18755

ผลของค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลล่าในแหนมที่จำหน่ายในตลาดหัวตะเข้(Effect of pH and lactic acid on Samonella in Nham sold in Hua Takhe)

T099561

โดย

นางสาวแดนสวรรค์ พึ่งเจริญ รหัสประจำตัว 44045046

นางสาวพวงเพ็ญ พานิชรักษาพงศ์ รหัสประจำตัว 44045053

โครงการคณะอุสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ.2545

ปพ.
ด951ผ
2545
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99561
วัน.เดือน.ปี.....16 JUN 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม ที่จำหน่ายในตลาดหัวตะเข้

(Effect of pH and lactic acid on Samonella in Nham sold in Hua Takhe)

โดย

นางสาวแดนสวรรค์ พึ่งเจริญ รหัสประจำตัว 44045046

นางสาวพวงเพ็ญ พานิชรักษาพงศ์ รหัสประจำตัว 44045053

ได้รับการพิจารณาจาก

..... ๑ ๑ **...../...../.....อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แดนสวรรค์ พึ่งเจริญ , พวงเพ็ญ พานิชรักษาพงศ์ . ผลของค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในตลาดหัวตะเข้ (Effect of pH and lactic acid on Salmonella in Nham sold in Hua Takhe) . ภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในท้องที่หัวตะเข้และตลาดอุดมผลจำนวน 14 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบค่าพีเอช ปริมาณแลคติกที่มีผลต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา พบว่าที่ค่าพีเอชสูงกว่า 4.5 มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.1-1.6 ตรวจพบซาลโมเนลลามากกว่าแหนมที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 ปริมาณกรดแลคติก 1.7-2.3 ในปริมาณร้อยละ 21.42 และ 14.28 ตามลำดับ การเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective plating medium ที่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม โดยนำเชื้อจากตัวอย่างแหนมที่ทำการเพาะเลี้ยงใน salmosyst broth base แล้วทำการเขี่ยเชื้อลงเลี้ยงในอาหารแข็ง 4 ชนิด พบว่าการใช้อาหารแข็ง Modifiled semisolid rapaport vassiliadis(MSRV) , Rambach(RAM) Agar , Xylose-lysine-deoxycholate(XLD)Agar ให้ผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาได้ดีกกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hetoen (HE) Agar ซึ่งการใช้ salmosyst procedure ควบคู่กับการใช้ MSRV , RAM , XLD และ HE ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม จะให้ผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาดีกว่าเพราะการใช้อาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อมากกกว่า 1 ชนิด จะให้ผลการตรวจพบชนิดเซโรวาร์ของเชื้อซาลโมเนลลาได้มากกว่าการใช้อาหารแข็งเพียงชนิดเดียว การศึกษานี้ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมรวม 5 ตัวอย่าง(ร้อยละ 35.71) เซโรวาร์ที่พบมากที่สุด *S.* Agona รองลงมาได้แก่ *S.* Anatum และ *S.* Stanley ตามลำดับ

(นางสาวแดนสวรรค์ พึ่งเจริญ)

(นางสาวพวงเพ็ญ พานิชรักษาพงศ์)
ลายมือชื่อนักศึกษา

(ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์)
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

/ /
วัน / เดือน / ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง ผลของค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในตลาดหัวตะเข้ สำเร็จได้ด้วยดี ผู้จัดทำขอขอบพระคุณท่าน ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และกรุณาสละเวลาอันมีค่าคอยให้คำปรึกษาและแนะนำในทุกเรื่อง รวมทั้งแก้ไขรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่คอยแนะนำและช่วยให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการศึกษา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยให้ความช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์และ เปิด-ปิด ห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ช่วยให้กำลังใจมาโดยตลอด

นางสาวแดนสวรรค์ พึ่งเจริญ

นางสาวพวงเพ็ญ พานิชรักษาพงศ์

16 ธันวาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	3
- สักษณะทั่วไปของเชื้อซาลโมเนลลา	3
- Antigenic structure	4
- Toxin ของเชื้อซาลโมเนลลา	4
- โรคที่เกิดจากเชื้อซาลโมเนลลา	5
- การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักแหนม	6
- การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาโดยวิธีSalmosyst procedureและวิธีมาตรฐาน	6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	8
บทที่ 4 ผลการทดลอง	12
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	17
ประวัติผู้เขียน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่1 แสดงผลของปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอดTSI agar , LIM medium ของเชื้อซาลโมเนลลา 10

ตารางที่2 แสดงผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาที่ค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกที่ต่างกัน 12

ตารางที่3 แสดงการเปรียบเทียบ ชนิดของ Selective plating medium ในการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา13

ตารางที่4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อHEKTOEN Agar 19

ตารางที่5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Agar 21

ตารางที่6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อRAMBACH® Agar 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1-3_ ลักษณะแหนมที่สุ่มตรวจ	8
รูปที่ 4 แสดงลักษณะของซาลโมเนลลาบนอาหาร Hektoen agars	19
รูปที่ 5 แสดงลักษณะของซาลโมเนลลาบนอาหาร XLD agars	21
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของซาลโมเนลลาบนอาหาร RAM agars	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แหนมเป็นอาหารพื้นเมืองของไทย ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทางภาคเหนือ ซึ่งปัจจุบันนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ปกตินิยมบริโภคหลังจากการหมักผ่านไป 3-4 วัน ของการหมักเองตามธรรมชาติ จะส่งผลกระทบให้เกิดเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมได้ เพราะในแหนมจะมีเนื้อหมูเป็นส่วนผสมหลักและเมื่อซาลโมเนลลาปนเปื้อนในหมูจากขั้นตอนฆ่าตัดแต่งซากที่ไม่ถูกสุขลักษณะ จึงหลีกเลี่ยงไม่ได้เลยที่จะทำให้ซาลโมเนลลาปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์

ในแหนมจะมีส่วนผสมของเนื้อหมู หนังหมู หรือหูหมู เกลือ Nitrate หรือ Nitrite กระเทียมสด และข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวสุก จากนั้นคลุกเคล้าส่วนผสม อัดให้แน่นในถุงพลาสติก จากนั้นกิจกรรมการหมักจะเกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เช่น *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ที่มากับส่วนผสมแหนม เช่น หมู กระเทียม เป็นต้น จะเจริญและสร้างกรดแลคติกแล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์แหนม จากการทดลองได้ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาเซโรไทป์ต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในแหนมที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก(อดิศร,2533)ในช่วง 0-5 วัน ถึง 16 เซโรไทป์ และพบว่า *S.* Derby เป็นเซโรไทป์ที่ตรวจพบมากที่สุดในการทดลองนี้ 20.59% ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ สุขใจ(2525) และ Phan-Urai(1978) แต่ *S.* Anatum และ *S.* Krefeld พบรองลงมาคือ 17.65%และ14.72%ตามลำดับ และจากการทดลองของ อดิศร เสวตวิวัฒน์ และอรุณ บ่างตระกูลนนท์ (2539) จากการตรวจเชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมพร้อมบริโภคที่จำหน่ายตามท้องตลาด และห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยวิธี Salmosyst procedure และวิธีมาตรฐานพบว่า Salmosyst Procedure ให้ผลการตรวจพบเชื้อสูงกว่าวิธีมาตรฐานที่ใช้ TTB และ SCB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment (ร้อยละ75และร้อยละ70 ตามลำดับ) นอกจากนั้น เซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่ตรวจพบโดยวิธี Salmosyst Procedure มีจำนวนมากว่าวิธีมาตรฐาน (ร้อยละ86.4และร้อยละ54.5 ตามลำดับ)ด้วยเช่นกัน การใช้Rambach (RAM) agarในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนล-ลาจะให้ผลการตรวจพบซาลโมเนลลาได้ดีกว่าการใช้ Salmonella-Shi-gella(SS) agar และ Xylose-lisine-Deoxycholate (XLD) agar ทั้งในด้านจำนวนตัวอย่าง และชนิดของเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่พบการใช้ Salmosyst Procedure ควบคู่กับการใช้ RAM agar ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนมจะให้ผลการตรวจเชื้อดีที่สุด แต่การใช้อาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดจะให้ผลการตรวจพบชนิดเซโรวาร์ของเชื้อซาลโมเนลลาได้มากกว่าการใช้อาหารแข็งเพียงชนิดเดียว การศึกษานี้ตรวจพบซาลโมเนลลาปนเปื้อนในแหนมรวม 30 ตัวอย่าง(ร้อยละ75) เซโรวาร์ของเชื้อที่พบมากที่สุดได้แก่ *S.* Derby(ร้อยละ80) รองลงมาได้แก่ *S.* Anatum(ร้อยละ63.3) และ *S.* Rissen(ร้อยละ56.7) ตามลำดับ ด้วยเหตุนี้การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในเขตหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะเข้เพื่อเป็นข้อมูลในการตรวจพบเชื้อในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวโดยวิธี Salmosyst Procedureรวมทั้งศึกษาผลของพีเอช และปริมาณกรดแลคติกต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาผลิตภัณฑ์แหนม และชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงในขั้นตอน Selective plating ที่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อซาลโมเนลลา

เชื้อซาลโมเนลลาจัดอยู่ใน แฟมิลี่ Enterbacterlaceae มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมสีติดแกรมลบไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยมี peritrichous flagella (ยกเว้น *Salmonella pullurum* และ *Salmonella gallinarum*) สามารถย่อยสลายกลูโคสได้กรดกับก๊าซ แต่ไม่ย่อยสลายแลคโตสหรือซูโครส การแยกชนิดโดยการใช้วิธีทาง serology เพราะเชื้อมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เชื้อซาลโมเนลลาจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 5-47 °ซ Aw ขั้นต่ำประมาณ 0.93-0.95 การทนความร้อนและผลกระทบที่มีปัจจัยต่าง ๆ ของสิ่งแวดล้อมในการเจริญจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์และชนิดของอาหาร เชื้อซาลโมเนลลามีค่า $D_{60°ซ}$ อยู่ในช่วง 0.06-11.3 นาที โดยทั่วไปเชื้อซาลโมเนลลาจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 66 °ซ นานอย่างน้อย 12 นาที

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อหลายสปีซีส์ สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งคนและสัตว์ เชื้อซาลโมเนลลาที่ทำให้เกิดโรคได้แก่ *S.* Typhi , *S.* Paratyphi , *S.* Enteritidis เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารแต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้านทานของผู้บริโภค ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ โรคของเชื้อและจำนวนเชื้อที่ผู้บริโภคได้รับ เช่น *S.* Pullorum จะต้องบริโภคเข้าไป 100 ล้านถึงล้านล้านเซลล์จึงจะทำให้เกิดโรคเมื่อเทียบกับ *S.* Enteritidis ที่ถูกบริโภคเข้าไปเพียงล้านเซลล์ก็ทำให้เกิดโรคได้แล้ว การเจริญของเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารมักทำให้เกิดลักษณะของอาหารเปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะเป็นกลิ่นหรือรส ดังนั้นถ้ามีเชื้อนี้อยู่ในอาหารมากเท่าใดก็จะทำให้ผู้บริโภคเกิดโรคติดเชื้อได้มากขึ้นและมีระยะฟักตัวเร็วขึ้น โดยที่ผู้บริโภคไม่สามารถทราบได้

เชื้อซาลโมเนลลามีความทนต่อสภาวะที่แช่แข็งและทนต่อสารเคมี เช่น brilliant green, sodium tetrathionate และ sodium deoxycholate ซึ่งสารเคมีเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของ Coliform bacilli

การจำแนกสปีซีส์ของซาลโมเนลลาใช้การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีและการทดสอบทาง antigen ของเซลล์ สำหรับการแยก strain ต่าง ๆ ในแต่ละสปีซีส์ อาจใช้วิธี Phage typhiing โดยใช้ specific bacteriophage ทำปฏิกิริยากับเซลล์ ถ้า specific กันจะทำไซลล์แตกสลายในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Antigenic Structure

1. Antigens : เซลล์ของซาลโมเนลลา ประกอบด้วย Antigen 3 ชนิดคือ

1.1 H-antigen (flagella antigen) ไม่ทนความร้อน กรด และแอลกอฮอล์เมื่อ treat formalin คุณสมบัติของ H- antigen ยังคงอยู่ไม่สูญเสีย เพราะฉะนั้นวิธีทดสอบทาง serology ของเชื้อทำได้โดยเติม formalin ลงใน broth culture ของซาลโมเนลลา แล้วเติม serum ที่มี anti–H antibody(IgG) ลงไป ถ้า specific กันจะเกิด agglutinating ของเซลล์ซาลโมเนลลา

H-antigen แต่ละสปีซีส์มี antigen ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ชนิดที่หนึ่งเป็น type-specipic เรียก phase 1 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะทางสปีซีส์หนึ่งเท่านั้น อีกชนิดเป็น group- species หรือเรียกว่า phase 2 พบได้ทั่วไปใน O - group ต่าง ๆ

1.2 O - antigen (somatic antigen) มีคุณสมบัติเหมือน O-antigen ของแบคทีเรียในจีนัสอื่น ๆ คือทนความร้อนทนกรดและแอลกอฮอล์ พบได้ทั้งในแบคทีเรียที่เคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่เพราะเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ เนื่องจากโครงสร้าง antigen ที่แตกต่างกันทำให้จัดเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้คือ group A, B, C...ถึง Z และ 51 ถึง 65 (รวมทั้งสิ้น 41 group) antigen แต่ละชนิดใช้เป็นตัวเลข 1 ถึง 65 แต่ละกลุ่มมี O- antigen ชนิดเดียวกันหรือหลายชนิด antibody ต่อ O-antigen เป็นชนิด IgM

1.3 Vi-antigen เป็นส่วนที่หุ้มรอบผนังเซลล์ เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค (virulence factor) พบได้ใน *S.* paratyphi C Vi-antigen O จะถูกทำลายโดยความร้อน 60 ° ซ นาน 1 ชั่วโมง โดยกรดและ phenol แบคทีเรียที่มี Vi-antigen เมื่อ transfer เชื้อบ่อย ๆ จะสูญเสีย antigen นี้ไป

2. variation : Salmonella อาจสูญเสีย H-antigen แล้วทำให้เชื้อไม่เคลื่อนไหว(nonmotile)ส่วนการสูญเสีย O-antigen ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ colony จาก smooth เป็น rough colony สำหรับ Vi-antigen อาจสูญเสียไปบางส่วนหรือสูญเสียหมดก็ได้ ซึ่งจะทำให้ความรุนแรงของเชื้อสูญเสียไปด้วย

Antigen ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวสามารถสูญเสียหรือรับเข้ามาได้โดยกระบวนการ transduction

3. Toxin ของเชื้อซาลโมเนลลา

เชื้อซาลโมเนลลาเช่นเดียวกับ gram-negative bacteria อื่น ๆ ที่ผนังเซลล์จะประกอบด้วย lipopolysacharide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น endotoxin จะถูกปล่อยออกจากเซลล์แตกทั้งนี้เพราะผู้ป่วยจะป่วยเนื่องจากการกินแบคทีเรียกลุ่มซาลโมเนลลาเข้าไปและมีการเจริญเติบโตในร่างกายของผู้รับเชื้อเข้าไปแล้วจึงผลิตสารพิษ endotoxin โดยที่สารพิษนี้จะเป็นต้นเหตุของความเจ็บป่วย จนทำให้เกิดอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า Salmonellosis อาการของ Salmonellosis ประกอบไปด้วยเวียนศีรษะ อาเจียน และท้องเดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการตายเนื่องมาจาก Salmonellosis นี้ โดยทั่ว ๆ ไปจะอยู่ในระดับต่ำ โดยที่ถึงตายส่วนใหญ่จะเป็นเด็กหรือผู้สูงอายุที่มีสุขภาพอ่อนแอมาก่อนแล้ว หรือมิเช่นนั้นก็เป็นโรคอย่างอื่นมาก่อนแล้ว

4. โรคที่เกิดจากเชื้อซาลโมเนลลา

ในคนแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ

Enteric fever

Gastroenteritis

Septicemia

1. Enteric fever หมายถึงไข้ typhoid และ paratyphoid ต้นเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Salmonella typhi* และ *Salmonella paratyphi* A , B และ C อาการที่เกิดจากเชื้อทั้ง 4 ชนิดนี้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แม้จะมีรายงานว่า paratyphoid มีอาการรุนแรงน้อยกว่า typhoid ก็ตามแต่ก็ไม่แน่นอนทุกราย

พยาธิกำเนิด ผู้ป่วยได้รับเชื้อโดยการกินอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีเชื้อปะปนอยู่ จำนวนเชื้อที่พอเกิดโรคได้ประมาณ 10^5 ตัว เมื่อผ่านกระเพาะอาหารเชื้อจะตายไปบ้าง ส่วนที่เหลือเมื่อถึงลำไส้เล็กจะเข้าสู่ lymphoid tissue ของผนังลำไส้และต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้นจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นมากในระยะเวลาประมาณ 7-20 วัน (เท่ากับระยะฟักตัว) เชื้อจะผ่านทางหลอดน้ำเหลืองและ thoracicduct เข้าสู่กระแสโลหิตไหลผ่านอวัยวะต่างๆ จะพบเชื้อในปอด ตับ ม้าม ถุงน้ำดี ไขกระดูก ระยะที่เชื้อเริ่มเข้าสู่กระแสโลหิตจะมีเชื้อจำนวนหนึ่งตาย และปล่อย endotoxin ออกมากระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้เกิด endogenous pyrogen ก่อให้เกิดอาการไข้ การทำให้เกิดโรคโดย *Salmonella typhi* เป็นแบบ intracellula parasitic investion ดังนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนของ reticuloendothelial cell จำนวนมากในตับและม้าม ทำให้อวัยวะดังกล่าวมีขนาดโตขึ้น

เนื่องจากน้ำดีเป็นปัจจัยอย่างดี ช่วยในการเจริญของ *Salmonella typhi* จึงพบเชื้อที่ถุงน้ำดี เชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นและไหลออกมากับน้ำดีลงสู่ลำไส้เล็ก ก่อการอักเสบเพิ่มเติมที่ Peyer's patch มีเลือดออกหรือผนังลำไส้ทะลุ

ส่วนที่กระแสโลหิตเมื่อผ่านไต เชื้อจะออกทางปัสสาวะ ผู้ป่วยบางรายเชื้อไปทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ปอด หรือที่กระดูก

2. Gastroenteritis หรือ Salmonella food poisoning หลังจากที่กินอาหารซึ่งมีเชื้อปนอยู่เชื้อจะไปทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่ ระยะฟักตัวอยู่ระหว่าง 8-48 ชั่วโมง (นานกว่า food

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

poisoning ที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus*) ผู้ป่วยจะเกิดอาการไข้หนาวสั่น คลื่นไส้ อุจจาระร่วง ในรายที่ไม่รุนแรงโรคจะหายได้เองใน 2-4 วัน แต่ยังคงตรวจพบเชื้อในอุจจาระร่วงในรายที่ไม่รุนแรง โรคจะหายได้เองใน 2-4 วัน แต่ยังคงตรวจพบเชื้อในอุจจาระได้นานถึง 3-4 สัปดาห์

3. Septicemia เชื้อจะเข้าสู่กระแสโลหิต ส่วนอาการจะเป็นเช่นเดียวกับ Septicemia ที่เกิดจาก gram-negative อื่นๆ ผลจากภาวะ Septicemia จะก่อให้เกิดอาหารอักเสบที่อวัยวะต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ สำหรับเชื้อที่พบบ่อยทำให้เกิด Septicemia คือ *Salmonella cholerasuis*

5. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์แหนม

แบคทีเรียแลคติกเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่พึงประสงค์ เช่น รสเปรี้ยว การเกิดสีชมพู เนื้อแน่น และมีกลิ่นเฉพาะที่ไม่พบในอาหารชนิดอื่น ๆ ซึ่งการผลิตกรดแลคติกออกมานี้จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกับกรดแลคติกเป็นร้อยละ 0.5-10. และ มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.45-4.55(ไพโรจน์ 2538)

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างหรือความเป็นกรดทั้งหมดของแหนม จะเป็นดัชนีบ่งถึงระยะเวลาการบริโภคแหนม โดยพบว่าแหนมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.3 และมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 1.0 เป็นระดับที่ผู้บริโภคมีการยอมรับในลักษณะเนื้อสัมผัสและสีของผลิตภัณฑ์มากที่สุด (ไพโรจน์ 2533)

6. การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาโดยวิธี Salmosyst procedure และ วิธีการมาตรฐาน

จากการทดลองของ อดิศร เสวตวิวัฒน์และอรุณ บ่างตระกูลนนท์ ในปี 2539 พบว่าการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม 40 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีมาตรฐาน (conventional procedure) เปรียบเทียบกับวิธีการใหม่ (salmosyst procedure)พบว่า salmosyst procedure ให้ผลในการตรวจซาลโมเนลลา (75%) มากกว่าวิธีมาตรฐาน ซึ่งใช้ TTB และ SCB เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment(40 และ 62.5 % ตามลำดับ) นอกจากนี้ เมื่อนำเชื้อซาลโมเนลลาที่ตรวจพบในแต่ละวิธีไปทำการแยกหาเซโรวาร์ พบว่าวิธีการทั้งสองสามารถตรวจแยกชนิดของซาลโมเนลลาออกมาได้รวม 22 เซโรวาร์ โดยวิธี salmosyst สามารถแยกชนิดของซาลโมเนลลาได้มากกว่า วิธีมาตรฐาน คือ 86.4% และ 54.5% ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบข้อดีของการใช้ salmosyst ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนมกับวิธีการมาตรฐาน พบว่า

1. การใช้เวลาในการบ่ม SB ในช่วงพรีเอนริชเมนท์ (6 ชั่วโมง) กลุ่มเชื้อซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บรวมถึงเชื้ออื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในแหนม สามารถฟื้นตัวจนมีความสมบรูณ์ขึ้นได้
2. ผลในการยับยั้งทันทีกับเชื้อในกลุ่มที่ไม่ใช่ซาลโมเนลลาทำให้เชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนอยู่เจริญได้มาก
3. ช่วงพรีเอนริชในวิธีมาตรฐานต้องใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อนานถึง 18-24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลวในช่วง selective enrichment ซึ่งระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อที่นานดังกล่าวนี้จะทำให้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่นซึ่งปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์แหนมเจริญแข่งขันกับเชื้อซาลโมเนลลาได้ จึงทำให้เชื้อซาลโมเนลลาเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร
4. วิธี salmosyst ก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอน selective enrichment นั้น จะมีการถ่ายเชื้อจากพรีเอนริช (SB) 10 มิลลิลิตร ก่อนที่จะทำการเติม SBST จากนั้นค่อยละลาย SBST ให้ละลายอยู่ใน SB จนหมดเพื่อเป็นการเข้าสู่ขั้นตอน selective enrichment ซึ่งขั้นตอนในการละลาย SBST ดังกล่าวนี้ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ข้อดีของการค่อยละลายของ SBST ในอาหาร SB นี้ จะมีผลทำให้ซาลโมเนลลาที่เพิ่งฟื้นตัวเจริญได้ดีในอาหารดังกล่าว เพราะสารยับยั้งที่มีอยู่ใน SBST ที่ค่อย ๆ ละลายเพิ่มความเข้มข้นขึ้น จะไม่มีผลในการยับยั้งหรือทำลายซาล-โมเนลลาที่เพิ่งฟื้นตัวแต่จะเริ่มยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ด้วยทันที ในขณะที่วิธีมาตรฐานจะใช้ปริมาตรในการถ่ายเชื้อในช่วงพรีเอนริชมาเพียง 1 มิลลิลิตร ซึ่งสารยับยั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง selective enrichment ที่มีความเข้มข้นแต่แรกนี้จะมีผลในการยับยั้งซาลโมเนลลาที่อาจมีปริมาณน้อยและอ่อนแอในช่วงพรีเอนริชเมนท์ที่บ่มมาเป็นเวลานานได้ และจากปริมาตรของอาหารที่ถ่ายจากขั้นตอนพรีเอนริชเมนท์ที่แตกต่างกันมากดังกล่าวนี้อาจมีผลทำให้ปริมาณการตรวจพบซาลโมเนลลาทั้งจำนวนตัวอย่างและเซโรวาร์ที่ตรวจพบจาก salmosyst มีมากกว่าวิธีการมาตรฐานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างแหนม (ไม่ฉายรังสี) ที่จำหน่ายในหัวตะเข้ มาจำนวน 14 ตัวอย่าง

<u>รูปที่ 1-3</u> ลักษณะแหนมที่สุ่มตรวจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค

โดยชั่งแหนม 3 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียด กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายไปต้มไล่กาซคาร์บอนไดออกไซด์ เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึง end point เกิดสีชมพู คำนวณปริมาณกรดแลคติคตามสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์กรดแลคติค} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1000 \times \text{กรัมของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

3. การหาค่า pH

นำตัวอย่างแหนม 20 กรัม บดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน วัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอชของ SUNTEX SP – 701

4. การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลา

4.1) โดยใช้วิธี salmosyst procedure

นำตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ลงใน salmosyst broth base (SB, Merck 10153) 225 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก SB 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม salmosyst selective supplement tablet (SBST) (Merck 10141) 1 เม็ด ลงในหลอดที่มี SB เขย่าหลอดให้เม็ด SBST ละลายใน SB จนหมด บ่มหลอด SB + SBST ที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำไปเขี่ยเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อ Rambach (RAM) agar, Xylose lysine deoxycholaate (XLD) agars,Hektoen (HE) mediumบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และ Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium บ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในแต่ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมี คุณสมบัติทางเซโรโลยี และส่งตรวจยืนยันผลการทดลองที่ WHO Salmonella-Shigella Center Bangkok , กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

4.2) การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำโคโลนีที่สังสัยไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar และ Lysine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Indole Motility (LIM) medium บ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูผลปฏิกริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar , LIM medium ซึ่งเชื้อซาลโมเนลลาจะให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงผลของปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar , LIM medium ของเชื้อซาลโมเนลลา

TSI				LIM		
Slant	Butt	H_2S	gas	lysine	Indole	Motile
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-

K = alkaline ปลายหลอด(slant)ของ TSI จะมีสีแดง(ชมพูบานเย็น)

A = acid ก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H_2S (+) = ในหลอด TSI จะเกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งซาลโมเนลลาส่วนใหญ่จะให้ ผล +

H_2S (-) = ไม่มีตะกอนสีดำในหลอด TSI ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์

gas (+) = มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI เนื่องจากซาลโมเนลลาส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรด และแกสเพียงเล็กน้อย

gas (-) = ไม่มีฟองอากาศให้เห็นในหลอด TSI ซึ่งมีบางเซโรวาร์ให้ผล -

lysine (+) = จะมีสีม่วงทั้งหลอดเนื่องจากเชื้อซาลโมเนลลามีเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย lysine ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างมากขึ้น มีผลทำให้ Brom cresol purple ซึ่งใช้เป็นindicatorในอาหารดังกล่าวและมีสีม่วงที่ทีเอนทีเป็นกลางมีสีม่วงเข้มมากยิ่งขึ้น ซึ่งซาลโมเนลลาส่วนมากจะมีเอนไซม์ดังกล่าวนี้

lysine (-) = หลอดอาหารจะมีสีเหลือง เนื่องจากเชื้อที่ไม่มีเอนไซม์ lysine decarboxylase แต่มีเอนไซม์ lysine deaminase ซึ่งจะไปย่อย lysine ทำให้พีเอชของอาหารต่ำลง มีผลทำให้สีม่วงของ brom cresol purple เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

indole (+) = จะมีสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากหยดน้ำยา KOVAC

indole (-) = เกิดสีแดงหลังจากหยดน้ำยา KOVAC ซึ่งซาลโมเนลลาจะไม่มีเอนไซม์ trytophanase จึงไม่เกิดปฏิกริยากับ KOVAC

motile(+) = หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LIM จะขุ่นทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากซาลโมเนลลาส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อทำการ stab เชื้อลงในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LIM แล้วบ่มเพาะเชื้อซาลโมเนลลาจะเจริญเคลื่อนที่ออกจากรอย stab ไปทุกทิศทุกทาง จึงทำให้หลอดขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

motile(-) = หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีเชื้อบริเวณรอยstabเท่านั้น ส่วนบริเวณอาหารรอบรอย stab จะใสทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่จึงเจริญอยู่เฉพาะบริเวณรอย stab

4.3) Serological test

นำหลอด TSI slant และ LIM slant ที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาจากการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีข้างต้น มาทำการทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางเซโรโลยี โดยหยด Anti-salmonella A-67 ลงบนสไลด์ที่สะอาด ใช้ห่วงหรือเข็มเขี่ยเชื้อจาก TSI และ LIM slant เกลี่ยเชื้อให้ทั่วหยดของ Anti-salmonella A-67 สังเกตดูการเกิดตะกอนของเชื้อในหยด Anti-salmonella A-67 ถ้าเชื้อดังกล่าวเป็นซาลโมเนลลาจะเกิดการตกตะกอนของเชื้อขึ้น ถ้าไม่ใช่เชื้อจะละลายอยู่ในหยดของ Anti-salmonella A-67 ขาวขุ่นเหมือนน้ำนมทั้งหยด

4.4) ส่งตรวจวิเคราะห์ยืนยันที่ WHO Salmonella-Shigella Center Bangkok , กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99561

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการตรวจเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในเขตหัวตะเข้และตลาดอุดมผลจำนวน 14 ตัวอย่างพบว่ามีการปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง(ร้อยละ35.71) ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์แหนมยังคงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากอุตสาหกรรมในครัวเรือน ซึ่งการผลิตจะมีการควบคุมสุขลักษณะในการผลิตที่ไม่ดีเท่าที่ควรและที่สำคัญการชำเหละและตัดแต่งซากเนื้อสุกรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแหนมที่พบการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาที่สูง อีกทั้งการผลิตแหนมซึ่งไม่ได้มีการผ่านความร้อนหรือผ่านกระบวนการใด ๆ ที่จะไปมีผลทำลายเชื้อซาลโมเนลลาได้ จึงทำให้การตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาสูงตามไปด้วย

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาที่ค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกที่ต่างกัน

ค่าพีเอช	ปริมาณกรดแลคติก	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	ตัวอย่างที่ตรวจพบ		จำนวนเซโรวาร์	ชนิดเซโรวาร์
			จำนวน	ร้อยละ		
≤4.50	ช่วง 1.7-2.3	6	2	14.28	1	*S.* Agona
>4.50	ช่วง1.1-1.6	8	3	21.42	3	*S.* Anatum , *S.* Agona , *S.* Stanley

จากตารางจะพบจำนวนเชื้อสำหรับแหนมที่มีค่าพีเอชที่สูงและปริมาณกรดแลคติกที่ต่ำ คือ > 4.50 และช่วง 1.1-1.6 ตามลำดับ โดยจะพบจำนวนเชื้อซาลโมเนลลา 3 ตัวอย่าง (21.42 %) และจำนวนเซโรวาร์ที่พบถึง 3 เซโรวาร์ คือ *S.* Anatum , *S.* Agona , *S.* Stanley แต่ที่ค่าพีเอชต่ำและปริมาณกรดแลคติกที่สูง คือ ≤ 4.50 และ ช่วง 1.7-2.3 ตามลำดับ จะพบจำนวนเชื้อซาลโมเนลลาที่ต่ำกว่าอีกทั้ง จำนวนเซโรวาร์ที่พบก็มีความจำกัดลง ซึ่งจะพบเพียงหนึ่งเซโรวาร์ คือ *S.* Agona เนื่องจากค่าพีเอชต่ำและปริมาณกรดแลคติกที่สูงจะสามารถมีผลไปยับยั้งการเกิดเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมได้อีกทั้งจำนวนเซโรวาร์ที่ตรวจพบก็จำกัดลงด้วย จึงสามารถใช้ค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกมาหาช่วงที่เหมาะสมของการหมักแหนมรวมทั้งความเหมาะสมในการบริโภคเพื่อลดการรับสารพิษ(endotoxins)จากการบริโภคแหนมได้ และจากการทดลองของ ไพโรจน์ (2533) ได้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างหรือความเป็นกรดทั้งหมดของแหนมจะเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงระยะเวลาการบริโภคแหนม ค่าดังกล่าวจะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์กับลักษณะเนื้อสัมผัสและสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ โดยพบว่า แหนมที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.3 และปริมาณกรด 1.0 เป็นระดับที่ผู้บริโภคมีการยอมรับในลักษณะเนื้อสัมผัสและสีของผลิตภัณฑ์มากที่สุด อีกทั้งยังรายงานด้วยว่าผู้บริโภคจะยอมรับรสชาติของแหนมที่หมักได้ 3-4 วัน ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4.55-4.72 และมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดสูงที่สุด โดยจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 ของการหมักหลังจากนั้นจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 6 ของการหมัก ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองนี้ที่จะสามารถนำค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกมาคาดคะเนช่วงที่เหมาะสมต่อการบริโภคแหนมได้

ตารางที่3 แสดงการเปรียบเทียบ ชนิดของ Selective plating medium ในการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนตัวอย่างที่พบ	จำนวนร้อยละ	จำนวนเซโรวาร์	ชนิดเซโรวาร์
Modifiled semisolid rapaport vassiliadis (MSRV)	3/5	60	3	*S.* Anatum , *S.* Agona , *S.* Stanley
Rambach(RAM) Agar	3/5	60	2	*S.* Anatum , *S.* Agona
Xylose-lysine-deoxycholate(XLD) Agar	3/5	60	3	*S.* Anatum , *S.* Agona , *S.* Stanley
Hetoen (HE) Agar	1/5	20	1	*S.* Anatum

จากการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อซาลโมเนลลา 4 ชนิด คือ MSRV, RAM, XLD และ HE พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV, RAM, XLD จะให้ผลการตรวจเชื้อเท่ากัน คือ 3/5 (ร้อยละ60) ส่วนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ HE จะให้ผลการตรวจพบเชื้อน้อยที่สุดคือ 1/5(ร้อยละ20)

สาเหตุก็เนื่องมาจาก อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ HE ซึ่งอาศัยหลักการแยกกลุ่ม non-lactose fermenter และ lactose fermenter ซึ่งจะทำให้ทราบว่าอาจจะเป็นเชื้อซาลโมเนลลาได้ โดยที่กลุ่มที่เกิด non-lactose fermenter คือ เชื้อ *Salmonella , Proteus* และ *Paracolobactum* ซึ่งจะทำให้เกิดโอกาศผิดพลาดในการเลือกโคโลนีในขั้นตอน Selective plating ได้สูง ส่วนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MSRV จะมีส่วนผสมของ magnesium chloride และ malachite green ที่เป็นส่วนทำให้แบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเจริญได้ในวุ้น (Agar) จำนวนเล็กน้อย 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เชื้อซาลโมเนลลาเคลื่อนที่ได้ รวมทั้งค่าพีเอชและอุณหภูมิที่บ่มเพาะเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อซาลโมเนลลาคือ pH 5.2 อุณหภูมิ 42 $\pm$0.5 $^{\circ}$ซ ตามลำดับ จึงทำให้อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MSRV เหมาะสมต่อการตรวจพบเชื้อซาล-โมเนลลา อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ RAM จะอาศัยหลักการที่ว่าเชื้อซาลโมเนลลาที่อยู่ในกลุ่ม non-typhi salmonella ส่วนมากจะสามารถหมักย่อย propylene glycol ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจนเกิดกรดชนิดต่าง ๆ ได้ ปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับ neutral red ซึ่งใช้เป็นสารบ่งชี้ถึงความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้โคโลนีของซาลโมเนลลาที่เจริญบนอาหารเพาะแยกเชื้อดังกล่าวมีสีแดงสด ในขณะที่เชื้อโรคลำไส้อื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แหนม เช่น *E. coli* ซึ่งไม่มีเอนไซม์ในการหมักย่อย propylene glycol แต่มีเอนไซม์ B-galactosidase ในการหมักย่อยน้ำตาลในกลุ่มแลคโตส จะให้โคโลนีสีน้ำเงิน ส่วนเชื้อที่มีเอนไซม์ที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสองชนิด เช่น เชื้อในกลุ่ม *Citrobacter* spp. จะให้โคโลนีสีม่วงและเชื้อที่ไม่มีเอนไซม์ในการหมักย่อยน้ำตาลทั้งสอง เช่น *Protues* spp. หรือ *Salmonella typhi* จะให้โคโลนีที่ไม่มีสีบนอาหารเพาะแยกเชื้อนี้ (Rambach, 1990 อ้างถึงใน อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ 2539 .ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม .การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาสัตว์แพทย์ . 277 น.)และสำหรับอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ XLD อาศัยการแยกเชื้อระหว่างกลุ่ม lactose fermenter และ non- lactose fermenter กล่าวคือ เชื้อในกลุ่ม lactose fermenter เช่น *E. coli,* coliforms นั้นจะมีเอนไซม์ในการย่อยน้ำตาลแลคโตสทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่าง ๆ และปริมาณกรดที่เพิ่มมากขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเป็นกรดด่าง คือ phenol red ทำให้โคโลนีของเชื้อในกลุ่มนี้เกิดสีเหลือง สำหรับเชื้อในกลุ่ม non- lactose fermenter เช่น *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *protues* spp. เป็นต้น จะมีโคโลนีสีใสและสามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหารเลี้ยงได้ จึงทำให้สามารถแยกโคโลนีของเชื้อซาลโมเนลลาได้โดยโอกาศที่จะผิดพลาดจะมีน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกที่มีผลไปยับยั้งการเกิดเชื้อซาลโมเนลลาโดยวิธี samosyst procedure ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนมพร้อมบริโภค 14 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาถึง 5 (35.71 %) จากผลที่ตรวจพบแยกเป็นที่ค่าพีเอชต่ำ($\leq$4.50) ปริมาณกรดแลคติกสูง(1.7-2.3) และค่าพีเอชสูง($<$4.50) ปริมาณกรดแลคติกต่ำ (1.1-1.6)พบว่าที่ค่าพีเอชต่ำและประมาณกรดแลคติกสูงจะตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาที่ต่ำกว่าที่ค่าพีเอชสูงและปริมาณกรดแลคติกต่ำ รวมทั้งจำนวนเซโรวาร์ของเชื้อซาลโมเนลลาก็ต่ำกว่าด้วย เนื่องจากปริมาณกรดที่มากขึ้นในระหว่างการหมักมีผลไปยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลลาได้ และส่งผลให้การตรวจพบเซโรวาร์มีการจำกัดชนิดลงด้วย คือจะมีเพียงเชื้อซาลโมเนลลาที่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นกรดสูง ๆ เท่านั้น ที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้

การเปรียบเทียบอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ MSRV, RAM, XLD และ HE พบว่าอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MSRV, RAM และ XLD ให้ผลการตรวจพบซาลโมเนลลาเท่ากัน(ร้อยละ 60) แต่อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อHEให้ผลการตรวจพบเชื้อต่ำที่สุด(ร้อยละ 20) และเซโรวาร์ที่พบปนเปื้อนมากที่สุดคือ *S.* Agona , *S.* Anatum , *S.* Stanley ซึ่งจะสอดคลอดกับการทดลองของ อดิศร และคณะ ในปี 2539 คือการใช้อาหารแข็งเพาะแยกเชื้อควบคู่กันไปมากกว่าหนึ่งชนิดจะให้โอกาศในการตรวจพบเซโรวาร์ของซาลโมเนลลามากกว่าการใช้อาหารแข็งเพาะแยกเชื้อเพียงชนิดเดียว

ดังนั้นผู้ผลิตแหนมควรมีการควบคุมสุขลักษณะของการผลิตรวมทั้งสุขลักษณะส่วนบุคคลของตัวผู้ผลิตเองด้วย เพื่อเป็นการลดสาเหตุอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้ามได้ อีกทั้งการบริโภคแหนมซึ่งไม่ได้ผ่านการการให้ความร้อน เช่น ผัด และทอด จะมีความเสี่ยงต่อการได้รับสารพิษ (endotoxins) จนทำให้เกิดอันตรายจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ เพราะฉะนั้นการจะบริโภคแหนมดิบควรจะหลีกเลี่ยงหรือการบริโภคแหนมในช่วงที่มีการหมักผ่านไปแล้ว 4 วันเป็นอย่างน้อย (ไพโรจน์.2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ปาริชาติ พนมศรีสกุล และคณะ . 2540 . การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์ Salmonella จากอุจจาระด้วยวิธี MSRV กับวิธี Conventional culture . ภาควิชาจุลชีววิทยา , คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี .21-32 น.

ไพโรจน์ วิริยะจารี และคณะ . 2537 . โครงการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์แหนม . สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี , มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุขใจ โสมะฐิติ.2525.การสำรวจเชื้อโรคลำไส้บางชนิดในแหนม.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพ ฯ .

อดิศร เสวตวิวัฒน์และอรุณ บ่างตระกูลนนท์.2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Ramach ต่อการตรวจพบซาลโมเนลลาในแหนม. การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาสัตว์แพทย์ วันที่ 30 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์.2533.ผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซาลโมเนลลาในการหมักแหนม . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพ ฯ .

อรุณ บ่างตระกูลนนท์และนพรัตน์ หมานริม. 2542. การเปรียบเทียบ pre-enrichment 4 ชนิด ในการตรวจหาซาลโมเนลาจากอาหาร โดยวิธี MSRV . อาหาร. 29 (3) . กรกฎาคม-กันยายน.193-201 น.

Aspinall , S.T , Hindle , M.A. and Hutchinson , D.1992 . Improved isolaion of Salmonella fom faeces using a semi-solid Rappaport – Vasiliadis medium . European Journal of Chinlical Microbiology & Infections Discase. 11: 936-939

De Smedt , J.Y. and Bloderdijk , R.F. 1987 . Dynamics of Salmonella isolation wih modified semi-solid Rappaport – Vasiliadis medium . Journal of food Protection. 50: 658 –661

E. Merck , Microbiology Manual 1994 . Darmstadt . Germany . 1994.

Gossens , H.et .al 1984 . Semisolid selectore moillity enrihment medium for Isolation of Salmonella from fecal specimens . Journal of Chinlical Microbiology. 19: 940-941

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

0.1 N NaOH Solution

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Volumetric flask 1000 ml.
2. Erlenmeyer flask 250 ml.
3. Burette 50 ml.
4. Watch glass
5. Sodium hydroxide
6. Phenolpthalein (เตรียมได้จากละลายสาร 1 กรัมใน neutral 95% alcohol จนละลายหมดจึงเติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 ml.

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย NaOH 0.1 N (โดยประมาณ) ชั่ง sodium hydroxide 50 กรัม ใน watch glass ละลายสารด้วยน้ำกลั่น 50 ml. ในบีกเกอร์ 50 ml. ตั้งทิ้งไว้สักครู่ พร้อมกับปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา (watch glass)
2. ดูดสารละลายส่วนที่ใสในบีกเกอร์ประมาณ 5.5 มิลลิลิตรลงในขวด Vol.flask ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร ปิดจุกเขย่าให้สารละลายผสมกันด้วยดี
3. ชั่ง potassium phthalate ที่อบแห้งที่ 120°ซ. นาน 2 ชม. และทำให้เย็นใน disiccator ด้วยตาชั่งละเอียด 0.6000-0.7000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 – 75 มิลลิลิตร
4. หยดสารละลาย phenolpthalein 1% ในสารละลาย phthalate จำนวน 2 หยด
5. นำสารละลาย phthalate ไปไตเตรทกับสารละลายด่างที่บรรจุอยู่ใน burette จนสารละลาย phthalate เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อน และมีสีชมพูยังคงไม่เปลี่ยนภายในเวลา 1 นาที (หากสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีขาวให้หยดสารละลายด่างลงไปอีกจนได้สีชมพูอ่อน)
6. ทำการทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายด่างในขวดที่เตรียมไว้อีก 2 ครั้ง บันทึกปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

$$\text{Normality NaOH} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) } KHC_8H_4O_4}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229} \times 1000$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 HEKTOEN Enteric Agar

เป็น Selective agar ค้นพบโดย King and Metzer(1968) สำหรับตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ทำก่อให้เกิดโรคในลำไส้ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปรียบเทียบการเจริญของ Salmonella และShigella ให้ yield สูง

การเกิดปฏิกิริยา

Lactose(+) โคโลนีจะใส ซึ่งแตกต่างจาก Lactose(-) โคโลนีจะเปลี่ยนสี bromothymol blue และacidic fushsin ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ โดยอาศัยการ ferment น้ำตาล Lactose เป็นหลัก

จุลินทรีย์ที่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลแลคโตสได้จะแสดงโคโลนีเป็นสีชมพู ส่วนที่เฟอร์เมนต์ไม่ได้จะให้สีดำของซัลเฟอร์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวก salmonella

ส่วนประกอบของอาหาร (กรัม/ลิตร)

Peptone	15.0
sodium chloride	5.0
yeast extract	3.0
sucrose	14.0
lactose	14.0
salicin	2.0
sodium thiosulfate	5.0
ammonium iron(III) citrate	1.5
bile salt mixture	2.0
bromothymol blue	0.05
acidic fuchsin	0.08
agar-agar	13.5

การเตรียม

ละลายสารประกอบโดยรวม 75 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ไม่ต้องautocave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง

นำจุลินทรีย์มา streak plate ที่ผิวหน้าของอาหารที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

ตารางที่4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HEKTOEN Enteric Agar

Appearance of Colonies	Microorganisms
Green , moist , flat , trasparent	Shigella , Providencia
Blue-green , with or without a black center	Salmonella , Paracolobactum , Proteus
Green to bluish , flat , irregular edge	Pseudomonas
Salmon pink surrounded by a zone of precipitate	Coliform bacteria

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของซาลโมเนลลาบนอาหาร Hektoen agars

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 XLD Agar (Xylose Lysine Deoxycholate Agar)

อาหารชนิดนี้คิดค้นโดย TAYLOR(1965) , TAYLOR and HARRIS (1965 , 1967) และ TAYLOR and SCHELHART (1967) ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค โดยเฉพาะ Shigella และ Salmonella

การเกิดปฏิกิริยา

โดยจุลินทรีย์อื่นที่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล เช่น ไซโลส แลคโตส และซูโคส ได้เป็นกรดจะทำให้ phenol red เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส่วนซาลโมเนลลาที่ไม่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลก็จะใช้สารอาหารในการเจริญคลายความร้อน สร้างก๊าซเกิดปฏิกิริยากับ thiosulfate และ iron(III) ได้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำให้เป็นสีดำมีกลิ่นเหม็น

ส่วนประกอบของอาหาร (กรัม/ลิตร)

Yeast extract	3.0
Sodium chloride	5.0
D(+)xylose	3.5
Lactose	7.5
Sucrose	7.5
L(+)lysine	5.0
Sodium deoxycholate	2.5
Sodium thiosulfate	6.8
Ammomium iron(III)citrate	0.8
Phenol red	0.08
Agar-agar	13.5

การเตรียม

ละลายสารประกอบโดยรวม 55 กรัมในน้ำ 1 ลิตรอย่างรวดเร็ว พีเอช 7.4±0.2 และเทลงในจานเพาะเชื้อที่สะอาด ไม่ต้อง autocave

การทดลอง

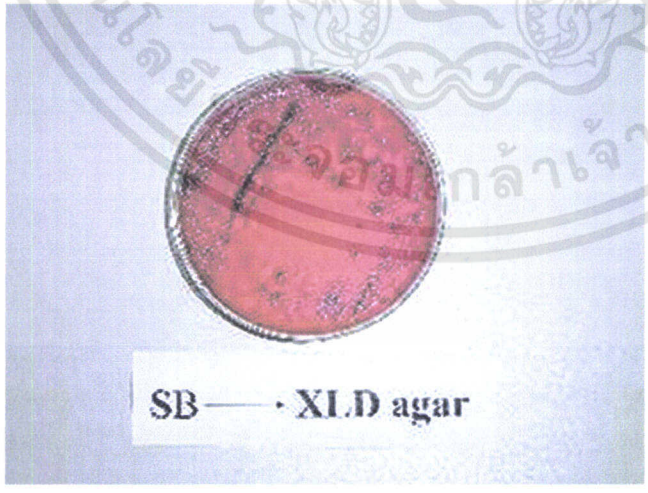
นำเชื้อที่สงสัยมา streak plate ลงบนอาหารที่เตรียมไว้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18955

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Agar

Apperance of Colonies	Microorganisms
Yellow , surrounded by yellow zones , opaque with precipitation zones	Escherichia coli , Enterobacter , Aeromonas
Yellow , surrounded by yellow zones , opaque , mucoid with precipitation zones	Klebsiella
Yellow , surrounded by yellow zones , opaque ,sometimes with a black center	Citrobacter(lactose-positive strains)
Yellow , surrounded by yellow zones , opaque	Serratia , Hafnia
Yellow , surrounded by yellow zones , traslucent, black center	Proteus vulgaris , most Protues mirabilis
Colonies are the same colour as the culture medium , traslucent , sometimes with a black center	Salmonella
Colonies are the same colour as the culture medium , traslucent	Shigella , Providencia , Pseudomonas
Orange , slightly opaque	Salmonella typhosa (xylose-positive strains)



รูปที่ 5 แสดงลักษณะของซาลโมเนลลาบนอาหาร XLD agars

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

2.3 RAMBACH® Agar

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซาลโมเนลลาที่ให้การรักษาเชื้อซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บได้เป็นอย่างดี

การเกิดปฏิกิริยา

จะดูการเฟอร์เมนต์ propylene glycol(PG) ซาลโมเนลลาเฟอร์เมนต์ PG ได้กรด พีเอชลดลง จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ส่วนโคลิฟอร์มจะเฟอร์เมนต์น้ำตาลแลคโตส เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแกมม่วง ส่วนเชื้อแกรมบวกตัวอื่น ๆ เช่น Proteus , Pseudomonas , Shigella , S.typhi และ S.paratyphi จะเจริญได้โคโลนีที่ไม่มีสี หรือเป็นสีเหลือง

ส่วนประกอบของอาหาร (กรัม/ลิตร)

peptone	8.0
sodium chloride	5.0
sodium deoxycholate	1.0
Chromogenic mix	1.5
Propylene gycol	10.5
Agar-agar	15.0

วิธีการเตรียม

ละลาย RAMBACH Agar 30 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร จากนั้นเติมสีคาโวเจนจำนวน 10 ml. ไม่ต้อง autocave

การทดลอง

นำเชื้อที่สงสัยมา streak plate ลงบนอาหารที่เตรียมไว้บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

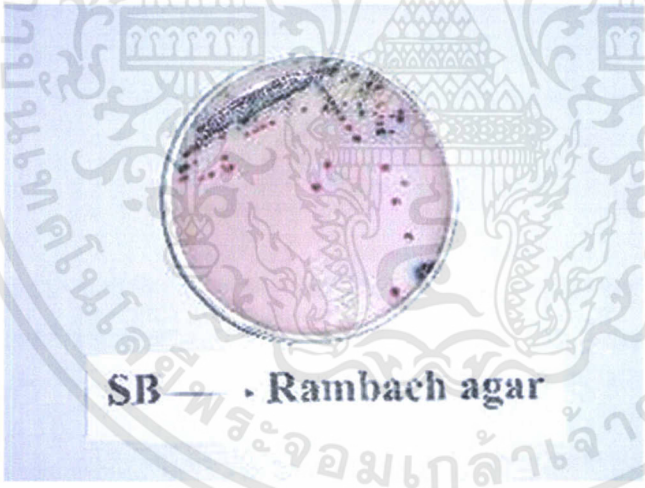
ตารางที่ 6แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RAMBACH® Agar

Test strains	Colony colour
Salmonella enteritidis ATCC 13076	red
Salmonella typhimurium ATCC14028	red
Salmonella 3002	red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ต่อ) ตารางที่ 6

Test strains	Colony colour
Salmonella 3001	red
Salmonella typhi ATCC6539	colourless/yellowish
Escherichia coli ATCC 25922	blue-green
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	blue-green
Shigella flexneri ATCC 11778	colourless/yellowish
Proteus mirabilis ATCC 14153	colourless/yellowish
Staphylococcus aureus ATCC 25923	inhibited
Bacillus cereus ATCC 11778	inhibited
Pseudomonas aeruginosa ATSS 27853	colourless/yellowish



รูปที่ 6 แสดงลักษณะของซาลโมเนลลาบนอาหาร RAM agars

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 Salmosyst® Broth Base

เป็นอาหาร 2 ขั้นตอน ในการดูแลเชื้อซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปอาหาร ซึ่งมีจำนวนมาก

ส่วนประกอบอาหาร Broth Base (กรัม/ลิตร)

peptone from casein	5.0
peptone from meat	5.0
sodium chloride	5.0
calcium carbonate	10.0

วิธีการเตรียม Broth Base

ละลายสารประกอบโดยรวม 25 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร autocave 15 นาที 121 องศาเซลเซียส

2.5 Salmosyst® Selective Supplement

ส่วนประกอบอาหาร Selective Supplement(กรัม/ลิตร)

Potassium tetrathionate	0.2
OX bile	0.08
Brillant green	

Preliminary Enrichment

นำตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในอาหาร Broth Base ที่เตรียมไว้จำนวน 225 ml. นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6-8 ชั่วโมง

Selective Enrichment

ดูดสารละลาย Preliminary Enrichment มา 10 ml. เติมSalmosyst selective supplement 1 เม็ด เขย่า 30 นาที บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา18-22 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจในขั้น selective plating ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวแดนสวรรค์ พึ่งเจริญ เกิดวันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ.2522 ที่จังหวัดสุรินทร์ จบการศึกษาระดับประกาศณียบัตรวิชาชีพชั้นสูง สาขาเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสุรินทร์ ปีการศึกษา 2541 จบการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ปีการศึกษา 2545

นางสาวพวงเพ็ญ พานิชรักษาพงศ์ เกิดวันที่ 11 มกราคม พ.ศ.2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับประกาศณียบัตรวิชาชีพชั้นสูง สาขาเคมีปฏิบัติการ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพฯ ปีการศึกษา 2541 จบการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้