



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus*
แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อป้องกันปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร

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

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802211

สัญญาเลขที่ 21/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus*
แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร

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

ผศ.ดร.อาทิตย์ ทิพย์รัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 21/2560

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาทิตย์ ทิพย์รัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio parahaemolyticus* แบบมีอินดิเคเตอร์สีเพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหาร (ภาษาอังกฤษ) Development of chromogenic enrichment broth for *Vibrio parahaemolyticus* to facilitate early-warning detection in food industry รหัสโครงการ 2560A10802211 สัญญาเลขที่ 21/2560 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 700,000 บาท (เจ็ดแสนบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2559 – วันที่ 30 กันยายน 2560) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้ทำการบูรณาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกอาหารทะเลสดแช่เยือกแข็งรายใหญ่ของโลก ทั้งนี้ปัญหาสำคัญของการผลิต และส่งออกอาหารทะเลสดแช่เยือกแข็งคือการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยส่วนใหญ่พบเชื้อชนิดนี้บริเวณชายฝั่งทะเลและปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเล การบริโภคอาหารทะเลที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่เพียงพอ จะทำให้มีโอกาสติดเชื้อสูง โดยปกติการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลใช้วิธีดั้งเดิมหรือวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก และใช้เวลานาน บางครั้งให้ผลไม่ทันต่อการเน่าเสียของอาหารทะเล หรืออาหารทะเลที่มีปัญหาดังกล่าวได้ไปถึงมือผู้บริโภคแล้ว จึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่สามารถประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในการที่จะบริโภคอาหารเหล่านั้นได้อย่างปลอดภัย ดังนั้นในงานวิจัยจึงบูรณาการวิธีการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการพัฒนาอาหารเหลววงซึ่งชนิดใหม่ โดยเป็นการพัฒนาอาหารเหลวสีหลากหลายปฏิกิริยาที่ใช้ร่วมกัน (Multiplexed colorimetric enrichment media) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในขณะเดียวกันเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล (sugar fermentation, SFT), ปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน (amino acid decarboxylation, AAD), ปฏิกิริยาเอส

คิวรีนไฮโดรไลซิส (Esculin hydrolysis, ESC) และปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide, HSP) ร่วมกับการตรวจสอบปฏิกิริยาค่ายการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหารเหลวบ่งชี้จำเพาะด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเคอร์ที่มีความยาวคลื่น 600, 550, 450, และ 650 นาโนเมตรตามลำดับ เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* เบื้องต้น ทั้งนี้ในงานวิจัยยังได้นำชุดทดสอบอาหารเหลวสีเพิ่มจำนวน เด็กซ์โตรส-โบรโมครีซอลเฟอเฟิล (DEX-BP), อะราบินอส-โบรโมครีซอลเฟอเฟิล (ARA-BP), แมนโนส-โบรโมครีซอลเฟอเฟิล (MAO-BP), แมนนิทอล-โบรโมครีซอลเฟอเฟิล (MAO-BP), ไลซีน-ฟีนอลเรด (LYS-PR), ออร์นิติน-ฟีนอลเรด (ORN-PR), และเอสคิวรีนไฮโดรไลซิส (ESC) มาประยุกต์ใช้ตรวจสอบคุณภาพของน้ำทะเลที่ผ่านระบบกรองเพื่อการเตรียมน้ำสำหรับการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ สำหรับการอนุบาลลูกกุ้งลูกปลา นอกจากนี้ในงานวิจัยยังมีการพัฒนาสูตรอาหารจำเพาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไลซีนดีคาร์บอกซิเลชัน เป็นการเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ (selectivity) ได้ดียิ่งขึ้นด้วยการศึกษาชนิดของตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมในการคัดแยกเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไลซีนดีคาร์บอกซิเลชันได้เช่นเดียวกัน เช่นเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมีการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ 96-microwell plate ที่ลดปริมาณการใช้อาหารแต่ยังคงให้ผลสอดคล้องกับวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ที่หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน

บทคัดย่อ

หลักการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปทดสอบใช้ได้จริงด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจำนวนที่เป็นลักษณะสีที่มีหลายปฏิกิริยาชีวเคมีร่วมกันได้ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสำหรับตัวอย่างโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร รูปแบบการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นการผนวกรวมกับอาหารเหลวเพิ่มจำนวนในขั้นตอนแรก โดยรูปแบบการวิเคราะห์อาหารเพิ่มจำนวนนี้ใช้ปฏิกิริยาชีวเคมีในการบ่มเพาะเลี้ยงด้วย 96-well ไมโครไทเทอเพลทที่เป็นการลดปริมาณอาหารที่ใช้แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ ร่วมกับการใช้เทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างเพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ รูปแบบจำเพาะของปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ครอบคลุมกลุ่มปฏิกิริยาชีวเคมีมาตรฐานที่ได้นำเสนอ เช่น การใช้น้ำตาล, การเกิดกรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลชัน, การเกิดปฏิกิริยา esculin hydrolysis และการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยการใช้ปฏิกิริยาเหล่านี้เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ ทั้งนี้อาหารเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ใช้จะมีสีที่เกิดจากการใช้ฟิเออซินดิเคเตอร์ที่เป็นโบรโมครีซอลเพอเฟิล, ฟีนอลเรด, เฟอริริกแอมโมเนียมซัลเฟต, และโซเดียมไรโอซัลเฟต ถูกเติมลงไปในการเพิ่มจำนวนเพื่อบ่งบอกการเกิดปฏิกิริยาและเพื่อให้มีผลกับการตอบสนองของค่าการดูดกลืนแสงด้วยการวัดด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ เงื่อนไขการเพิ่มจำนวนของเซลล์ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดสอบ เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella Typhi*, *Yersinia enterocolitica* ทั้งนี้ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นหนึ่งแบคทีเรียที่ใช้รูปแบบการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนด้วยอาหารหลากหลายปฏิกิริยาชีวเคมีด้วยเช่นกัน โดยในการทดสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ประมาณ 1-2 log CFU/ml อาหารเหลวเพิ่มจำนวนสีที่ได้มีการพัฒนาจะถูกทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 24 ชั่วโมง หรืออาจจะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีภายใน 16 – 18 ชั่วโมงในบางกรณีของปฏิกิริยา การเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวสีสะท้อนลักษณะจำเพาะของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความจำเพาะกับปฏิกิริยาดังกล่าว รูปแบบของปฏิกิริยาชีวเคมีของแต่ละเชื้อจะบ่งบอกความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนของเชื้อที่ปรากฏ สำหรับรูปแบบจำเพาะของการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวสามารถถูกนำไปใช้ในการบ่งบอกความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในตัวอย่างด้วยชุดวิเคราะห์ขนาดเล็ก อาหารเหลวจำเพาะที่ใช้ครอบคลุม 24 สับ

เสตรที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ และสามารถใช้ได้จริงในการตรวจสอบการปนเปื้อนว่ามีหรือไม่มี เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบในตัวอย่างโรงงาน อุตสาหกรรมที่มีปริมาณที่ต้องการทดสอบจำนวนมากและมีความถี่ในการตรวจสอบ ตัวอย่างอาหารทั้งที่มีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติและไม่มีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติ ถูกนำมาทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยใช้อาหารเหลวจำเพาะ 7 อาหารเหลวที่ให้ผลบวกของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จาก 24 อาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนาถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ด้วย รูปแบบการวิเคราะห์ที่น่าเสนอพบว่า ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนในตัวอย่างที่ทดสอบให้ผลสอดคล้องดี กับวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานเป็นอย่างดี

คำสำคัญ : อาหารเหลวสีเพิ่มจำนวน, รูปแบบปฏิกิริยาชีวเคมี, เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค, การตรวจวิเคราะห์

Abstract

A practical concept of microbial identification using multiplexed colorimetric enrichment substrates was developed to facilitate foodborne pathogen detection for industrial food samples in resource-poor settings. This detection scheme is seamlessly integrated into the primary liquid enrichment step of the conventional culture-based protocols. This enrichment protocol utilized miniaturized biochemical reactions based on the miniaturized cultivation in 96-well microtiter plates together with the use of high-throughput optical density measurement by a microplate reader. Specific biochemical fingerprints of foodborne pathogens can be obtained from a comprehensive matrix of standard biochemical reactions (i.e., sugar fermentation, amino acid decarboxylation, esculin hydrolysis and hydrogen sulfide production) and used to presumptively identify probability of foodborne pathogen contamination. Multiple color-producing agents including bromocresol purple, phenol red, ferric ammonium citrate, and sodium thiosulfate were added to enable unique colorimetric or absorbance responses. Cell enrichment condition was set at 37 °C for 24 h. Several Gram-positive (i.e., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) and Gram-negative bacteria (i.e., *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*) were included in this experiment and they were inoculated at the initial cell concentrations as low as log 1-2 CFU/ml. The broths developed color and alter absorbance within 24 h or as early as 16-18 h in some cases. The shift of broth colors reflected unique cell biochemistry specific to a particular strain. These biochemical fingerprints of each bacteria constituted a presumptive indicator of the existence of foodborne pathogens. Divergence from unique broth color patterns can presumptively signify the absence of the target foodborne pathogens in the samples. Our miniaturized, comprehensive broth set using all 24 substrates can reliably and practically identify the presence of foodborne pathogens suitable for industrial samples having high volumes and high sampling frequency in nature. Three commercial and artificially- *V. parahaemolyticus* contaminated samples were included in the test. 7 out of 24 developed substrates were selected to test positive of *V. parahaemolyticus* existence. The results of the proposed protocol agree well with those of the conventional agar-based culture.

Keywords: multiplexed colorimetric enrichment media / rapid screening / *Vibrio parahaemolyticus*

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	IV
สารบัญเรื่อง	VII
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	X
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	7
3 วัตถุประสงค์และการดำเนินงานวิจัย	42
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	52
5 สรุปผลการทดลอง	76
เอกสารอ้างอิง	78
ผลผลิต (output)	87
ประวัติคณะผู้วิจัย	88

สารบัญญัตินี้

ตารางที่		หน้า
2.1	วิกฤตการณ์ของแบคทีเรียก่อโรค	8
2.2	ข้อจำกัดของการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	14
2.3	ความแตกต่างทางชีวเคมีของเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>V. vulnificus</i>	16
2.4	ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS	21
2.5	แสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS	21
2.6	อาหารเลี้ยงเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่แนะนำ	25
2.7	ลักษณะของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar™ <i>Vibrio</i>	29
2.8	การทดสอบทางชีวเคมีขั้นต้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ในตัวอย่างอาหาร	30
2.9	ลักษณะที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ในตัวอย่างอาหาร	30
3.1	ปัจจัยที่ศึกษาในอาหาร lysine decarboxylase media	51
4.1	แสดงรูปภาพของอาหารเหลวใน well เดียวที่บรรจุอาหารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ กัน จำนวน 4 ชนิดที่เป็นอะราบิโนส-โบรโมครีซอล, ไลซีน-ฟีนอลเรด, ปฏิกริยาการใช้ esculin hydrolysis, และการใช้ Hydrogen sulfide ที่มีการ inoculation ด้วยเชื้อต่างชนิดกัน การเปลี่ยนสีดังกล่าวอยู่ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	60
4.2	แสดงความสามารถในการคัดแยกเชื้อด้วยอาหารเหลวเพิ่มจำนวนจำเพาะ 24 ชนิดในการเพาะบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในแต่ละเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคใช้ปริมาณเซลล์ที่ 1-2 log CFU/ml ผลการทดลองที่นำเสนอแสดงอยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารเหลวที่มีการ inoculation เชื้อ เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เป็น control	63
4.3	การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ในตัวอย่างอาหารจริง โดยการใช้วิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน 2 แบบ: การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวชีวเคมีที่นำเสนอและวิธีการที่เป็นมาตรฐานการวิเคราะห์ด้วย BAM, 2002	66

ตารางที่		หน้า
4.4	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการ treatment น้ำทะเลด้วยระบบกรองในอาหารเหลือที่ จำเพาะ 24 อาหาร	68

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
1.1	ผลิตภัณฑ์จากทะเลมีโอกาสนเป็นของเชื้อมากที่สุด	1
1.2	ลักษณะโคโลนีของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar	3
2.1	ลักษณะของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	13
2.2	Generation Time และ Specific Growth Rate ของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่อุณหภูมิ ต่างๆ	15
2.3	เชื้อ <i>Vibrio</i> สายพันธุ์ต่างๆบนอาหารแข็ง TCBS	23
2.4	โครงสร้าง Bile salt (sodium glycochol)	26
2.5	โครงสร้าง Methyl violet	27
2.6	โครงสร้าง Polymyxin B sulfate	27
2.7	โครงสร้าง Sodium lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate)	28
2.8	โครงสร้าง Tellurite	28
2.9	กลไก (mechanism) ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล (fermentation)	36
2.10	กลไก (mechanism) ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน (amino acid decarboxylation)	37
2.11	แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาคีโมการใช้ esculin ด้วยเอนไซม์ β -glucosidase ที่อยู่ใน แบคทีเรีย	38
2.12	ปฏิกิริยาการรีดักชันของไรโอซัลเฟตและการบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์	39
3.1	Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า	46
3.2	การใช้อาหารเหลวสีจำเพาะที่มีหลายปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (enrichment step) ในขณะที่เดียวกันสามารถบ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากการเปลี่ยนแปลง ของสีอาหาร	50
4.1	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของการเกิดปฏิกิริยา การใช้น้ำตาลแมนโนสในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., <i>Y. enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>)	54

รูปที่		หน้า
4.2	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้กรด อะมิโนไลซีนในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., <i>Y. enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>)	55
4.3	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้เอสคิวรีนในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., <i>Y. enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>)	56
4.4	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., <i>Y. enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>)	57
4.5	การเปลี่ยนแปลงของสีจากผลของปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษาและแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด	71
4.6	ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียต้นแบบ (<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด โดยปราศจากสารคัดเลือด เกลลือ และความเป็นด่าง (ตัวแปรควบคุม)	72
4.7	ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียต้นแบบ (<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด ที่ผสมสารคัดเลือด (polymyxin B sulfate 3 mg/L และ bile salt 0.3 g/L)	72
4.8	ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียต้นแบบ (<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด ที่ผสมเกลือร้อยละ 3	73
4.9	ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียต้นแบบ (<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด กับความเป็นด่าง (พีเอช 8.5)	74

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

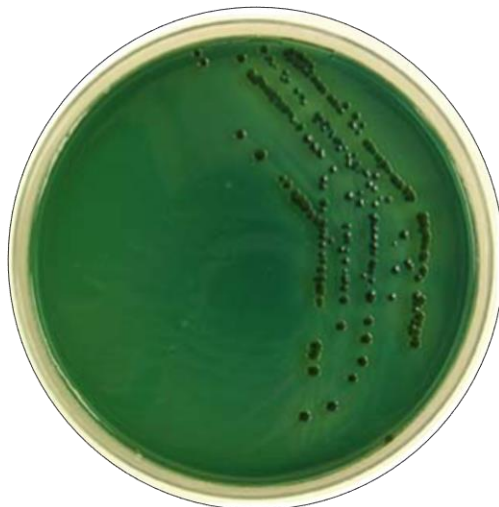
ปัจจุบันประเทศไทยสามารถส่งออกอาหารทะเลแช่เยือกแข็งทำรายได้ให้ประเทศมูลค่าหลายหมื่นล้านบาทต่อปี โดยอาหารทะเลแช่เยือกแข็งที่ส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศประมาณร้อยละ 40 – 60 เป็นกุ้ง รองลงมาคือปลาหมึก ปลา เป็นต้น (กองวิจัยสินค้าและการตลาด กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2556) ถึงแม้ว่าการส่งออกอาหารทะเลแช่เยือกแข็งของไทยจะขยายตัวเพิ่มขึ้น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



รูปที่ 1.1 ผลิตภัณฑ์จากทะเลมีโอกาสนปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด

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

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



รูปที่ 1.2 ลักษณะ โคลินิของ *V. parahaemolyticus* ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

ที่มา : www.microblog.me.uk/189

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

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

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

อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่เยือกแข็งจึงเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศแล้วยังส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศอีกด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมี การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทะเลที่แม่นยำและรวดเร็ว นวัตกรรมวิธีการ วิเคราะห์ดังกล่าวจัดเป็นนวัตกรรมที่สามารถสร้างบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในการประยุกต์และ พัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่เพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์แบบเดิม ที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน เป็นวิธีการ วิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อินดิเคเตอร์สีในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลวร่วมกับการประยุกต์ใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ ของเชื้อในการจำแนกวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ เป้าหมาย เช่น การใช้ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ (fermentable) ความสามารถในการใช้ กรดอะมิโนไลซีน ออนิทินและไลซีน การย่อยสลาย esculin เป็นต้น ขณะเดียวกันในปัจจุบันพบว่าก็มี ประเทศผู้ส่งออกอาหารทะเลแช่เยือกแข็งรายใหม่เกิดขึ้นตลอดเวลา เช่น เวียดนาม มาเลเซีย เข้ามาแข่งขัน เพื่อช่วงชิงส่วนแบ่งการตลาดเพิ่มขึ้น ดังนั้นการสร้างฐานการแข่งขันในระดับตลาดโลกจำเป็นต้องมีการ ยกกระดับเทคโนโลยีและกระบวนการผลิตที่ทันสมัยรวมทั้งการรักษามาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อ ขยายผลผลิตให้เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อใช้ในการส่งออกทั้งในและต่างประเทศ จากที่มาและ ความสำคัญของการปฏิรูปการวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* จึงเห็นสมควรให้การสนับสนุนเป็นอย่าง ยิ่งในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อนำเสนอวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เทียบเท่าวิธีมาตรฐาน
- 1.2.2 เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
- 1.2.3 นำผลงานวิจัยมาประยุกต์ใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกผลิตภัณฑ์ทั้งในและ ส่งออกต่างประเทศ
- 1.2.4 ได้เทคโนโลยีใหม่ที่สามารถตรวจ *Vibrio parahaemolyticus* ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารใน ประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารคัดเลือกว่าจากการตรวจเอกสารจำนวนมากในการเพิ่มจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์คู่แข่ง
- 1.3.2 ศึกษาการรวมกันของสารคัดเลือกว่าใช้ในการฟื้นฟูและคัดเลือกการปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากเชื้อจุลินทรีย์คู่แข่งอื่นๆ
- 1.3.3 ศึกษาการใช้อาหารเหลวสีจำเพาะและสารคัดเลือกว่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการฟื้นฟูเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการกำหนดความแตกต่างของสีสำหรับการบ่งบอกการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus*
- 1.3.4 ปรับระดับของปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจหาเชื้อและการตรวจนับที่สามารถทำให้การตรวจหาเป็นไปอย่างแม่นยำ
- 1.3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus*

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

บทนี้จะแสดงทฤษฎีและรายงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการศึกษานี้ ซึ่งมีเนื้อหาเกี่ยวกับแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และสารคัดเลือกว่าใช้ในการคัดเลือกว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

2.1 แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อเกิดขึ้นจากแบคทีเรียก่อโรค ไวรัส หรือปรสิต ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร วิกฤตการณ์ทั่วโลกส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร แม้ว่าสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศให้ความสำคัญกับความปลอดภัยทางอาหารมากที่สุด อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยมากกว่าหนึ่งล้านคนที่เจ็บป่วยจากการรายงานในทุกปี

2.1.1 ประเภท

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

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

2.1.2 วิกฤตการณ์

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

ตารางที่ 2.1 วิกฤตการณ์ของแบคทีเรียก่อโรค

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

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

เป็นไปได้ของการเกิดวิกฤตการณ์ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว ประเทศกำลังพัฒนาและประเทศที่ยังไม่ได้พัฒนา ดังนั้น ความเจ็บป่วยของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นที่จดจำไปทั่วโลก

2.2 จีโนส Vibrio

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

2.3 การก่อโรค

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

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

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

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

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

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

2.4 *Vibrio parahaemolyticus*

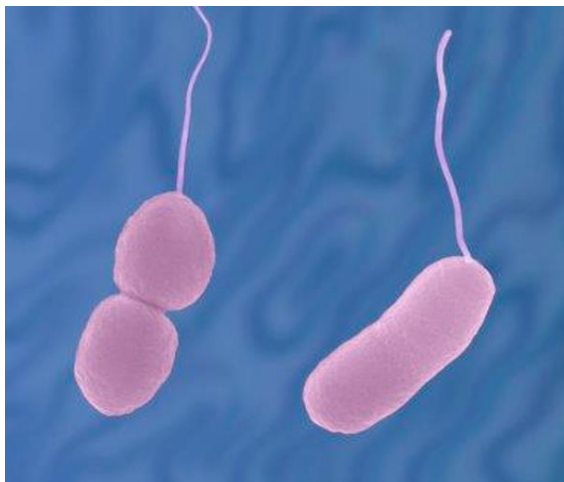
2.4.1 *Vibrio* spp.

Vibrio spp. มีความสำคัญทางการแพทย์ ปัจจุบันมีมากกว่า 30 สปีชีส์ ที่สำคัญคือ *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* สปีชีส์อื่นเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรค

ลักษณะของเชื้อ *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น ดิคสิแกรมลบ มักเป็นรูปท่อน โค้ง และเคลื่อนที่ด้วยฟลาเจลลา เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อมีออกซิเจน

2.4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา – เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Vibrionaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนตรงหรือโค้ง มีขนาด 0.4 – 0.6 x 1-3 ไมโครเมตร มีฟลาเจลลาเพียงหนึ่งเส้นอยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง (Polar flagellum) แต่บางสายพันธุ์อาจมีฟลาเจลลาหลายเส้นอยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างแคปซูลและสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ในของเหลวด้วยความเร็ว 60 ไมครอนต่อวินาที (McCarter, 2001) โดยเฉพาะสายพันธุ์ O3:K6 มีฟิไลที่มีมวลโมเลกุล 18 กิโลดาลตัน (Nakasone et al., 2000) ลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

การแพร่กระจาย – *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* spp. ที่มีการแพร่กระจายมากที่สุด โดยพบได้ทั่วไปในอาหารทะเลทั่วทุกแห่งของโลก และพบได้บ่อยที่สุดบริเวณชายฝั่ง และปากอ่าวของ ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีถิ่นอาศัยอยู่ตามปากอ่าว บริเวณชายฝั่งและในน้ำกร่อย และมีส่วนเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แผลงก่ตอน ปลา และปลาหมึก เป็นต้น โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของสิ่งปฏิภูลในทะเล แต่บ่อยครั้งที่พบว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามปริมาณสารอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (Chai และ Pace, 1994) นอกจากนี้ การเพิ่มจำนวนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในธรรมชาติยังมีความสัมพันธ์กับความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำทะเลด้วย (Tamplin, 2001)

การระบาดในประเทศเขตอบอุ่นนั้น มักพบว่ามีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ หรืออากาศ เชื้อ *V. parahaemolyticus* มักเกิดการระบาดในฤดูร้อน มักไม่ค่อยพบการระบาด ในฤดูหนาวที่อุณหภูมิต่ำลงในฤดูหนาวเป็นระยะพักตัวของเชื้อ เนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* มักจะเข้าไปอยู่ในหอยนางรม กุ้ง และสัตว์ทะเลอื่นๆ (Suthienkul et al., 1995)

ลักษณะทางสรีระวิทยา – เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) เจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิระหว่าง 15 – 42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส และช่วงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5 – 11 แต่เจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.5 จัดเป็นพวก Facultative Anaerobe และเป็นพวกที่ชอบเกลือ (Halophile) สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้น

ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 – 8 แต่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เจริญเติบโตได้ดีอยู่ในช่วงร้อยละ 2 – 3 เนื่องจากโซเดียมไอออนมีความจำเป็นต่อการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ปริมาณของโซเดียมไอออนที่ทำให้มีการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากที่สุดอยู่ที่ 40 มิลลิโมลาร์ จึงมักพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในแหล่งน้ำที่มีความเค็ม รวมทั้งผิว และเครื่องในของสัตว์น้ำเค็มต่างๆ ไป เชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถถูกทำลายด้วยรังสี 0.03 – 0.04 กิโลเกรย์ (Dion et al., 1994)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar ให้โคโลนีสีเขียว ขนาด 0.5 – 2.0 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ผิวโค้งนูน ผิวหน้าเรียบ และเป็นมัน ข้อจำกัดของการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* แสดงในตารางที่ 2.2

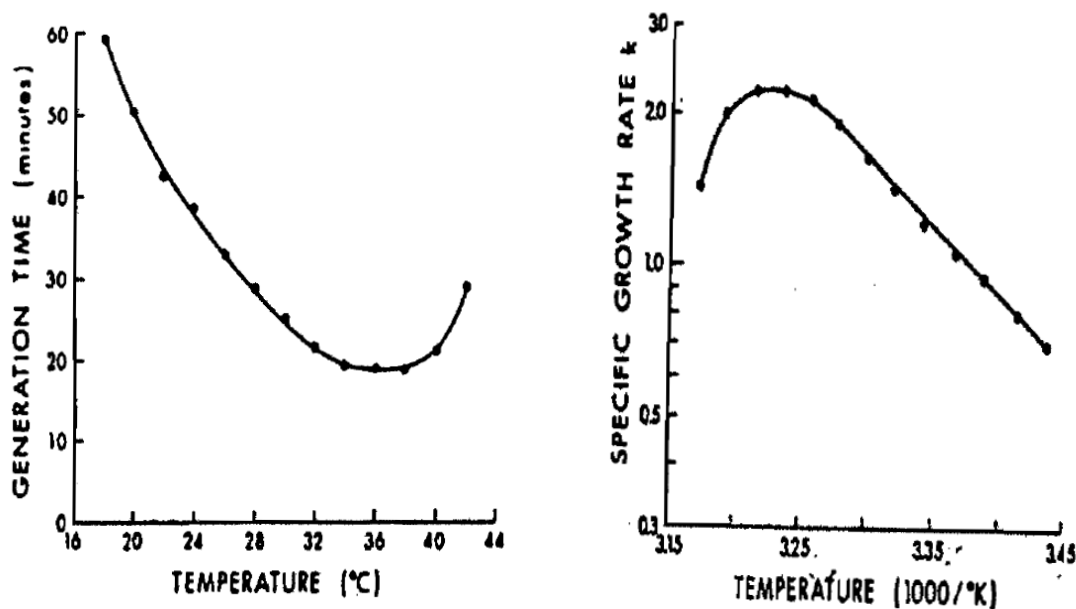
ตารางที่ 2.2 ข้อจำกัดของการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ปัจจัย	ค่าที่รายงาน
ปริมาณน้ำอิสระต่ำสุด	0.94
ความเป็นกรด-ด่างต่ำสุด	4.8
ความเป็นกรด-ด่างสูงสุด	11
ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงสุด	ร้อยละ 10
อุณหภูมิต่ำสุด	5 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิสูงสุด	44 องศาเซลเซียส

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้ ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญในการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ออกจากเชื้อ *Vibrio* spp. สกุลอื่น เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อยู่ในสภาวะขาดสารอาหาร จะสามารถทนทานต่อความร้อน แรงดันออสโมติก และปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าเซลล์ในสภาวะปกติ (Koga และ Takumi, 1995)

Jackson, 1973 ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* 8 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำสุด 9.5 – 10.5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการแบ่งตัว (Generation Time) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 Generation Time และ Specific Growth Rate ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิต่างๆ

(Jackson, 1973)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำ การเก็บรักษาอาหารทะเลไว้ที่อุณหภูมิต่ำ สามารถลดอันตรายที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลได้ (Muntada-Garriga et al., 1995)

Jiang และ Tuu-Jyi (1996) ได้ศึกษาถึงการรอดชีวิตอยู่ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิต่ำๆ พบว่า ที่อุณหภูมิต่ำนี้ เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการเปลี่ยนรูปร่างจากรูปท่อนเป็นทรงกลม

Pace และคณะ (1997) ได้ศึกษาถึง ผลของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของคน ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่า น้ำย่อยในกระเพาะอาหารสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ให้สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้

เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นพวก Chemoorganotroph เหมือนกันกับเชื้อ *Vibrio* spp. สกุลอื่นๆ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 แต่ไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ ทำให้สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ออกจากเชื้อ *Vibrio cholera* และ *Vibrio mimicus* ได้ (Doyle, 1989)

Vibrio alginolyticus, *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ให้ผลลบต่อปฏิกิริยา Arginine dihydrolase แต่ให้ผลบวกสำหรับการทดสอบ Ornithine decarboxylase (Doyle, 1989)

ตารางที่ 2.3 ความแตกต่างทางชีวเคมีของเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

คุณสมบัติ	ปฏิกิริยาของ		
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
การหมักของ:			
Cellobiose	-	-	-
Lactose	-	-	+
Salicin	-	-	+
การเจริญเติบโตใน:			
โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 8	+	+	+
โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 10	แตกต่างกันสายพันธุ์	-	-
Voges-Proskauer	+	-	-
การหมักน้ำตาล	+	-	-
ซูโครส			
การหมักน้ำตาลอะรา	-	+	-
บีโนส			

แอนติเจนและซีโรไทป์ – เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีโครงสร้างทางแอนติเจนประกอบด้วย Thermostable Somatic O Antigens 12 กลุ่ม และ Thermolabile Capsular K Antigen 59 ชนิด ส่วน Flagella H Antigens มีมากกว่า 70 กลุ่ม และมีในเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ (strains)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีแอนติเจน O, K, และ H เหมือนกับแบคทีเรียในลำไส้ทั่วไป โดยซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดในประเทศไทย สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และประเทศในทวีปแอฟริกา คือ O5:K17

K. Antigen เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ที่มีสภาพเป็นกรด ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลเพนโตส (Pentose) น้ำตาลเฮกโซส (Hexose) และน้ำตาลเฮกโซ-ซามีน (Hexosamines) ซึ่งอัตราส่วนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแอนติเจน K Antigen ถูกปลดปล่อยออกมาจากผิวเซลล์ โดยการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง

O antigen เป็นสารประกอบไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lypopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคซามีน (Glucosamine) น้ำตาลเฮปโตส (Heptose) ฟอสฟอรัส เอสเทอร์ของกรดไขมัน และสารประกอบไนโตรเจน

2.4.3 การระบาด การปนเปื้อนในอาหารทะเล และสิ่งแวดล้อม

นันทิรา (2544) ได้ทำการศึกษาถึงการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากทะเลสาบสงขลา จำนวนทั้งหมด 64 ตัวอย่าง จาก 13 จุดของการเก็บตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงถึง ร้อยละ 50 ของตัวอย่างน้ำที่เก็บมาทั้งหมด

ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 – 2544 เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษเป็นอันดับ 1 คิดเป็นร้อยละ 57.7, 57.1 และ 58.1 (วันทนิย์, 2545)

Bhathema และ Doctor (1995) ได้ศึกษาถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอ่าวบอมเบย์ ประเทศอินเดีย พบว่า มีการแพร่กระจายของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุดในช่วงฤดูหนาวของทุกปี และการรอดชีวิตอยู่ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในช่วงฤดูหนาวยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารไคตินที่เป็นสารป้องกันความเย็นให้กับเชื้อ *V. parahaemolyticus* อีกด้วย

จากรายงานการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในระหว่าง ปี ค.ศ.1996 – 1998 ของกระทรวงสาธารณสุข ประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีผู้ป่วยที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* 292, 568 และ 850 ราย ตามลำดับ และมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี โดยสายพันธุ์ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่พบมากที่สุดคือ สายพันธุ์ O3:K6

ในปี ค.ศ. 1997 Canada Communicable Disease Report ได้รายงานถึงการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเมือง British Columbia ประเทศแคนาดา พบว่า มีผู้ป่วยสูงถึง 43 ราย โดยผู้ป่วยทุกรายมีอาการท้องร่วง ร้อยละ 87 มีอาการปวดท้อง ร้อยละ 38 มีอาการคลื่นไส้ ร้อยละ 36 มีอาการอาเจียน ร้อยละ 33 มีอาการไข้ และร้อยละ 5 มีอาการถ่ายอุจจาระเป็นเลือด

Ghosh และ Sehgal (1998) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างที่เก็บมาจากทะเลอันดามัน ในระหว่างปี ค.ศ. 1996 – 1997 จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่ามี การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Kanagawa test สูงถึง 44 ตัวอย่าง โดยสารพิษที่ผลิตขึ้นมาสามารถถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และความรุนแรงจะเพิ่มขึ้น เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Wong และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ระบาดในประเทศไทย ได้หวั่น ที่ที่แยกจากผู้ป่วย 370 ราย ระหว่างปี ค.ศ. 1992 – 1995 พบว่าเชื้อ *V. parahemolyticus* ที่พบมีเพียงร้อยละ 4 เท่านั้นที่ให้ผลการทดสอบยูรีเอสเป็นบวก โดยสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่พบมากที่สุดคือ สายพันธุ์ O5:K15 คิดเป็นร้อยละ 18.5 สายพันธุ์ O4:K8 คิดเป็นร้อยละ 16.2 สายพันธุ์ O3:K29 คิดเป็นร้อยละ 12.5 สายพันธุ์ O1:K56 คิดเป็นร้อยละ 8.3 สายพันธุ์ O2:K3 คิดเป็นร้อยละ 6.5 และสายพันธุ์ O4:K12 คิดเป็นร้อยละ 6.0 เชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ถูกทำลายได้ง่ายด้วย Nalidixic acid, Tetracycline, Tobramycin, Cephalothin และ Gentamicin มีเพียงร้อยละ 10 เท่านั้นที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

Davies และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาทะเลที่จำหน่ายในสหภาพยุโรป พบว่า ปลาทะเลที่นำเข้ามาจากประเทศโปรตุเกสและกรีซ มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงถึงร้อยละ 35 และ 14 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่ผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนต่ำ เช่น ปลารมควัน เป็นต้น

ประเทศไทยมีอุณหภูมิอบอุ่นตลอดปี จึงมักพบการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการพบการปนเปื้อนในลูกชิ้นปลา ที่จำหน่ายในโรงเรียน การระบาดครั้งนั้น มีผู้ป่วยถึง 132 ราย และเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคท้องร่วงในผู้ป่วยโรคเอดส์ สูงถึงร้อยละ 53.3

2.4.4 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค

เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคหลายชนิด คือ Thermostable Direct Hemolysin (TDH) เป็นสารพิษหลักของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ฮีโมไลซินนี้มีคุณสมบัติทนความร้อน และสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ การทดสอบความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดคน หรือกระต่ายที่เรียกว่า Wagatsuma ถ้าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีคุณสมบัติเป็น TDH จะสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ ทำให้เกิดเป็นวงใสรอบโคโลนี เรียกว่าการให้ผลบวกต่อการทดสอบ Kanagawa phenomenon เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากอุจจาระผู้ป่วย พบว่าร้อยละ 97 ให้ผลการทดสอบ Kanagawa phenomenon เป็นบวก ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม ร้อยละ 99 ให้ผลการทดสอบ Kanagawa phenomenon เป็นลบ TDH เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติทนต่อ ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เป็นสารพิษที่ทำให้เกิดรูพรุนบนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก คลอไรด์ไอออน และแคลเซียมไอออนสามารถกระตุ้นให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น

2.4.5 อาการของโรค

ระยะฟักตัวของโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีระยะเวลาประมาณ 3-9 ชั่วโมง โดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 12-18 ชั่วโมง ภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวนประมาณ 10^6 - 10^9 เซลล์เข้าไป โดยผู้ป่วยจะมีอาการป่วยนาน 2-3 วัน

อาการของโรคที่สำคัญคือ อุจจาระเป็นน้ำเลือด และปวดท้องอย่างรุนแรง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง และอุจจาระเป็นน้ำ หรือมีมูกเลือด ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการเด่นของหัวใจผิดปกติ แต่พบอัตราการตายต่ำมาก

2.4.6 การรักษา

ผู้ป่วยที่มีการสูญเสียน้ำจากการถ่ายอุจจาระ ต้องรักษาด้วยการให้น้ำเกลือ เพื่อทดแทนน้ำที่เสียไป ส่วนยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษา ได้แก่ Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracycline และ Streptomycin เป็นต้น

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) ถูกคิดค้นขึ้นในปี ค.ศ. 1962 โดย Nakanishi และถูกปรับปรุงโดย Kobayashi และคณะ ในปี ค.ศ. 1963

อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) ใช้สำหรับการแยกเชื้อ และคัดเลือกเชื้อ *V. cholerae* และ *Vibrio* spp. สกุลอื่นๆ เช่น *V. parahaemolyticus* เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก (WHO) และสมาคมสาธารณสุขแห่งสหรัฐอเมริกา (APHA)

ในปี ค.ศ. 1969 Kamplimacher และคณะ ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS สามารถนำไปใช้ในการตรวจ และจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาได้

2.5.1 กลไกการคัดเลือกเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

ปริมาณของสารไทโอซัลเฟต และซิเตรท (Citrate) ที่มาก รวมทั้งการมีค่าความเป็นด่างที่สูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ Enterobacteriaceae อ็อกบิลด์ (Ox bile) และคลอเรต (Cholate) จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพวก Enterococci ทำให้โคโลฟอร์ม แบคทีเรียที่อาจเจริญเติบโตขึ้นมา แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ มีเพียงแบคทีเรียพวกโปรเทียส (Proteus) บางชนิดเท่านั้น ที่สามารถเจริญเติบโต เกิดเป็นโคโลนีสีเหลืองที่คล้ายกับ *Vibrio* spp. ตัวบ่งชี้ (Indicator) สองชนิดที่ใส่ลงไปคือ ไทมอลบลู (Thymol blue) และ โบรโมไทมอลบลู (Bromothymol Blue) จะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง เมื่อมีการสร้างกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้

2.5.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังต่อไปนี้

Peptone จากเคซีน (Casein) 5.0; Peptone จากเนื้อสัตว์ 5.0; Yeast extract 5.0; Sodium citrate 10.0; Sodium thiosulfate 10.0; Oxbile 5.0; Sodium cholate 3.0; Sucrose 20.0; Sodium chloride 10.0; Iron (III) citrate 1.0; Thymol blue 0.04; Bromothymol blue 0.04; Agar 15 ปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.6 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต้มให้เดือด (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันสูง) เทใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ รอให้เย็น อาหารแข็งที่ได้จะมีลักษณะใส และมีสีน้ำตาลเงินแกมเขียว

2.5.3 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

ถ่ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนผิวหน้าของอาหารแข็งอย่างสม่ำเสมอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะการเจริญเติบโตตามตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

ลักษณะปรากฏของโคโลนี	ชนิดของแบคทีเรีย
โคโลนีแบน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สีเหลือง	<i>Vibrio cholerae</i>
โคโลนีขนาดเล็ก ศูนย์กลางของโคโลนี มีสีน้ำตาลเงินแกมเขียว	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
โคโลนีขนาดใหญ่สีเหลือง	<i>Vibrio alginolyticus</i>
โคโลนีสีน้ำตาลเงิน	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp. และอื่นๆ
โคโลนีมีขนาดเล็กมาก โปร่งแสง	Enterobacteriaceae และอื่นๆ

ตารางที่ 2.5 แสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

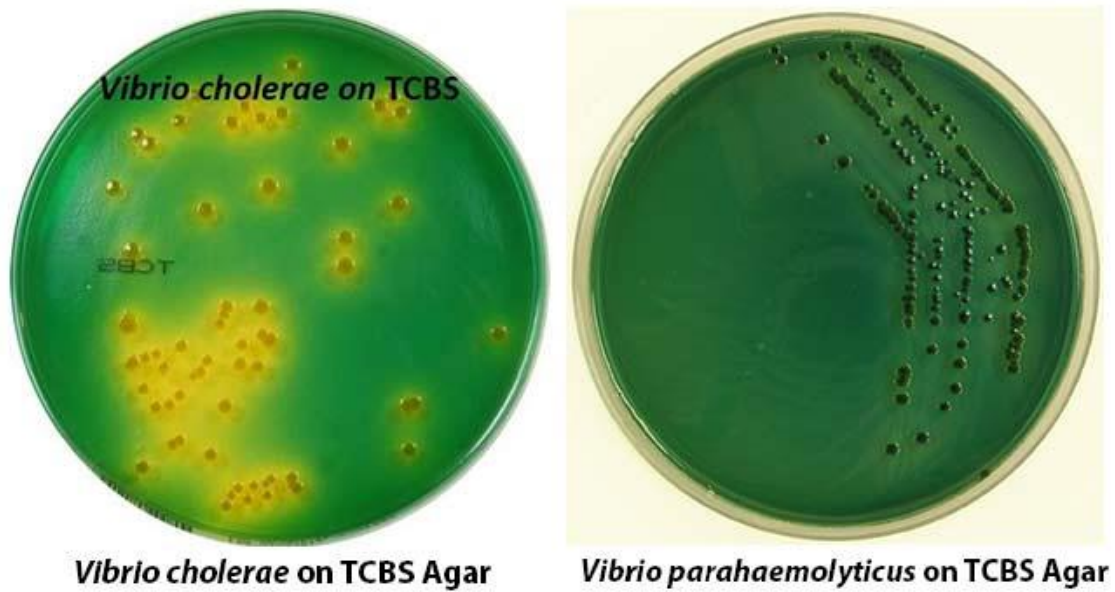
เชื้อจุลินทรีย์	การเจริญเติบโต	การเปลี่ยนแปลงของสี
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ดี	สีเหลือง
<i>Vibrio cholera</i> Inaba	ดี	สีเหลือง
<i>Vibrio cholerae</i> Ogawa	ดี	สีเหลือง
<i>Vibrio cholera</i> eltor Inaba	ดี	สีเหลือง
<i>Vibrio cholera</i> eltor Ogawa	ดี	สีเหลือง
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	ดี	สีน้ำตาลเงิน

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ไม่เจริญเติบโต	
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	ไม่เจริญเติบโต/เจริญเติบโต ได้ไม่ดี	สีเหลือง
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14273	ไม่เจริญเติบโต/เจริญเติบโต ได้น้อยมากๆ	สีน้ำตาลใส
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ไม่เจริญเติบโต/เจริญเติบโต ได้ปานกลาง	สีน้ำตาล

2.6 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio* spp. ในอาหาร

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio* spp. ในอาหาร ทำได้ดังนี้

- ก. ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม ใส่ในบัฟเฟอร์ปริมาตร 450 มิลลิลิตร (บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio* spp. ในตัวอย่างอาหารคือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 3 หรือ PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.2 – 7.5 ทำให้เจือจาง 10 เท่าในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน
- ข. นำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline Peptone Water หรือ Alkaline Peptone Salt Broth ที่ประกอบด้วย เปปโตน 10 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 8.5 จำนวน 3 หลอด (Multiple Dilution MPN) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง
- ค. เชื้อเชื้อในหลอดที่ให้ผลบวกไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง
- ง. ตรวจสอบโคโลนีที่มีสีเขียวหรือสีเขียวกม่น้ำเงิน (sucrose-negative) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร
- จ. นำโคโลนีที่ได้ตามข้อ ง. ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง Tryptone salt ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 หรือ Tryptic Soy agar ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.5 พร้อมทั้งถ่ายเชื้อลงในอาหารแข็ง Gelatin Salt agar โดยใช้โคโลนีเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 12 – 24 ชั่วโมง

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

รูปที่ 2.3 เชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์ต่างๆบนอาหารแข็ง TCBS

2.7 วิธีการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม

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

อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่ใช้กัน โรงงานส่วนใหญ่กล่าวว่าวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แต่ยังไม่ปรากฏข้อเสียบางประการ วิธีการเหล่านี้ต้องการเงินลงทุนสำหรับอุปกรณ์จำนวนมากและจำเป็นต้องใช้การยืนยันในขั้นตอนสุดท้ายด้วยอาหารแข็งตามวิธีแบบดั้งเดิมเพื่อให้อาหารได้รับการยอมรับตามมาตรฐาน นอกจากนี้นักวิจัยที่ทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญเป็นอย่างมาก เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์มีความไวสูง โดยเฉพาะเรื่องความสะอาด (Mandal et al., 2011).

วิธีการตรวจสอบแบบดั้งเดิมในมุมมองของอุตสาหกรรมอาหารควรจะถูกปรับปรุงและพัฒนาพร้อมกับวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งจะนำไปสู่ค่าใช้จ่ายที่ลดลง นอกจากนี้การวิเคราะห์ในระดับไมโครจะถูกนำมาใช้ในการลดปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และได้รับการยอมรับจากมาตรฐานอาหารในขั้นตอนสุดท้าย

2.7.1 Media in conventional methods

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

ตารางที่ 2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แนะนำ

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

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

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

2.7.2 สารสำหรับคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

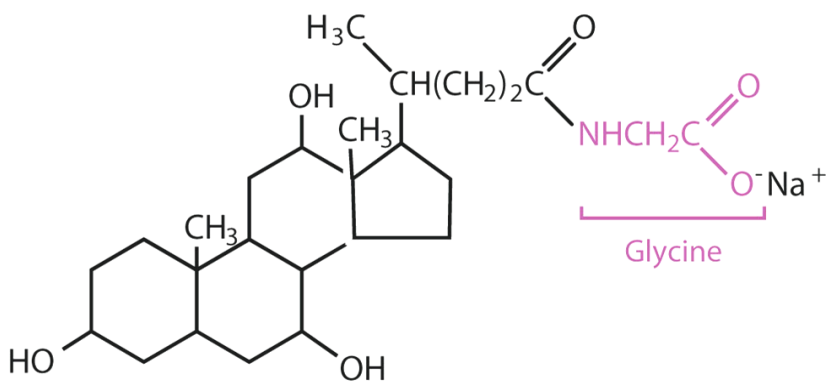
สารคัดเลือกเชื้อในทางจุลชีววิทยาถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ระบบคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ถูกนำมาใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมตรงข้ามกับแบคทีเรียที่ต้องการคัดเลือกจะถูกยับยั้งด้วยสารคัดเลือก อาหารที่คัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามที่อธิบายไว้ข้างต้นมี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

- Bile salt และ oxbile

สาร bile salts ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยส่วนมากจะถูกนำมาใช้เป็นสารคัดเลือกเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยการทำลายผนังเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบสามารถทนต่อการกระทำ

ดังกล่าวได้ (Entis, 2002) แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด (*E. coli*, *V. cholerae* และ *Campylobacter jejuni*) สามารถกำจัดสาร bile salts จากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Thanassi et al., 1997; Lin et al., 2003; Chatterjee et al., 2004)

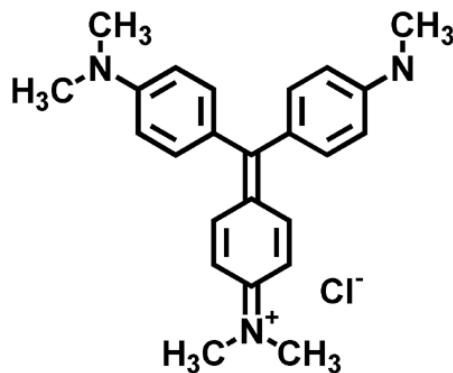
King และ Metzger (1968) รายงานว่า *E. coli* และ *Proteus mirabilis* สามารถยับยั้ง bile salts ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ได้ทั้งหมด และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Citrobacter* สามารถยับยั้ง bile salts ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เชื้อ *E. coli* จะถูกแยกออกมาจากถุงน้ำดีและน้ำดีของสัตว์และมนุษย์ (Onyekaba และ Njoku,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



รูปที่ 2.4 โครงสร้าง Bile salt (sodium glycochol) (ที่มา: Ball et al., 2013)

- Methyl violet

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

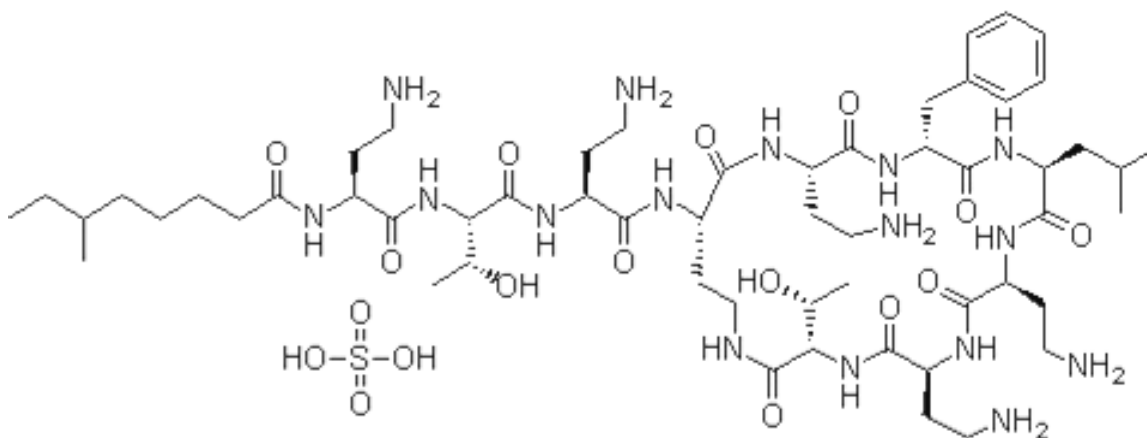


รูปที่ 2.5 โครงสร้าง Methyl violet (ที่มา: Frick, 2009)

- Polymyxin B sulfate

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

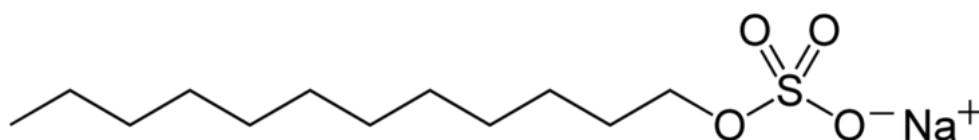
การรวมกันของสาร polymyxin B sulfate กับยาชนิดอื่นถูกค้นพบว่าเกิดผลกระทบกับแบคทีเรียก่อโรคร้ายมาก (Evans et al., 1999) สาร Polymyxin ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Vibrio* spp. และใช้เป็นสารในการคัดเลือกเชื้อจากอาหารทะเล (Oliver et al., 1992) การใช้สาร polymyxin ถูกแนะนำให้ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อ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



รูปที่ 2.6 โครงสร้าง Polymyxin B sulfate (ที่มา: Anonymous, 2009)

- Sodium lauryl sulfate (teepol)

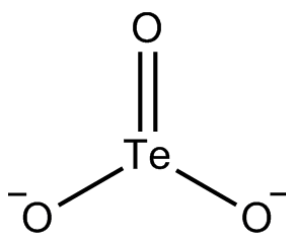
สาร Sodium Lauryl Sulfate มักเรียกชื่อในทางการค้าว่า teepol เป็นสารลดแรงตึงผิว แม้ว่าสารนี้จะใช้เป็นสารสำหรับทำความสะอาด แต่ยังคงถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อ Chun et al. (1974) เป็นคนแรกที่ใช้ teepol ในการพัฒนาการพิจารณาเชื้อ *V. parahaemolyticus*



รูปที่ 2.7 โครงสร้าง Sodium lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate) (ที่มา: Mills, 2013)

- Tellurite

สาร Tellurite (TeO_3^{2-}) เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียอย่างมาก เนื่องจากมีอำนาจในการเกิดปฏิกิริยา oxidation อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถต่อต้านสารดังกล่าวได้ แบคทีเรียก่อโรคจำนวนมากสามารถอยู่รอดจากสารนี้ได้โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง cellular thiols เช่น glutathione, หรือ methyltransferase-catalyzed reaction (Taylor, 1999).



รูปที่ 2.8 โครงสร้าง Tellurite (ที่มา: Wells, 2013)

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar™ *Vibrio* (Hara-Kura et al., 2001)

อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยสารตั้งต้น (Substrates) ที่จำเพาะต่อเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (Beta-galactosidase) ที่ *V. parahaemolyticus* ผลิตขึ้นมา ทำให้เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีลักษณะแตกต่างไปจากแบคทีเรียชนิดอื่น ลักษณะของโคโลนีของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar™ *Vibrio* แสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ลักษณะของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar™ *Vibrio*

แบคทีเรีย	CHROMagar		TCBS	
	ขนาดของโคโลนี (มิลลิเมตร)	สีของโคโลนี	ขนาดของโคโลนี (มิลลิเมตร)	สีของโคโลนี
<i>Citrobacter freundii</i>	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Edwardsiella tarda</i>	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Photobacterium damsela</i>	ไม่เจริญ		ไม่เจริญ	
<i>Proteus mirabilis</i>	เล็กมาก	สีขาวขุ่น	เล็กมาก	สีน้ำเงินเขียว
<i>Providencia rettgeri</i>	1	สีขาวขุ่น	เล็กมาก	สีน้ำเงินเขียว
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ไม่เจริญ			
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ไม่เจริญ			
<i>Serratia marcescens</i>	ไม่เจริญ			
<i>Shigella sonnei</i>	ไม่เจริญ			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5-6	สีขาวขุ่น	3-4	สีเหลือง
<i>Vibrio cholera</i> O1	3	สีน้ำเงินอ่อน	3	สีเหลือง
<i>Vibrio hollisae</i>	4	สีขาวขุ่น	3	สีเขียว
<i>Vibrio mimicus</i>	3-4	สีน้ำเงินอ่อน	1-2	สีเขียว
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3-5	สีม่วง	2-4	สีเขียว
<i>Vibrio vulnificus</i>	5	สีน้ำเงินอ่อน	1	สีเขียว

2.9 การตรวจทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

การตรวจทดสอบทางชีวเคมี แสดงในตารางที่ 2.8 และ 2.9

ตารางที่ 2.8 การทดสอบทางชีวเคมีขั้นต้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร (Mac, 2000)

การทดสอบ	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	ลักษณะปรากฏ
ออกซิเดส	ผลบวก	สีน้ำเงินเข้ม (ภายใน 2 นาที)
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่เป็นวงกลม
AGS	K/A	Akaline (สีม่วง) Slant และ acid (สีเหลือง) butt
ความอ่อนไหวต่อ O/129		
Vibriostant		
10 มิลลิกรัม	ทนทาน	เจริญเติบโต
150 มิลลิกรัม	อ่อนไหว	ยับยั้ง
ONPG discs	ผลลบ	ไม่เปลี่ยนแปลง
แกรม	แกรมลบ	สีแดง รูปท่อน

หมายเหตุ AGS = Arginine – glucose slant

TSI = Triple sugar iron slant

O/129 = 2,4-Diamino-6,7-diisopropyl pteridine disks

ONPG = O-nitrophenyl- β -D-galactosidase

ตารางที่ 2.9 ลักษณะที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร (Mac, 2000)

การทดสอบ	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น
สัณฐานวิทยา	แกรมลบ รูปท่อน
Indophenol oxidase	ผลบวก

ลักษณะปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI	Akaline Slant/Acid Butt, ไม้สรีรังสี 1 ซ ไฮโดรเจนซัลไฟด์
Hugh-Leifson	หมักน้ำตาลกลูโคส
Cytochrome oxidase	ผลบวก
Arginine dihydrolase	ผลลบ
Ornithin decarboxylase	ผลบวก
Lysine decarboxylase	ผลบวก
Voges-Proskauer	ผลลบ
Halophilism	ปราศจาก NaCl-ผลลบ; NaCl ร้อยละ 3, 6 และ 8 – ผลบวก; NaCl ร้อยละ 10 – ผลลบ หรือเจริญเติบโตไม่ได้
การหมักน้ำตาลซูโครส	ผลลบ
O-nitrophenyl- β -D-galactosidase	ผลลบ
การหมักน้ำตาลอะราบิโนส	ปกติให้ผลบวก
ความอ่อนไหวต่อ O/129	10 ไมโครกรัม – ทนทาน; 150 ไมโครกรัม – อ่อนไหว;
การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	ผลบวก

2.10 ปัญหาโรคลูกตายนด่วน (Early Mortality Syndrome: EMS)

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

ในต้นปี พ.ศ. 2556 พบว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนี้คือแบคทีเรียในกลุ่ม วิกิริโอ พาราฮีโมไลติกัส (*Vibrio parahaemolyticus*) ในขณะที่ถึงแม้จะทราบสาเหตุของโรค แต่การควบคุมและป้องกันแบคทีเรียนี้ เป็นไปได้ยาก เนื่องจากยังขาดวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคที่มีความจำเพาะและรวดเร็ว ที่สามารถจะนำไปใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคในพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ และคัดกรองลูกกุ้งก่อนปล่อยลงบ่อคนได้ ผู้เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมนี้ทุกภาคส่วน ได้พยายามแก้ปัญหา ตั้งแต่กระบวนการผลิตลูกกุ้ง รวมทั้งมี การตรวจเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด EMS ตั้งแต่ลูกกุ้ง ก่อนนำไปเลี้ยงในบ่อคน รวมทั้งการจัดการ คุณภาพน้ำ และหลากหลายวิธีตามความเหมาะสม แต่ก็ยังไม่สามารถนำไปปฏิบัติได้ผลสม่ำเสมอ ไม่ใช่วิธีตายตัว ที่บอกได้ว่า ทำแบบนี้แล้วจะประสบความสำเร็จ เพราะบางที่เลี้ยงรอบนี้ได้ผลดี เลี้ยงรอบหน้ากลับไม่ได้ผลผลิตดี เช่นเดิม ทั้งนี้ว่าวิธีการเลี้ยงและการจัดการเช่นเดิมมาใช้ บางฟาร์มเลี้ยงกุ้งแล้วได้ผลผลิตดี บางฟาร์มนำไปใช้ กลับไม่ได้ผล ทั้งนี้อาจเพราะคุณภาพของลูกกุ้งในแต่ละรอบการเลี้ยงแตกต่างกัน จากปัญหาต่าง ๆ นั้น แม้ว่าจะมีการนำเสนอแนวทางการเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ หลากรูปแบบ แต่ละรูปแบบมีความเหมาะสมกับลักษณะภูมิประเทศแล้ว แต่ก็ต้องยอมรับว่าในขณะนี้ การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมี ข้อจำกัดที่คุณภาพของลูกกุ้ง และความไม่สม่ำเสมอของคุณภาพลูกกุ้ง ที่บางครั้งโตดี มีภูมิคุ้มกัน บางครั้งโตดี แต่ไม่มีภูมิคุ้มกัน ตายง่าย หรือโตช้าแต่ทนทาน รวมทั้งโตช้าแต่ยังเป็น EMS อีกด้วย ลักษณะอาการของโรค โรค EMS มักเกิดโรครภายใน 20 - 30 วันหลังการปล่อยลูกกุ้งลงบ่อ ในช่วงแรกกุ้งในบ่อไม่แสดงอาการ ผิดปกติอย่างเด่นชัด แต่จะเริ่มพบกุ้งตายในบ่อและตายที่ก้นบ่อ หลังจากนั้นจะพบซากกุ้งลอยขึ้นมา กุ้งทยอยตายและอาจมีการตายสูงถึง 100% ภายในเวลาประมาณ 30 วัน ในบ่อที่มีการตายมากพบกุ้งมีอาการว่ายน้ำ เฉื่อย เชื่องซึม กินอาหารลดลง เปลือกนูนและมีสีเข้มขึ้น ตับสีบ นิม ซีดหรือสีคล้ำ ปัจจุบันพบว่าโรค EMS ที่เกิด ในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวมีลักษณะพยาธิสภาพของโรค EMS ที่เหมือนกัน โดยตัวอย่างกุ้งที่เก็บมาศึกษาทาง เนื้อเยื่อ แสดงให้เห็นความผิดปกติที่ บริเวณตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เริ่มจาก epithelial cell ของ ตับและตับอ่อนถูกทำลาย การสะสมของไขมันในตับอ่อนลดลงทั้งในรูปแบบของ fat storage cell vesicle และ oil droplet รวมทั้งมีการทำงานที่ลดลงของเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งสาร ในกุ้งที่มีอาการรุนแรงมากพบว่า ไขมัน เซลล์ ของตับและตับอ่อน และเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งสารถูกทำลายมากขึ้นและหลุดช่องของท่อตับ ในระยะท้ายของโรคจะมีการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection) อย่างรุนแรงโดยเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งในที่สุดกุ้ง ที่ติดเชื้อจะตายจากการที่ตับและตับอ่อนไม่สามารถทำงานได้ และการติดเชื้อแบคทีเรียวิกิริโอในช่วงท้ายของโรค ซึ่งพบว่าพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนที่ถูกทำลายน่าจะเกิดจากสารพิษ โดยพบลักษณะที่คล้ายคลึง

กับในกึ่งที่ ได้รับ aflatoxin B1 และ benomyl จึงได้มีการศึกษาการติดเชื้อโดยใช้อาหารสำเร็จรูปที่เก็บจาก ฟาร์มกึ่งที่พบ โรค รวมทั้งยาและสารเคมีที่ใช้กันมากในพื้นที่ที่เกิดโรคเพื่อฆ่าพาหะของโรคตัวแดงดวงขาว ในการเตรียมบ่อก่อน ลงลูกกึ่ง อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรค EMS ได้ใน ห้องปฏิบัติการ จึงยังไม่ สามารถยืนยันสาเหตุของโรคนี้อตามลำดับ แนวทางการป้องกันโรค EMS อย่างที่ ทราบกันดีว่าโรค EMS ไม่มียารักษาใดๆ สามารถรักษาโรคนี้อได้ ทำได้เพียงป้องกันให้ดีที่สุด เท่านั้น เพื่อลด ความเสี่ยงของการเกิดโรคนี้อ มาดูแนวทางการป้องกันโรค EMS ดังนี้

1. เตรียมบ่อให้ดีก่อนลงเลี้ยงกึ่ง เดิมคลอรีน เพื่อฆ่าเชื้อในบ่อทิ้งไว้ประมาณ 20 วันขึ้นไป จึงค่อยปล่อยน้ำ ออกจากบ่อเลี้ยง จากนั้นทำการล้างบ่อ กำจัดสารอินทรีย์ก้นบ่อ และตากบ่อให้แห้งทิ้งไว้ประมาณ 1 - 1.5 เดือน แล้วจึงเอาน้ำเข้าสู่บ่อเลี้ยง และ เดิมคลอรีนในน้ำก่อนลงเลี้ยง
2. คัดเลือกลูกกึ่งที่สุขภาพดี แข็งแรง มาจากแหล่งผลิตลูกกึ่งที่เชื่อถือได้ ลูกกึ่งที่นำมาปล่อยต้องผ่านการ ตรวจสอบตัว และเซลล์ไขมันก่อน ตัวต้องมีความสมบูรณ์ มีเม็ดไขมันมาก และตรวจไม่พบแบคทีเรียใน ตัว
3. ทดสอบความแข็งแรง จากการใช้น้ำความเค็มเป็นศูนย์ หรือน้ำจืด ถ้ามีกึ่งตายมากกว่า 10% ในเวลา 30 นาที ถือว่าไม่ผ่าน
4. ลงกึ่งไม่หนาแน่นจนเกินไป เพราะจะทำให้ควบคุมและจัดการบ่อได้ยาก เป็นเหตุให้กึ่งเกิด ความเครียด อ่อนแอ และเกิดโรคได้ง่าย
5. ควรมีการจัดการอาหารที่ดี ใช้อาหารที่มีคุณภาพดี และไม่ควรรให้อาหารปริมาณมากเกินไป
6. ควบคุมคุณภาพน้ำให้ดีเสมอและควบคุมอุณหภูมิของน้ำไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน พร้อมทั้ง ดูแลพื้นบ่อไม่ให้เกิดการเน่าเสีย
7. กรณีเกิดโรคหรือมีอาการที่น่าสงสัย ควรรีบส่งตัวอย่างกึ่งให้หน่วยงานของกรมประมงตรวจวินิจฉัย เพื่อ ป้องกันและแก้ไขปัญหาได้ทันท่วงที หากเป็นโรคต้องทำการฆ่าเชื้อกึ่งและน้ำในบ่อ โดยใส่คลอรีน เพื่อฆ่า เชื้อ ทิ้งไว้อย่างน้อย 14 วัน ก่อนปล่อยน้ำทิ้งออกสู่แหล่งน้ำภายนอก เพื่อควบคุมการแพร่กระจายของโรคไป ยังพื้นที่อื่น

2.11 แหล่งที่มา

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

2.12 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิค (PCR)

โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลสามารถทำได้โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อชนิดคัดเลือก (selective media) Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar และยืนยันผลด้วยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีหลายชนิด ซึ่งการทดสอบหรือแยกชนิดแบคทีเรียชนิดนี้ต้องใช้ระยะเวลา 3-5 วัน ในการทำปฏิกิริยาชีวเคมีและการรายงานผล (ISO/TS 21872) อย่างไรก็ตามนอกจาก *V. parahaemolyticus* ยังมีแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาที่คล้ายกัน จึงทำให้การตรวจสอบด้วยวิธีการดังกล่าวมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดได้ ในปัจจุบันจึงมีความสนใจหาวิธีการแก้ไขข้อผิดพลาดนี้โดยการนำวิธีทางด้านอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจสอบ โดยเฉพาะการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและมีความจำเพาะสูง ซึ่งยืนยันเป้าหมายที่นำมาใช้ตรวจและบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ ได้แก่ *toxR* (นาร์หัสการสร้าง transmembrane regulatory protein) (Kim et al., 1999) และ *tl* (thermolabile hemolysin gene) สำหรับยืนยันซึ่งความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้ยีน *tdh* (thermostable direct hemolysin gene) (Bej et al., 1999) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* กำหนดให้สร้าง thermostable direct hemolysin (TDH) เป็นโปรตีนก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxic) เกิดภาวะเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น เกิดภาวะเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร (enterotoxicity) และสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) (Humada et al., 2007) และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ O3:K6 เป็นสาเหตุการเกิดโรคจากการรับประทานอาหารทะเล ซึ่ง

เคยพบการระบาดไปทั่วโลกในปี พ.ศ. 2516-2541 เป็นสายพันธุ์ที่มียีน *tdh+* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วย (Okuda et al., 1997) แต่อย่างไรก็ตามด้วยเทคนิค PCR มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาแพง บางชิ้นส่วนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจระดับหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ดังนั้น โรงงานอุตสาหกรรมขนาดกลางหรือเล็กอาจไม่สามารถดำเนินการดังกล่าวได้

2.13 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับ *V. parahaemolyticus*

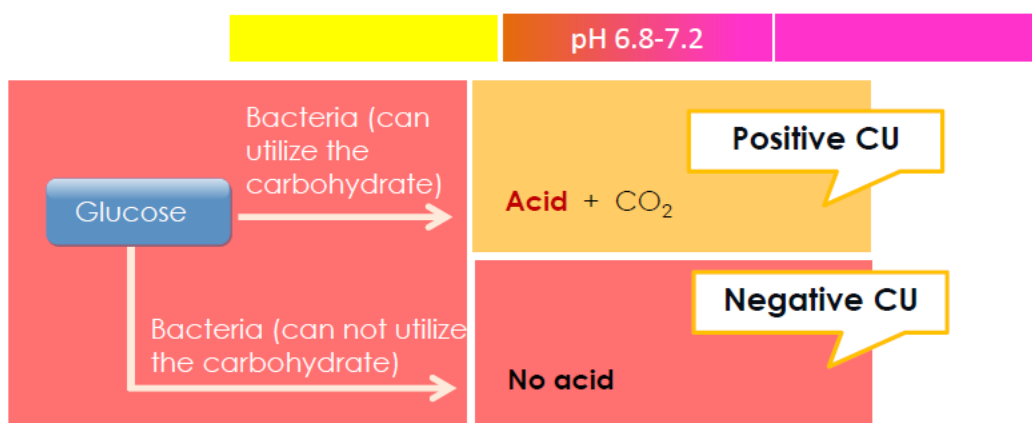
ในปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ยังคงเป็นวิธีการวิเคราะห์แบบ conventional method ที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปลงในอาหาร selective agar เพื่อคัดแยกโคโลนิของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งโคโลนิที่เป็น *V. parahemolyticus* จะมีสีเขียว ในการวิเคราะห์ผลเบื้องต้นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 วัน ทำให้ไม่สามารถแก้ปัญหาเชื้อที่มีโอกาสปนเปื้อนที่จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และสินค้าอาจถูกตีกลับเนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว ทำให้ต้องทำลายสินค้า lot ดังกล่าว เกิดการสูญเสียรายได้มูลค่าหลายล้านบาท ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ที่เป็นการใช้วิธีทางด้านอณูพันธุศาสตร์ (PCR) มาใช้ในการตรวจสอบ แต่เทคโนโลยีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องมืออุปกรณ์ที่มีความเฉพาะทาง และผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญระดับหนึ่ง อีกทั้งอุตสาหกรรมในประเทศไทยในระดับกลางและเล็ก ตลอดจน SME อาจจะยังไม่สามารถที่จะมีเครื่องมือดังกล่าวได้ ดังนั้นผู้วิจัยนำเสนอวิธีการวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในรูปแบบใหม่ โดยเป็นการพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่มีการใช้อาหารเหลวจำเพาะเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเบื้องต้น ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น *Salmonella* spp. มีสูตรอาหารเหลวจำเพาะหลากหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกซัลโมเนลลาที่ดิซันและยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลา อาหารดังกล่าวแยกตัวอย่างแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่มหลัก ตามบทบาทของสารยับยั้ง (inhibitor) ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง คือกลุ่มที่มีสารยับยั้งคือ Malachite green และ $MgCl_2$ ตัวอย่างเช่น อาหาร RappaportVassiliadis soy broth (RVS) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มี Selenite เป็นสารยับยั้ง เช่น selenite cystine broth (SC) และ MüllerKauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTTn) (Taskilaet et al., 2012) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความจำเพาะและถูกต้องมากขึ้น แต่ยังคงกลุ่มสารยับยั้งหลักๆ ไว้ในสูตร อย่างไรก็ตาม

ตามหลังจากบ่มในอาหารดังกล่าวแล้วจะต้องนำตัวอย่างไปเขียนบนอาหารแข็งจำเพาะ เพื่ออ่านผลการทดสอบในอีก 1 วันถัดมา ดังนั้นในการพัฒนาอาหารในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยอาศัยการวัดการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีนั่นๆ โดยวัดออกมาเป็นค่าต่างๆ อาทิเช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความขุ่น ค่าสี เป็นต้น (Shelef และ Firstenberg-Eden, 1997)

จากแนวคิดการใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปฏิกิริยาหนึ่งที่สำคัญและปรากฏอยู่ใน 9th edition of the Manual of Clinical Microbiology สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเพื่อการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ โดยรายละเอียดในแต่ละปฏิกิริยาแสดงดังต่อไปนี้

2.13.1 ปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล (sugar fermentation)

เป็นปฏิกิริยาการตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการหมักย่อย (ferment) น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลแลคโตส (lactose), ซูโครส (sucrose), กลูโคส (glucose) และน้ำตาลอื่นๆ ลักษณะของปฏิกิริยาดังกล่าวแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลส่งผลให้เกิด by product ที่ทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรด (positive) อาหารเหลวที่มีพีเอชอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนสีจากพีเอชเป็นกลางประมาณ 6.8 – 7.2 เป็นพีเอชกรดประมาณ 5 – 6 สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล อาหารจะไม่มีสภาพเป็นกรด (negative) สีของอาหารจะคงเดิมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลยังใช้ในการแยกเชื้อแกรมบวกแกรมลบ enteric pathogens

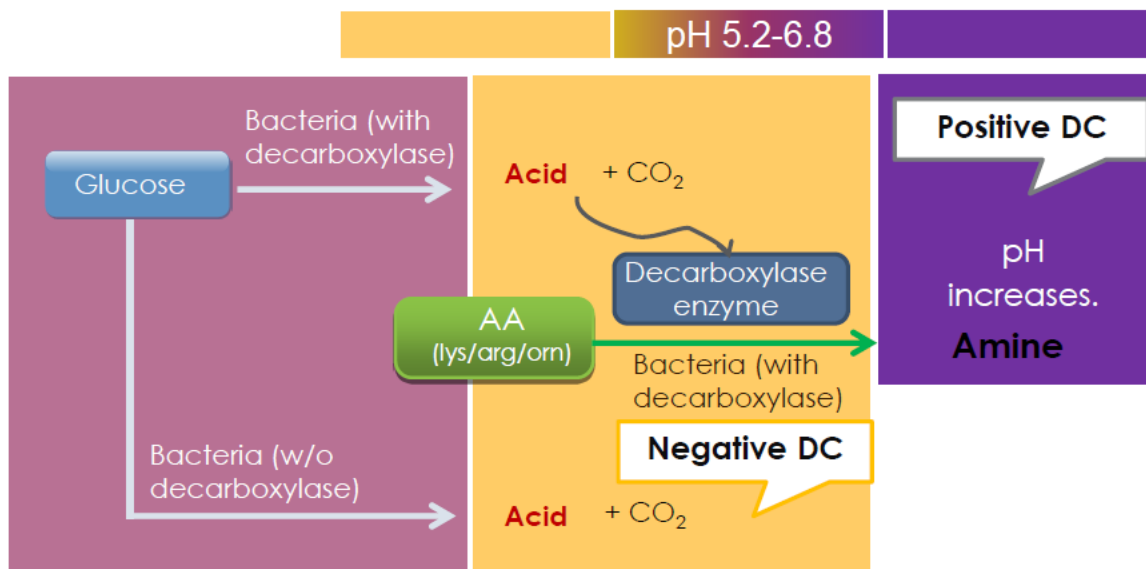


รูปที่ 2.9 กลไก (mechanism) ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล (fermentation)

ทั้งนี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถใช้น้ำตาลเด็ซโทรส อะราบิโนส แมนโนส แมนนิทอล น้ำตาลดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นอาหารเหลวจำเพาะเพื่อการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ การใช้ น้ำตาลที่ให้ผลบวกหลากหลายชนิดจะช่วยเพิ่มความถูกต้องในการวิเคราะห์

2.13.2 ปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโน (amino acid decarboxylation)

ปฏิกริยานี้จะเกิดกับแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะสามารถใช้กรดอะมิโน เช่น ไลซีน ออร์นิตินและอาร์จินินเพื่อการเจริญเติบโต โดยในอาหารเหลวของการเกิดปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนมีส่วนประกอบของ เด็ซโทรส เปปโตนและฟิเอซอินดิเคเตอร์ กลไกการเกิดปฏิกริยาแสดงดังรูปที่ 2.10

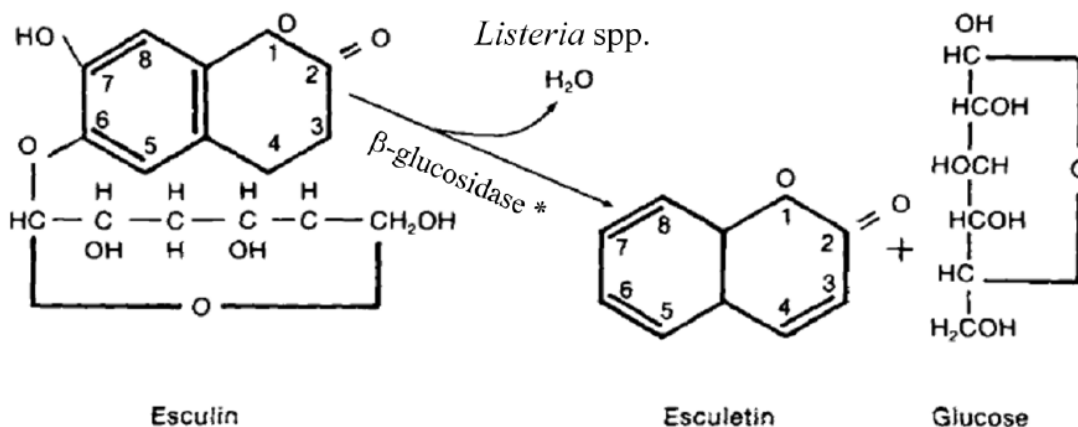


รูปที่ 2.10 กลไก (mechanism) ของการเกิดปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโน (amino acid decarboxylation)

โดยขั้นตอนของการเกิดปฏิกริยา แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสจะใช้น้ำตาลเด็ซโทรสในอาหารเหลวก่อน ส่งผลให้มี by product ที่ทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรดพิเศษของอาหารลดลง ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวจะเร่งการเกิดปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโน จากนั้นแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนที่มีอยู่ในอาหารต่อไปส่งผลให้พิเศษของอาหารสูงขึ้น อาหารเหลวจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีเห็นได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะใช้กรดอะมิโนไลซีนและออร์นิตินได้ดี

2.13.3 ปฏิกริยาการใช้ Esculin hydrolysis

ส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ก็คือปฏิกิริยาการใช้ esculin โดยปฏิกิริยาเกิดจากอาหารเหลวจำเพาะที่มีส่วนประกอบของ esculin, ferric ammonium citrate, peptone ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของอาหารเหลวจำเพาะจากสีของอาหารเหลืองใสเป็นสีดำ เกิดจากการที่แบคทีเรียที่สามารถใช้ esculin ไปเป็น β -D-6, 7- dihydroxycoumarin (esculetin) และ glucose จากนั้น esculetin ทำปฏิกิริยากับ ferric ions ในอาหารเหลวจำเพาะเป็นผลให้เกิดเป็นสีดำ (van Netten, Perales, van de Moosdijk, Curtis, and Mossel, 1989) ดังแสดงการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีในรูปที่ 2.11

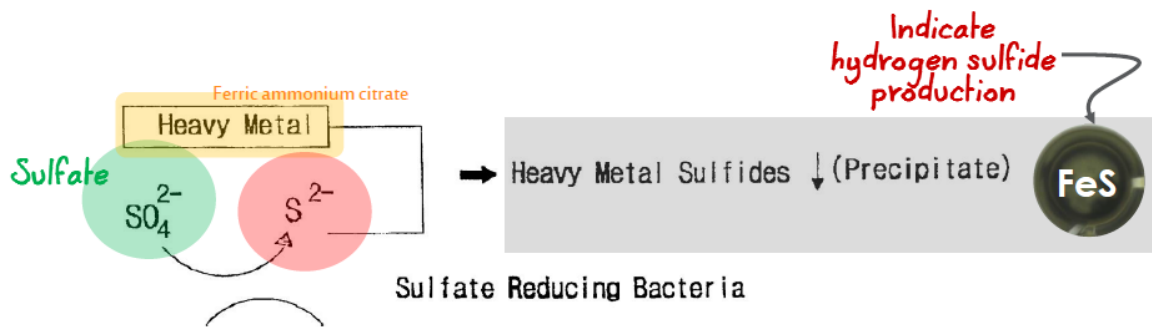


รูปที่ 2.11 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีการใช้ esculin ด้วยเอนไซม์ β -glucosidase ที่อยู่ในแบคทีเรีย

โดยปฏิกิริยานี้เกิดจากการเปลี่ยน esculin เป็น esculetin โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase ทำให้อาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์ ferric ammonium citrate เปลี่ยนสี การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม ดังเช่นจากการวิจัยของ Shelefet et al., (1998) ได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ ไลซีน อาร์จินีน และฮิสทีน ของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียอื่นๆ ในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยอาศัยเครื่อง BioSys สำหรับวัดค่า Transmittance ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร โดยพบว่าสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงค่า Transmittance

2.13.4 ปฏิกริยาการใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์

แบคทีเรียที่เรียกกลุ่มที่สามารถเกิดปฏิกริยาการใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แบคทีเรียดังกล่าวจะรีดิวซ์ซัลเฟตเป็นซัลไฟด์ จากนั้นซัลไฟด์จะจับกับโลหะหนักเพื่อฟอร์มเป็นโลหะซัลไฟด์ที่ไม่ละลายดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 2.12 ทั้งนี้ปฏิกริยาการใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นปฏิกริยาที่เชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. สามารถใช้ปฏิกริยาดังกล่าวได้ ตัวอย่างที่ให้ผล positive กับปฏิกริยาดังกล่าวสามารถบ่งบอกได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อกลุ่ม *Salmonella*



รูปที่ 2.12 ปฏิกริยาการรีดักชันของไฮโอซัลเฟตและการบ่งชี้การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์

ท่ามกลางแหล่งของซัลเฟตที่หลากหลายและอินดิเคเตอร์ที่ใช้ สารสับเสตรทไฮโอซัลเฟตกับเพอริกแอมโมเนียมซิติเรทเป็นสารส่วนใหญ่ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการใช้ในการแยก

2.14 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Miyamoto, Harufumi และ Shoji (1990) ได้พัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร โดยวิธีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorogenic assay) โดยตรวจสอบการทำปฏิกริยาของเอนไซม์ Trypsin like จากเชื้อ *V. parahaemolyticus* กับสาร Benzoyl-L-Arginine-7-Aminomethyl-Coumarin พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficients) เท่ากับ 0.95

Lee และคณะ (1992) ได้ศึกษาถึงการใช้องลิโนนิวคลีโอไทด์โพรบในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรม โดยการใช้ oligonucleotide probe ที่มีลำดับเบส 5'-GCTAAGTTTGTTGGAAGATGAAGG-3' ที่สังเคราะห์มาจาก 1,275 คู่เบส ของ Thermostable Direct

Hemolysin (*tdh*) gene ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ถูกติดฉลากด้วย ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP โดยวิธี 5' End Labeling พบว่า Oligonucleotide Probe ที่สร้างขึ้นมา มีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* 89 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 95 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และไม่มีมีความจำเพาะกับเชื้อ *Vibrio* spp. และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

Hagen และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Enrichment Broths สองชนิด สำหรับเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Salt-polymyxin B Broth และ Alkaline Peptone Water สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปู หอยนางรม กุ้ง กุ้งก้ามกรามและหูลดาม พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline Peptone Water มีประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่บาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปอาหารให้กลับคืนสู่สภาพปกติได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Salt-Polymyxin B Broth

Chang และคณะ (1994) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารด้วยวิธี Latex Agglutination Test ที่จำเพาะต่อ Outer Membrane Protein ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 และ 34,000 ดาลตัน พบว่าให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบสูง และให้ผลการวิเคราะห์ ภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว

Kaysner และคณะ (1994) ได้พัฒนาวิธีการตรวจนับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ให้สามารถแยกความแตกต่างออกจากเชื้อ *V. vulnificus* ได้ ด้วยวิธี DNA-DNA Colony Hybridization ที่จำเพาะกับยีนส์ *tdh* ที่แยกมาด้วยวิธี Hydrophobic Grid Membrane Filtration Technique พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการตรวจนับ และให้ผลการตรวจสอบภายใน 18 ชั่วโมง

Chen และ Tsung (1992) ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่รวดเร็วโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ที่จำเพาะต่อ Outer – Membrane Proteins สองชนิดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน และ 34,000 ดาลตัน ตามลำดับ พบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สูง สามารถตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีอยู่ในอาหารปริมาณต่างๆได้ และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 24 ชั่วโมง น้อยกว่าการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานที่ใช้เวลา 4-6 วัน

Yok และคณะ (1995) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพิษ Thermostable Direct Hemolysin (TDH) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) หรือวิธี Bead-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Bead-ELISA) ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้อย่างแพร่หลายใน

ประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีประสิทธิภาพสูง โดยปริมาณสารพิษที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Hui และ Chang (1996) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี Indirect Immunofluorescence Microscopy โดยการใช้อินดิบอดี ที่จำเพาะต่อ Outer Membrane Proteins ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีมวลโมเลกุล 34 และ 36 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Isothiocyanate-Conjugate Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin G พบว่ามีประสิทธิภาพสูง และสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ขั้นยืนยัน โดยให้ผลที่แน่นอน ภายใน 24 ชั่วโมง

Kim และคณะ (1999) ได้พัฒนาวิธีการตรวจนับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี DNA Colony Hybridization Test โดยการใช้ *tox R Gene* เป็น Polynucleotide Probe เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธีนี้ให้ผลบวกต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* 373 สายพันธุ์

Gooch และคณะ (2001) ได้พัฒนาการตรวจนับเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Most Probable Number โดยใช้ Alkaline Phosphatase-Labeled DNA-Probe VPAP ซึ่งจำเพาะต่อ Species-Specific Thermolabile Hemolysin Gene (*tlh*) และวิธี Direct Plating 2 วิธี โดยใช้ VPAP Probe และ Digoxigenin-labeled Probe พบว่าทั้ง 3 วิธี ได้ผลใกล้เคียงกัน และพบว่าวิธี Direct Plating เป็นวิธีการที่รวดเร็ว และถูกต้อง แต่วิธี MPN เหมาะสำหรับเซลล์ที่บดเจ็บ และอ่อนแอ

Hara-Kudo และคณะ (2001) ได้ตรวจนับเชื้อ *V. parahemolyticus* ในอาหารทะเล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic Agar พบว่าการนำอาหารทะเลมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ก่อนนำไปใส่ใน Selective medium เช่น Alkaline Peptone Salt หรือ Salt Polymyxin Broth จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจนับ และเป็นการซ่อมแซมเซลล์ที่บดเจ็บได้ดี

Wright และคณะ (1993) ได้สร้าง Oligonucleotide DNA Probe (VWP) ที่จำเพาะกับส่วนหนึ่งกับส่วนหนึ่งของลำดับยีนส์ของ *V. vulnificus* Cytolysin Gene (*hly A*) สำหรับตรวจหาเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหาร ผลการทดลองพบว่า วิธีการดังกล่าวให้ผลในการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงถึงร้อยละ 100

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพื่อให้ได้ชุดวิเคราะห์ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และลดเวลาการดำเนินงานจากวิธีการปกติ (conventional method) ซึ่งใช้เวลานาน 2 - 3 วัน ให้เหลือเพียง 1 วัน ทั้งนี้ขั้นตอนที่พัฒนาศึกษาเป็นขั้นตอนการบ่งชี้จำเพาะการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารสีของการใช้น้ำตาลจำนวน 19 ชนิด (sugar fermentation), การเกิดกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชันของไลซีน ออร์นิธินและอาร์จินิน (amino acid decarboxylation), การเกิดปฏิกิริยา esculin hydrolysis, และการเกิด Hydrogen sulfide production โดยอาหารเหลวสีจำเพาะดังกล่าวมีการตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ A_{600} , A_{550} , A_{450} , และ A_{650} ตามลำดับ ด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีที่เป็นการใช้ไมโครเพลทรีดเคอร์ร่วมกับอุปกรณ์ 96-well ไมโครเพลท นอกจากนี้ยังมีการศึกษาชนิดของตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไลซีน โดยตัวบ่งชี้ที่ใช้ได้จากส่วนประกอบพื้นฐานในอาหารมาตรฐานที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เพื่อให้ได้สูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้แล้วอาหารสีที่ได้มีการพัฒนามีการนำไปทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์กับตัวอย่างอาหารจริงและตัวอย่างน้ำทะเลเพื่อตรวจสอบคุณภาพของน้ำสำหรับการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ สำหรับการอนุบาลลูกกุ้งลูกปลา โดยรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานแสดงดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

Group	Organisms	Culture collection number
แบคทีเรียแกรมบวก	<i>Listeria monocytogenes</i>	DMST 17303
	<i>Listeria innocua</i>	DMST 9011
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
	<i>Enterococcus faecium</i>	DMST 4743
	<i>Enterococcus avium</i>	DMST 4159

	<i>Staphylococcus aureus</i>	TISTR 808
	<i>Bacillus cereus</i>	DMST 12126
แบคทีเรียแกรมลบ	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DMST 15285
	<i>Vibrio cholerae</i>	DMST 4279
	<i>Vibrio vulnificus</i>	DMST 21245
	<i>Escherichia coli</i>	DMST 4609
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	DMST 23156
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	DMST 8012
	<i>Krebsiella pneumoniae</i>	DMST 8216
	<i>Shigella dysenteriae</i>	DMST 7123
	<i>Shigella flexneri</i>	DMST 4423
	<i>Shigella sonnei</i>	DMST 561
	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	DMST 8014
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	DMST 15676
	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	DMST 15673
	<i>Salmonella Paratyphi B</i>	DMST 28118
	<i>Salmonella Typhi</i>	DMST 22842

3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

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

- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Nylon syringe filter membrane (13 mm diameter, 0.45 μm pore size, Filtrex, Thailand)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3.1.4 น้ำตาลชนิดต่างๆ

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

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

3.1.5 กรดอะมิโนชนิดต่างๆ

- L-Lysine
- L-Ornithine
- L-Arginine

3.1.6 พิเอนินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ

- โบร โมครีซอลเพอเพิล
- ฟีนอลเรด

3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

3.2.1 การทำ frozen stocks

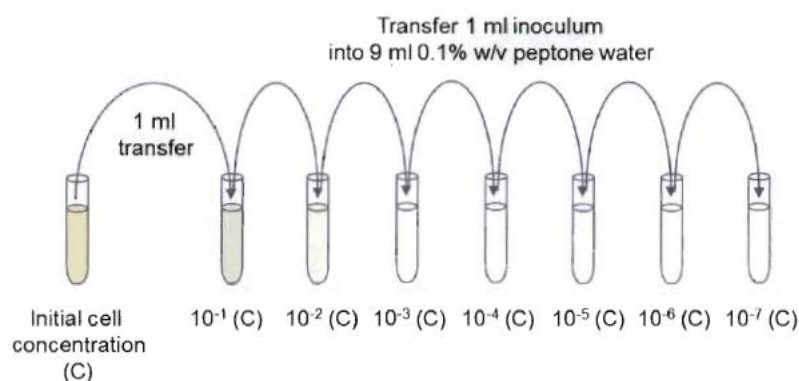
เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Thailand) ถูก streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเชื้อเดี่ยวดังกล่าวจะถูกถ่ายลงด้วยลูปในอาหาร tryptic soy broth (TSB) ปริมาณ 100 ml และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm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

3.2.2 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จาก frozen stock ถูกทำให้เพิ่มจำนวนใน 100 ml ของ TSB ในขวดลูกผสมพู่ขนาด 250 ml และทำการบ่มด้วยอุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ภายใต้การเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง นำลูปที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อที่ถูกทำให้เพิ่มจำนวน จากนั้นนำมา streak ลงบนอาหารแข็ง TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ agar ที่มีโคโลนีของเชื้อถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ สำหรับใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง

3.2.3 การเตรียม cell culture preparation

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



รูปที่ 3.1 Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า

3.3 การศึกษาพัฒนาอาหาร (Multiplexed Colorimetric Enrichment Media) เพื่อการบ่งบอกความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

(Spectrophotometry)

3.3.1 การเตรียมส่วนประกอบอาหาร

- อาหารเหลว *Sugar fermentation*

เพื่อที่จะทดสอบการ fermentation ของน้ำตาล จะทำการเตรียมน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น เด็กโตรส อะราบิโนส แมนโนส แมนนิทอล ฯลฯ ที่ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ถูกนำไปเติมลงในเบสอาหารที่มีส่วนประกอบของ เปปโตน 10 กรัม/ลิตร, ทริปโตน 3 กรัม/ลิตร, เกลือโซเดียมคลอไรด์ 3% และฟิเอซอินดิเคเตอร์ของโบรโมคริสซอลเพอเฟิล 0.08 กรัม/ลิตร เพื่อที่จะผลิตอาหารเหลวเพื่อการ fermentation

- อาหารเหลว *Amino acid decarboxylation*

สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาอะมิโนดีคาร์บอกซิเลชัน, 5 กรัมต่อลิตรของกรดอะมิโนไลซีน (L) ออร์นิติน (O) และอาร์จินิน (A) ถูกเติมในอาหารที่มีส่วนประกอบของซอยโตน 4.5 กรัม/ลิตร, กลูโคส 1 กรัม/ลิตร, และฟีนอลเรด 0.08 กรัม/ลิตร เพื่อที่จะผลิต ไลซีน-ฟีนอลเรด, ออร์นิติน-ฟีนอลเรด, และอาร์จินิน-ฟีนอลเรด

- อาหารเหลว *Esculin hydrolysis (ESC)*

อาหารเหลว ESC มีการเติมเปปโตน 10 กรัม/ลิตร, beef extract 5 กรัม/ลิตร, ferric ammonium citrate 0.5 กรัม/ลิตรและ esculin 1 กรัม/ลิตร

- อาหารเหลว *Hydrogen sulfide production (HSP)*

อาหารเหลว HSP มีส่วนประกอบของซอยโตน 4.5 กรัม/ลิตร, โซโลส 1 กรัม/ลิตร, ferric ammonium citrate 0.5 กรัม/ลิตร และโซเดียมไธโอซัลเฟต 6.8 กรัม/ลิตร

อาหารทั้งหมดในแต่ละสูตรถูกนำมาละลายส่วนผสมและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น pH 7 ด้วยกรด HCl 1 N และ NaOH 1 N จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter ด้วยการใช้นylon syringe เมมเบรน ที่มี pore size ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm. และ 0.45 μm เก็บรักษาในขวด aseptic filling ก่อนการใช้งาน

3.3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวจำเพาะ (SFT, AAD, ESC, HSP) ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (i.e., *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (i.e., *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. Typhi*, *Y. enterocolitica*) ปริมาณ 20 μl ที่ปริมาณของเชื้อ 2 log CFU/ml (ถูกเตรียมด้วยการ recovery เชื้อในอาหาร TSB จนได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10⁷ CFU/ml จากนั้นทำการ dilution ด้วยเปปโตนที่ความเข้มข้น 0.1%) เชื้อแต่ละชนิดถูก inoculation ลงในอาหารเหลว 24 ชนิด

โดยแต่ละชนิดอาหารเหลวปริมาณ 180 μ l ใน 96-deep well microplate ตัวอย่างทั้งหมดถูกทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{600} , A_{550} , A_{450} , และ A_{650} ถูกทำการวัดทุกๆ 3 ชั่วโมงโดยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ โดยในระหว่างการวัดค่าการดูดกลืนแสง ตัวอย่างมีการเขย่าด้วยความถี่ 840 rpm เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อทำการเขย่าตัวอย่างให้มีลักษณะเป็นส่วนผสมเนื้อเดียวกันก่อนทำการวัดตัวอย่าง

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเหลวจำเพาะกับตัวอย่างอาหารทะเล

ตัวอย่างอาหารทั้งหมดเช่น ข้าวผัดปู, กุ้งต้ม, และหอยลวก ซึ่งมาจากร้านสะดวกซื้อทั่วไป ถูกนำมาใช้ในการศึกษาประเมินประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่เป็นมาตรฐานตาม BAM, 2002 เพื่อให้ได้ผลที่เป็นแหล่งอ้างอิงที่ถูกต้อง นอกจากนี้ตัวอย่างอาหารจริงยังได้ถูกนำไปทดสอบกับอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* ซึ่งเป็นอาหาร Chromogenic ที่ได้รับความนิยมในการนำมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และมีรายงานพบว่าอาหารดังกล่าวให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องน่าเชื่อถือกว่าการใช้อาหาร TCBS ที่เป็น selective agar จากเทคนิควิธีการที่เป็นมาตรฐาน (Di Pinto et al., 2011) ในการทดลองตัวอย่างอาหาร 25 กรัมที่มีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติจะมีการ spiked ด้วย 1 ml ของ *V. parahaemolyticus* ที่ 1 log CFU/ml

3.3.3.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร (Food sample)

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

3.3.3.2 การดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะ

ตัวอย่างที่ pre-enriched ด้วย APW ปริมาณ 20 μ l ถูกนำมาใส่ในอาหารเหลว 180 μ l ของแต่ละอาหารเหลว (เด็กซ์โตรส-โบรโมครีซอลเพอเฟิล, อะราบีโนส-โบรโมครีซอลเพอเฟิล, แมนโนส-โบรโมครีซอลเพอเฟิล, แมนนิทอล-โบรโมครีซอลเพอเฟิล, อาหารเหลว ESC, ไลซีน-ฟีนอลเรด, และออร์นิติน-ฟีนอลเรด) ใน sterile 96-well ไมโครเพลท ตัวอย่างทั้งหมดถูกทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างมีการเขย่าในไมโครเพลทที่ 840 rpm เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้เซลล์มีการกระจายตัวสม่ำเสมอในอาหารเหลวก่อนที่จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{600} และ A_{550} และทำการวัดควบคู่กับน้ำกลั่นที่เป็น blank ด้วยการวัดด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์

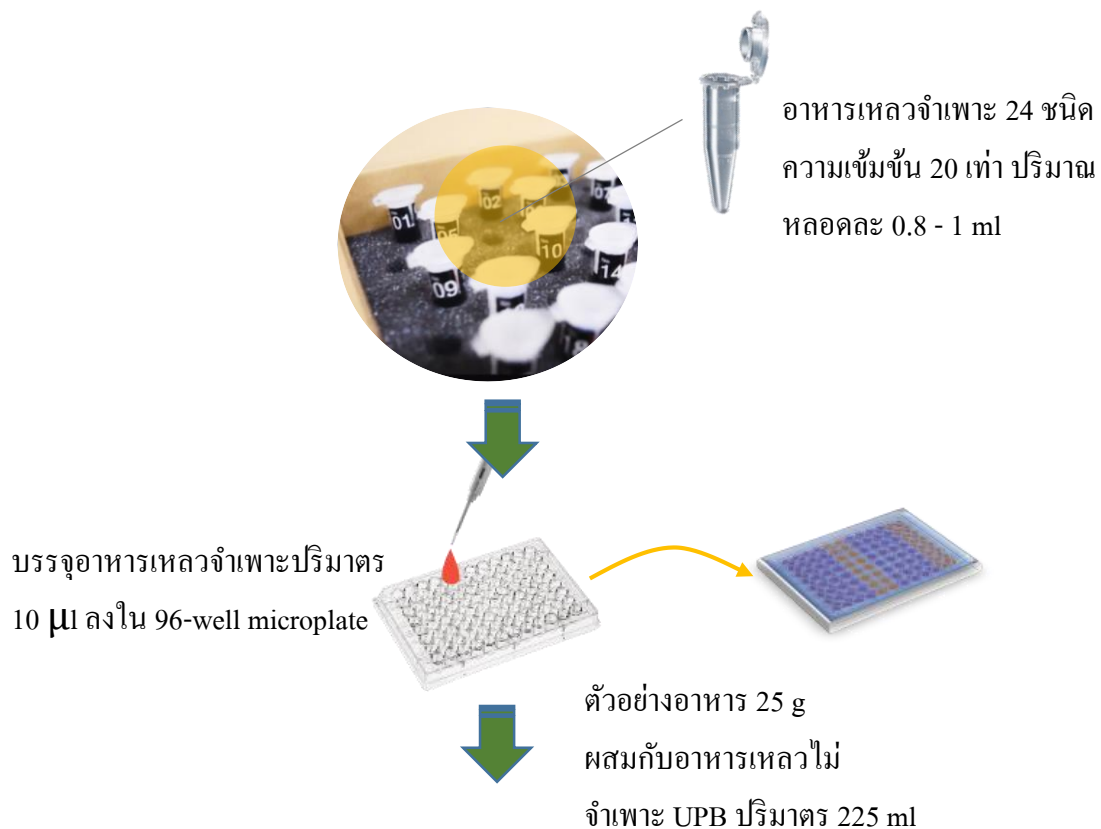
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของอาหาร Multiplexed Colorimetric Enrichment Media ในการตรวจสอบความสามารถในการ treatment น้ำทะเลด้วยระบบกรองน้ำ

3.4.1 การเตรียมอาหาร

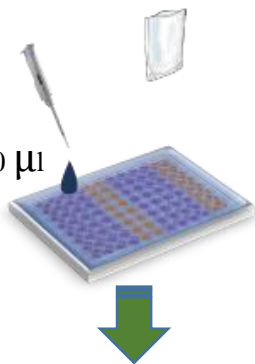
ทำการเตรียมอาหารเหลวสี่จำเพาะ 24 ชนิดตามส่วนประกอบที่ปรากฏในข้อ 3.3.1 ที่ความเข้มข้น 20X จากนั้นทำการบรรจุลงใน aseptic appendofit เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งาน

3.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการ treatment น้ำทะเลด้วยระบบกรองน้ำด้วยอาหาร Multiplexed Colorimetric Enrichment Media

ปิเปตอาหารเหลวจำเพาะสี่ (24 broths) แต่ละชนิดปริมาณ 10 μl ลงใน 96 – well flat bottom microplate จากนั้นเติมตัวอย่างน้ำทะเลที่ต้องการทดสอบปริมาณ 190 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ในระหว่างการบ่มตัวอย่างมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{600} , A_{550} , A_{450} , และ A_{650} ตามลำดับ



บรรจุตัวอย่างอาหารปริมาณ 190 μ l
ลงใน 96-well microplate



บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง
หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนของแสง

รูปที่ 3.2 การใช้อาหารเหลวสีจำเพาะที่มีหลายปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (enrichment step)

ในขณะเดียวกันสามารถบ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

3.5 การพัฒนาอาหารเหลวไลซีนดีคาร์บอกซีเลชันเพื่อเพิ่มความสามารถในการ selectivity ในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus*

3.5.1 การเตรียมอาหารที่เพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อ

Lysine decarboxylase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย lysine ได้เป็น cadaverine และสามารถเกิดขึ้นในเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ (Soda และ Moriguchi, 1969) อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ก็มีเอนไซม์ชนิดนี้เช่นเดียวกัน แต่จะใช้เอนไซม์ได้ช้ากว่าในเชื้อ *V. parahaemolyticus* เอนไซม์ Lysine decarboxylase ถูกนำมาทดลองในขั้นตอนนี้ เนื่องจากจะให้ระบบการเปลี่ยนแปลงสีที่ชัดเจน สูตรของอาหาร lysine decarboxylase salt broth ประกอบด้วย เด็กซ์โตรส (0.5 กรัม/ลิตร), L-ไลซีน (10 กรัม/ลิตร), เนื้อสกัด (5 กรัม/ลิตร), เนื้อเปปโตน (5 กรัม/ลิตร), เกลือ (30 กรัม/ลิตร) และ ฟีนอลเรด (0.015 กรัม/ลิตร) สูตรอาหารนี้ถูกประยุกต์ใช้ในงานวิจัยจาก Elston (1971) อาหาร Lysine decarboxylase salt broth จะถูกเติมสารคัดเลือกที่ความเข้มข้นต่างๆ สารคัดเลือกจะผสมกับเกลือ ร้อยละ 3 และ pH 8.5 ถูกพิจารณาในการทดลองนี้ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยที่ศึกษาในอาหาร lysine decarboxylase media

สภาวะ	ปัจจัยที่ศึกษา		
	สารคัดเลือด (polymyxin B sulfate 0.3 mg/L และ bile salt 3 g/L)	ความเป็นเกลือ (เกลือร้อยละ 3)	ความเป็นด่าง (pH 8.5)
1	✓	-	-
2	-	✓	-
3	-	-	✓
4	✓	✓	-
5	✓	-	✓
6	-	✓	✓
7	✓	✓	✓

3.5.2 ขั้นตอนการทดลอง

แบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ถูกพิจารณาในอาหาร lysine decarboxylase salt broth ที่ผสมกับความเข้มข้นของสารคัดเลือดใน 96-microwell plate การทดลองนี้ศึกษาที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ผลโดยการนับเชื้อที่เวลา 0, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง การถ่ายภาพ และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวพร้อมรูปแบบการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวจำเพาะ (Pre-enrichment step) เป็นการประยุกต์ใช้อาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนาจากปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล (sugar fermentation, SFT), ปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน (amino acid decarboxylation, AAD), ปฏิกิริยาเอสคิวรินไฮโดรไลซิส (Esculin hydrolysis, ESC) และปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide, HSP) เพื่อคัดเลือกรหัส *V. parahaemolyticus* โดยรูปแบบการวิเคราะห์เป็นการลดปริมาณของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (miniaturized protocol) ที่มีการประยุกต์ใช้ 96-well ไมโครเพลท ในขณะที่ยังให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง นอกจากนี้ในการทดลองยังได้มีการทดสอบอาหารเหลวชีวเคมีจำเพาะจำนวน 24 ชนิดกับแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยในแต่ละเชื้อจุลินทรีย์จะให้ finger print เพลทฟอร์มที่แตกต่างกันซึ่งแต่ละ finger print สามารถนำมาใช้ในการบ่งบอกความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และมีการประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ของอาหารเหลวสี่ดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้แล้วอาหารเหลวชีวเคมีจำเพาะ 24 ชนิดยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการ treatment น้ำทะเลเพื่อการเตรียมน้ำในการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์สำหรับการนำไปอนุบาลลูกกุ้งและลูกปลา และเพื่อให้ได้ผลที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ มีการติดตามปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตเมทรี นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้มีการพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะไลซีนเพื่อเพิ่มความ selectivity ของการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการใช้ตัวยับยั้งที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้รายละเอียดผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

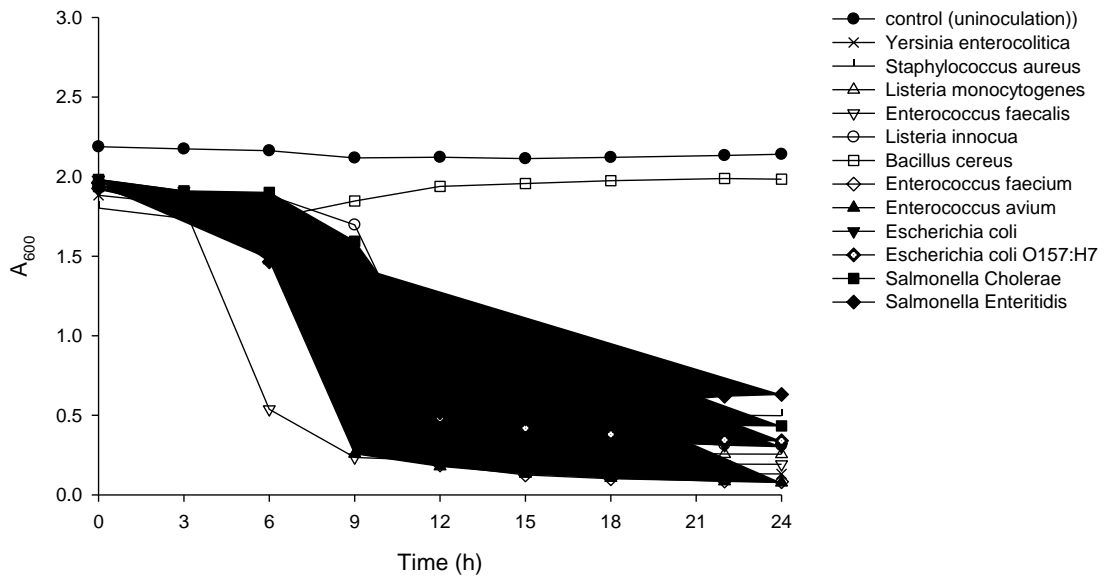
4.1 การใช้อาหารเหลวจำเพาะสีร่วม (Multiplexed Colorimetric Enrichment Media) ในการบ่งบอกความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนิตต่างๆ

ในความพยายามที่จะทำการพัฒนาอาหารเหลวสีเพิ่มจำนวนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *V. parahemolyticus*

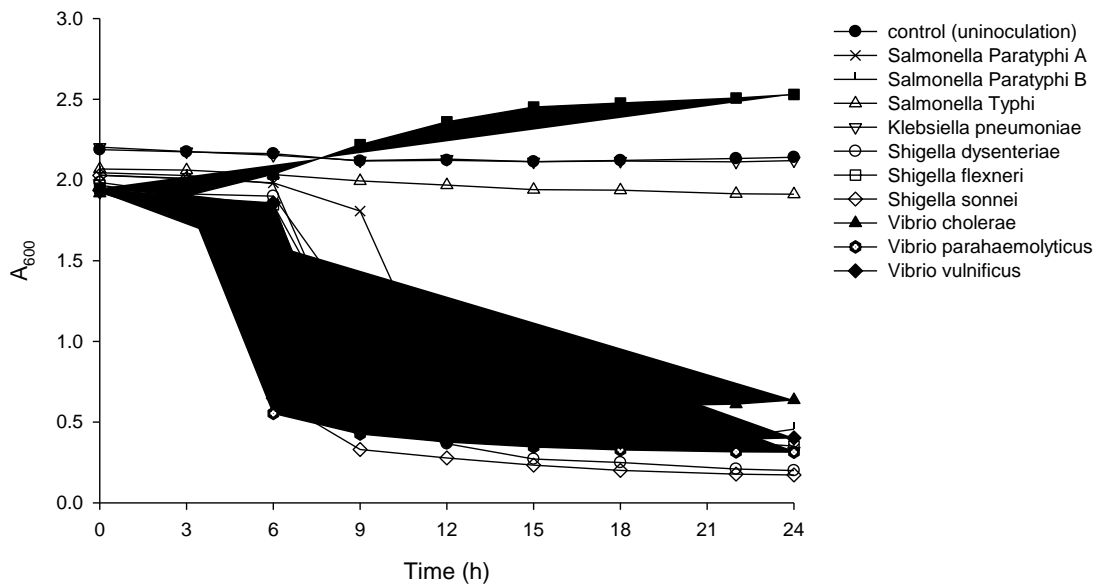
การประยุกต์ใช้การทดสอบทางชีวเคมี ปฏิกริยาที่ใช้ถูกเลือกจากคู่มือทางจุลชีววิทยา 9th edition of the Manual of Clinical Microbiology ในการแบ่งจำแนกปฏิกริยาชีวเคมีของเชื้อเป้าหมายเหล่านี้ โดยปฏิกริยาที่ใช้ เช่น ปฏิกริยาการใช้ SFT, AAD, ESC, และ HSP ถูกนำมาใช้เพื่อยอมให้ pH และอาหารสีเปลี่ยนในระหว่างขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเพื่อการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงโดยการตรวจวัดด้วยการใช้ spectrophotometric ทั้งนี้กลไกของการเกิด by-product จากปฏิกริยาในอาหารเหลว 24 ชนิดของการเกิดกรดและเบสโดยธรรมชาติ ด้วยการใส่ฟิเอชอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวสีส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปฏิกริยาด้วยการติดตามด้วย wavelength ที่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงในอาหารเหลวสามารถที่จะทำการวัดและสะดวกง่ายในการ detected โดยรูปแบบการวิเคราะห์ด้วยอาหารเหลวเพิ่มจำนวนสียังไม่เคยมีการนำมาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของตัวอย่างเพื่อที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ร่วมกันและจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ประโยชน์ของการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเพิ่มจำนวนดังกล่าวร่วมกับการตรวจวัดปฏิกริยาด้วยการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ขนาดเล็กสามารถที่จะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วเพื่อประยุกต์ใช้กับโรงงานในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็น routine ของโรงงาน และเพื่อให้ง่ายในการจัดทำเป็นรูปแบบการวิเคราะห์ที่ได้มาตรฐานเพื่อนำไปใช้ในการเฝ้าเตือนระวังแนวโน้มการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

4.1.1 กราฟแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เวลาการบ่มต่างๆ ของปฏิกริยาในอาหารเหลวจำเพาะชนิดต่างๆ (SFT, AAD, ESC, และ HSP)

อาหารเหลวที่ประกอบไปด้วยความจำเพาะของแต่ละปฏิกริยาจำนวน 24 อาหารและเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 22 ชนิด ซึ่งจัดได้ว่าอยู่ในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการเกิดปฏิกริยาดังกล่าวของเชื้อแต่ละชนิดในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ประมาณ 2 log CFU/ml จำนวน 20 μ l ถูก inoculation ลงในอาหารจำเพาะแต่ละชนิดที่ 180 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ในระหว่างทำการบ่ม ตัวอย่างถูกนำออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 3 ชั่วโมง (A_{600} สำหรับปฏิกริยาการใช้น้ำตาล; A_{550} สำหรับปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโน; A_{450} สำหรับปฏิกริยาการใช้ esculin hydrolysis; A_{650} สำหรับปฏิกริยาการเกิด Hydrogen sulfide)

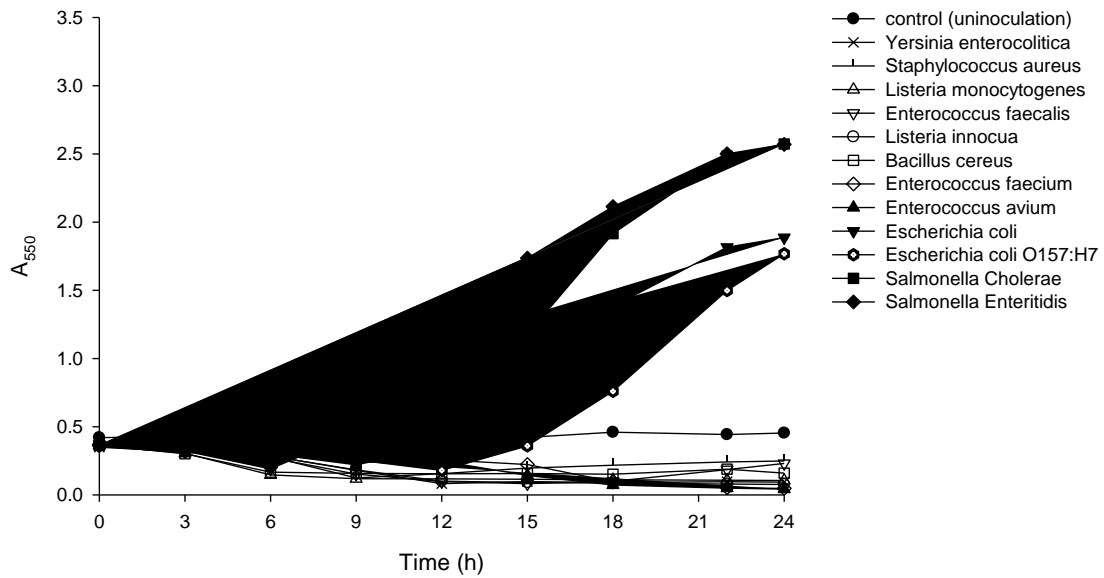


(A1) MAO-BP

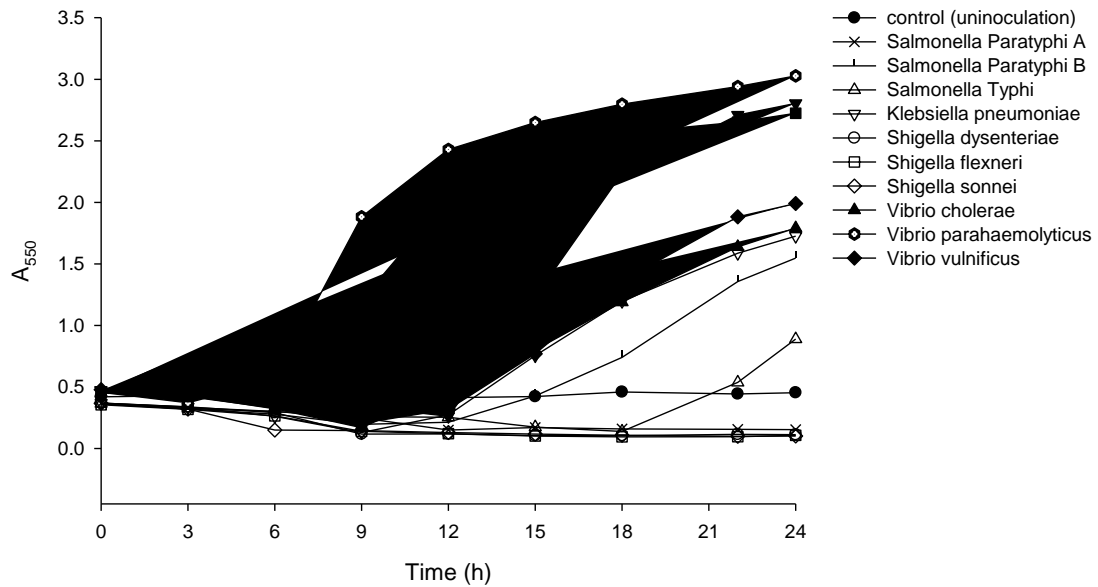


(A2) MAO-BP

รูปที่ 4.1 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล
แมนโนสในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*)

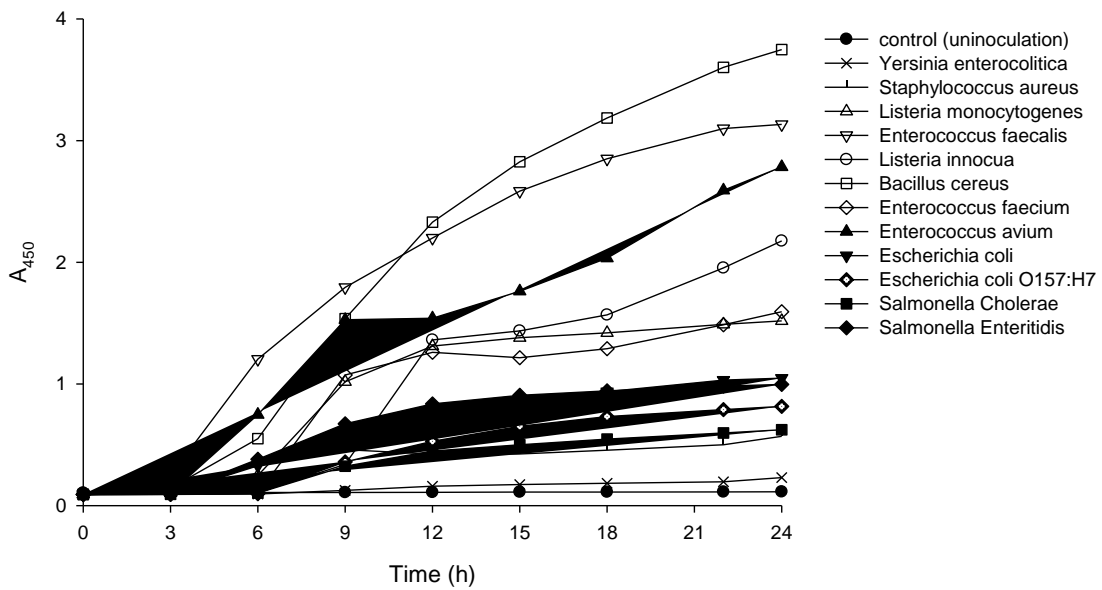


(B1) LYS-PR

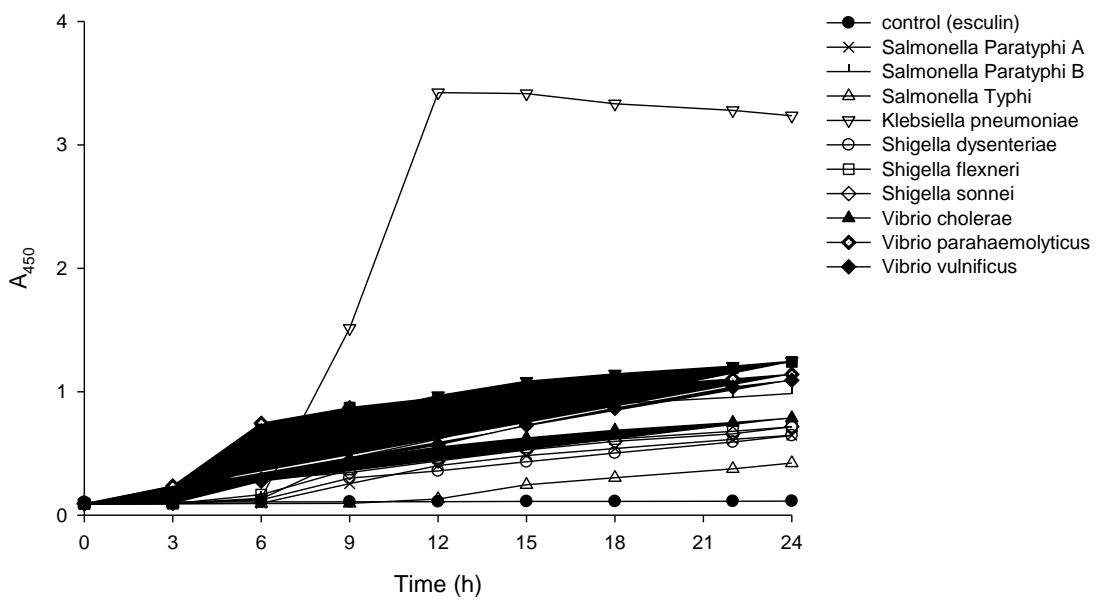


(B2) LYS-PR

รูปที่ 4.2 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนไลซีนในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*)

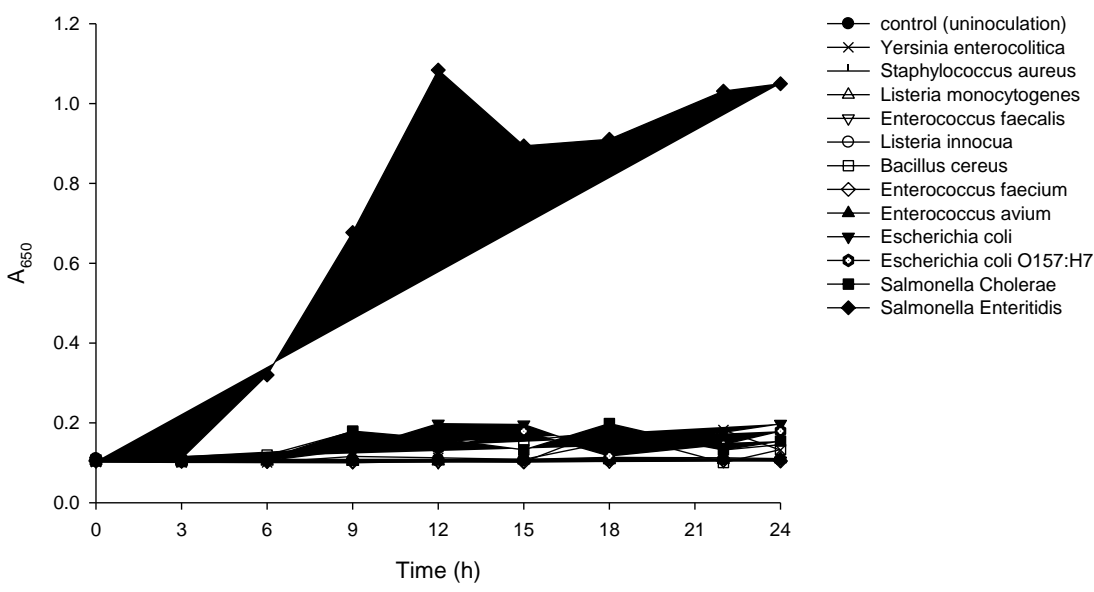


(C1) ESC

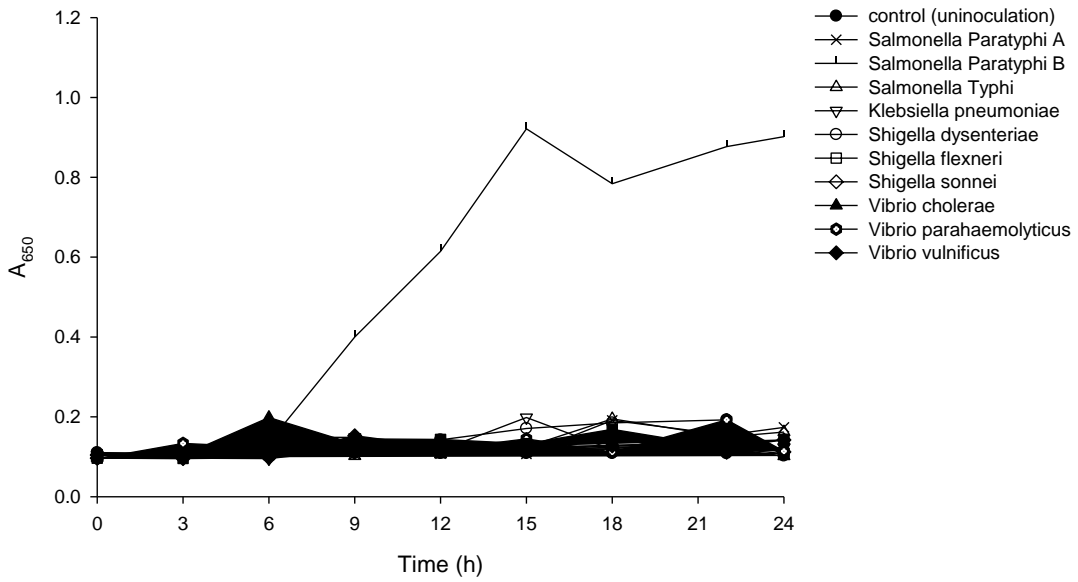


(C2) ESC

รูปที่ 4.3 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของการเกิดปฏิกิริยาการใช้เอสคิวริน
ในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*)



(D1) HSP



(D2) HSP

รูปที่ 4.4 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ ของปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารเหลวที่บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิด (i.e., *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*)

รูปที่ 4.1-4.4 แสดงให้เห็น profile ของค่าการดูดกลืนแสงของตัวแทนอาหารเหลวจำเพาะการใช้น้ำตาลอะราบิโนส, อาหารไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่น, ปฏิกิริยา Esculin hydrolysis, และ ปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งในการทดลองได้แสดงกราฟ profile ของค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาดังกล่าวเนื่องจากน้ำตาลและกรดอะมิโนเป็นที่รู้จักกันดี พีเอชอินดิเคเตอร์โบรโมครีซอลเพอเฟิลและฟีนอลเรดถูกเลือกให้เป็นพีเอชอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในระบบของ SFT และ AAD ของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 และ 550 นาโนเมตรตามลำดับ การค้นพบและการใช้พีเอชอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมได้มีการถูกตีพิมพ์ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Khueankhanchroen และคณะ, 2016) การใช้ Ferric ammonium citrate และ โซเดียมไซโอซัลเฟตถูกนำมาใช้เพื่อให้อาหารเหลวเกิดเป็นสีดำของ ESC และ HSP (Khueankhanchroen และคณะ, 2016) ที่ซึ่งความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจ detect ตัวอย่างเป็นที่ 450 และ 650 นาโนเมตร (Sangadkit และคณะ, 2016; Khueankhanchroen และคณะ, 2016) การเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวสามารถตรวจสอบติดตามได้ด้วยการใช้สายตาและมีความสัมพันธ์สอดคล้องดีกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยการวัดด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ใน 96-well ไมโครไทเทอเพลท

ในรูปที่ 4.2 แสดง profile การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนไลซีน-ฟีนอลเรด (LYS-PR) โดยในช่วงแรกค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงจากนั้นมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยรูปแบบของค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนถูกสังเกตโดยงานวิจัยอื่นเช่นเดียวกัน (Khueankhanchroen และคณะ, 2016) แบคทีเรียที่สามารถเกิดผลบวกของ LYS –PR สามารถที่จะดูดซึมใช้กลูโคสส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเหลวลดลงจากที่ 7.0 ไปอยู่ที่ประมาณ 4.5 เนื่องจากเกิดผลิตผลพลอยได้จากการ fermentation ได้กรดส่งผลให้อาหารเหลวมีสถานะเป็นกรด ในการมีพีเอชอินดิเคเตอร์ฟีนอลเรด ส่งผลให้ phenomena ของการเปลี่ยนสี LYS –PR เปลี่ยนจากสีส้มของอาหารที่ pH 7 เป็นสีเหลืองเมื่ออาหารเหลวมีสถานะเป็นกรดที่เกิดจาก by product ที่สถานะกรด โดยเงื่อนไขของสถานะกรดจะกระตุ้นการใช้กรดอะมิโนส่งผลให้เกิดผลพลอยได้จากการใช้กรดอะมิโนโดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสเปลี่ยน L-Lysine ไปเป็น cadaverine เอมีน derivative ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ pH ของอาหารเหลวจาก 4-4.5 เปลี่ยนไปเป็นสถานะเบสที่ 8.5-9 ดังนั้น LYS-PR ของอาหารเหลวจะถูกเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีชมพู ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 2.2-2.5A₅₅₀ สำหรับอาหารเหลว ODB-PR และ ADR-PR แสดงให้เห็นรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกันกับอาหารเหลวสี LYS –PR

เพื่อเป็นองค์ความรู้ การประยุกต์ใช้อาหารเหลว ESC กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ นอกเหนือจากเชื้อ *L. monocytogenes* และกลไกของการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการเกิด esculatin ได้มีการยืนยันเป็นเอกสารปรากฏค่อนข้างน้อย (รูปที่ 2.11) โดยรูปที่ 4.3 นำเสนอการวัดด้วยการใช้สเปกโตรโฟโตเมทรีในการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เป็นสีดําของอาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนาขึ้นมา และมีการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 22 ชนิด เป็นตัวแทนในการทดสอบ ตามรายการที่ได้ปรากฏในวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มสูงขึ้นแสดงให้เห็นถึงการเกิด ESC ที่เป็นผลบวกโดยแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้เช่น *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *E. faecalis* สามารถที่จะใช้โดยเปลี่ยน esculin ไปเป็น esculatin อาหารเหลวสีดําถูกเกิดจาก esculin ทำปฏิกิริยากับ ferric ions (Netten และคณะ, 1989) สำหรับแบคทีเรียที่ให้ผลลบกับการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว เช่น *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A สีของอาหารเหลวจะยังคงเป็นสีเดิมที่เป็นสีเหลืองใสตลอดระยะเวลาการบ่ม



















สำหรับรูปแบบการเกิด HSP ได้ถูกนำเสนอในการทดสอบ serological และการออกแบบการเกิดโคโลนีที่เป็นสีดําในอาหารแข็ง การเกิดสีของอาหารเช่นเดียวกับอาหารเหลว ESC โดยอาหารเหลว ESC เป็นอาหารเหลวทดสอบทางชีวเคมีและกลไกการพัฒนาของสีถูกมีการทดลองศึกษาโดย Khueankhancharoen และคณะ, 2016 รูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นการ verified ของการใช้ ferrous sulfide (FeS) เพื่อที่จะ generate การเกิดเป็นตะกอนสีดําจากเชื้อ *S. Enteritidis* และ *S. Paratyphi* B และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีในอาหารเหลว HSP ที่ปริมาณของเซลล์ต่ำประมาณ 2 log CFU/ml พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ที่สามารถ reducing สาร thiosulfate ส่งผลต่อการเปลี่ยนสีด้วยการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวไปเป็นสีดํากายใน 24 ชั่วโมง และสามารถแยกให้เห็นความแตกต่างที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 650 นาโนเมตร โดยสามารถที่จะ detect ปฏิกิริยาได้ภายในระยะเวลา 6-9 ชั่วโมง ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกันดีกับข้อมูลที่ได้มีการนำเสนอตีพิมพ์ไปก่อนหน้านี้ จากกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* มีเพียงเชื้อ *S. Enteritidis* และ *S. Paratyphi* B ที่สามารถ metabolize ไธโอซัลเฟตในการพัฒนาการเกิดเป็นตะกอนสีดําซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยสายตา มนุษย์และการใช้สเปกโตรโฟโตเมทรี

4.1.2 ลักษณะปรากฏทางกายภาพของอาหารเหลวสีจำเพาะภายใต้ micro well ที่เวลาการบ่มต่าง ๆ



















ในการเกิดปฏิกิริยาของอาหารเหลวจำเพาะนอกจากมีการตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว การตรวจวิเคราะห์ด้วยสายตาเบื้องต้นสามารถที่จะบ่งบอกความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาได้เช่นกัน โดยผลการทดลองที่ให้ผลบวก (positive) และผลลบ (negative) ควรที่จะให้ผลสอดคล้องสัมพันธ์กันดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

ตารางที่ 4.1 แสดงรูปภาพของอาหารเหลวใน well เดียวที่บรรจุอาหารปฏิชีวนเคมีชนิดต่างๆ กันจำนวน 4 ชนิดที่เป็นอะราบีโนส-โบรโมคริสอล, ไลซีน-ฟินอลเรด, ปฏิกิริยาการใช้ esculin hydrolysis, และการใช้ Hydrogen sulfide ที่มี การ inoculation ด้วยเชื้อต่างชนิดกัน การเปลี่ยนสีดังกล่าวอยู่ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



















ปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล (sugar fermentation)

เวลา (ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
สถานะควบคุม (ไม่มีเชื้อ)									
ผลบวก (positive) <i>V. parahaemolyticus</i>									



















ปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน (amino acid decarboxylation)

เวลา (ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
สถานะควบคุม (ไม่มีเชื้อ)									
ผลบวก (positive) <i>V. parahaemolyticus</i>									

ปฏิกิริยาเอสคิวรีนไฮโดรไลซิส (*esculin hydrolysis*)

เวลา (ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
สถานะควบคุม (ไม่มีเชื้อ)									
ผลบวก (positive) <i>V. parahaemolyticus</i>									

ปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (*Hydrogen sulfide production*)

เวลา (ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
สถานะควบคุม (ไม่มีเชื้อ)									
ผลบวก (positive) <i>S. Enteritidis</i>									

ตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นบางตัวอย่างของเชื้อที่สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาได้ โดยจะมีตัวอย่างควบคุมที่ไม่มี การเติมเชื้อและตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในการทดลองเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* และ *S. Enteritidis* ถูกนำมาเป็น model ของแบคทีเรียในการทดสอบปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล, ปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน, ปฏิกิริยาเอสคิวรีนไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ดังที่กล่าวมา จากภาพการ เปลี่ยนแปลงของสีอาหารเหลวที่ปฏิกิริยาต่างๆ จะเห็นว่า สีของอาหารเหลวทั้ง 4 ชนิดที่ให้ผลเป็นบวก ก่อนข้างที่จะมีความแตกต่างแยกจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเชื้ออย่างชัดเจน โดยปฏิกิริยาการใช้ น้ำตาล สีของอาหารเหลวจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองที่เวลาการบ่มประมาณ 9 ชั่วโมง สำหรับ ปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนสีของอาหารเหลวจะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลืองเนื่องจากการใช้น้ำตาล เด็กซ์โตรสในช่วงแรก จากนั้นสีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ส่วนปฏิกิริยาเอสคิวรีนไฮโดรไลซิสและ ปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทั้ง 2 ปฏิกิริยาอาหารเหลวสีเหลืองใสจะเปลี่ยนเป็นสีดำ สำหรับเชื้อ แบคทีเรียที่ให้ผลลบกับอาหารเหลวจำเพาะสีทั้ง 4 ชนิด ตัวอย่างอาหารจะยังคงสีเดิมเหมือนกับตัวอย่าง ควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อ

การพัฒนาการเปลี่ยนแปลงของสีในอาหารเหลวเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมดเป็นอย่างดี ในการทดลองสามารถที่จะตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเหลวด้วยการใช้สายตาภายใน 24 ชั่วโมง และด้วยการใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีภายใน 12 – 18 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1 – 4.4) ดังนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{600} , A_{550} , A_{450} , และ A_{650} ของอาหารเหลวการใช้น้ำตาล, ปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน, ปฏิกิริยาเอสคิววินไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ถูกใช้ในการติดตามกิจกรรมของแบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ในการวัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงในระดับขนาดเล็ก โดยอาหารเหลวสีของ ARA-BP และ LYS-PR นำเสนอการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้อย่างชัดเจนในน้ำตาลทั้ง 18 ชนิด และ 2 กรดอะมิโน ในปฏิกิริยาความสามารถในการใช้น้ำตาลและอะมิโนคีคาร์บอกซีเลชั่น

4.1.3 ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในอาหารเหลวจำเพาะ 24 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ

รูปแบบปฏิกิริยาจำเพาะที่เกิดขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดในอาหารเหลวจำเพาะ 24 อาหารที่พัฒนาขึ้นมาดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งแสดงให้เห็นอาหารเหลวสีหลังจากที่ทำการเพาะบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 22 ชนิด โดยจากการทดลองก่อนหน้านั้น (4.1.1 และ 4.1.2) ที่พบว่าการประเมินด้วยสายตาและการวัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงสเปกโตรโฟโตเมตรีให้ผลการทดลองที่สอดคล้องตรงกันดังที่แสดงในรูปภาพและกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาการบ่มต่างๆ สำหรับข้อมูลการทดลองที่ให้ผลเป็น positive และ negative ได้รับจากการทำการทดลองในการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยในการทดลองมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีความสำคัญจำนวน 22 ชนิด ที่มีปรากฏอยู่ใน Bergey's manual of systematic และ 9th edition of the Manual of Clinical Microbiology สำหรับข้อมูลที่ตีพิมพ์ด้านอื่นๆ ได้รับจากการสำรวจในการงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Jacxsen et al., 2009) มีข้อมูลบางผลการทดลองที่เป็น positive และ negative ไม่มีปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลวิทยาศาสตร์ที่สามารถเข้าถึงได้ นอกเหนือจากนี้ในการ verification ของปฏิกิริยาชีวเคมีเหล่านี้ในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์อื่นๆ เป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะเป็นประโยชน์ต่อไปในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ตารางที่ 4.2 แสดงความสามารถในการคัดแยกเชื้อด้วยอาหารเหลวเพิ่มจำนวนจำเพาะ 24 ชนิดในการเพาะบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในแต่ละเชื้อจุลินทรีย์
 ก่อโรคใช้ปริมาณเซลล์ที่ 1-2 log CFU/ml ผลการทดลองที่นำเสนอแสดงอยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารเหลวที่มีการ
 inoculation เชื้อ เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เป็น control

เชื้อจุลินทรีย์	GAL	DUC	MAN	CEL	ARA	XYL	FRU	SUC	TRE	MEL	INO	RHA	MAI	LAC	SOR	MAL	DEX	ADO	SAL	LYS	ORN	ARG	ESC	HSP
แบคทีเรียแกรมบวก																								
- <i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
- <i>L. innocua</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
- <i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
- <i>E. faecium</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
- <i>E. avium</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
- <i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
- <i>B. cereus</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
แบคทีเรียแกรมลบ																								
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

เชื้อจุลินทรีย์	GAL	DUC	MAN	CEL	ARA	XYL	FRU	SUC	TRE	MEL	INO	RHA	MAI	LAC	SOR	MAL	DEX	ADO	SAL	LYS	ORN	ARG	ESC	HSP
<i>S. dysenteriae</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. flexneri</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. sonnei</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>S. Choleraesuis</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>S. Paratyphi A</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>S. Paratyphi B</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>S. Typhi</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

หมายเหตุ : ปฏิกิริยาของอาหารเหลวที่มีการใช้น้ำตาล; +, ผลบวก, $A_{600 \text{ sample}} < A_{600}$ ตัวอย่างควบคุม; -, ผลลบ, $A_{600 \text{ ตัวอย่าง}} \geq A_{600}$ ตัวอย่างควบคุม;
อาหารเหลวกรดอะมิโน; +, $A_{550 \text{ ตัวอย่าง}} > A_{550}$ ตัวอย่างควบคุม; -, $A_{550 \text{ ตัวอย่าง}} \leq A_{550}$ ตัวอย่างควบคุม; อาหารเหลว esculin hydrolysis; +, $A_{450 \text{ ตัวอย่าง}} > A_{450}$ ตัวอย่างควบคุม; -, $A_{450 \text{ ตัวอย่าง}} = A_{450}$ ตัวอย่างควบคุม; การเกิด hydrogen sulfide production; +, $A_{650 \text{ ตัวอย่าง}} > A_{650}$ ตัวอย่างควบคุม; -, $A_{650 \text{ ตัวอย่าง}} = A_{650}$ ตัวอย่างควบคุม)

ผลการทดลองในตารางที่ 4.2 ได้จากการ inoculation ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ จำนวน 22 ชนิดในอาหารเหลวสีจำเพาะ โดยแบคทีเรียที่ให้ผลบวก (positive) จะปรากฏมีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร ในขณะที่แบคทีเรียที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้หรือให้ผลลบ (negative) สีของอาหารเหลวจะยังคงสีเดิม ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวสีสะท้อนการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่จะสามารถ metabolize การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ กรดอะมิโน การใช้ esculin และปฏิกิริยาการเกิด Hydrogen sulfide production โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในแต่ละชนิดของแบคทีเรียให้รูปแบบการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันไปหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่าง finger print pattern ของ *L. monocytogenes* จะเห็นได้ว่าสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาการใช้ MAO-BP, CEL-BP, FRU-BP, SUC-BP, TRE-BP, RHA-BP, LAC-BP, MAL-BP, DEX-BP, SAL-BP, และ ESC ในอาหารเหลวดังกล่าว นอกจากนี้แล้วจะเห็นได้ว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะเกิดเพลทฟอร์มการเกิดปฏิกิริยาของ 7 ชีวิตเคมีอาหารเหลวที่เป็น (DEX-BP, ARA-BP, MAO-BP, MAI-BP, ESC, LYS-PR และ ORN-PR) รูปแบบการเกิดปฏิกิริยาชีวิตเคมีเหล่านี้ของ finger prints ในแต่ละเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคถูกใช้เป็นตัวบ่งบอกความเป็นไปได้การปรากฏมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสามารถที่จะแยกความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเชื้อแต่ละชนิดจะให้รูปแบบการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้จึงเป็นการนำความเป็น unique ของการวัดอาหารเหลวด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่มีรูปแบบที่แตกต่างกันจะถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อบ่งบอกการมีหรือไม่มี การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่าง

4.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพความสามารถของอาหารเหลวจำเพาะในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลสำเร็จรูป (finished products)

ทั้งนี้เนื่องจาก *V. parahaemolyticus* สามารถที่จะ metabolized การเกิดปฏิกิริยาได้ 7 ชนิดอาหารเหลว เพื่อที่จะตรวจสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ด้วยอาหารเหลวเพิ่มจำนวนที่มีการเปลี่ยนสี ปฏิกิริยาที่ใช้ใน 7 อาหารเหลวจากใน 24 อาหารเหลวสีจำเพาะ ปฏิกิริยาที่นำเสนอที่มีการใช้สับเสตรถูกใช้ในการ identified อาหารเหลวสีเพิ่มจำนวนที่ให้ผลบวกของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ตามที่แสดงในตารางที่ 4.2) ถ้า 7 อาหารเหลวเพิ่มจำนวนดังกล่าวมีการให้ผลเป็นลบ สามารถบ่งบอกได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารที่ทำกรวิเคราะห์และสามารถที่จะรายงานในรูปแบบของ not detected (ND) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลการทดลองที่เป็นลบจากอาหารเหลวเพิ่ม

จำนวนที่บ่งบอกความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนนำไปสู่การสรุปว่าตัวอย่างมีความปลอดภัยในการปนเปื้อนจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* และไม่จำเป็นต้องมีการใช้ agar เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป ตัวอย่างอุตสาหกรรมอาหารถูกใช้และแบ่งเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่มีการ sterilization และไม่มีการ sterilization ตัวอย่างทั้งคู่เหล่านี้มีการเติมเชื้อลงไปในตัวอย่อาหารแบบทั้งเดิมและไม่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในระหว่างการบ่ม บนพื้นฐานของการใช้อาหารเหลวจำเพาะจำนวน 7 อาหารที่เป็นอาหารเหลวสี เช่น เด็กซ์ โตรส-โบรโมครีซอลเพอเพิล, อะราบีโนส-โบรโมครีซอลเพอเพิล, แมนโนส-โบรโมครีซอลเพอเพิล, แมนนิทอล-โบรโมครีซอลเพอเพิล, ปฏิกริยาการใช้ ESC, ไลซีน-ฟีนอลเรด และออร์นิน-ฟีนอลเรด โปรโตคอลที่นำเสนอสามารถที่จะบ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีตามธรรมชาติให้ผลสอดคล้องตรงกันกับวิธีการที่เป็นมาตรฐานที่เป็นการใช้ agar

ตารางที่ 4.3 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารจริงโดยการ
ใช้วิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน 2 แบบ: การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวชีวเคมี
ที่นำเสนอและวิธีการที่เป็นมาตรฐานการวิเคราะห์ด้วย BAM, 2002

การเตรียม ตัวอย่าง	ตัวอย่างอาหาร (n)	ตัวอย่างอาหาร มีการเติมเชื้อ	อาหารเหลวจำเพาะ							ผลโดยรวมจาก อาหารเหลวสี	วิธีการที่เป็น มาตรฐาน
			DEX	ARA	MAO	MAI	ESC	LYS	ORN		
<i>V. parahaemolyticus</i>											
มีการฆ่าเชื้อ (sterilization)	ข้าวผัดปู (2)	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	กุ้งต้ม (3)	✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	หอยแครงลวก (2)	✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ไม่มีการฆ่า เชื้อ (no sterilization)	ข้าวผัดปู (2)	x	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	กุ้งต้ม (2)	x	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	หอยแครงลวก (2)	x	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	ข้าวผัดปู (3)	✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	กุ้งต้ม (3)	✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	หอยแครงลวก (3)	✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตัวอย่างอาหารที่มีการฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ในระดับ sterilized ถูก served เพื่อที่จะกำจัดเชื้อที่จะมีการปนเปื้อนในตอนตั้งแต่เริ่มต้นในตัวอย่าง เช่น ข้าวผัดปู, กุ้งต้ม, และหอยแครงลวก การบ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อ *V.*

parahaemolyticus ในตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อและตัวอย่างที่เป็น sterilized พบว่าให้ผลสอดคล้องตรงกันกับรูปแบบของการออกแบบการทดลอง อย่างไรก็ตามตัวอย่างอาหารที่ไม่มีการฆ่าเชื้อสามารถที่จะมีแนวโน้มการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นเป็นจำนวนมากนอกเหนือจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยส่วนใหญ่แล้วผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปควรที่จะไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หรือมีการปนเปื้อนน้อยมาก ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้นำเสนอจะทำให้ผลที่ถูกต้องและมีประโยชน์เป็นอย่างมาก อย่างเช่นเมื่อพิจารณาผลของตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ sterilization ในตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ ถึงแม้ว่าจะไม่ได้มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงไป ปรากฏให้ผลการทดสอบในอาหารเหลวจำเพาะที่ให้ผลบวก มีผลการทดลองที่ให้ผลเป็น 5, 1, 4 ที่ให้ผลเป็นบวก จาก 7 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจำนวนจำเพาะ แต่มีเพียงผลบวกทั้งหมดแสดงให้เห็นเป็นผลบวกของ *V. parahaemolyticus* ใน protocol ที่เป็น conventional เนื่องจากการปนเปื้อนโดยธรรมชาติส่วนใหญ่มาจากแบคทีเรียผสมที่มีปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง โดยปกติมีโอกาที่ตัวอย่างจะมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่สามารถใช้สับเซสตรทในอาหารเหลวจำเพาะดังกล่าวได้ เป็นความคุ้มค่าเพื่อที่จะสนใจมุ่งไปที่การตรวจวิเคราะห์ด้วยการเปลี่ยนสีของอาหารจากสาร substrate ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการตรวจวิเคราะห์ภายใน 1 วัน การพัฒนาเทคนิคเพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ภายใน 1 วัน ใช้เวลาน้อยกว่าการใช้วิธี conventional method ที่ใช้เวลา 2-3 วัน การใช้อาหารเหลวจำเพาะชีวเคมีจำนวน 7 ชนิดสามารถที่จะถูกใช้เพื่อยืนยันการไม่ปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อผลการวิเคราะห์ให้ผลเป็น negative อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ที่ให้ผลบวกในอาหาร selective หรืออาหาร chromogenic จำเป็นที่จะต้องมีการนำไปยืนยันผลการมีเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพื่อหลีกเลี่ยงผลการทดลองที่ให้ผลแต่จริงๆ ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ

4.2 การใช้อาหารเหลวสีจำเพาะ (Multiplexed Colorimetric Enrichment Media) ในการทดสอบประสิทธิภาพการ treatment น้ำทะเลด้วยระบบกรอง

การใช้ประโยชน์อาหารเหลวสีจำเพาะ นอกจากนำไปใช้ในการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปแล้ว (Finished products) ยังมีการประยุกต์นำไปใช้ในการทดสอบกับตัวอย่างน้ำทะเลที่มีการ treatment ด้วยระบบกรอง เพื่อเป็นการเตรียมน้ำทะเลให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจจะไปใช้ในการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ โดยในการทดลองน้ำทะเลหลังจากผ่านกระบวนการบำบัดน้ำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้วจะนำตัวอย่างน้ำดังกล่าวมา

ทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการกรองน้ำทะเลด้วยอาหารเหลวจำเพาะ 24 อาหาร โดยรายละเอียดผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการ treatment น้ำทะเลด้วยระบบกรองในอาหารเหลวสีจำเพาะ 24 อาหาร

24 Broths	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
1. GAL-BP	-	-	-	-	-
2. DUC-BP	-	-	-	-	-
3. MAN-BP	-	-	-	-	-
4. CEL-BP	-	-	-	-	-
5. ARA-BP	-	-	-	-	-
6. XYL-BP	-	-	-	-	-
7. FRU-BP	-	-	-	-	-
8. SUC-BP	-	-	-	-	-
9. TRE-BP	-	-	-	-	-
10. MEL-BP	-	-	-	-	-
11. INO-BP	-	-	-	-	-
12. RHA-BP	-	-	-	-	-
13. MAI-BP	-	-	-	-	-
14. LAC-BP	-	-	-	-	-
15. SOR-BP	-	-	-	-	-
16. MAL-BP	-	-	-	-	-
17. DEX-BP	-	-	-	-	-
18. ADO-BP	-	-	-	-	-
19. SAL-BP	-	-	-	-	-
20. LYS-PR	+	-	-	+	+
21. ORN-PR	-	-	+	-	-
22. ARG-PR	+	-	-	-	-
23. ESC	+	+	+	+	+

24. HSP

หมายเหตุ : GAL-Galactose, DUC-Ducitol, MAO-Mannose, CEL-Cellobiose, ARA-Arabinose, XYL-Xylose, FRU-Fructose, SUC-Sucrose, TRE-Trehalose, MEL-Melibiose, INO-Inositol, RHA-Rhamnose, MAI-Mannitol, LAC-Lactose, SOR-Sorbitol, MAL-Maltose, DEX-Dextrose, ADO-Adonitol, SAL-Salicin, LYS-Lysine, ORG-Ornithine, ARG-Arginine, ESC-Esculin, HSP-Hydrogen sulfide production, BP-Bromocresol purple, PR-Phenol red

จากการทดลองตัวอย่างน้ำทะเลที่ผ่านการ treatment ด้วยระบบกรอง เมื่อนำตัวอย่างที่ได้มาทดสอบในอาหารเหลวสีจำเพาะทั้ง 24 อาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นสังเกตและบันทึกผลด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างน้ำจาก sample ต่าง ๆ ให้ผลปรากฏเป็น positive น้อยมาก โดยเฉพาะ sample 2 มีเพียงอาหารเหลว ESC ที่ให้ผลเป็น positive นอกจากนี้แล้วเป็นที่สังเกตว่า sample ทั้ง 5 ตัวอย่างให้ผล positive กับอาหาร ESC ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liamkaew และคณะ, 2016 ที่พบว่าอาหาร Palcam ที่มีส่วนผสมของ esculin เชื้อส่วนใหญ่สามารถที่จะใช้ปฏิกิริยาดังกล่าว ทำให้อาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีดำ สำหรับอาหารกรดอะมิโนไลซีน ออร์นิตินและอาร์จินินพบมีโอกาสที่เชื้อที่หลุดรอดสามารถใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวได้ จึงให้ผล positive กับอาหารดังกล่าว เมื่อพิจารณาอาหาร fermentable ที่เป็นการใช้น้ำตาล 19 ชนิด พบว่า sample ทั้ง 5 ตัวอย่างให้ผลเป็น negative แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่สามารถผ่านออกมาได้ไม่สามารถใช้น้ำตาลดังกล่าว จึงส่งผลให้อาหารเหลวไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของสี แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาโดยรวมน้ำทะเลไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากในแต่ละตัวอย่างน้ำทะเลไม่ปรากฏรูปแบบอาหารที่ให้ผล positive ที่ให้ลักษณะ finger print ที่ตรงกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคใดๆ ดังในตารางที่ 4.2

ทั้งนี้เมื่อก้าวถึงประสิทธิภาพของระบบกรองน้ำทะเล คุณภาพของน้ำที่กรองได้ยังไม่ได้อยู่ในระดับที่ปราศจากเชื้อทั้งหมดซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าตัวอย่างน้ำยังมีการให้ผลเป็น positive กับตัวอย่างอาหารเหลวจำเพาะกรดอะมิโน ซึ่งเมื่อพิจารณาระบบกรองที่ใช้พบว่า filter มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 μ m ซึ่งสามารถที่จะกรองแบคทีเรียได้โดยส่วนใหญ่แต่ก็อาจจะมีโอกาสที่มีแบคทีเรียที่มีขนาด

เล็กกว่า $0.3 \mu\text{m}$ สามารถหลุดผ่านออกมาได้ส่งผลให้มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำหลังกรองประมาณ $2.26 \log \text{CFU/ml}$ โดยที่ปริมาณเชื้อดังกล่าวส่งผลให้อาหารเหลวจำเพาะเป็น positive ดังนั้นเพื่อให้เกิดมีการบำบัดน้ำที่สมบูรณ์ น้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วควรที่จะถูกส่งไปฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อาจยังเหลือรอดอยู่ด้วยเทคโนโลยี Advanced Oxidation Processes โดยเทคโนโลยีดังกล่าวเป็นการผสมผสานการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) ร่วมกับโอโซนเนชั่น (Ozonation) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ โดยเทคโนโลยีนี้ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองหรือความเป็นพิษตกค้าง และที่สำคัญเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

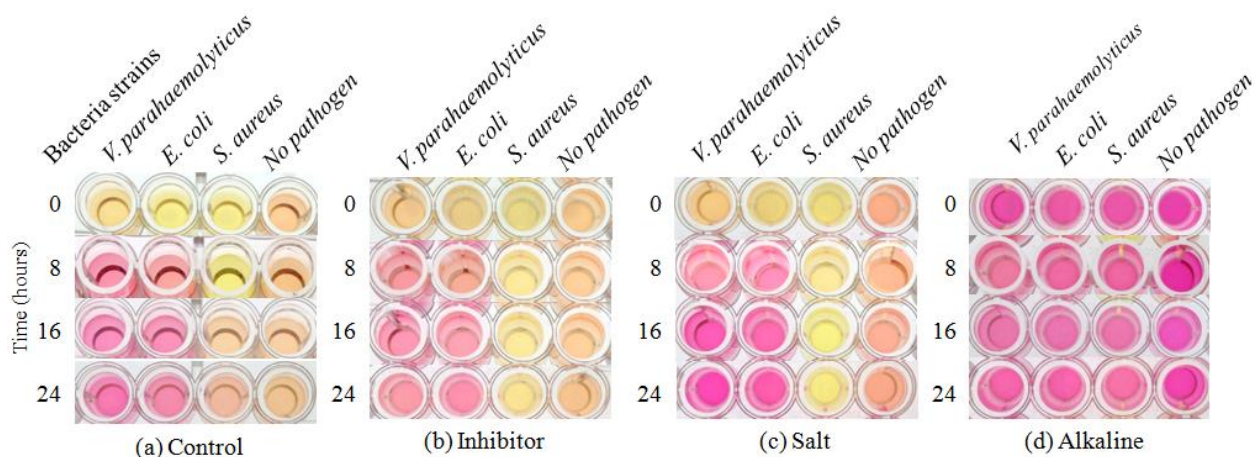
4.3 อาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดที่ผสมสารคัดเลือด กลีโกล และเบส

การใช้สารคัดเลือกร่วมกันในระบบอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดถูกศึกษาแทนอาหารเหลว TSB ระบบที่ใช้ในการบ่งชี้การเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* คือกลไกการผลิตเบสจากไลซีน ภายใต้การกระตุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรด ในการทดลองนี้จะทำการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง TSA

4.3.1 ผลของปัจจัยเดี่ยว

ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียทั้งสามชนิดในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดซึ่งปราศจากปัจจัยที่ศึกษา (ตัวแปรควบคุม) ถูกแสดงในรูปที่ 4.6a และ 4.6b จากการทดลองพบว่า อาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดสามารถสนับสนุนการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *S. aureus* ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* สุดท้ายมีค่าลดลงต่ำกว่าจำนวนเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB อย่างมีนัยสำคัญ

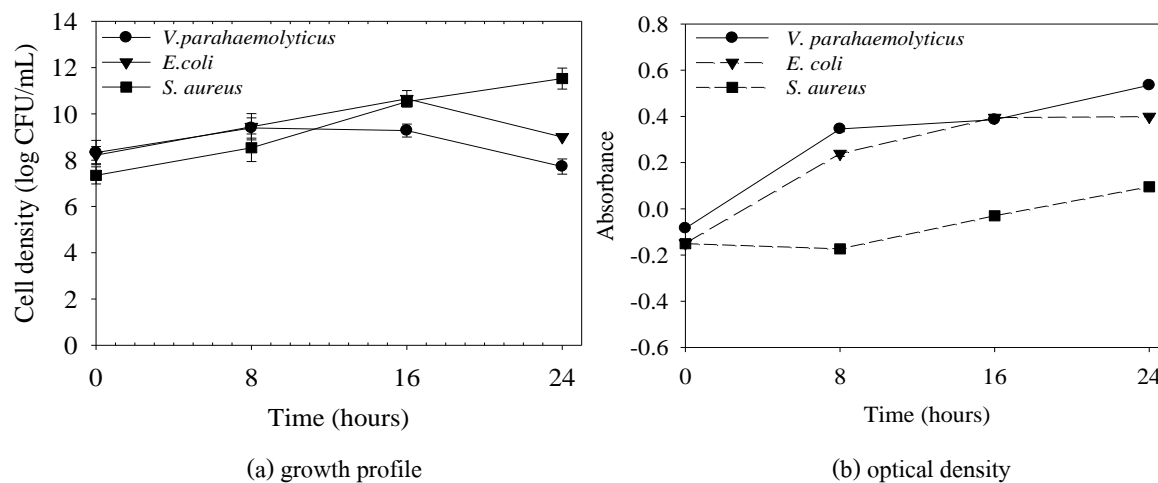
ในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง เนื่องจากการสร้างกรดของแบคทีเรีย จากนั้นแบคทีเรียที่สามารถใช้ไลซีนได้จะสร้างคาตาเวอรินและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้ความเป็นด่างของอาหารมากขึ้น และเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีชมพู



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของสีจากผลของปัจจัยต่างๆที่ศึกษาและแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด

(รูปที่ 4.5a) เมื่อครบเวลาการเพาะเลี้ยงพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของ *V. parahaemolyticus* จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหลังจากบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถใช้ไลซีนและเปลี่ยนสีอาหารจากส้มไปเป็นสีชมพูได้โดยใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ อย่างไรก็ตาม *E. coli* ก็สามารถผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase ได้เช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus*

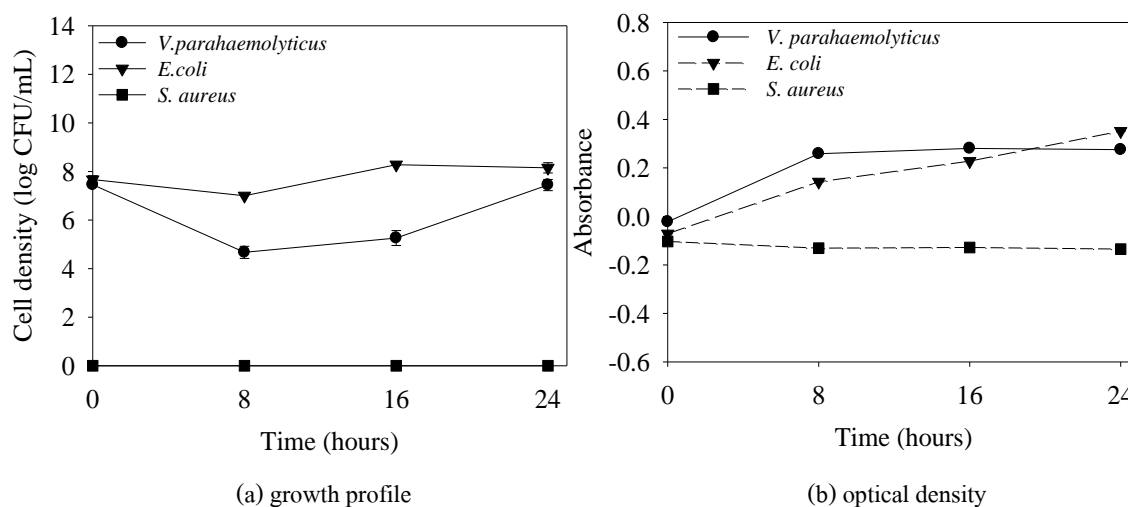
กระบวนการย่อยไลซีนในแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นไปอย่างเชื่องช้าซึ่งสรุปได้จากการที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อช้ากว่าในแบคทีเรียอีก 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bermudez และคณะ (2012) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกจะใช้กรดอะมิโนไลซีนได้ช้ากว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ



รูปที่ 4.6 ลักษณะการเจริญและค่าการคูณคลิ่นแสงของแบคทีเรียคั้นแบบ (*V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *S. aureus*) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด โดยปราศจากสารคัดเลือก เกลือ และความ เป็นด่าง (ตัวแปรควบคุม)

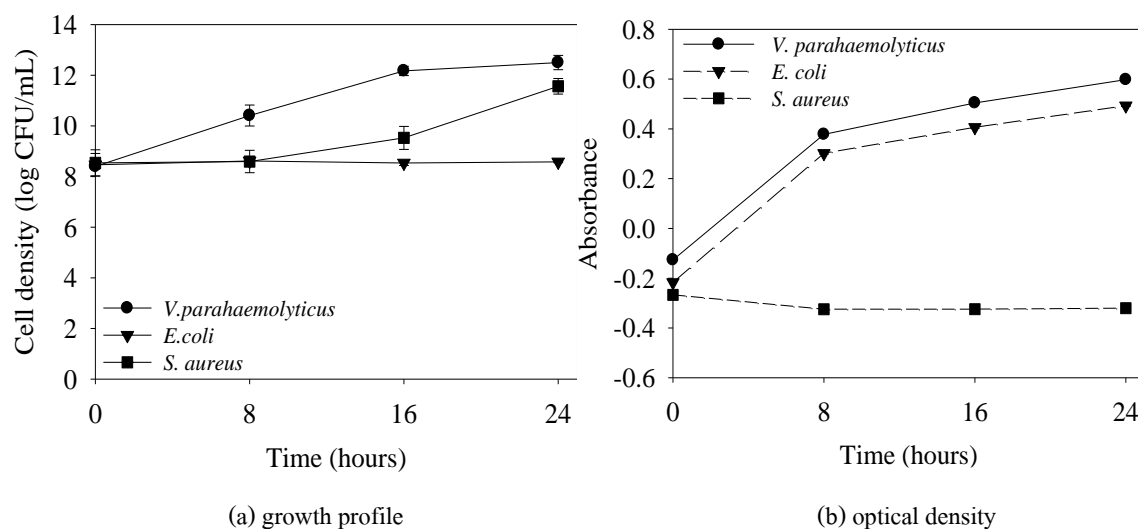
การใช้สารคัดเลือกในการทดลองก่อนหน้า (preliminary) พบว่าการใช้ polymyxin B sulfate 3 mg/L ควบคู่ กับ bile salt 0.3 g/L ประสบความสำเร็จในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ดังนั้นการใช้ สภาวะของสารคัดเลือกดังกล่าวในการทดลองนี้จึงช่วยในการหยุดการเจริญของ *S. aureus* ได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามที่สภาวะสารคัดเลือกนี้กลับทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ *V. parahaemolyticus* มากกว่า *E. coli* (รูปที่ 4.7a)

สำหรับผลการทดลองในส่วนของการเปลี่ยนแปลงค่าการคูณคลิ่นแสงพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของ *S. aureus* มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีส้มไปเป็นสีเหลืองเท่านั้นในขณะที่ *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* เปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู (รูปที่ 4.7b และ 4.5b) อย่างไรก็ตามการใช้สภาวะสารคัดเลือกดังกล่าวพบว่าไม่ สามารถคัดแยก *V. parahaemolyticus* ออกจาก *E. coli* ได้ด้วยระบบ lysine decarboxylase



รูปที่ 4.7 ลักษณะการเจริญและค่าการคูณคลิ่นแสงของแบคทีเรียคั้นแบบ (*V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *S. aureus*) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด ที่ผสมสารคัดเลือก (polymyxin B sulfate 3 mg/L และ bile salt 0.3 g/L)

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของเกลือสูงนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการชะลอการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* (รูปที่ 4.8a) ในอาหารเหลวที่มีเชื้อ *S. aureus* จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง แต่สีของอาหารของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* จะเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.8b) อย่างไรก็ตาม การยับยั้งเชื้อ *E. coli* สามารถใช้ประโยชน์จากสารไลซีนในขณะที่เชื้อ *S. aureus* ไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดได้เลย (รูปที่ 4.5c)

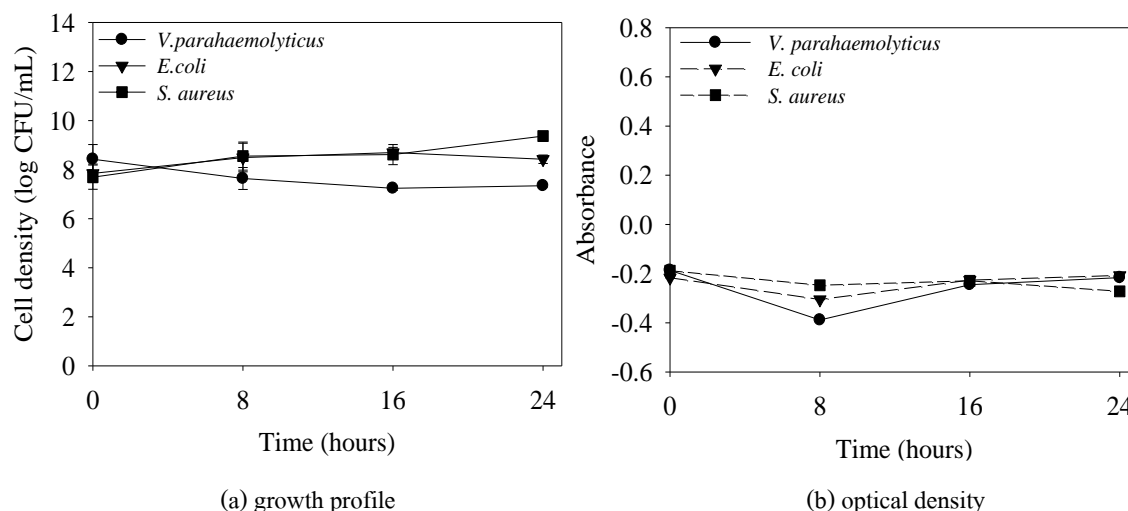


รูปที่ 4.8 ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียต้นแบบ (*V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *S. aureus*) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด ที่ผสมเกลือร้อยละ 3

ความเป็นด่างที่พีเอช 8.5 ไม่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด แต่ในสภาวะดังกล่าวพบปิดการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของไลซีน-ฟีนอลเรด (รูปที่ 4.9a) สีของอาหารเป็นสีชมพูในช่วงเวลาการบ่มเริ่มต้น การเกิดปฏิกิริยาของ lysine decarboxylase สังเกตได้ค่อนข้างยากหลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.9b)

ดังนั้น ความเป็นด่างเป็นสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ออกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น แต่ฟีนอลเรดไม่ใช่ระบบในอุดมคติที่สนับสนุนการบ่งชี้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดี เพราะสีของอาหารเหลวทั้งหมดยังคงเป็นสีชมพูตลอดระยะเวลาที่ทำการบ่ม (รูปที่ 4.5d)

จากการทดลองของ Tanaka และคณะ, 2008 พบว่าการใช้ระบบ lysine decarboxylase ในสภาวะกรดนี้ให้ผลอย่างมีประสิทธิภาพคั้งนั้นการใช้ระบบนี้ที่ pH 8.5 จึงให้ผลที่มีประสิทธิภาพมากคั้งแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.9 ลักษณะการเจริญและค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียคั้งแบบ (*V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *S. aureus*) ในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด กับความเป็นด่าง (พีเอช 8.5)

ความเข้มข้นของเกลือในอาหารเหลวที่สูงกว่าเป็นสารที่สำคัญในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน (Covert และ Woodburn, 1972) Whitaker และคณะ (2010) รายงานว่าการใช้เกลือความเข้มข้นร้อยละ 3 จะช่วยให้ *V. parahaemolyticus* เจริญในอาหารเหลว TSB ได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามแบคทีเรียก่อโรคนิโคอื่นยังสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นเกลือดั้งกล่าว

ทั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* สามารถฟื้นตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือในช่วงความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 5 ถึง 10 (Hajmeer และคณะ, 2006) ในอีกนัยหนึ่งความเข้มข้นของเกลือประมาณร้อยละ 0.85 และปริมาณทริปโตสที่มีความเข้มข้นต่ำมาก จะทำให้เชื้อ *S. aureus* ได้รับความอันตราย (Parfentjev และ Catelli, 1964)

สภาวะความเป็นด่างไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli* เพราะ *E. coli* สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่กว้างระหว่างพีเอช 3 ถึง 10.78 (Erdogrul และ Erbilir, 2005) ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นของเชื้อ *V.*

parahaemolyticus ที่เลี้ยงในอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรด ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว TSB ที่ผสมเกลือร้อยละ 3

ปรากฏการณ์นี้อาจมีผลมาจากสารคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายสารไลซีนและ สังกะสีสารคาตาเวอริน ซึ่งสนับสนุนในการทะลุผ่านของ bile salt ไปยังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งถูกรายงาน โดย King และคณะ (2003) และแนะนำโดย Begley และคณะ (2005)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์รูปแบบอาหารเหลวสีเพิ่มจำนวนให้มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารอย่างรวดเร็วและสามารถที่จะบอกได้ว่าควรที่จะทำการ reject ตัวอย่างเมื่ออาหารเหลวจำเพาะปรากฏการปนเปื้อนของเชื้อ หรือในกรณีที่อาหารเหลวจำเพาะให้ผลลบ ตัวอย่างดังกล่าวไม่จำเป็นที่จะต้องไปทำการทดสอบในอาหารแข็งต่อไป ทำให้โรงงานลดต้นทุนในการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์ที่ได้เพื่อประโยชน์และช่วยในการตัดสินใจ การประเมินเบื้องต้นของอาหารเหลวสีจำเพาะ 24 ชนิดได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างทั้งในอาหารและตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ข้อมูลการทดลองที่มีการเก็บมากมายอาจจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนเทคนิค นอกเหนือจากนั้นด้วย concept รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของสีในรูปแบบที่แตกต่างกันของเชื้อแต่ละชนิดได้ provide ให้เห็นผลที่เป็นประโยชน์เบื้องต้นของความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้จริงดังที่แสดงในงานวิจัยนี้

จากการทดลองพบว่าชุดอาหารเหลวสีจำเพาะ 24 อาหารมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารสำเร็จรูป (Finished food) เป็นอย่างดี โดยผลการทดลองให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับวิธีการที่เป็นมาตรฐาน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง นอกจากนี้ด้วยชุดอาหารเหลวสีจำเพาะที่นำเสนอสามารถให้ผลการวิเคราะห์ภายในเวลา 1 วัน จากวิธีปกติที่ใช้เวลา 2 – 3 วัน ช่วยลดเวลาการวิเคราะห์ส่งผลให้ช่วยตัดสินใจเกี่ยวกับกระบวนการผลิต นอกจากนี้ด้วยชุดอาหารเหลวสีจำเพาะ 24 อาหาร เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดจะให้ลักษณะปรากฏรูปแบบของ finger print ที่แตกต่างกัน สามารถนำมาใช้ในการบ่งบอกโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

ในการทดสอบประสิทธิภาพการ treat น้ำทะเลด้วยชุดอาหารเหลวสีจำเพาะพบว่าชุดทดสอบดังกล่าวให้ผลการทดสอบคุณภาพน้ำที่กรองได้สอดคล้องกับระบบการกรองน้ำซึ่งเป็นการใช้ filter ขนาด 0.3 μm ซึ่งที่ขนาดเมมเบรนดังกล่าวยังมีโอกาสที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผ่านออกมาได้ ส่งผลให้น้ำทะเลที่กรองได้มีปริมาณเชื้อระดับหนึ่ง (2.26 log CFU/ml) ทำให้อาหารเหลวสีจำเพาะให้ผลบวกในบางตัวอย่างอาหาร เช่น อาหารเหลวกลุ่มอะมิโน

นอกจากนี้ประโยชน์ของชุดอาหารเหลวสีจำเพาะยังสามารถนำไปใช้กับโรงงานอุตสาหกรรมอาหารกระป๋องหรืออาหารที่จำเป็นต้องมีการ Sterilized ชุดทดสอบดังกล่าวสามารถใช้ทดสอบว่าผลิตภัณฑ์มีการฆ่าเชื้อสมบูรณ์หรือไม่โดยไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบเชื้อเป้าหมาย เช่น *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhi* หรือเชื้ออื่นๆ ที่ต้องใช้อาหารจำนวนมากและหลายขั้นตอน ด้วยชุดอาหารเหลวสีจำเพาะ 24 อาหารจะสามารถบ่งบอกได้ว่าผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อสมบูรณ์หรือไม่ โดยตัวอย่างอาหารที่ทำทดสอบจะต้องให้ผลเป็นลบ (negative) ทั้งหมด นอกจากนี้ในการทดลองยังได้พัฒนาอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการบ่งชี้การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยจากการศึกษาการยับยั้งของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ด้วยสารยับยั้งชนิดต่างๆ พบว่าอาหารเหลวไลซีน-ฟีนอลเรดที่มีสารยับยั้งมีแนวโน้มช่วยเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2538, รายงานประจำปี 2537, โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, หน้า 177
2. กองวิจัยสินค้าและการตลาด กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2534, รายงานการค้าทะเลแช่แข็งเพื่อการส่งออก, หน้า 1
3. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2001, การแพร่กระจายของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในทะเลสาบสงขลา [online], Available <http://www.clib.psu.ac.th/acad41/pnua2.htm> [19 มีนาคม 2544]
4. วันทนี วัฒนาสุรกิตต์, 2545, "อาหารเป็นพิษ", รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำเดือน, ปีที่ 33, ฉบับที่ 3, หน้า 92-95.
5. Abdeldaim, G.M. and Herrmann, B., 2013, "Pcr Detection of Haemophilus Influenzae from Respiratory Specimens", **Methods Mol Biol**, Vol. 943, No., pp. 115-23.
6. 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.
7. Anonymous, 2009, **Polymyxin B Sulfate**, [online], Available: http://www.lookchem.com/product_593/Polymyxin-B-sulfate-price.html [3 March 2013].
8. 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.
9. Ball, D.W., Hill, J.W. and Scott, R.J., 2013, **The Basic of General Organic and Biological Chemistry**, [online], Available: http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/2547?e=gob-ch17_s04 [3 March 2013].
10. Baumann, P. and Schubert, R.H.W., 1984, "Family Ii. *Vibrionaceae*", In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N.R. and JG, J.G.H., Williams & Wilkins Co. , Baltimore, London, pp 516-550.
11. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* 1999;36:215-25.

12. Bhathena, Z.P. and Doctor, T.R., 1995, "Suitability of enrichment broths for the recovery of *Vibrio parahaemolyticus* from prawns caught off Bombay coast", *Journal of Food Science*, Vol. 32, No. 4, pp. 295-300.
13. Brook, I., 1989, "Aerobic and Anaerobic Microbiology of Biliary Tract Disease", *J Clin Microbiol*, Vol. 27, No. 10, pp. 2373-5.
14. Cabello, F.C., Espejo, R.T., Hernandez, M.C., Rioseco, M.L., Ulloa, J. and Vergara, J.A., 2007, "*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Epidemic Diarrhea, Chile, 2005", **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 13, No. 4, p. 656.
15. Ceccarelli, D., Spagnoletti, M., Cappuccinelli, P., Burrus, V. and Colombo, M.M., 2011, "Origin of *Vibrio cholerae* in Haiti", **The Lancet Infectious Diseases**, Vol. 11, No. 4, p. 262.
16. Centers for Disease Control and Prevention, 2006, ***Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish**, [online], Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5531a5.htm> [19 January 2013].
17. Chai, T.J. and Pace, J., 1994, *Food Disease Handbook: Disease Caused by Bacteria*, Marcell Dekker, New York, p. 397.
18. Chang, T.C., Chen, C.H. and Chen, H.C., 1994, "Development of a latex agglutination test for the rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus*", *Journal of Food Protection*, Vol. 57, No. 1, pp. 31-36.
19. Chatterjee, A., Chaudhuri, S., Saha, G., Gupta, S. and Chowdhury, R., 2004, "Effect of Bile on the Cell Surface Permeability Barrier and Efflux System of *Vibrio cholerae*", **J Bacteriol**, Vol. 186, No. 20, pp. 6809-14.
20. Chen, H.C. and Chang, T.C., 1996, "Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters by Immunofluorescence Microscopy", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 29, No. 2-3, pp. 311-319.
21. Chen, C.H. and Chang, T.C., 1992, "An enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*", *Journal of Food Protection*, Vol. 58, No. 8, pp. 873-878.

22. Chin, J., 2000, "Control of Communicable Diseases Manual: An Official Report of the American Public Health Association", American Public Health Association, pp 624.
23. Cliver, D.O., Potter, M. and Riemann, H.P., 2011, "Foodborne Infections and Intoxications", Elsevier Science, Spain, pp.
24. Chun, D., Chung, J.K. and Seol, S.Y., 1974, "Enrichment of *Vibrio parahaemolyticus* in a Simple Medium", **Appl Microbiol**, Vol. 27, No. 6, pp. 1124-6.
25. Dack, G.M., 1960, "Food Poisoning: Food-Borne Infection and Intoxication", **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, Vol. 50, No. 6/1, p. 906.
26. Davies, A.R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J.E. and Kirby, R.M., 2001, "Incidence of Foodborne Pathogens on European Fish", *Food Control*, Vol. 12. No. 2, pp. 67-71.
27. Dewberry, E.B., 1959, "Food Poisoning; Food-Borne Infection and Intoxication, Nature, History, and Causation: Measures for Prevention and Control", Leonard Hill Books Limited, pp 411.
28. DePaola, A., Hopkins, L.H., Peeler, J., Wentz, B. and McPhearson, R.M., 1990, "Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal Waters and Oysters", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 56, No. 8.
29. Dion, P., Charbonneau, R. and Thibault, C., 1994, "Effect of Ionizing Dose Rate on the Radioresistance of Some Food Pathogenic Bacteria", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 40, No. 5, pp. 369-374.
30. Doyle, P., 1989, "Foodborne Bacterial Pathogens", In *Vibrio parahaemolyticus*, Marcel Dekker Incorporated, pp 796.
31. Doyle, M.P. (Ed.), 1989, Foodborne Bacterial Pathogen, Marcel Dekker, New York, p.544.
32. Elliot, E.L., Kaysner, C.A. and M.L.Tamplin, 1992, "*V. Cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp.", In **Bacteriological Analytical Manual**, 7, Association of Official Analytical Chemists International, Virginia, pp 111-141.
33. Entis, P., 2002, **Food Microbiology: The Laboratory**, Food Processors Institute, USA, Pages.

34. 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.
35. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988, Food Microbiology, 4th, (eds.), Mc Graw – Hill, Singapore. p. 484
36. Fry, B.A., 1957, "Basic Triphenylmethane Dyes and the Inhibition of Glutamine Synthesis by *Staphylococcus aureus*", **J Gen Microbiol**, Vol. 16, No. 2, pp. 341-9.
37. Flores, C., Maguilnik, I., Hadlich, E. and Goldani, L.Z., 2003, "Microbiology of Choledochal Bile in Patients with Choledocholithiasis Admitted to a Tertiary Hospital", **J Gastroenterol Hepatol**, Vol. 18, No. 3, pp. 333-6.
38. Frick, O.T., 2009, **Standard Ultramarine and Color Company Huntington, West Virginia**, [online], Available: <http://www.colorantshistory.org/StandardUltramarine.html> [3 March 2013].
39. Fry, B.A., 1957, "Basic Triphenylmethane Dyes and the Inhibition of Glutamine Synthesis by *Staphylococcus aureus*", **J Gen Microbiol**, Vol. 16, No. 2, pp. 341-9.
40. Gaulin, C., Ramsay, D. and Bekal, S., 2012, "Widespread Listeriosis Outbreak Attributed to Pasteurized Cheese, Which Led to Extensive Cross-Contamination Affecting Cheese Retailers, Quebec, Canada, 2008", **J Food Prot**, Vol. 75, No. 1, pp. 71-8.
41. Ghosh, A.R. and Sehgal, S.C., 1998, "Haemolysin Production by Environmental Isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from Andamans", *Indian Journal of Medical Research*, Vol. 107, No. ARR, pp. 151-154.
42. Gooch, J.A., DePaola, A., Kaysner, C.A. and Marshall, D.L., 2001, "Evaluation of two direct plating methods using nonradioactive probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 2, pp. 721-724.
43. Hagen, C.J., Sloan, E.M., Lancette, G.A., Peeler, J.T. and Sofos, J.N., 1994, "Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Various Seafoods with Two Enrichment Broths", **Journal of Food Protection**, Vol. 57, No. 5, pp. 403-409.

44. Hara-Kura, Y., Nishina, T., Hiroshi Nakgawa, Hirotaka Konuma, Junko Hasegawa and Susumu Kumagai, 2001, "Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67. No. 12, pp. 5819 – 5823.
45. Horwitz, M.A. and Ganagarosa, E.J., 1976, "Foodborne Disease Outbreaks Traced to Poultry", **Journal of Milk Food Technology**, Vol. 39, No., pp. 859-63.
46. Hui, Chen, C. and Chang, T.C., 1996, "Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters by immunofluorescence microscopy", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 29, No. 2-3, pp. 311-319.
47. Humada D, Higurashi T, Mayanagi K, Miyata T, Fukui T, Lida T, et al. Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle X-ray scattering and electron microscopy. *J Mol Biol* 2007;365:187-95.
48. International Commission on Microbiological Specification for Foods, 1996, *Microorganisms in Food: Microbiological Specification of Food Pathogen*, Blackie Academic and Professional, London, p. 429.
49. ISO, 2007, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of Potentially Enteropathogenic *Vibrio* Spp. Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae**. the International Organization for Standardization, Switzerland, Vol. ISO/TS 21872-1:2007(E).
50. ISO/TS 21872. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.* 2007.
51. Jackson, H., 1973, "Temperature Relationships of *Vibrio parahaemolyticus*", *International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus**, Saikon, September 17-18, Tokyo, Japan, pp. 139-145.
52. Jensen, R.V., Depasquale, S.M., Harbolick, E.A., Hong, T., Kernell, A.L., Kruchko, D.H., Modise, T., Smith, C.E., McCarter, L.L. and Stevens, A.M., 2013, "Complete Genome Sequence of Prepandemic *Vibrio parahaemolyticus* Bb22op", **Genome Announc**, Vol. 1, No. 1.

53. Jiang, X. and Chai, T.J., 1996, "Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low Temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of Viable, Nonculturable cells", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 4, pp. 1300-1305.
54. Kaysner, C.A. & DePaola, A. (2004). *Vibrio. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 9*. Arlington, VA: U.S. Food and Drug Administration.
55. Kaysner, C.A., Ablylyta, C.J.R., Jinneman, K.C. and Hill, W.E., 1994, "Enumeration and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* by DNA-DNS colony hybridization using the hydrophobic grid membrane filtration technique for isolation", *Journal of Food Protection*, Vol. 57, No. 2, pp. 163-165.
56. Koch, W.H., Payne, W.L., Wentz, B.A. and Cebula, T.A., 1993., "Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholera* in food", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 2, pp. 556-560.
57. Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. and Nishibuchi, M., 1999, "Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to *toxR* gene", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, No. 4, pp. 1173-1177.
58. Koga, T. and Takumi, K., 1995, "Nutrient Starvation Induces Cross Protection Against in *Vibrio parahaemolyticus*", *Microbiology and Immunology*, Vol. 39, No. 3, pp. 213-215.
59. Lee, C., Chen, H.H., Liu, M.L. and Su, Y.C., 1992, "Use of an oligonucleotide probe to detect *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated oyster", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 10, pp. 3419-3422.
60. Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O. and Zhang, Q., 2003, "Critical Role of Multidrug Efflux Pump Cmeabc in Bile Resistance and in Vivo Colonization of *Campylobacter jejuni*", **Infect Immun**, Vol. 71, No. 8, pp. 4250-9.
61. Liston, J., 1990, "Microbial Hazards of Seafood Consumption", **Food technology**, Vol. 44, No. 12, pp. 58-62.

62. Lund, B., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W., 2000, **Microbiological Safety and Quality of Food**, Aspen, USA., Pages.
63. Mac, F.F., 2000, Biochemical test for identification of Medical Bacteria, Lippincoll Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 701-702.
64. Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K. and Pal, U.K., 2011, "Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview", **Am J Food Technol**, Vol. 6, No., pp. 87-102.
65. McCarter, L.L., 2001, "Polar flagellar motility of the Vibrionaceae ", *Microbiology and Molecular Biology: MMBR*, Vol. 65, No. 3, pp. 445-465
66. Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. and McMeekin, T.A., 1997, "Development and Evaluation of a Predictive Model for the Effect of Temperature and Water Activity on the Growth Rate of *Vibrio parahaemolyticus*", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 38, No. 2-3, pp. 133-142.
67. Ministry of Health, Labor and Welfare. (2004). Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation (Microbe Edition, 2004). Japan Food Hygiene Association, Tokyo, 201-224, 637-639, (in Japanese).
68. Mills, B., 2013, **Sodium Dodecyl Sulfate**, [online], Available: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---S/Sodium-Dodecyl-Sulfate.htm> [19 March 2013].
69. Miyamoto, T., Miwa, H. and Hatano, S., 1990, "Improve fluorogenic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 5, pp. 1480-1484.
70. Muntada-Garriga, J.M., Rodriguer-Jerez, J.J., Lopez-Sabater, E.I., Mora-Ventura, M.T., 1995, "Effect of Chill and Freezing Temperatures on Survival of *Vibrio parahaemolyticus* Inoculated in Homogenates of Oyster Meat", *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 20, No. 4, pp. 225-227.
71. Nakasone, N., Insisengmay, S. and Iwanaga, M., 2000, "Characterization of the Pili Isolate from *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6", *The Southeast Asia Journal of Tropical Medicine and Public Health*, Vol. 31, No. 2, pp. 360-365.

72. O'Brien, M. and Colwell, R., 1985, "Modified Taurocholate-Tellurite-Gelatin Agar for Improved Differentiation of *Vibrio* Species", **J Clin Microbiol**, Vol. 22, No. 6, pp. 1011-3.
73. Okuda J, Ishbashi M, Abbott SL, Janda JM, Nishibushi M. Analysis of the thermostable direct hemolysis (*tdh*) genes and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* 1997;35:1965-77.
74. Onyekaba, C.O. and Njoku, H.O., 1986, "Bacteria and Helminth Isolates from Bile and Faeces of Zebu Cattle Slaughtered for Human Consumption in the Niger Delta Areas of Nigeria", **Ann Trop Med Parasitol**, Vol. 80, No. 4, pp. 421-4.
75. Oliver, J.D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L.M., Siebeling, R. and Morris, J.G., Jr., 1992, "Use of Colistin-Polymyxin B-Cellobiose Agar for Isolation of *Vibrio vulnificus* from the Environment", **Appl Environ Microbiol**, Vol. 58, No. 2, pp. 737-9.
76. Oliver, J.D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L.M., Siebeling, R. and Morris,
77. Pace, J.L., Chai, T.J., Rossi, A.H. and Jing, X., 1997, "Effect of Bile on *Vibrio parahaemolyticus*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 6, pp. 2372-2377.
78. Schmidt, R.H., Goodrich, R.M., Archer, D.L. and Schneider, K.R., 2003, General Overview of the Causative Agents of Foodborne Illness. **Food Science and Human Nutrition Department, Florida Cooperative Extension Service**. University of Florida, USA., Vol. 33.
79. Suthienkul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M. and Honda, T., 1995, "Urease Production Correlates with Possession of the *trh* Gene in *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated in Thailand", *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 172, No. 5, pp. 1405-1408.
80. Swanson, K.M.J., 1996, "*Vibrio parahaemolyticus*", In **Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens**. (ICMSF), I.C.o.M.S.f.F., Springer, London, pp 426-435.
81. Tamplin, M.L., 2001, "Coastal Vibrios: Identifying Relationship between Environmental Condition and Human Disease ", *Human and Ecological Risk Assessment*, Vol. 7, No. 5, pp. 1437-1445.

82. Taylor, D.E., 1999, "Bacterial Tellurite Resistance", **Trends Microbiol**, Vol. 7, No. 3, pp. 111-5.
83. Thanassi, D.G., Cheng, L.W. and Nikaido, H., 1997, "Active Efflux of Bile Salts by *Escherichia coli*", **J Bacteriol**, Vol. 179, No. 8, pp. 2512-8.
84. Twedt, R.M., Spaulding, P.L. and Hall, H.E., 1969, "Morphological, Cultural, Biochemical, and Serological Comparison of Japanese Strains of *Vibrio parahaemolyticus* with Related Cultures Isolated in the United States", **Journal of bacteriology**, Vol. 98, No. 2, pp. 511-518.
85. Velkinburgh, J.C. and Gunn, J.S., 1999, "Phop-Phoq-Regulated Loci Are Required for Enhanced Bile Resistance in *Salmonella* spp.", **Infect Immun**, Vol. 67, No. 4, pp. 1614-22.
86. Walker, J.R., Shafiq, N.A. and Allen, R.G., 1971, "Bacterial Cell Division Regulation: Physiological Effects of Crystal Violet on *Escherichia coli* Lon + and Lon - Strains", **J Bacteriol**, Vol. 108, No. 3, pp. 1296-303.
87. Wamnes, J., 2011, Outbreak at the Okeechobee Correctional Institution Lyda, S. Food and Waterborne Disease Program, USA., Vol. February 2011.
88. Wells, A.F., 2013, **Tellurate**, [online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tellurate> [2 March 2013].
89. Wong, H.C., Chenb, M.C., Liua, S.H. and Liuc, D.P., 1999, "Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood Imported from Asian Countries", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 52, No. 3, pp. 181-188.
90. Wright, A.C., Miceli, G.A., Landry, W.L., Christy, J.B., Watkins, W.D. and Morris, J.R., 1993, "Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on non-selective media with an alkaline phosphatase-labeled oblongonucleotide probe", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 59, No. 2, pp. 541-546.
91. Yok, M., Kawakami, N., Funakoshi, Y., Oskada, K. and Honda, T., 1995, "Evaluation of two assay kits for thermostable direct hemostable (TDH) produced by *Vibrio parahaemolyticus*", **Microbiology and Immunology**, Vol. 39, No. 2, pp. 157-159.

ผลผลิต (Output)

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

1.1 Wipavadee Sangadkit, Juthamas Khueankhancharoen, Anat Deepatana, and Aluck Thipayarat, 2018, “Biochemical fingerprints of foodborne pathogens for rapid industrial detection routine”, Food Innovation Asia Conference 2018 Creative Food for Future and Sustainability (Fostat 2018), pp. 466 – 474, June 14 – 16, 2018, BITEC, Bangkok, Thailand.

2. การจดสิทธิบัตร

-

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

ชุดอาหารเหลวจำเพาะสีร่วม (Multiplexed colorimetric enrichment media) มีการนำไปทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างน้ำบ่อกึ่ง บริษัทสุชาติฟาร์มเพื่อการตรวจสอบคุณภาพน้ำที่ใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งลูกปลา นอกจากนี้ชุดอาหารเหลวจำเพาะดังกล่าวยังได้มีการผลิตออกมาในรูปแบบเชิงพาณิชย์ เพื่อนำไปจำหน่ายแก่ภาครัฐกิจหรือบุคคลทั่วไปที่สนใจนำไปใช้งาน



4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย สามารถเป็นแนวทางต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคนิโคอื่น ช่วยลดต้นทุนการนำเข้าชุดทดสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ สามารถนำผลงานดังกล่าวไปประยุกต์ใช้จริงในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐต่างๆ

ประวัติคณะผู้วิจัย

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