.00	0.00	100.00	0.00	32.98	0.60
24.00	0.00	0.00	100.00	0.00	54.09	1.17

เวลา (h)	20.00 mg/L ของ Ceftriaxone					
	<i>B. cereus</i>	SD	<i>E. coli</i>	SD	<i>S. aureus</i>	SD
0.00	11.15	0.41	20.04	1.65	0.00	0.00
8.00	27.61	6.40	71.68	1.14	31.77	0.14
16.00	0.00	0.00	100.00	0.00	35.09	0.83
24.00	0.00	0.00	100.00	0.00	55.57	0.49