การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารฮีสตามีนจากแซนวิชทูน่า

ISOLATION OF HISTAMINE FORMING BACTERIA FROM TUNA SANDWICHES

เรวัต บุญมา
ลักษิณาพัฒน์ เข็มพิลา
เสาวลักษณ์ พิมล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF HISTAMINE FORMING BACTERIA FROM TUNA SANDWICHES

REWAT BOONMA
LUKSINAPAT KHEMPILA
SAOWALUK PHIMON

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารฮีสตามีนจากแซนวิชทูน่า Isolation of Histamine Forming Bacteria From Tuna Sandwiches
ชื่อนักศึกษา	นายเรวัต บุญมา รหัส 56050898 นางสาวลักษิณาพัฒน์ เข็มพิลา รหัส 56050899 นางสาวเสาวลักษณ์ พิมล รหัส 56050942
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารฮีสตามีนจากแซนวิชทูน่า

ชื่อนักศึกษา นายเรวัต บุญมา รหัส 56050898
นางสาวลักษิณาพัฒน์ เข็มพิลา รหัส 56050899
นางสาวเสาวลักษณ์ พิมล รหัส 56050942

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศผู้ส่งออกสินค้าประมงรายใหญ่ของโลก ทั้งอาหารทะเลสดและอาหารทะเลแปรรูป จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของสารพิษ ซึ่งฮีสตามีนเป็นหนึ่งในสารพิษที่ต้องได้รับการควบคุมโดยเฉพาะในปลาทะเลสดและผลิตภัณฑ์จากปลาทะเล ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในแซนวิชทูน่า เนื่องจากปลาทูน่าจัดอยู่ในวงศ์ Scombridae ซึ่งเป็นปลาที่มีปริมาณกรดอะมิโนฮีสทีดีนในเนื้อสูง จึงมีความเสี่ยงต่อการสะสมของฮีสตามีนถ้ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้ ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีน จากตัวอย่างแซนวิชทูน่าทั้ง 7 ยี่ห้อ ที่มีจำหน่ายอยู่ในร้านสะดวกซื้อ และห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพมหานคร โดยใช้อาหาร differential medium และทำการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยเครื่อง MALDI Biotyper พบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้ ถูกคัดแยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D คือ *Morganella morganii* subsp. *morganii* 15284_1 CHB ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae

คำสำคัญ : แซนวิชทูน่า ฮีสตามีน *Morganella morganii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	ISOLATION OF HISTAMINE FORMING BACTERIA FROM TUNA SANDWICHES
Students	Mr.REWAT BOONMA Student ID 56050898
	Miss LUKSINAPAT KHEMPILA Student ID 56050899
	Miss SAOWALUK PHIMON Student ID 56050942
Degree	Bachelor of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr.KARN WONGSARIYA

Abstract

Thailand is one of the main seafood exporters, both in fresh products and processed products. For the reason, the quality control of the products is required, especially for contamination of the toxin. Histamine is one of the toxins which need to be controlled, especially in fresh marine fish and the products from marine fish. This study focused on the contamination of histamine producing bacteria in tuna sandwiches because tuna is the member in Scombridae family which contains high level of histidine in its muscle; therefore there is a risk for accumulation of histamine. Histamine producing bacteria were isolated from 7 brands of tuna sandwiches which were sold in convenience stores and super markets in Bangkok area. The targeted bacteria were isolated by growth on the differential medium and the strain of isolated bacteria was determined by MALDI Biotyper. The histamine producing bacteria were screened from tuna sandwich TSW-D sample and the strain of isolated bacteria was *Morganella morganii* subsp. *morganii* 15284_1 CHB. This bacterium is Gram-negative rod and it is a member of Enterobacteriaceae.

Keywords : Histamine producing bacteria, *Morganella morganii,* tuna sandwiches

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนกรุณาตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้ถูกต้อง สมบูรณ์ และเรียบร้อยด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริง และความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ ผู้ที่ให้คำแนะนำ การดำเนินการ และการพิจารณาโครงงานพิเศษเป็นไปอย่างสมบูรณ์เรียบร้อย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาตรวจทานและพิจารณาโครงงานฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อย ด้วยความเสียสละ ความอนุเคราะห์ และน้ำใจ อาทิ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมืออย่างถูกต้อง สิ่งดี ๆ เหล่านี้ผู้วิจัยซาบซึ้งในไมตรีจิต และจะเก็บความทรงจำนี้ตลอดไป

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ไม่มากก็น้อย จึงขอบูชาแด่พระคุณบิดา มารดา บูรพาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนทำให้ได้งานวิจัยที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง หากมีข้อบกพร่องที่อาจเกิดขึ้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัย

เรวัต บุญมา
ลักษิณาพัฒน์ เข็มพิลา
เสาวลักษณ์ พิมล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขต	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความเป็นพิษของอาหารทะเล	3
2.1.1 Puffer fish poisoning	3
2.1.2 Ciguatera fish poisoning	3
2.1.3 Histamine fish poisoning	4
2.1.4 Shellfish poisoning	4
2.2 Biogenic amines	4
2.2.1 แบคทีเรียที่สร้าง Histamine	6
2.2.1.1 ปลาที่มีความเสี่ยงในการพบ Histamine	6
2.2.2 คุณสมบัติของสาร Histamine	8
2.2.3 ข้อกำหนดปริมาณสาร Histamine ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ	8
2.2.3.1 ผลิตภัณฑ์ปลาสด ปลาแช่แข็ง และปลาบรรจุกระป๋อง	8
2.2.3.2 ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูป	8
2.2.3.3 ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปประเภทน้ำปลา	8
2.2.4 อาการที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน Histamine	9
2.2.5 การป้องกันการเกิด Histamine	9
2.2.5.1 การแช่เย็น	9
2.2.5.2 การตัดเหงือกและควักไส้	9
2.2.5.3 การแช่แข็ง	10
2.2.5.4 การใช้ความร้อน	10
2.2.5.5 การใช้ความดัน	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.5.6 การใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง เกลือ ก๊าซ และบรรจุภัณฑ์สุญญากาศ	10
2.2.5.7 การใช้วัตถุเจือปนอาหาร	11
2.2.5.8 การใช้หัวเชื้อ หรือเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ประเภทหมักและผลิตภัณฑ์ประมง	11
2.2.5.9 การสร้างแบบจำลองปริมาณจุลินทรีย์	11
2.3 เทคนิคการคัดแยกเชื้อ และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์	11
2.3.1 วิธีการ Filtration	11
2.3.2 วิธีการ Spread plate technique	12
2.3.3 วิธีการ Pour plate technique	12
2.3.4 วิธีการ Streak plate technique	12
2.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย	13
2.4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)	13
2.4.1.1 Bismuth sulfite agar (BSA)	13
2.4.1.2 Brilliant green agar (BGA)	13
2.4.1.3 Citrate utilization test	13
2.4.1.4 Cystine lactose electrolyte deficiency (CLED) agar	13
2.4.1.5 Desoxycholate citrate agar (DCA)	13
2.4.1.6 Eosin methylene blue (EMB) agar	14
2.4.1.7 Hektoen enteric agar (HEA)	14
2.4.1.8 Lysine indole motility (LIM) medium	14
2.4.1.9 Lysine iron agar (LIA)	15
2.4.1.10 MacConkey agar	16
2.4.1.11 Malonate-Dulcitol test	16
2.4.1.12 Methyl red test และ Voges-Proskauer test	16
2.4.1.13 Nitrate และ Nitrite test	17
2.4.1.14 Ornithine decarboxylase	17
2.4.1.15 Oxidase test	17
2.4.1.16 Salmonella -Shigella (SS) agar	17
2.4.1.17 Selenite F broth	18
2.4.1.18 Tetrathionate broth	18
2.4.1.19 Triple sugar iron (TSI) agar	18
2.4.1.20 Urease test	19
2.4.1.21 Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.1.22 การหมักย่อยน้ำตาลต่าง ๆ	19
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	21
3.1 สารเคมี	21
3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ	21
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	22
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง	22
3.4.2 การเตรียมอาหาร และการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	22
3.4.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย และเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	22
3.4.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้าง Biogenic amine ได้	22
3.4.4 การทดสอบความสามารถในสร้าง Biogenic amine ของเชื้อที่คัดแยกได้โดยใช้อาหาร Differential medium	23
3.4.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	23
3.4.6 การศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้น	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	25
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในแชนวิชทูน่า	25
4.2 ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรีย	27
4.3 ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	27
4.4 การอภิปรายผล	28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	30
5.1 สรุปผลวิจัย	30
5.2 ข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงวงศ์ของปลาที่สามารถพบ Histamine	6
4.1 แสดงถึงการปนเปื้อนแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอจินิกเอมีนที่ปนเปื้อนในแซนวิชทูน่า	25
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อมาตรฐานที่สร้าง Histamine และเชื้อที่สร้าง Histamine จากแซนวิชทูน่า ยี่ห้อ TSW-D	25
4.3 แสดงผลการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER)	27

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของ Histidine และ Histamine	5
2.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง	12
3.1 เครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER)	23
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Morganella morganii*	26
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อที่คัดแยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D	26
4.3 แสดงการติดสีแกรม และลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า	28
4.4 แสดงการติดสีแกรม และลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
°C	Degree Celsius
CFU	Colony Forming Unit
g	Gram
PCA	Plate Count Agar
ppm	Parts Per Million
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
w/v	weight by volume

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกสินค้าประมงเป็นอันดับ 4 ของโลกมีมูลค่าการส่งออกประมาณ 6 พันล้านเหรียญดอลล่าร์สหรัฐต่อปี ซึ่งในปัจจุบันความต้องการอาหารทะเลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลก จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพอาหารทะเล และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลเพื่อให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยพบว่าอาหารทะเล หรือผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์แล้วพบว่ายังมีสาเหตุที่สำคัญอีกหนึ่งสาเหตุ คือ การปนเปื้อนของสารพิษ ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ เช่น นิวโรทอกซิน (Neurotoxin) โบทูลินัมทอกซิก (Botulinum toxin) และ คอเลอราทอกซิน (Cholera toxin) (สุทธิพงษ์, 2549 ; วินัย, 2551) โดยสารพิษที่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคในวงกว้าง คือ Histamine โดย Histamine เป็นสารประกอบไบโอจินิกเอมีน (Biogenic amines) ที่ถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเล หรือผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปลาทะเลที่มีปริมาณกรดอะมิโนฮีสทิดีน (Histidine) ในเนื้อสูง โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส (Histidine decarboxylase) ที่สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนฮีสทิดีนอิสระ (Free histidine) ในเนื้อปลาให้เป็น Histamine หากผู้บริโภครับประทานอาหารทะเล หรือผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนของ Histamine สูง สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยอาการป่วยที่สามารถพบได้ เช่น มีผื่นคัน อาเจียน ท้องเสีย แสบร้อนบริเวณปาก ปวดศีรษะ และในผู้บริโภคบางรายที่มีความไวสูงต่อ Histamine อาจเสียชีวิตได้ (Attaran and Probst, 2002) Histamine สามารถทนต่อความร้อนได้ดี ไม่สามารถถูกทำลายด้วยการแปรรูปต่าง ๆ และไม่ทำให้เนื้อปลามีกลิ่น หรือรสที่ผิดแปลกไปจากปกติ แม้ว่าแบคทีเรียที่สร้างสารพิษจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน แต่สารพิษยังคงสภาพอยู่ได้ในเนื้อปลา (Kovacova. *et al.*, 2515) ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวจึงมีความสำคัญ โดยในการทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบ และระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ที่ปนเปื้อนอยู่ในแซนวิชทูน่า

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อให้ทราบถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้ในแซนวิชทูน่า
2) เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine จากแซนวิชทูน่า
3) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในแซนวิชทูน่าที่ขายในร้านสะดวกซื้อ หรือห้างสรรพสินค้า และทดสอบความสามารถในการสร้าง Histamine รวมถึงการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในแซนวิชทูน่า เพื่อให้ผู้บริโภคตระหนักถึงอันตรายที่อาจเกิดขึ้นเมื่อได้รับ Histamine เข้าสู่ร่างกาย และเพื่อเป็นแนวทางในการหลีกเลี่ยงและป้องกันการได้รับสารพิษดังกล่าว และรวมถึงเป็นพื้นฐานสำหรับการผลิตชุดทดสอบเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเป็นพิษของอาหารทะเล (Seafood intoxication)

ทะเลเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ โดยพบว่าสัตว์ทะเลหลายชนิดจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายประเภท แต่อย่างไรก็ตามอาหารทะเลสด หรือผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ในกรณีที่อาหารทะเลหรือผลิตภัณฑ์อาหารทะเลดังกล่าวมีการปนเปื้อนของสารพิษ โดยสามารถแบ่งสารพิษตามแหล่งที่มาได้ 4 ประเภทหลัก คือ

2.1.1 Puffer fish poisoning

ปลาปักเป้าทั้งในวงศ์ Tetrodontidae และวงศ์ Diodontidae สามารถพบสารพิษได้เฉพาะบริเวณผิวหนัง รังไข่ และอวัยวะภายใน มีสารพิษ Tetrodotoxin (TTX) ที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ประสาทโดยไม่ยอมให้โซเดียมไอออนกลับเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ของระบบประสาททั้งประสาทสั่งการ (Motor nerve) และประสาทรับความรู้สึก (Sensory nerve) ไม่สามารถสื่อนำกระแสประสาทได้ตามปกติ และยังส่งผลต่อเซลล์กล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเป็นอัมพาต หรืออาจทำให้สมองตายได้ ซึ่งสารพิษ TTX เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ดี และทนต่อความร้อน ดังนั้นการทำให้สุกจึงไม่สามารถลดความเป็นพิษได้ (Chen. *et al.*, 2015) ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Vibrio alginolyticus Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ทะเล และสาหร่ายเซลล์เดียวเช่น *Alexandrium tamarense Prorocentrum minimum Anabaena flosaquae* และ *Microcystis aeruginosa* ที่อยู่เป็นอิสระตามธรรมชาติ และเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ทะเลสามารถสร้างสารพิษนี้ขึ้นมาได้ (Fukuyo. *et al.*, 1993 ; Kodama. *et al.*, 1996 ; Vlamis. *et al.*, 2015) ซึ่งพบว่ามีสัตว์ทะเลบางชนิดเท่านั้นที่สามารถสะสมสารพิษ TTX ไว้ในเนื้อเยื่อได้ ปลาปักเป้าในประเทศไทยที่สามารถสร้างสารพิษ TTX เช่น ปลาปักเป้า (*Tetrodon hispidus*) ปลาปักเป้าดำ (*Tetrodon stillatus*) และปลาปักเป้าลาย (*Sphoeroides scleratus*) (Lago. *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังพบสารพิษชนิดนี้ในสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด ได้แก่ หมึกสายวงน้ำเงิน (*Hapaloclaena maculosa*) หอยกาบเดี่ยวบางชนิด เช่น *Veremolpa scabra Umborium suturale Natica lineata* และ *Nassarius conoidalis* ทากทะเลบางชนิด เช่น *Pleurobranchaea maculata* และ *Stylochoplana* spp. หรือปูบางชนิด เช่น *Zesimus aeneus และ Atergatis floridus* ซึ่งความรุนแรงของพิษ TTX ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อน และสะสมอยู่ในสัตว์ทะเล (Cavazzoni. *et al.*, 2008 ; Lin. *et al.*, 2011 ; Salvitti. *et al.*, 2015)

2.1.2 Ciguatera fish poisoning

สารพิษ Ciguatoxin (CTX) พบได้ในปลาทะเลที่กินสาหร่ายเซลล์เดียวพวกไดโนแฟลเจลเลต (Dinoflagellate) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) ที่อาศัยอยู่บนซากปะการัง เช่น *Gambierdiscus lapillus Gambierdiscus toxicus* และ *Oscillatoria erythraea* ซึ่งสามารถสร้างสาร CTX ได้ (Scott and Michael, 1992 ; Kretzschmar. *et al.*, 2017) CTX เป็นสารพิษที่ละลายได้ดีในไขมัน ไม่มีกลิ่น และรส ทนต่อกรด และไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน การทำให้แห้ง การแช่แข็ง การรมควัน และการปรุงด้วยวิธีต่าง ๆ ผู้ป่วยจึงเกิดอาการอาหารเป็นพิษได้หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรับประทานปลาทะเล ถึงแม้ผ่านการปรุงสุกแล้วก็ตาม สาร CTX ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาท โดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรส (Cholinesterase) ของเม็ดเลือดแดง และเพิ่มอัตราการไหลของโซเดียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อปลาที่กินสาหร่ายเซลล์เดียวจำพวกนี้เป็นอาหารจะไม่ได้รับอันตราย แต่กลับสะสมสารพิษ CTX ไว้ในเนื้อเยื่อ และอวัยวะภายในนอกจากนี้สารพิษ CTX ยังสามารถสะสมและถ่ายทอดผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ปลายิ่งมีขนาดใหญ่ยิ่งมีปริมาณสารพิษ CTX สะสมอยู่มาก เช่น ปลาสาก (*Sphyraena jello*) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ปลากะรัง (*Epinephelus* spp.) ปลาไหลมอเรย์ (*Gymnothorax javanicus*) ปลาหมอทะเล (*Epinephelus lanceolatus*) และปลานกแก้ว (*Scarus* spp.) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารพิษ Maitotoxin (MTX) ได้ในปลานกแก้ว และสารพิษ Scaritoxin ในปลาขี้ตังเบ็ด (*Ctenochaetus* spp.) ซึ่งจัดเป็นสารพิษในกลุ่ม Ciguatera fish poisoning ด้วยเช่นกัน (Bagnis and Chungue, 1977 ; Copeland. *et al.*, 2014)

2.1.3 Histamine fish poisoning

Histamine เป็นสารที่สามารถทนความร้อนได้สูง อุณหภูมิที่ใช้ในการปรุงอาหารสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอาหารได้แต่ไม่สามารถทำลาย Histamine ได้ โดยทั่วไปแล้วสามารถพบได้ในปลาวงศ์ Scomberesocidae และ Scombridae สารพิษชนิดนี้จะเกิดขึ้นได้โดยแบคทีเรียบางสายพันธุ์ โดยสามารถแบ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง Histamine ได้สูง เช่น *Klebsiella pneumonia K. oxytoca Enterobacter agglomerans และ Proteus vulgaris* และสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง Histamine ได้น้อย เช่น *Escherichia coli* และ *Vibrio alginolyticus* เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มดังกล่าวข้างต้นสามารถสร้างเอนไซม์ Histidine decarboxylase โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะเปลี่ยนกรดอะมิโน Histidine ในเนื้อปลาไปเป็น Histamine (Bartholomew. *et al.*, 1987 ; Lehane and Olley, 2000 ; Butler. *et al.*, 2011)

2.1.4 Shellfish poisoning

เป็นสารพิษที่สามารถพบได้ในทั้งหอยกาบคู่ และหอยกาบเดี่ยว เช่น หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) หอยแครง (*Tegillarca granosa*) หอยนางรม (*Crassostrea virginica*) หอยมือเสือ (*Tridacna squamosa*) แมงดาถ้วย (*Carcinoscorpius rotundicauda*) โดยสามารถแบ่งประเภทของสารพิษได้อีก 4 กลุ่ม ตามการเป็นพิษต่อผู้บริโภค หรือตามคุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ Amnesic shellfish poisoning (ASP) Diarrheal shellfish poisoning (DSP) Neurotoxic shellfish poisoning (NSP) และ Paralytic shellfish poisoning (PSP) สารพิษเหล่านี้สามารถสะสมในเนื้อเยื่อหอย เนื่องจากหอยกินสาหร่ายขนาดเล็ก และไดอะตอมที่สามารถสร้างสารพิษได้ ดังนั้นจึงมีการสะสมของสารพิษอยู่ในเนื้อเยื่อหอย (Fletcher. *et al.*, 1995 ; Plakas, 2002)

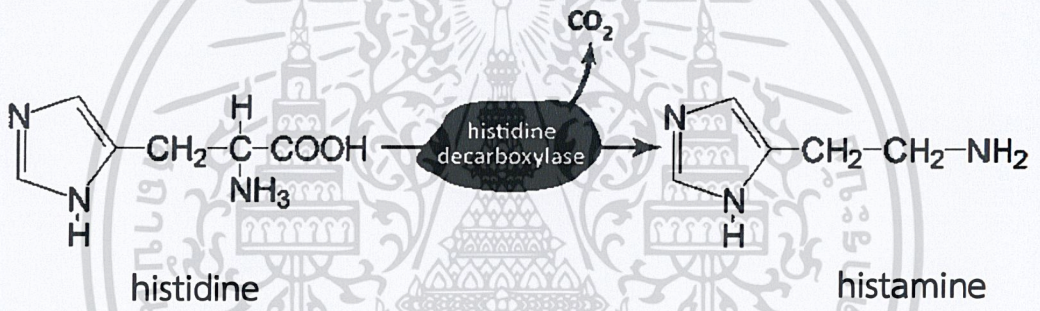
2.2 Biogenic amines

Biogenic amines เป็นสารประกอบที่มีธาตุไฮโดรเจน (H) ในองค์ประกอบของแอมโมเนียที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่อัลคิล (Alkyl groups) หรืออัลลิล (Aryl groups) Biogenic amines เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในเซลล์สิ่งมีชีวิต ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีววิทยา เช่น การส่งผ่านไซแนปส์ (Synaptic transmission) การควบคุมความดันโลหิต การตอบสนองต่ออาการแพ้ และการควบคุมการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้สามารถพบ Biogenic amines ได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น ปลา ผลิตภัณฑ์จากปลา ผลิตภัณฑ์อาหารที่หมักจำพวก เนื้อ นม ผัก เบียร์ และไวน์ (Shalaby,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1996 ; Silla, 1996) Biogenic amines มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยสามารถแบ่งได้ตามโครงสร้างที่แตกต่างกัน สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นอะลิฟาติก (Aliphatic structure) ได้แก่ พิวทริซีน (Putrescine) คาดาเวอรีน (Cadaverine) แอคมาทีน (Agmatine) สเปอร์มีน (Spermine) และสเปอร์มิดีน (Spermidine) สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก (Aromatic structure) ได้แก่ ไทรามีน (Tyramine) และฟีนิลเอทิลเอมีน (Phenylethylamine) ในขณะที่สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic structure) ได้แก่ ฮีสตามีน (Histamine) และทริปตามีน (Tryptamine) (Moret. *et al.*, 2005 ; Tsai. *et al.*, 2005 ; Ordóñez. *et al.*, 2016)

Biogenic amines สามารถเกิดขึ้นในระหว่างการเน่าเสียของอาหาร ที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase) ที่เปลี่ยนกรดอะมิโนอิสระในอาหารเหล่านั้นจนได้เป็น Biogenic amines ซึ่ง Histamine เกิดจากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ Histidine decarboxylase ซึ่งจะเปลี่ยนกรดอะมิโนอิสระฮีสทิดีนที่มีอยู่มากในเนื้อปลาเปลี่ยนเป็น Histamine หรือเรียกว่า Scombrotoxin เนื่องจากสามารถพบได้ในปลาทะเลโดยเฉพาะปลาในวงศ์ Scombridae และวงศ์ Scomberosocidae (Önal, 2007)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสาร Histidine และ Histamine
ที่มา : King, 2017

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น Histamine เป็นสารพิษที่ทนต่อความร้อนได้ และไม่ทำให้เนื้อปลามีกลิ่นหรือรสที่ผิดแปลกไปจากปกติ แม้ว่าแบคทีเรียที่สร้างสารพิษจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน แต่สารพิษยังคงสภาพอยู่ได้ในเนื้อปลา ทำให้ผู้บริโภคที่ทานเนื้อปลาปนเปื้อน Histamine เกิดการแพ้ได้ ปริมาณของ Histamine ที่เกิดขึ้นมีความแปรผันตรงกับปริมาณ Histidine ซึ่งสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของปลา และกิจกรรมของเอนไซม์ Histidine decarboxylase และยังพบว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคที่เรียคืออุณหภูมิ แบคทีเรียจำพวก Mesophilic bacteria เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง 20-45 $^{\circ}$C ดังนั้น Histamine จึงพบมากเมื่อปลาถูกเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ปลาที่มีคุณภาพดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (Cold storage) 0-5 $^{\circ}$C จะพบ Histamine ในปริมาณน้อยกว่า 10 ppm. ในขณะที่ปลาที่เริ่มเน่าเสียจะมีปริมาณ Histamine 30 ppm. และปลาที่เน่าเสียแล้วจะมีปริมาณ Histamine มากกว่า 50 ppm. (Gonzaga. *et al.*, 2009 ; Köse, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 แบคทีเรียที่สร้าง Histamine

แบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และแบคทีเรียที่พบว่าสามารถสร้าง Histamine ในผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูป ผลิตภัณฑ์ปลาบรรจุกระป๋อง และปลาสด มักจะเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำทะเล หรือแบคทีเรียประจำถิ่นจากตัวปลา ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Vibrio Pseudomonas* และ *Photobacterium* เช่น *Vibrio alginolyticus Photobacterium phosphoreum* และ *P. damselae* และแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งมักจะพบการปนเปื้อนหลังจากการจับ (Post harvest) เช่น *Morganella morganii M. psychrotolerans Raoultella planticola Hafnia alvei* และสายพันธุ์ที่พบว่ามีการสร้าง Histamine ได้น้อย เช่น *Serratia marcescens* (Frank. *et al.*, 1981 ; Staruszkiewicz. *et al.*, 2004) รวมทั้งแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ในผลิตภัณฑ์ถนอมอาหารมักเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus Enterococcus* และ *Staphylococcus* เช่น *Lactobacillus rhamnosus* ที่สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก *Enterococcus durans* ที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาแช่แข็ง *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus capitis* ที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม (Hernandez. *et al.*, 1999 ; Pons. *et al.*, 2005 ; Long and Tu, 2015)

2.2.1.1 ปลาที่มีความเสี่ยงในการพบ Histamine

Histamine สามารถพบได้ในปลาทะเลชนิดต่าง ๆ โดยส่วนใหญ่แล้วมักพบในปลาวงศ์ Scombridae และปลาวงศ์ Scomberosocidae เนื่องจากปลาในกลุ่มนี้จัดเป็นปลาที่มีปริมาณ Histidine สูงจะสามารถพบการปนเปื้อนของ Histamine ได้ในปริมาณที่สูงกว่าปลาที่มีปริมาณ Histidine ต่ำ โดยปลาทะเลที่มีปริมาณ Histidine ในเนื้อเยื่อสูงแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงข้อมูลปลาทะเลที่มีปริมาณ Histidine ในเนื้อเยื่อสูง

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อทั่วไป	Histidine (mg/kg)	อ้างอิง
Scombridae	*Scomber japonicus*	ปลาซาบะ	1,063	Kim *et al.*, 2013 ; Hibiki and Simidu, 1959
	Thunnus obesus	ปลาทูน่าตาโต	4,450	Espiñeira *et al.*, 2009 ; Suyama and Yoshizawa, 1973
	Scomber scombrus	ปลาแมคเคอ-เรลแอตแลนติก	4,000	Emilio *et al.*,1994 ; Mackie *et al.*, 1997
	Thunnus alalunga	ปลาโอครีบยาว	4,600	Espiñeira *et al.*, 2009 ; Murata *et al.*, 1994
	Katsuwonus pelamis	ปลาโอแถบ	13,400	Espiñeira *et al.*, 2009 ; Suyama and Yoshizawa, 1973

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลปลาทะเลที่มีปริมาณ Histidine ในเนื้อเยื่อสูง

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อทั่วไป	Histidine (mg/kg)	อ้างอิง
Scombridae	*Thunnus albacares*	ปลาโอครีบเหลือง	2,123	Espiñeira *et al.*, 2009 ; Suyama and Yoshizawa, 1973
Scomberosocidae	*Cololabis saira*	ปลาซันมะ	16,100	Torido *et al.*, 2014 ; Hibiki and Simidu, 1959
Clupeidae	*Clupea harengus*	ปลาเฮอริ่งแอตแลนติก	1,230	Zhihua *et al.*, 2011 ; Mackie *et al.*, 1997
	Sardina pilchardus	ปลาซาร์ดีน	2,884	Nadica *et al.*, 2013 ; Ababouch *et al.*, 1996
	Sardinops melanostictus	ปลาซาร์ดีนญี่ปุ่น	1,227	Torido *et al.*, 2014 ; Hibiki and Simidu, 1959
Coryphaenidae	*Coryphaena hippurus*	ปลาอีโต้มอญ	1829	Butler *et al.*, 2011 ; Sasikala *et al.*, 2002
Engraulidae	*Stolephorus heterolobus*	ปลากะตัก	4,810	Chatchawan, 2014 ; Arakaki and Suyama, 1966
Carangidae	*Seriola quinqueradiata*	ปลาสำลีญี่ปุ่น	8,470	Torido *et al.*, 2014 ; Sasikala *et al.*, 2002
	Seriola lalandi	ปลาสำลี	7320	Auerswald *et al.*, 2006 ; Sasikala *et al.*, 2002
Istiophoridae	*Istiompax indica*	ปลากระโทงร่มดำ	7,630	Tsai *et al.*, 2005 ; Suyama and Yoshizawa, 1973
	Istiophorus platypterus	ปลากระโทงร่มอินโด	7,630	Tsai *et al.*, 2005 ; Tsai *et al.*, 2005
Chanidae	*Chanos chanos*	ปลานวลจันทร์ทะเล	4,410	Tsai *et al.*, 2005 ; Chiou *et al.*, 1990

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 คุณสมบัติของสาร Histamine

Histamine ทำหน้าที่เป็นทั้งฮอร์โมนและสารสื่อประสาท โดยจะจับกับตัวรับอย่างจำเพาะ (H1-receptors H2-receptors H3-receptors และ H4-receptors) บนเซลล์เป้าหมาย การเปลี่ยนแปลงของระดับ Histamine ทำให้เกิดหน้าที่หลากหลายทางสรีรวิทยา เช่น การหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร จังหวะเซอร์คาเดียน (Circadian rhythm) การเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายในอาหาร (Food hazard) ประเภทอันตรายทางเคมี (Chemical hazard) ที่ทนต่อความร้อนไม่ถูกทำลายได้ง่าย ดังนั้นอาหารที่มี Histamine ปนเปื้อนอยู่ถึงแม้จะนำมาผ่านการปรุงอาหารด้วยความร้อนก็ไม่สามารถทำลาย Histamine ที่ปนเปือนได้ และยังคงสภาพอยู่ในอาหารโดยไม่ทำให้อาหารมีกลิ่น หรือรสที่ผิดแปลกไปจากปกติ (Ienistea, 1973 Masaki. *et al.*, 2004 ; FDA, 2011)

2.2.3 ข้อกำหนดปริมาณสาร Histamine ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

2.2.3.1 ผลิตภัณฑ์ปลาสด ปลาแช่แข็ง และปลาบรรจุกระป๋อง

ตามระเบียบสหภาพยุโรป เรื่อง เพิ่มเติมข้อกำหนดปริมาณ Histamine ในผลิตภัณฑ์ประมง ตามภาคผนวก 1 ของ Commission Regulation (EC) No 2073/2005 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาสด ปลาแช่แข็ง และปลาบรรจุกระป๋องกระป๋อง มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 100 ppm. (EC, 2005)

ตามระเบียบของประเทศแคนาดา หลักเกณฑ์สำหรับการปนเปื้อนสารเคมีและสารพิษในผลิตภัณฑ์ปลาและปลาสด ตามภาคผนวก 3 ของ Canadian Food Inspection Agency 2013 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาสด ปลาแช่แข็ง และปลาบรรจุกระป๋องกระป๋อง มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 100 ppm. (CFIA, 2013)

ตามระเบียบของประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ตาม Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) Standard 2.2.3 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาสด ปลาแช่แข็ง และปลาบรรจุกระป๋องกระป๋อง มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 200 ppm. (MPI 2013b)

ตามระเบียบขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (USFDA) หลักเกณฑ์สำหรับ Histamine ที่ปนเปื้อนในเนื้อปลา ตาม CPG 7108.24 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาสด ปลาแช่แข็ง และปลาบรรจุกระป๋อง มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 50 ppm. (FDA, 2011)

2.2.3.2 ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูป

ตามระเบียบสหภาพยุโรป เรื่อง เพิ่มเติมข้อกำหนดปริมาณ Histamine ในผลิตภัณฑ์ประมง ตามภาคผนวก 1 ของ Commission Regulation (EC) No 2073/2005 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูป มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 200 ppm. (EC, 2005)

ตามระเบียบของประเทศแคนาดา หลักเกณฑ์สำหรับการปนเปื้อนสารเคมีและสารพิษในผลิตภัณฑ์ปลาและปลาสด ตามภาคผนวก 3 ของ Canadian Food Inspection Agency 2013 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูป มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 200 ppm. (CFIA, 2013)

2.2.3.3 ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปประเภทน้ำปลา

ตามระเบียบสหภาพยุโรป เรื่อง เพิ่มเติมข้อกำหนดปริมาณ Histamine ในผลิตภัณฑ์ประมง ตามภาคผนวก 1 ของ Regulation 2073/2005 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปประเภทน้ำปลามีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 400 ppm. (EC, 2005)

ตามระเบียบของประเทศแคนาดา หลักเกณฑ์สำหรับการปนเปื้อนสารเคมีและสารพิษใน

เอกสารนี้เป็นเ... ...การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ปลาและปลาสด ตามภาคผนวก 3 ของ Canadian Food Inspection Agency 2013 ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปประเภทน้ำปลา มีปริมาณ Histamine ได้ไม่เกิน 200 ppm. (CFIA, 2013)

2.2.4 อาการที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน Histamine

เนื่องจาก Histamine เป็นสารก่อภูมิแพ้ (Food allergen) โดยการจับกับตัวรับอย่างจำเพาะซึ่งมีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การขยายตัวของหลอดเลือด และการไหลเวียนเลือดไปสู่เนื้อเยื่อโดยรอบ เช่น เยื่อเมือก และ เนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (Jørgensen. *et al.*, 2007) ส่งผลให้ผู้ที่ได้รับ Histamine จะเกิดอาการแพ้ในลักษณะต่าง ๆ โดยอาการที่ปรากฏจะแสดงออกมาในลักษณะของผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย หรือ อาการอื่น ๆ ปกติแล้วอาการป่วยจะมีตั้งแต่ไม่รุนแรง และสามารถหายได้เอง ส่วนในกรณีที่อาการรุนแรง ผู้ป่วยอาจมีอาการความดันเลือดต่ำ หายใจลำบาก เห็นภาพซ้อน และอาจถึงขั้นหมดสติได้ สำหรับผู้ที่ได้รับ Histamine เข้าสู่ร่างกายแล้ว มีวิธีการรักษาเบื้องต้น คือ การได้รับยาต้านฮีสตามีน (Antihistamine) สามารถบรรเทาอาการแพ้ได้ หรือยาสเตียรอยด์ (Steroids) สามารถลดอาการอักเสบที่เกิดขึ้นจาก Histamine ได้ (Attaran and Probst, 2002 ; Kovacova. *et al.*, 2015)

2.2.5 การป้องกันการเกิด Histamine

2.2.5.1 การแช่เย็น

การแช่เย็นของปลาให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้หลังจากที่จับได้ เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการควบคุมการสะสมของสารประกอบเอมีน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้าง Histamine จะเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิต่ำ และอัตราการเจริญของเซลล์จะลดลงมากเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิใกล้อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง (0 °C) ดังนั้นข้อแนะนำในการแช่เย็นปลาหลังการจับเป็นวิธีการที่ชาวประมง และภาคอุตสาหกรรมสามารถทำได้เพื่อเป็นการควบคุมการสร้าง Histamine ของแบคทีเรีย (FDA, 2011)

ปลาที่สัมผัสกับอากาศ หรือน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่า 28.3 °C ควรวางไว้ในน้ำแข็ง หรือน้ำทะเลที่เย็น ปิดทับด้วยน้ำแข็งให้ทั่ว หรือแช่ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 4.4 °C หรือต่ำกว่าโดยเร็วที่สุดหลังการจับ และต้องจัดเก็บภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง หลังการจับ (FDA, 2011)

ปลาที่สัมผัสกับอากาศ หรือน้ำที่อุณหภูมิ 28.3 °C หรือต่ำกว่า ควรวางไว้ในน้ำแข็ง หรือน้ำทะเลที่เย็น ปิดทับด้วยน้ำแข็งให้ทั่ว หรือแช่ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 4.4 °C หรือต่ำกว่าโดยเร็วที่สุดหลังการจับ และต้องจัดเก็บภายในระยะเวลา 9 ชั่วโมง หลังการจับ (FDA, 2011)

ปลาที่นำเหงือกและเครื่องในออกแล้ว ควรวางไว้ในน้ำแข็ง หรือน้ำทะเลที่เย็น ปิดทับด้วยน้ำแข็งให้ทั่ว หรือแช่ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 4.4 °C หรือต่ำกว่าโดยเร็วที่สุดหลังการจับและ และต้องจัดเก็บภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังการจับ (FDA, 2011)

ปลาที่ตาย และสัมผัสกับอากาศ หรือน้ำที่อุณหภูมิ 18.3 °C หรือต่ำกว่า ควรวางไว้ในน้ำแข็ง หรือน้ำทะเลที่เย็น ปิดทับด้วยน้ำแข็งให้ทั่ว หรือแช่ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 4.4 °C หรือต่ำกว่า โดยเร็วที่สุดหลังการจับภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง หรือน้อยกว่า แต่ไม่ควรเกินระยะเวลานี้ นับตั้งแต่เริ่มออกจากที่อุณหภูมิ 18.3 °C (FDA, 2011)

2.2.5.2 การตัดเหงือกและควักไส้

โดยทั่วไปแล้วมักจะพบแบคทีเรียในลำไส้ เหงือก และผิวหนังของปลา ดังนั้นการการตัดเหงือก และควักไส้ในทันทีจะทำให้ช่วยลดการสร้าง Histamine ของแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับปลาขนาดใหญ่แล้วการควักไส้ออกยังช่วยให้น้ำแข็งสามารถเข้าไปในบริเวณท้องได้จึงสามารถควบคุมอุณหภูมิภายในตัวปลาให้ต่ำได้ทั่วถึงมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในระหว่างการตัดเหงือก และควักไส้ควรใช้ความระมัดระวังเพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในเนื้อเยื่อของปลา (FDA, 2011)

2.2.5.3 การแช่แข็ง

การเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จะช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้ แต่การเก็บรักษาไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Psychrophile ที่สามารถสร้าง Histamine ได้ เช่น *Photobacterium aquimaris P. kishitanii* และ *M. psychrotolerans* ดังนั้นการจัดเก็บโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 °C หรือต่ำกว่าจะหยุดยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และเป็นการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Histidine decarboxylase ที่ได้ (Emborg and Dalgaard, 2008 ; Torido. *et al.*, 2014)

2.2.5.4 การใช้ความร้อน

การให้ความร้อนสามารถทำลาย และลดจำนวนแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้ และรวมถึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Histidine decarboxylase ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ แต่ไม่สามารถทำลาย Histamine ได้ ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้นั้นจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่ใช้ในการปรุงอาหารหรือถนอมอาหาร แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างสปอร์สามารถทนต่อความร้อนดังกล่าวข้างต้นได้ ดังนั้นการปรุงอาหารหรือการแปรรูปผลิตภัณฑ์ควรใช้ความร้อนที่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียและการทำงานของเอนไซม์ Histidine decarboxylase และรวมถึงสามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ไม่ให้มีปริมาณอยู่ในระดับที่อันตรายซึ่งจะสามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้ (Osborne and Bremer, 2000)

2.2.5.5 การใช้ความดัน

การใช้ความดันสูงเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนซึ่งสามารถนำมาใช้ทำลายแบคทีเรียที่ผลิต Histamine และ Biogenic amines ในผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อความร้อนได้ โดยพบว่าเมื่อมีการใช้ความดันที่ 350 MPa เป็นเวลา 15 นาที สามารถลดแลคติกแบคทีเรียในไส้กรอกได้ 20.1% ลดปริมาณ Cadaverine 12.5% Putrescine 8.7% และ Tyramine 17% ในระหว่างการเก็บรักษาแช่เย็นเป็นเวลา 160 วัน เมื่อเทียบกับการไม่ได้ใช้ความดัน (Ruiz *et al.*, 2007) และพบว่าการใช้ความดันที่ 300 ถึง 400 MPa เป็นเวลา 3 นาที ในปลาซาบะ พบว่าปริมาณเอนไซม์ Histidine decarboxylase ลดลง 63.3%, และ 84.5% ตามลำดับ และเมื่อใช้ความดันที่ 200 ถึง 300 MPa เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ลดลงมาระหว่าง 10^5 CFU/g และ 10^3 CFU/g ตามลำดับเมื่อเทียบกับการไม่ได้ใช้ความดัน คือ 10^9 CFU/g โดยไม่มีผลต่อคุณภาพของปลา (Kim. *et al.*, 2013)

2.2.5.6 การใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง เกลือ ก๊าซ และบรรจุภัณฑ์สุญญากาศ

การใช้กรดอินทรีย์เพื่อลดค่าความเป็นกรดด่าง การใช้เกลือ หรือวิธีอื่น ๆ เพื่อลดความชื้น และการเก็บรักษาภายใต้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถยับยั้ง หรือป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้ สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง (Emborg and Dalgaard, 2005 ; Emborg. *et al.*, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.7 การใช้วัตถุเจือปนอาหาร

วัตถุเจือปนอาหารเช่น Potassium sorbate Sodium nitrites Glucono-delta-lactone และ Glycine ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine และลดการสร้าง Histamine ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์นั้นด้วย (Naila *et al.*, 2010) และยังพบว่าการผสมเครื่องเทศในอาหารเช่น ขมิ้นชัน พริก และพริกไทยดำ สามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่สร้าง Histamine ได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามวัตถุเจือปนอาหารยังส่งผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส หรือการยอมรับของผู้บริโภค และอาจก่อให้เกิดผลกระทบทางด้านลบ เช่น การใช้ผงขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine แต่ก็สามารถยับยั้งเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส (Diamine oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย Histamine ได้ (Bhutani. *et al.*, 2009)

2.2.5.8 การใช้หัวเชื้อ หรือเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ประเภทหมัก และผลิตภัณฑ์ประมง

ผลิตภัณฑ์ประเภทหมักและผลิตภัณฑ์ประมงจะมีการเติมเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเพื่อสร้างลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยมักจะเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ได้ ส่งผลให้ไม่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการใช้หัวเชื้อที่มีความสารถในการผลิตเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส (Diamine oxidase) ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเอมีนได้เพื่อลดการปนเปื้อนของ Histamine ในผลิตภัณฑ์ (EFSA, 2011)

2.2.5.9 การสร้างแบบจำลองปริมาณจุลินทรีย์

การผลิต Histamine ในปลา และผลิตภัณฑ์ประมงบางชนิดที่ถูกเก็บไว้ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันสามารถประมาณจำนวนจุลินทรีย์ได้โดยการใช้แบบจำลองปริมาณจุลินทรีย์ ซึ่งมีประโยชน์มากสำหรับผู้บริโภคในการเลือกซื้อเมื่อทราบถึงอุณหภูมิจัดเก็บที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ โดยสามารถใช้เพื่อคำนวณปริมาณ Histamine ระยะเวลา และรวมถึงระดับ Histamine ที่เป็นอันตราย (Dalgaard, 1995)

2.3 เทคนิคการคัดแยกเชื้อ และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติแบคทีเรียจะเติบโตอยู่รวมกันหลายสายพันธุ์ เพื่อการคัดแยก และจำแนกชนิดของแบคทีเรีย แต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Isolation of pure culture) โดยส่วนมากจะใช้อาหารแข็ง (Solid medium) ที่มีส่วนประกอบของวุ้น (Agar) และมีสารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่กับที่ เจริญและแบ่งตัวจากเซลล์เดี่ยวเป็นหลายเซลล์อยู่บนอาหาร จนมีขนาดใหญ่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า โคโลนี วิธีการนี้เหมาะกับจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็งเท่านั้น (อภิญญา, 2556)

2.3.1 วิธี Filtration

วิธีนี้ใช้ในการแยก และเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากน้ำ เพราะมักมีปริมาณจุลินทรีย์น้อย น้ำตัวอย่างจะถูกนำมากรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง (Membrane filter) ซึ่งมีรูขนาด 0.22-0.45 µm (ศรีการจนา, 2558) โดยแบคทีเรียจะถูกกักไว้บนแผ่นเยื่อกรอง จากนั้นนำแผ่นเยื่อกรองวางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม เพื่อสังเกตการเจริญและนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย (ศศิธร, 2559)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 วิธี Spread plate technique

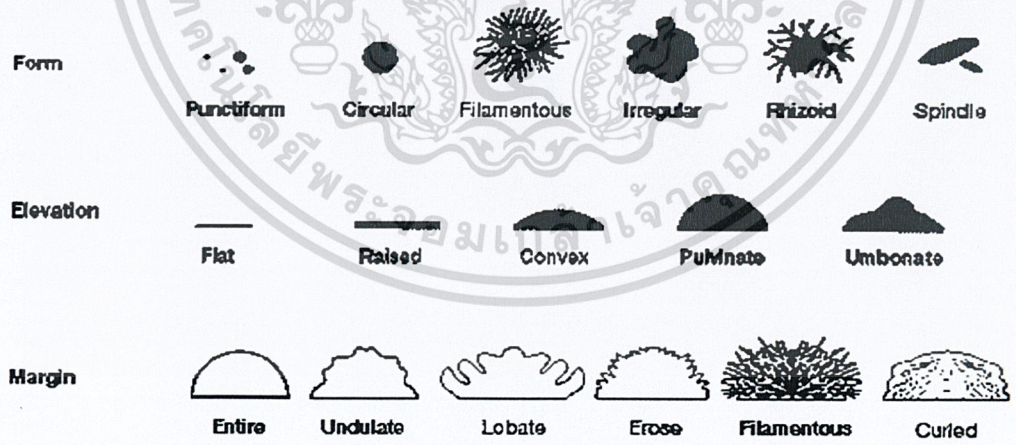
วิธีการนี้เป็นวิธีที่ทำง่ายที่สุด ซึ่งวิธีนี้แบคทีเรียถูกเจือจางให้ได้ระดับที่ต้องการ จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางจนได้ระดับที่ต้องการปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงสู่ตรงกลางของจานเพาะเชื้อ แล้วทำการเกลี่ย (Spread) ให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล หลังจากนั้นคว่ำจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ข้างบน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม สังเกตโคโลนีของเชื้อที่เจริญ (อภิญญา, 2556)

2.3.3 วิธีการ Pour plate technique

วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ และสามารถตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อได้ ซึ่งวิธีนี้แบคทีเรียถูกทำให้เจือจางให้ได้ตามที่ต้องการโดยใช้วิธี การเจือจางทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) แล้วนำระดับความเจือจางของเชื้อที่ต้องการปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ถ่ายลงในจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ และหมุนจานเพาะเชื้อ เพื่อให้เชื้อ และอาหารผสมกันดี จากนั้นรอจนอาหารแข็งตัวแล้วจึงคว่ำจานเพาะเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม สังเกตการเจริญของเชื้อ และนับจำนวนเชื้อของแบคทีเรีย (อภิญญา, 2556)

2.3.4 วิธี Streak plate technique

วิธีนี้เป็นวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สะดวก และดีที่สุดสำหรับจุลินทรีย์ที่เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง โดยทำให้เชื้อมีการเจือจางลงเรื่อย ๆ ซึ่งใช้ Loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อ และนำไปลาก (Streak) บนผิวอาหารแข็งไม่ให้เส้นทับกันกับรอยลากแรก ๆ จะให้การเจริญที่ติดต่อกัน รอยลากสุดท้ายจะสามารถพบเชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนีที่แยกกัน เนื่องจาก 1 โคโลนี เจริญมาจากเซลล์ 1 เซลล์ ดังนั้นแต่ละโคโลนีถือได้ว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (อภิญญา, 2556) เมื่อมองโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ด้วยตาเปล่าจะมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง
ที่มา : Prescott *et al.*, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

2.4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)

2.4.1.1 Bismuth sulfite agar (BSA)

Bismuth sulfite agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective medium ที่มีความคัดเลือกสูง ใช้สำหรับคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Salmonella* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. typhi* จากการที่มี Bismuth sulfite และ Brilliant green เป็นองค์ประกอบ จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และมี Ferrus sulfate เป็นองค์ประกอบ เพื่อดูความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยเมื่อมีการผลิตก๊าซจะเห็นโคโลนีมีสีน้ำตาลถึงสีดำและมีลักษณะที่เรียกว่า Metallic sheen (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.2 Brilliant green agar (BGA)

Brilliant green agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective medium ใช้สำหรับคัดแยก แบคทีเรียในสกุล *Salmonella* ยกเว้น *S. typhi* เป็นอาหารที่มีความคัดเลือกสูง เนื่องจากคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ แบคทีเรียในสกุล *Salmonella* โดยในอาหารจะมีน้ำตาลแล็กโทส และน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ และมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ทำให้เห็นโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลที่เจริญบนอาหารที่มีสีเหลือง (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.3 Citrate utilization test

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้โซเดียมซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีเพียงซิเทรตชนิดเดียวที่เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเทรตเป็น แหล่งคาร์บอนได้จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง จนทำให้อินดิเคเตอร์ (Bromothymol blue) เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.4 Cystine lactose electrolyte deficiency (CLED) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ CLED agar ใช้สำหรับแยก นับจำนวน และจัดจำแนกแบคทีเรียจากตัวอย่างปัสสาวะ โดยจากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มี Electrolyte source เป็นองค์ประกอบจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแผ่ขยายคล้ายคลื่นของแบคทีเรียในสกุล *Proteus* และในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลแล็กโทสเป็นส่วนประกอบเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาลได้ โดยมีอินดิเคเตอร์ คือ Bromothymol blue ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถหมักย่อย และไม่หมักย่อยน้ำตาลออกจากกัน เนื่องจากเมื่อเกิดการหมักย่อยน้ำตาลจะเกิดกรดทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.5 Desoxycholate citrate agar (DCA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ DCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective medium ที่มีคุณสมบัติคัดเลือกระดับปานกลาง ใช้แยกแบคทีเรียรูปท่อนที่เจริญในลำไส้ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Salmonella* และ *Shigella* โดยในอาหารจะมี Sodium citrate และ Sodium desoxycholate เป็นองค์ประกอบ มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และแบคทีเรียในสกุล Proteus ได้ นอกจากนั้นยังประกอบด้วย Ferric ammonium citrate เพื่อดูความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอินดิเคเตอร์ Neutral red เมื่อแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทสที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร และเกิดกรด จะทำให้เห็นโคโลนีของเชื้อมี สีแดงจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (สุบัณฑิต, 2552)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.6 Eosin methylene blue (EMB) agar

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถบอกความแตกต่างของแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส และไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทสได้ เนื่องจากมีอินดิเคเตอร์ 2 ชนิด คือ อิโอซิน และเมทิลีนบลู โดยโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่มหมักย่อยน้ำน้ำตาลแล็กโทสจะสร้างกรดให้โคโลนีสีชมพู ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มไม่หมักย่อยน้ำตาลแล็กโทสจะให้โคโลนีไม่มีสี และ *E. Coli* ยังสามารถให้โคโลนีลักษณะพิเศษ คือ มีความมันวาวคล้ายโลหะ เรียกว่า Metallic sheen เนื่องจากเป็นเชื้อที่หมักย่อยน้ำตาลแล็กโทสได้ดีจนทำให้เกิดการตกตะกอนของสีบนผิวโคโลนีจากสภาวะกรด (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.7 Hektoen enteric agar (HEA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ HEA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective medium ที่มีความคัดเลือกปานกลางใช้ในการแยก และเพาะแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญในลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในสกุล *Shigella* ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ เนื่องจากมีเกลือน้ำดีเป็นองค์ประกอบ แต่บางครั้งก็เป็นพิษกับแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์เช่นกัน อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีน้ำตาล 3 ชนิด คือ แล็กโทส ซูโครส (แซ็กคาโรส) และซาลิซิน (Salicin) เพื่อดูความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาล โดยจะมีน้ำตาลแล็กโทสในปริมาณสูง ซึ่งจะสามารถช่วยลดปัญหาการหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทสช้าได้ อีกทั้งมี Sodium citrate และ Sodium thiosulfate เพื่อดูความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยโคโลนีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะเห็นเป็นจุดสีดำกลางโคโลนี อินดิเคเตอร์ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ คือ Acid fuchsin และ Bromothymol blue (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.8 Lysine indole motility (LIM) medium

เป็นอาหารรวมที่สามารถใช้ทดสอบปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้ 4 ชนิด ได้แก่

Lysine Decarboxylation (LDC) Decarboxylation เป็นการทดสอบการผลิตเอนไซม์ Decarboxylase ทำหน้าที่ดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของกรดอะมิโน เช่น เอนไซม์ Lysine decarboxylase ก็จะมีความจะเพาะกับ Lysine เป็นต้น โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้น คือ เอมีน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างส่งผลให้อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ Bromocresol purple เปลี่ยนเป็นสีม่วง การย่อยสลายกรดอะมิโนเริ่มต้นจากแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารทำให้เกิดกรดอินทรีย์ และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลือง อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรดจึงทำให้เอนไซม์ Decarboxylase ทำให้ทำงานได้ดี โดยจะย่อยกรดอะมิโนข้างต้น อาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนสีกลับไปเป็นสีม่วงเหมือนเดิม ซึ่งการทดสอบการย่อยกรดอะมิโนนั้นจะต้องแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ชุด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนผสมเหมือนกัน ยกเว้นกรดอะมิโน เนื่องจากแบคทีเรียในวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี สามารถหมักย่อยน้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ แต่แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงได้ ทั้งนี้เกิดจากปฏิกิริยา Oxidation deamination แบคทีเรียจะย่อยสลายโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเป็น กรดอะมิโน เอมีน และคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งมีสภาวะเป็นด่าง เอนไซม์ Decarboxylase มีหลายชนิด และแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน กรดอะมิโนที่นิยมใช้ในการพิสูจน์แบคทีเรียวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอีมี 3 ชนิด คือ Lysine Arginine และ Ornithine ซึ่งมีประโยชน์แตกต่างกัน แต่ปฏิกิริยาในการทดสอบเหมือนกัน แบคทีเรียที่ไม่สร้าง

เอกสารนี้ถือเป็นทรัพย์สินของ[illegible] ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ Decarboxylase จะให้ผลลบต่อการทดสอบนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออาจมีสีม่วงตรงส่วนบนอยู่เล็กน้อย (สุบัณฑิต, 2552)

Lysine decarboxylase (LDC) สามารถใช้แยกแบคทีเรียวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี เช่น *Citrobacter* ซึ่งให้ผลลบ ในขณะที่ *Salmonella* และ *Arizona* ให้ผลบวก และการผลิตเอนไซม์ Ornithine decarboxylase (ODC) นิยมใช้แยกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Serratia* (สุบัณฑิต, 2552)

Lysine Deamination (LDM) Deamination หมายถึง ปฏิกิริยาที่ทำให้หมู่อะมิโนของกรดอะมิโนหลุดออกจากส่วนอื่นของโมเลกุลด้วยเอนไซม์ Deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในแบคทีเรียสกุล *Proteus Morganella* และ *Providencia* เท่านั้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเรียกว่า Oxidative deamination หมู่อะมิโนที่หลุดออกมานี้จะเป็นแอมโมเนีย

เอนไซม์ Deaminase แบ่งออกเป็น Lysine deaminase และ Phenylalanine deaminase นั้น ผลบวกจะเห็นเป็นสีแดงที่ส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง (สุบัณฑิต, 2552)

การทดสอบการผลิตอินดอล (Indole production test) เป็นการทดสอบการผลิตอินดอลจากทริปโตฟาน (Tryptophan) โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ทริปโตฟานเนส (Tryptophanase) เมื่อทริปโตฟานในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกออกซิไดส์โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ จะให้อินดอล สคาทอล (Skatole) และกรดอินดอลแอซิติก (Indoleacetic acid) การทดสอบอินดอลทำได้โดยใช้สาร Alcoholec p-dimethylamino-benzaldehyde ทำปฏิกิริยากับอินดอลให้ผลเป็น Rosindole dye ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีแดง แบคทีเรียที่สามารถผลิตอินดอล เช่น *E. coli Proteus vulgaris* ขณะที่ *Enterobacter Klebsiella Serratia* และ *Proteus mirabilis* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ (สุบัณฑิต, 2552)

การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) แบคทีเรียที่มีแฟกเจลลาจะเคลื่อนที่ได้ เช่น *E. coli Salmonella* แบคทีเรียที่ไม่มีแฟกจลลาจะไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *Klebsiella* และ *Shigella* อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ต้องเป็น Semisolid agar ซึ่งมี Agar เพียง 0.4% ถ้า Agar มีมากกว่านี้จะทำให้แบคทีเรียเคลื่อนที่ไม่ได้ เนื่องจากอาหารแข็งเกินไป โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37 °C ยกเว้น *Yersinia enterocolitica* บางสายพันธุ์จะไม่สร้างแฟกเจลลาที่อุณหภูมิ 35-37 °C แต่จะสร้างที่อุณหภูมิ 22 °C หรืออุณหภูมิห้อง จึงต้องตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine indole motile medium จะต้องสังเกตการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนหยด Indole reagent เพราะถ้าหยด Indole reagent ก่อน จะดูการเคลื่อนที่ยากขึ้น (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.9 Lysine iron agar (LIA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ LIA ใช้เพื่อดูความแตกต่างของแบคทีเรียในลำไส้จากคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ Lysine decarboxylase และ Lysine deaminase และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารที่มีน้ำตาล Dextrose ซึ่งจะใช้ดูความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาล โดยใช้อินดิเคเตอร์ Bromocresol purple ซึ่งจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองเมื่อมีการหมักย่อยน้ำตาลและเกิดกรด (pH 5.2) และจะมีสีม่วงเมื่อ pH 6.8 Ferric ammonium citrate และ Sodium thiosulfate ใช้ในการดูความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ส่วนกรดอะมิโน Lysine จะใช้ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ได้กล่าวไปข้างต้น โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ Lysine

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

decarboxylase จะทำให้อาหารมีสภาวะด่างมากขึ้นทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงบริเวณก้นหลอด ส่วนแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ Lysine deaminase อาหารจะมีสีเหลืองบริเวณก้นหลอด และมีสีแดงบริเวณ Slant และอาจมีการผลิตก๊าซ (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.10 MacConkey agar

เป็นอาหารที่ใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนออกจากแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังใช้แยกแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ รูปท่อน สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส ซึ่งจะให้โคโลนีสีแดงจากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ รูปท่อน ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส หรือกลุ่มแกรมลบ รูปท่อน ที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลทุกชนิดซึ่งให้โคโลนีไม่มีสีได้อีกด้วย (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.11 Malonate-Dulcitol test

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้มาโลเนต (Malonate) เป็นแหล่งคาร์บอน คุณสมบัติทางชีวเคมีนี้เป็นคุณสมบัติสำคัญที่ใช้จัดจำแนกแบคทีเรียในวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอีโดยเฉพาะ Salmonella

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมีส่วนประกอบของโซเดียมมาโลเนต (Sodium malonate) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และ Bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ โดยจะให้สีน้ำเงินเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นด่าง (pH ≤ 7.6) และให้สีเหลืองเมื่อมีสภาวะเป็นกรด (pH ≥ 6.0) แบคทีเรียที่สามารถใช้มาดลเนตเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานให้ผลผลิตที่เป็นด่าง ทำให้สีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ในกรณีที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้มาโลเนตเป็นแหล่งคาร์บอนจะใช้น้ำตาลกลูโคสแทน ซึ่งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรด สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แต่ปกติแล้วแบคทีเรียที่ไม่ใช้มาโลเนตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง และยังคงสีเขียวเหมือนเดิม (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.12 Methyl red test และ Voges-Proskauer test (MR-VP test)

Methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งมีช่วงระหว่าง 6.0 (สีเหลือง) และ 4.0 (สีแดง) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ Meyhyl red สามารถตรวจสอบสภาวะกรดได้นั้นจะต่ำกว่าระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่อินดิเคเตอร์อื่น ๆ ตรวจสอบได้ การเปลี่ยนสีที่เกิดในการทดสอบนี้เป็นผลจากการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน

MR test เป็นการทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative test) สำหรับทดสอบการสร้างกรดแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบนี้จะต้องสร้างกรดแก่ (กรดแก่ เช่น กรดแล็กติก กรดแอซีติก กรดฟอร์มิก) จากน้ำตาลกลูโคสทาง Mixed-acid fermentation pathway

VP test เป็นการทดสอบการสร้างสาร Acetyl methyl carbinol หรือ Acetoin ตั้งชื่อตามนักจุลชีววิทยา 2 ท่าน ซึ่งเป็นผู้ค้นพบปฏิกิริยานี้ และนำมาใช้ประโยชน์ในโอกาสต่อมา เมื่อแบคทีเรียสลายน้ำตาลกลูโคสจะเกิดกรดไพรูวิก ซึ่งจะถูกเมแทบอไลต์ต่อไปโดยผ่านวิถี (Pathway) ต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่กับระบบเอนไซม์ของแบคทีเรียแต่ละชนิด วิถีหนึ่ง คือ Butelene glycol fermentation ซึ่งมีผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสาร Acetoin หรือ methyl carbinol แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้าง Mixed acid น้อยมาก เมื่อ Acetoin ถูกออกซิเจนในอากาศ และ 40% Potassium hydroxide โดยมี Creatine และ α-naphthol ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง แบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิต Acetoin ได้ เช่น *Enterobacter Klebsiella Hafnia* และ *Serratia* (สุบัณฑิต, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.13 Nitrate และ Nitrite test

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการรีดิวซ์ไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ หรือก๊าซไนโตรเจน การทดสอบการรีดิวซ์ของไนเทรตแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการตรวจสอบการรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ หลังจากที่ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Nitrate broth แล้วทดสอบการมีไนเทรตโดยการเติม Sulfanilic acid และ α-naphthylamine ลงไป รีเอเจนต์ทั้งสองตัวนี้จะทำปฏิกิริยากับไนไทรต์เกิดสารประกอบสีแดง เรียกว่า Red azo dye ถ้าในขั้นตอนแรกนี้ให้ผลบวกแสดงว่า ไนเทรตถูกรีดิวซ์กลายเป็นไนไทรต์ แต่ถ้าการทดสอบขั้นตอนแรกไม่เกิดสีแดงดังกล่าวอธิบายได้ 2 ทาง คือ ไนเทรตไม่ถูกรีดิวซ์ หรือไนเทรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไทรต์ และเกิดปฏิกิริยาต่อกลายเป็นแอมโมเนีย หรือก๊าซไนโตเจนทำให้ตรวจไม่พบไนไทรต์ ดังนั้นต้องทำการตรวจสอบต่อโดยการเติมผงสังกะสีลงในหลอดทดสอบซึ่งเป็นการทดสอบขั้นที่ 2 ผงสังกะสีมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ ดังนั้นถ้าไนเทรตไม่ถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไทรต์จะเกิดสีแดงในขั้นที่ 2 นี้ แสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นผลลบ คือ แบคทีเรียไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต และยังคงมีไนเตรทอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เกิดสีแดงในการทดสอบขั้นที่ 2 แสดงว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์เป็นแอมโมเนีย หรือก๊าซไนโตรเจน แสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นบวก (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.14 Ornithine decarboxylase

เหมือนกับ Lysine decarboxylase โดย Ornithine decarboxylase สามารถใช้แยกแบคทีเรียวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี เช่น *Citrobacter* ซึ่งให้ผลลบ ในขณะที่ *Salmonella* และ *Arizona* ให้ผลบวก และการผลิตเอนไซม์ Ornithine decarboxylase (ODC) นิยมใช้แยกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Serratia* (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.15 Oxidase test

เป็นการทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรีย ตามปกติแล้วแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facuitative anaerobic bacteria) จะมีการหายใจโดยใช้ขบวนการ Oxidative phosphorylation ซึ่งอาศัยไซโทโครม (Cytochrome) ต่าง ๆ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ทำให้ได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสจะต้องใช้สารรีเอเจนต์ที่ไม่มีสี คือ Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride หรือtetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ถ้าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดสจะทำให้สารทั้งสองชนิดนี้ถูก ออกซิไดส์กลายเป็นสารประกอบที่มีสีม่วง เรียกว่า Indophenol แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส (Glucose nonfermentative gram negative bacilli) เช่น *Pseudomonas Alcaligene* แบคทีเรียวงศ์วิบริโอนาซีอี เช่น *Vibrio Aeromonas* ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีนี้ทำให้แยกแบคทีเรียเหล่านี้จากแบคทีเรียวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอีได้ ซึ่งแบคทีเรียวงศ์นี้ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดรส นอกจากนี้แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลมบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดรสได้ เช่น *Neisseria* (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.16 Salmonella-Shigella (SS) agar

Salmonella-Shigella (SS) agar เป็น Selective agar medium ที่ใช้ในการแยก *Salmonella* และ *Shigella* บางสายพันธุ์ออกจากอุจจาระ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SS agar ประกอบด้วย โปรตีน เกลือน้ำดี แหล่งซัลเฟอร์ น้ำตาลแล็กโทส สี 2 ชนิด และสี Brilliant green เป็นสีที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้เพื่อประโยชน์ในการจำแนก *Salmonella* ออกจากแบคทีเรียในลำไส้อื่น ๆ สำหรับเกลือน้ำดี และโซเดียมซิเทรต (Sodium citrate) ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากมายหลายชนิด นอกจากนี้เกลือน้ำดียังมีความเข้มข้นสูงที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นในลำไส้ที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทสได้สำหรับโซเดียมไทโอซัลเฟส (Sodium thiosulfate) สามารถถูกรีดิวซ์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในลำไส้ ทำให้ได้ซัลไฟด์ และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไทโอซัลเฟตรีดักเทส (Thiosulfate reductase) การให้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถตรวจสอบได้จากการตกตะกอนสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟล์ (Ferrous sulfide) ในปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเขนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide) กับเฟอร์ริคไอออน (Ferric ion)

จากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการคัดเลือกสูง ควรนำสิ่งส่งตรวจที่ต้องการแยก *Salmonella* และ *Shigella* นี้มาใส่ใน SS agar ที่มีน้ำตาลแล็กโทสเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส และให้กรด ทำให้สีอินดิเคเตอร์ Neutral red เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีแดง ทำให้โคโลนีใสของแบคทีเรียเหล่านี้สีแดง สำหรับแบคทีเรียที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส โคโลนีจะไม่มีสี และมีสีดำ หรือไม่มีสีดำตรงกลางโคโลนีก็ได้ (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.17 Selenite F broth

อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite F broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Enrich medium ใช้แยกแบคทีเรียในสกุล *Salmonella* จากตัวอย่างอุจจาระ ปัสสาวะ น้ำ อาหาร หรือตัวอย่างต่าง ๆ ที่ต้องการตรวจ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีส่วนประกอบสำคัญ คือ Selenite แบคทีเรียเจริญ และใช้ Selente อาหารจะมีสภาวะด่างซึ่งลดความเป็นพิษของ Selenite และลดการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนกลุ่มอื่นที่ไม่ต้องการได้ และ Sodium selenite ยังยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด และยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci และ โคลิฟอร์ม (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.18 Tetrathionate broth

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective eneichment จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม Coliform แต่จะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในสกุล *Salmonella* ที่สามารถรีดิวซ์ Tetrathionate ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.19 Triple sugar iron (TSI) agar

TSI agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จำแนกแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี โดยใช้ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แล็กโทส และซูโครส ทำให้ได้กรด และอาจได้ก๊าซเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะทำให้ได้กรด สังเกตได้จากอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนผิวอาหารซึ่งสัมผัสกับอากาศ (Slant) และสามารถใช้เพปโทนทำให้มีสภาวะเป็นด่าง อาหารจึงเปลี่ยนสีเป็นสีแดง ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส และซูโครส จะเห็นผิวหน้าอาหารเป็นสีแดง และสร้างกรดที่ก้นหลอดจึงเห็นเป็นสีเหลืองหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส หรือซูโครส (หรือทั้งสองชนิด) รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ทำให้เกิดกรดปริมาณมาก ถึงแม้บริเวณผิวหน้าอาหารจะเกิดแอมโมเนียจากการใช้ เพปโทน ซึ่งมีสภาวะเป็นด่างก็ไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นด่างได้ จึงทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งก้นหลอด และผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนสังเกตได้จากรอยแตก หรือฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะทำปฏิกิริยากับ Ferric ion ของ Ferric ammonium sulfate เกิดตะกอนสีดำของ Ferrous sulfide ใช้แยก *Salmonella* จาก *Shigella* และแบคทีเรียอื่น ๆ โดย *Salmonella* ส่วนใหญ่จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถใช้แยกระหว่าง *Salmonella* ชนิดต่าง ๆ เช่น *S. typhi* ให้ผลบวก แต่ *S. paratyphi* A ให้ผลลบ (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.20 Urease test

เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส มีประโยชน์มากในการพิสูจน์แบคทีเรียในสกุล *Proteus* และใช้แยก *Proteus* ที่ให้ผลบวกกับ *Providencia* ที่ให้ผลลบ แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอสจะย่อยสลายยูเรียให้ผลผลิตเป็นแอมโมเนียซึ่งมีสภาวะเป็นด่าง โดยจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 8.1 ทำให้อินดิเคเตอร์ คือ Phenol red เปลี่ยนจากสีส้มอ่อนเป็นสีบานเย็น (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.21 Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Selective medium มีความคัดเลือกระดับปานกลาง และยังจัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Differential medium เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียต่างชนิดกัน เมื่อเจริญบนอาหารชนิดนี้จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน

ในอาหารที่มีน้ำตาล Xylose เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในลำไส้แทบทุกชนิสามารถหมักย่อยได้ ยกเว้นแบคทีเรียในสกุล *Shigella* จึงใช้คุณสมบัติในการแยก *Shigella* จากแบคทีเรียในลำไส้ด้วยกันได้ โดยดูความแตกต่างจากการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ Phernol red ซึ่งแบคทีเรียที่หมักย่อยน้ำตาล Xylose จะมีโคโลนีสีเหลืองเนื่องจากเกิดกรด ส่วนแบคทีเรียสกุล *Shigella* ที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ โคโลนีจะใสไม่มีสี แต่มองเห็นเป็นสีแดงเนื่องจากเจริญบนอาหารที่มีสีแดง และเนื่องจากในอาหารมี Lysine เป็นองค์ประกอบ อาจเกิดการผันกลับของสีโคโลนีจากสีเหลืองที่เกิดจากการหมักย่อยน้ำตาลไปเป็นสีแดงได้ในแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลาย Lysine โดยภายหลังที่ใช้น้ำ Xylose หมด แบคทีเรียจะเปลี่ยนมาย่อยสลาย Lysine แทนทำให้เกิดสภาวะด่าง อินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งจะทำให้แยกความแตกต่างออกจาก *Shigella* ได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีน้ำตาลแล็กโทส และน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่มากเกินพอเพื่อป้องกันการใช้ Lysine โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้

ส่วนแบคทีเรีย *Salmonella* จะสามารถย่อยน้ำตาล Xylose ได้อย่างรวดเร็ว แต่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโทส และซูโครสได้ ดังนั้นเมื่อใช้น้ำตาล Xylose หมดแบคทีเรียจะเปลี่ยนมาย่อยสลายกรดอะมิโน Lysine ที่มีอยู่ในอาหารต่อ โดยเอนไซม์ Lysine decarboxylase ซึ่งภายหลังการย่อยสลายจะทำให้อาหารมีสภาวะด่าง โคโลนีจะมีสีแดงจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ Phenol red ซึ่งคล้าย *Shigella* แต่ต่างจาก *Shigella* คือ กลางโคโลนีจะมีสีดำเนื่องจากสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ ส่วนแบคทีเรียไม่ก่อโรคชนิดอื่นที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่ไม่สามารถย่อยสลาย Lysine โคโลนีก็จะไม่เปลี่ยนเป็นสีดำเนื่องจากถูกยับยั้งจากกรดที่เกิดจากการหมักย่อยน้ำตาลเพียงอย่างเดียว (สุบัณฑิต, 2552)

2.4.1.22 การหมักย่อยน้ำตาลต่าง ๆ

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้กรด และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

เอกสารนี้ มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีฟองก๊าซอยู่ในหลอดดักก๊าซ (Durham tube) (สุบัณฑิต, 2552)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยปริมาณไบโอจินิกเอมีน แบคเรียที่สร้าง Histamine ในเกี๊ยวทูน่าที่มีเนื้อหมู และเนื้อไก่เป็นส่วนผสม พบว่าผลิตภัณฑ์เกี๊ยวปลาทูน่าส่วนใหญ่ที่ขายในไต้หวันตอนใต้มีระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (aerobic plate count) และ *E. coli* สูงกว่าข้อบังคับที่ไต้หวันกำหนด เท่ากับ 6.47 log CFU/g และ 50 MPN/g ตามลำดับ ปริมาณ Histamine ในผลิตภัณฑ์มีค่าต่ำกว่าที่องค์การอาหาร และยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) กำหนด คือ 5 mg/100 g เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Serratia marcescens Bacillus megaterium Klebsiella oxytoca* และ *Klebsiella pneumoniae* มีความสามารถในการสร้างสาร Histamine ได้น้อย แต่ในขณะที่แบคทีเรีย สายพันธุ์ *Raoultella ornithinolytica Enterobacter aerogenes Acinetobacter baylyi Pantoea agglomerans* และสายพันธุ์ *Bacillus pumilus* มีความสามารถในการผลิต Histamine มากกว่า 180 ppm ในอาหาร TSBH ซึ่งจากจำนวนปลาทูน่าทั้งหมดที่นำมาทดสอบ พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในปลาทูน่าสายพันธุ์ Thynnus obesus และ Thynnus thynnus (Kung .et al., 2010) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยในแง่ของ ข้อกำหนดของประเทศไต้หวัน และทราบถึงสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิต Histamine จึงทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาผลิตภัณฑ์จากปลาทูน่า

จากงานวิจัยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาโอดำ (*Thunnus tonggoh*) แช่แข็ง พบว่าความเสี่ยงด้านการปลอดภัยของอาหารทะเล ส่วนใหญ่มาจากวิธีการจับปลาในทะเลโอมาน และวิธีการหลังจากการจับปลาโอดำของโรงงานอาหารกระป๋อง ซึ่งเป็นผลมาจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม เนื่องจากแบคทีเรียที่สร้าง Histamine เป็น Mesophilic bacteria และปนเปื้อนหลังจากการจับปลา ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญกับการปฏิบัติให้ถูกสุขลักษณะ การให้ความเย็นในขณะที่เก็บรักษา และการขนส่ง (Valiollah *et al.*, 2012) จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจถึงสาเหตุการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่สร้าง Histamine ในปลาทะเลที่อยู่ในตระกูล Scombridae และ Scomberosocidae

จากงานวิจัยที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับเชื้อ *M. morganii* และ *M. psychrotolerans* พบว่าสามารถสร้าง Histamine โดยสามารถคัดแยกได้จากปลาทูน่าสด ปลาทูน่าแช่แข็ง และปลากะพง (Emborg *et al.*, 2006) ซึ่งอุณหภูมิในการเก็บรักษาปลาสด ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 °C (Novotny et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย คือ อุณหภูมิการเก็บรักษาปลาทูน่าก่อนนำมาแปรรูป หนึ่งในนั้นคือการนำมาทำแซนวิชทูน่า เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังสอดคล้องกับเรื่องแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ว่าส่วนใหญ่มักปนเปื้อนมาจากหลังกระบวนการจับปลา คือ ระหว่างการผลิต สำหรับระยะเวลาการเก็บรักษาปลาสด ที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 1-2 วัน และที่อุณหภูมิประมาณ -18 °C สามารถเก็บได้ประมาณ 3-8 เดือน (United States Department of Agriculture, 2016) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแซนวิชทูน่าที่ขายตามห้างสรรพสินค้าและร้านสะดวกซื้อ ควรเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 8 °C ส่วนอายุการเก็บรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของขนมปัง ซึ่งโดยปกติสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 1-2 วัน (Pawsey, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

Agar
70% Ethyl Alcohol
Bromothymol blue
Calcium carbonate ($CaCO_3$)
Gram staining kit
    95% Ethyl Alcohol
    Crystal violet
    Iodine
    Safranin
Hydrocloric acid (HCl)
Immersion oil
L-histidine
Sodium chloride (NaCl)
Sodium hydroxide (NaOH)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

Autoclave
Beaker
Bunsen burner
Compound light microscope
Cover slip
Cylinder
Digital balance
Dropper
Duran
Glass slide
Hot air oven
Inoculating Loop
Laminar flow cabinet
Microwave
Needle
Petri dish

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH indicator paper
Pipette 1, 5, 10 ml
Rack
Refrigerator
Rubber bulb
Spatula
Stirring rod
Test tube
Toothpick
Vortex mixer

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Plate Count Agar (PCA)
Sodium hydroxide (NaOH)
Trypticase soy agar (TSA)
Trypticase soy broth (TSB)
Tryptone
Yeast extract

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างแซนวิชทูน่าจากร้านสะดวกซื้อ และห้างสรรพสินค้า จำนวน 7 ยี่ห้อ ประกอบด้วยยี่ห้อ TSW-A TSW-B TSW-C TSW-D TSW-E TSW-F และ TSW-G เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสารถในการสร้าง Histamine

3.4.2 การเตรียมอาหาร และการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.4.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย และเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

TSA ซึ่งจัดอยู่ในรูปแบบของอาหารประเภท simply medium ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย Trypticase soy powder 30 กรัม และ Agar 2 กรัม โดยละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 6±0.2 เมื่อปรับ pH ได้ตามที่ต้องการแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที

3.4.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้าง Biogenic amine ได้

ชั่งทูน่าจากตัวอย่างแซนวิชทูน่า ปริมาณ 1 กรัม ลงในหลอดทดลองที่มี Normal saline (NaCl) ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวโดยใช้ Vortex mixer ทำการเจือจางโดยวิธี 10 fold serial dilution จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา Spread ลงบนอาหาร TSA โดยทำความเจือจางละ 2 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนอาหาร TSA และนับโคโลนี จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross streak บนอาหาร TSA และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการยืนยันความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่สร้าง Biogenic amine บนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCA ที่มี Bromothymol blue และ L-histidine เป็นองค์ประกอบ

3.4.4 การทดสอบความสามารถในสร้าง Biogenic amine ของเชื้อที่คัดแยกได้โดยใช้อาหาร Differential medium

อาหาร Differential medium ประกอบด้วย Bromothymol blue 0.06 กรัม L-histidine 1 กรัม และ PCA 23.5 กรัม ซึ่ง Bromothymol blue มี pH อยู่ในช่วง 6.0-7.6 สีอาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า โดยวิธีการเตรียมอาหาร Differential medium จะทำการละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 6±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดสอบการสร้าง Biogenic amine โดยทำการเพาะเชื้อลงบนอาหาร Differential medium ข้างต้น และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนอาหาร PCA สังเกตสีของอาหาร สีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Biogenic amine ได้จะมีโคโลนีสีเขียว ส่วนแบคทีเรียที่สร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นกรดจะมีโคโลนีสีเหลือง และเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเขียวฟ้า

3.4.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย

การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER) ซึ่งเครื่องนี้ใช้สำหรับ วิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรีย

รูปที่ 3.1 เครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER)

โดยหลักการของ MALDI MS หรือ matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry ซึ่งเป็นการตรึงโปรตีน หรือเปปไทด์กับผลึกของ matrix และยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างโปรตีน ให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า โดยสารที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบจับตัวตรวจจับ ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบตัวตรวจจับ เรียกว่า time of flight (TOF) ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลแต่ละเปปไทด์ที่อยู่ในแต่ละโปรตีนตัวอย่างได้ นำไปสู่การค้นหาโดยการเปรียบเทียบกับสายเปปไทด์ในฐานข้อมูล เพื่อระบุชนิดของโปรตีนนอกจากนี้ยังสามารถนำรูปแบบของน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ทำเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้ซึ่งวิธีการนี้ได้ถูกพัฒนาให้มีวิธีการ และระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างให้ง่าย และมีความรวดเร็ว โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ต้องการให้บริสุทธิ์บนอาหาร TSA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาสเมียร์ลงบนเพลท ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก หยดกรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 70% w/v ปริมาณ 1 ไมโครลิตรลงบนเพลท จากนั้นหยด HCCA (Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) Matrix ปริมาณ 1 ไมโครลิตร สเมียร์ และรอจนแห้ง สุดท้ายนำเพลทเข้าเครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER) เพื่อทำการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

3.4.6 การศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

การศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphology) เบื้องต้นโดยดูลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA การติดสีแกรม (Gram staining) ลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การติดสีแกรมเพื่อศึกษารูปร่างของเชื้อที่แยกได้ และจำแนกว่าเชื้อที่ได้นั้นจัดเป็น Gram-positive หรือ Gram-negative โดยเริ่มจากการทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง นำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบมาเสมียร์ รอจนแห้ง จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยความร้อน และหยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยเสมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนลงไปหนึ่งหยด ทิ้งไว้ 30 วินาที จากนั้นชะสีส่วนเกินออกด้วยเอทานอล 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วง ล้างออกด้วยน้ำทันที สุดท้ายหยดสี Safranin ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง ล้างออกด้วยน้ำ วางทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปสังเกตดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในแซนวิชทูน่า

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียที่สามารถสร้าง Biogenic amine ได้จำนวน 53 โคโลนี ดังตารางที่ 4.1 โดยเชื้อที่คาดว่าสามารถสร้าง Histamine ได้มีลักษณะโคโลนี ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงถึงการปนเปื้อนแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Biogenic amine ที่ปนเปื้อนในแซนวิชทูน่า

ยี่ห้อแซนวิชทูน่า	จำนวนไอโซเลต			CFU/g	แบคที่เรียที่สร้าง Biogenic amine (โคโลนี)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
TSW-A	50	4	-	5.0×10^{3}	-
TSW-B	25	1	5	ต่ำกว่า 30	11
TSW-C	45	20	5	4.5×10^{3}	32
TSW-D	-	2	-	ต่ำกว่า 30	2
TSW-E	1	2	-	ต่ำกว่า 30	3
TSW-F	40	27	-	4.0×10^{3}	5
TSW-G	-	-	-	-	-
รวม	161	56	10		53

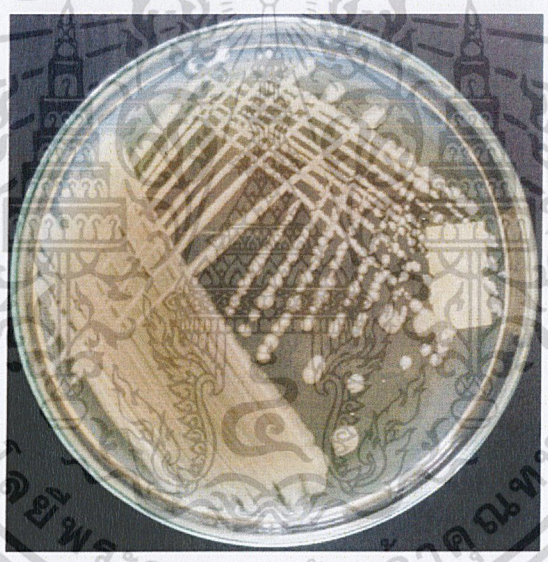
ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อมาตรฐานที่สร้าง Histamine และเชื้อที่สร้าง Histamine จากแซนวิชทูน่า ยี่ห้อ TSW-D

เชื้อแบคทีเรีย	สี	รูปร่าง	ขอบ	ความนูน	ผิวหน้า
Morganella morganii	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	Convex	เรียบ
TSW-D	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	Convex	เรียบ

โดยลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *Morganella morganii* และโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแซนวิชทูน่า TSW-D บนอาหาร TSA ที่บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Morganella morganii* บนอาหาร TSA



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อที่คัดแยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D บนอาหาร TSA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรีย

จากการวิเคราะห์สายพันธ์แบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER) พบว่า มีความเหมือนกับ *Morganella morganii* subsp. *morganii* 15284_1 CHB สูงที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.3

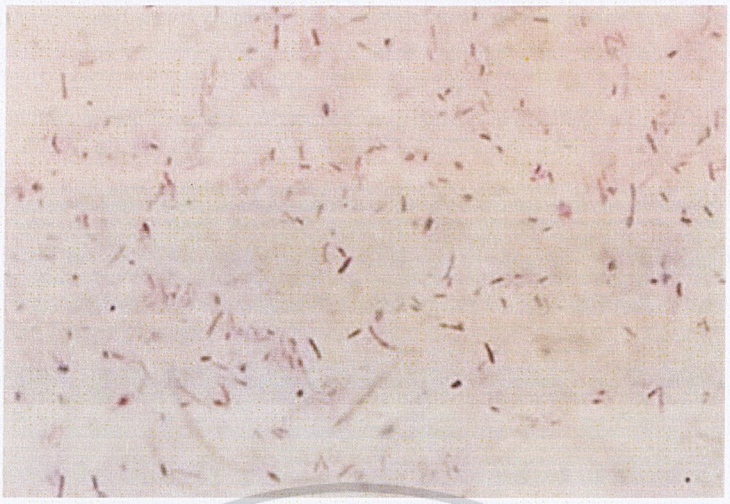
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI Biotyper CA System (Autoflex speed ; BRUKER)

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score value	NCBI Identifier
1 (+++)	*Morganella morganii* subsp. *morganii* 15284_1 CHB	2.381	180434
2 (+++)	*Morganella morganii* (E) 21086317_MLD	2.376	582
3 (++)	*Morganella morganii* subsp. *morganii* DSM 30164T HAM	2.297	180434
4 (++)	*Morganella morganii* subsp. *sibonii* Mb19277_2 CHB	2.273	180435
5 (++)	*Morganella morganii* 9544_1 CHB	2.252	582
6 (++)	*Morganella morganii* RV_BA_03_A LBK	2.242	582
7 (++)	*Morganella morganii* subsp. *morganii* DSM 30164T DSM	2.233	180434
8 (++)	*Morganella morganii* (PX) 22086121_MLD	2.149	582
9 (+)	*Morganella morganii* subsp. *morganii* DSM 30117 DSM	1.885	180434
10 (+)	*Morganella morganii* subsp. *sibonii* 14805T HAM	1.718	180435

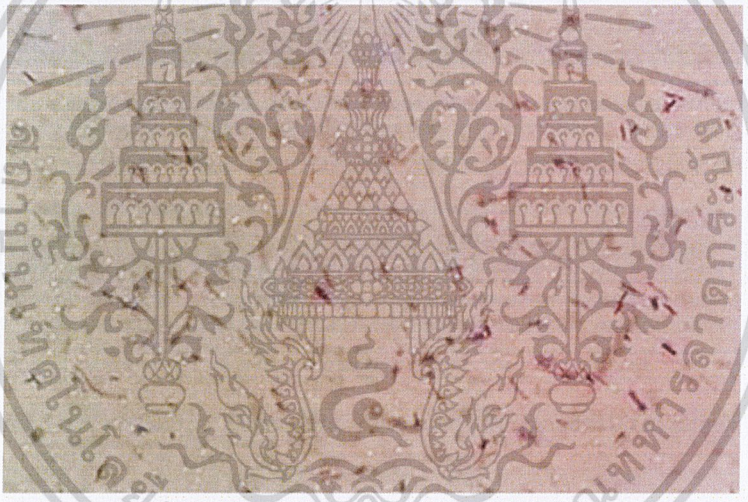
4.3 ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากติดสีแดงของ Safanin มีรูปร่างเป็นแบบท่อนอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวดังที่แสดงดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงการติดสีแกรม และลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 4.4 แสดงการติดสีแกรม และลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

4.4 การอภิปรายผล

ผลจากการทดลองคาดว่าการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine มาจาก 2 แหล่ง คือ แบคทีเรียประจำถิ่น และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนหลังจากกระบวนการ post harvest (Dalgaard. *et al.*, 2008) โดยปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-5 °C จะพบ Histamine ในปริมาณน้อยกว่า 10 ppm ในขณะที่ปลาที่เริ่มเสียจะมีปริมาณ Histamine 30 ppm และปลาที่เน่าเสียจะมีปริมาณ Histamine มากกว่า 50 ppm (Gonzaga. *et al.*, 2009 ; ธัญญาภรณ์, 2552) ซึ่งสอดคล้องกับการเก็บรักษาสเต็กทูน่าที่อุณหภูมิประมาณ 2 °C ช่วยยับยั้งการสร้าง Histamine ของเชื้อ *Morganella morganii* และ *Photobacterium phosphoreum* (Emborg. *et al.*, 2005) โดยจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง Histamine ได้ในเนื้อปลาทูน่าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาจากแซนวิชทูน่าพบว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้หลังจากกระบวนการ post harvest เนื่องจากเนื้อปลาทูน่าที่นำมาทำแซนวิชเป็นปลาทูน่าสด และปลาทูน่ากระป๋อง ซึ่งปลาทูน่ากระป๋องนี้อาจผ่านกระบวนการแปรรูปหลายขั้นตอน ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียอาจปนเปื้อนมาระหว่างการกระบวนการผลิต โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแซนวิชทูน่าที่ขายตามห้างสรรพสินค้าและร้านสะดวกซื้อควรเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 8 °C ส่วนอายุการเก็บรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของขนมปัง ซึ่งโดยปกติสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 1-2 วัน (Pawsey, 2002)

นอกจากนี้ Lopez-Sabater. *et al.* (1996) รายงานว่า 83% ของแบคทีเรียที่สร้าง Histamine จัดอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae Lopez-Sabater. et al. (1996) ยังรายงานด้วยว่ากลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ histidine-decarboxylase ได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Histamine ที่คัดแยกได้จากแซนวิชทูน่า คือ *Morganella morganii* subsp. *morganii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสาร Histamine จากตัวอย่างแซนวิชทูน่าจำนวน 7 ยี่ห้อ เพื่อให้ทราบถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้าง Histamine ได้ในแซนวิชทูน่า พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 227 โคโลนี โดยแบ่งออกเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอมีน และเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าสามารถสร้าง Histamine ได้ 53 และ 2 โคโลนี ตามลำดับ

จากผลการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้าง Histamine ได้ ซึ่งพบได้ในแซนวิชทูน่ายี่ห้อ TSW-D ดังนั้นจึงนำมาศึกษาด้านสัณฐานวิทยา โดยลักษณะของโคโลนีจะมีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ และมีลักษณะการนูนตัวของโคโลนีแบบ Convex จากนั้นนำไปทดสอบการติดสีแกรม พบว่าแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อน อยู่เป็นเซลล์เดียว ติดสีแดงของ Safanin แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และจากการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI Biotyper CA System สามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบ คือ แบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae สายพันธุ์ *Morganella morganii* subsp. *morganii* 15284_1 CHB

5.2 ข้อเสนอแนะ

นอกจากตัวอย่างแซนวิชทูน่าทั้ง 7 ยี่ห้อ ที่นำมาทดสอบแล้ว ควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้หลากหลายยิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสการพบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง Histamine และควรเพิ่มวิธีการทดสอบการวัดปริมาณ Histamine ด้วยวิธีอื่นด้วย เช่น วิธีทางเคมี thin layer chromatography และวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงอุตสาหกรรม. 2558. **สคอมโบรท็อกซิน (Scombrotoxin)**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/สคอมโบรท็อกซิน%20(Scombrotoxin).pdf.

กรมประมง. 2554. **รู้จักทูน่า**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.fisheries.go.th/marine/DeepSea/image/PDF/ปลาทูน่า.pdf.

กรมประมง. 2554. **Histamine**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.fisheries.go.th/quality/บทความ-Histamine-300658-Final.pdf.

นลินี หงษ์ชุมพล, ธราวิทย์ อุปพงษ์, จิระวรรณ พึ่งสกุล, อมรรัตน์ หาญตั๊ะ, วิชาญ ปาวัน, มุทิตะ ชลามาตย์, ชุติกาญจน์ งามนัก, ปวีณา วงค์สวรรค์, อมรา ทองหงษ์, ส าเริง ภู่ระหงษ์ และโสภณ เอี่ยมศิริถาวร. 2550. **การสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษจากสาร Scombrotoxin ในกลุ่มพนักงาน โรงงานผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง จังหวัดสมุทรปราการ กรกฎาคม พ.ศ. 2550**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.osirjournal.net/index.php/osir/article/download/77/113.

ธัญญาภรณ์ ศิริเลิศ. 2552. "ฮีสตามีน คือ อะไร." *เทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม.* 4(1) : 4-6.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. **Enterotoxin**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3850/enterotoxin.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. **Scombrotoxin**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2039/scombrotoxin.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. **Histamine**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1185/histamine-ฮิสทามีน.

มหาวิทยาลัยมหิดล. 2558. **สารพิษจากจุลินทรีย์**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/Micro.

วราวุฒิ ตั้งพสุธาดล. 2554. **สารประกอบเอมีน**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302262/3Present_Amines54_handout.pdf.

วินัย วนานุกูล. 2551. "โรคโบทูลิซึม (Botulism)." *Thai J Toxicology.* 23(2) : 19-24

โรจน ประภพ. 2551. **ฮีสตามีน (histamine) สารที่ทำให้เกิดอาการแพ้เมื่อรับประทานอาหารทะเล**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://siweb.dss.go.th/dss_doc/fulltext/radio/R3.pdf.

ศรีการจนา คล้ายเรือง. 2558. **การควบคุมจุลินทรีย์**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.biotech.mju.ac.th/Upload/Document/294_microbial%20control%202556.pdf.

ศศิธร วงศ์เรือง. 2559. **เทคนิคเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในอาหาร**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://202.28.24.44/e_books/602122/E-learning%20PDF/Sasithon4.pdf.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุทธิพงษ์ พงษ์วร. 2549. **Botulinum Toxin สารพิษจากเชื้อแบคทีเรียในหน่อไม้ปี๊บ**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://biology.ipst.ac.th/?p=794.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2552. **การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี** กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิญญา จันทรวัฒนะ. 2556. **จุลชีววิทยา**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1.php.

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน. 2557. "การลดปริมาณฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์ปลาโดยจุลินทรีย์". *เทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม.* 9(1) : 1-6.

Ababouch, L. Afilal, M.E. Benabdeljelil, H. and Busta, F.F. 1991. "Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25–28°C) and in ice." *J. Food Sci. Technol.* 26(1) : 297–306.

Arakaki, J. and Suyama, M. 1966. "Free and conjugated amino acids in the extractives of anchovy." *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 32(1) : 74–79.

Attaran, R.R. and Probst, F. 2002. "Histamine fish poisoning: a common but frequently misdiagnosed condition." *Emergency Medicine Journal.* 19(5) : 474–475.

Auerswald, L. Morren, C. and Lopata, A.L. 2006. "Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood." *Food Chemistry.* 98(2) : 231-239.

Australian and New Zealand Food Authority (ANZFA). 2010. **Standard 2.2.3 Fish and fish products.** [Online] Available : http://www.foodstandards.gov.au/foodstandards/.

Australia New Zealand Food Standards. 2014. **Fish and Fish Products**. [online] Available : http://www.legislation.gov.au/Details/F2011C00569.

Bagnis, R. and Chungue, E. 1977. "Isolation of two toxins from a parrotfish *Scarus gibbus.*" *Toxicon.* 15(1) : 89–93.

Bartholomew, B.A. Berry, P.R. Rodhouse, J.C. and Gilbert, R.J. 1987. "Scombrotoxic fish poisoning in Britain: Features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986." *Epidemiol Infect.* 99(3) : 775–782.

Bhutani, M.K. Bishnoi, M. and Kulkarni, S.K. 2009. "Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral." *biochemical and neurochemical changes.* 92(1) : 39-43.

Birkun, A. Noltkamper, D. 2014. **Histamine toxicity from fish**. [Online]. Available : http://emedicine.medscape.com/article/ 1009464-overview.

Bolton, G.E. Bjornsdottir, K. Nielsen, D. Luna, P.F. and Green, D.P. 2009. "Effect of high hydrostatic pressure on histamine forming bacteria in yellowfin tuna and mahi-mahi skinless portions." *Institute of Food Technologists (IFT).* Abstract :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5-6.

Butler, K.B. Jones, J.L. Benner, R.A. and Burkhardt, W. 2011. "Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method." *Food Microbiology.* 28(7) : 1284-1292.

Canadian Food Inspection Agency. 2013. **Food safety facts on scombroid poisoning.** [Online]. Available : https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html.

Cavazzoni, E. Lister, B. Sargent, P. and Schibler A. 2008. "Blue-ringed Octopus (*Hapalochlaena* sp.) Envenomation of a 4 year old boy : A case report." *Clinical Toxicology (Philadelphia).* 46(8) : 760–761.

Chen, T.Y. Hsieh, C.H. and Hwang, D.F. 2006. "Development of standardized methodology for identifying toxins in clinical samples and fish species associated with tetrodotoxin-borne poisoning incidents." *Journal of Food and Drug Analysis.* 24(1) : 9-14.

Chatchawan Chotimarkorn. 2014. "Quality changes of anchovy (Stolephorus heterolobus) under refrigerated storage of different practical industrial methods in Thailand." *J Food Sci Technol.* 51(2): 285–293.

Chiou, T.K. Shiau, C.Y. and Chai, T.J. 1990. "Extractive nitrogenous components of cultured milkfish and tilapia." *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(1) : 1313–1317.

Copeland, N.K. Palmer, W.R. and Bienfang, P.K. 2014. "Ciguatera fish poisoning in Hawaii and the Pacific." *Hawaii J Med Public Health.* 73(11) : 24–27.

Costa, P.R. Robertson, A. and Quilliam, M.A. 2015. "Toxin Profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Portuguese Coast, as Determined by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Marine Drugs.* 13(4) : 2046-2062.

Dalgaard, P. 1995. "Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish." *International Journal of Food Microbiology.* 26(3) : 305-317.

Dalgaard, P. Emborg, J. Kjølby, A. Sørensen, N.D. and Ballin, N.Z. 2008. **Histamine and biogenic amines** : formation and importance in seafood. Improving Seafood Products for the Consumer. Cambridge : Woodhead Publishing.

Dalgaard, P. Emborg, J. Kjølby, A. Sørensen, N.D. and Ballin, N.Z. 2008. **Improving Seafood Products for the Consumer**. Cambridge. Woodhead Publishing : 292-324.

Emborg, J. and Dalgaard, P. 2008. "Growth inactivation and histamine formation of Morganella psychrotolerans and Morganella morganii development and evaluation of predictive models." *International Journal of Food Microbiology.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

128(2) : 234-243.

Emborg, J. and Dalgaard, P. 2008. "Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by Morganella psychrotolerans." *International Journal of Food Microbiology.* 128(2) : 226-233.

Emborg, J. Laursen, B.G. and Dalgaard, P. 2005. "Significant histamine formation in tuna (Thunnus albacares) at 2 °C — effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria." *International Journal of Food Microbiology* 101(3) : 263-279.

Emborg, J. Dalgaard, P. and Ahrens P. 2006. "Morganella psychrotolerans sp. nov., a histamineproducing bacterium isolated from various seafoods." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56(10) : 2473–2479.

Emilio, I.L.S. José,J.R.J. Manuela, H.H. and Maria, T.M.V. 1996. "Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area." *Food Microbiology.* 28(3) : 411-418.

Emilio, I.L.S. José,J.R.J. Manuela, H.H. and Maria, T.M.V. 1994. "Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (Sardina pilchardus) by an enzymic method." *Applied Microbiology.* 19(2) : 70-75.

Espiñeira, M. Nerea Gonzalez-Lavín, Vieites J.M. and Santaclara. F.J. 2009. "Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by Fins." *Food Chemistry.* 117(4) : 698 – 704.

Food and Drug Administration. 2011. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance**. [Online]. Available : http://www.fda.gov/FoodGuidances

Food Standards Australia New Zealand. 2009. **Recall: Seafood product recall**. [Online]. Available : http://www.foodmag.com.au/news/seafood-product-recall.

Fletcher, G.C. Summers, G. Winchester, R.V. and Wong, R.J. 1995. "Histamine and histidine in New Zealand marine fish and shellfish species." particularly Kahawai (Arripis trutta). *journal of aquatic food product technology.* 4(1) : 53–74.

Frank, H.A. Yoshinaga, D.H. and Nip, W.K. 1981. "Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, Katsuwonus pelamis, at elevated temperatures." *Marine Fish. Rev.* 43(10) : 9–14.

Fukuyo, Y. Kodama, M. Ogata, T. Ishimaru, T. Matsuoka, K. Okaichi, T. Maala, A. M. and Ordones J.A. 1993. **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea.** New York : Elsevier Science Publishers B.V.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gonzaga, V. E. Lescano, A.G. Huamán, A.A. Mulanovich, G.S. and Blazes. D.L. 2009. "Histamine Levels in Fish from Markets in Lima, Perú." *Journal of Food Protection.* 72(5): 1112–1115.

Hernandez Herrero, M.M. Roig Sagues, A.X. Rodriguez Jerez, J.J. and Mora Ventura, M.T. 1999. "Halotolerant and halophilic histamine forming bacteria isolated during the riping of salted anchovies." *Journal of Food Protection.* 62(5) : 509–514.

Hibiki, S. and Simidu, W. 1959. "Studies on putrefaction of aquatic products. 27. Inhibition of histamine formation in spoiling of cooked fish and histidine content in various fishes." *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* 24(1) : 916–919.

Hongchumpon, N. Ouppapong, T. Pungsakul, J. Hanta, A. Pawan, W. Chalamaat, M. Ngamnak, C. Wongsawan, P. Thonghong, A. Purahong S. and Iamsirithaworn, S. 2007. "Scombrotoxin Food Poisoning Outbreak among Frozen Seafood Factory Workers Samut Prakan Province, Thailand, July 2007." *Outbreak, Surveillance and Investigation Reports.* 2(1) : 5-8.

Hwang, C.C. Lee, Y.C. Huang, Y.R. Lin, C.M. Shiau C.Y. Hwang, D.F. and Tsai, Y.H. 2010. "Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products." *Food Control.* 21(7) : 977-982.

Ienistea, C. 1973. "Significance and detection of histamine in food." 327-343. In Hobbs, B.C. and Christian, J.H.B. (editors). **The microbiological safety of food**. London : Academic Press.

Jørgensen, E.A. Knigge, U, Warberg, J. and Kjær, A. 2007. "Histamine and the regulation of body weight." *Neuroendocrinology.* 86(3) : 210–214.

King, M.W. 2017. **Tyrosine-Derived Neurotransmitters / Hormones**. [Online]. Available : https://themedicalbiochemistrypage.org/aminoacidderivatives.php

Kim, D.H. Kim, K.B.W.R. and Ahn, D.H. 2013. "Inhibitory effects of high-hydrostatic-pressure treatments on histamine production in mackerel (Scomber japonicus) muscle inoculated with Morganella morganii and Photobacterium phosphoreum." *Food Control.* 34(2) : 307-311.

Kodama, M. Sato, S. Sakamoto, S. and Ogata, T. 1996. "Occurrence of tetrodotoxin in Alexandrium tamarense, a causative dinoflagellate of paralytic shellfish poisoning." *Toxicon.* 34(10) : 1101-1105.

Köse, S. 2010. "Evaluation of Seafood Safety Health Hazards for Traditional Fish Products: Preventive Measures and Monitoring Issues." *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 10(review) : 139–160.

Kovacova Hanuskova, E. Buday, T. Gavliakova S. and Plevkova J. 2015. "histamine intoxication and intolerance." *Allergol Immunopathol.* 43(5) : 498–506.

Kretzschmar, A.L. Verma, A. Harwood, T. Hoppenrath, M. and Murray, S. 2017.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

"Characterization of Gambierdiscus lapillus sp. nov. (Gonyaulacales, Dinophyceae): a new toxic dinoflagellate from the Great Barrier Reef (Australia)." *Journal of Phycology.* 53(2) : 283-297.

Kung, H.F. Lee, Y.C. Huang, Y.R. Lin, W.F. and Lin, C.M. 2010. "Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products." *Food Control.* 21(7) : 977–982.

Lago, J. Rodríguez, L.P. Blanco, L. Vieites, J.M. and Cabado, A.G. 2015. "Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses." *Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* 2015(13) : 6384-6406.

Lehane, L. and Olley, J. 2000. "Histamine fish poisoning revisited." *International Journal of Food Microbiology.* 58(1-2) : 1–37.

Lee, Y.C. Kung H.F. Wu, C.H. Hsu, H.M. Chen, H.C. Huang, T.C. and Tsai, Y.H. 2016. "Determination of histamine in milkfish stick implicated in food-borne poisoning." *journal of food and drug analysis.* 24(1) : 63-71.

Lin, S.J. and Hwang, D.F. 2011. "Possible source of tetrodotoxin in the starfish *Astropecten scoparius*". *Toxicon.* 39(4) : 573–579.

Lopez-Sabater, E.I. Rodriguez-Jerez, J.J. Hernandez-Herrero, M. and Morana-Ventura, M.T. 1996. "Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in Scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area." *Food Microbiol.* 28(3) : 411-418.

Long Nguyen, P.T., and Tu Nguyen, H.K. 2015. "Histamine Production by Lactobacillus rhamnosus." *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences.* 4(3) : 70–74.

Mackie, I.M. Pirie, L. Ritchie, A.H. and Yamanaka, H. 1997. "The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*)." *Food Chem.* 60(1) : 291–295.

Mah J.H. and Hwang H.J. 2009. "Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by Staphylococcus xylosus as a protective culture." *Food Control.* 20(9) : 796-801.

Masaki, T. Chiba, S. Yasuda, T. Noguchi, H. Kakuma, T. Watanabe,T. Sakata, T. and Yoshimatsu, H. 2004. "Involvement of hypothalamic histamine H1 receptor in the regulation of feeding rhythm and obesity." *Diabetes.* 53(9) : 2250–2260.

Ministry for Primary Industries. 2013. **Imported Food Requirements: Fish - species susceptible to production of histamine. Wellington,** [Online]. Available :.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Imported_Food_Requirements-Sets_Clearance.pdf.

Moret, S. Smela, D. Populin, T. and Conte, L.S. 2005 "A Survey on Free Biogenic Amine Content of Fresh and Preserved Vegetables." *Food Chem.* 89(3) : 355-361.

Murata, Y. Henmi, H. and Nishioka, F. 1994. "Extractive components in the skeletal muscle from ten different species of scombroid fishes." *Fish. Sci.* 60(1) : 473–478.

Naila, A. Flint, S. Fletcher, G. Bremer P. and Meerdink, G. 2010. "Control of biogenic amines in food – existing and emerging approaches." *J. Food Sci.* 75(7) : 139–150.

Novotny, L. Dvorska, L. Lorencova, A. Beran, V. and Pavlik, I. 2004. "Fish : a potential source of bacterial pathogens for human beings." *Veterinární medicína.* 49(9) : 343-358.

Önal, A 2007. "Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods." *Food Chemistry* 103 (A review) : 1475-1486.

Ordóñez, J.L. Troncoso, A.M. García-Parrilla, C.M.D. and Callejon, R.M. 2016. "Recenttrends in the determination of biogenic amines in fermented beverages." *Analytica Chimica Acta.* 939 (A review) : 10-25.

Osborne, C.M. and Bremer, P.J. 2000. "Application of the bigelow (z-value) model and histamine detection to determine the time and temperature required to eliminate Morganella morganii from seafood." *J. Food Prot.* 63(2) : 277–280.

Pawsey, R.K. 2002. **Case Studies in Food Microbiology for Food Safety and Quality**. Great Britain : Royal Society of Chemistry.

Plakas, S.M. Elsaid, K.R. Jester, E.L.E. Granade, H.R. Musser, S.M. and Dickey, R.W. 2002. "Confirmation of brevetoxin metabolism in the Eastern oyster (Crassostrea Virginia) by controlled exposures to pure toxins and to Karenia brevis cultures." *Toxicon.* 40(1) : 721–729.

Pons Sánchez Cascado, S. Bover Cid, S. Veciana Nogués, M. T. and Vidal Carou, M. C. 2005. "Amino acid decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies." *European Food Research and Technology.* 220(3-4) : 312–315.

Prescott, L.M. Harley, J.P. and Klein, D.A. 2002. **Microbiology.** New York : McGraw-Hill.

Ruiz-Capillas, C. Colmenero, F.J. Carrascosa, A.V. and Muñoz, R. 2007. "Biogenic amine production in Spanish dry-cured "chorizo" sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage." *Meat Sci.* 77(3) : 365-371.

Salvitti, L.R. Wood, S.A. Winsor, L. and Cary S.C. 2015. "Intracellular

เอกสารนี้มีกลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Immunohistochemical Detection of Tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata* (Gastropoda) and *Stylochoplana* sp. (Turbellaria)". *Marine Drugs.* 13(2) : 756–769.

Sasikala, A. Wijeyaratne, M.J.S. and Jayasinghe, J.M.P.K. 2002. "Histamine levels in fishery products imported to Sri Lanka." *Indian J. Fish.* 52(4) : 385–395.

Scott, T.H. and Michael, F.C. 1992. "The cyanobacterium *Oscillatoria erythraea* a potential source of toxin in the ciguatera food-chain." Food *Additives & Contaminants.* 9(4) : 351-355.

Shalaby, A.R. 1996. "Significance of biogenic amines to food safety and human health." Food Research International. 29(7) : 675–690.

Silla Santos M.H. 1996. "Biogenic amines: their importance in food." *International Journal of. Food Microbiology.* 29(2-3) : 213–231.

Staruszkiewicz, W.F. Barnett, J.D. Rogers, P.L. Benner, R.J. Wong L.L. and Cook J. 2004. "Effects of on-board and dockside handling on the formation of biogenic amines in mahi-mahi (Coryphaena hippurus), skipjack tuna (Katsuwonus pelamis), and yellowfin tuna (Thunnus albacares)." *J. Food Prot.* 67(1) : 134–141.

Sureelak Rodtong, Siriwan Nawong and Jirawat Yongsawatdigul. 2005. "Histamine accumulation and histamine forming bacteria in Indian anchovy (Stolephorus indicus)." *Food Microbiology.* 22(5) : 475–482.

Suyama, M. and Yoshizawa, Y. 1973. "Free amino acid composition of the skeletal muscle of migratory fish." *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 9(1) : 1339–1343.

Tao, Z. Sato, M. Abe, N. Yamaguchi, T. and Nakano, T. 2009. "Simple and rapid detection of histamine-forming bacteria by differential agar medium." *Food Contral.* 20(10) : 903-906.

Tao, Z. Sato, M. Zhang, H. Yamaguchi, T. and Nakano, T. 2011. "A survey of histamine content in seafood sold in markets of nine countries." *Food Control.* 22 (3-4) : 430–432.

The European Food Safety Authority. 2011. "Scienfic opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods." *EFSA Journal.* 9(10) : 23-93.

The European Food Safety Authority. 2011. **Fish and fishery products hazards and controls guidance.** [Online]. Available : http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM251970.pdf.

Torido, Y. Ohshima, C. Takahashi, H. Miya, S. Iwakawa, A. Kuda, T. and Kimura, B. 2014. "Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retailed fish in Japan." *Food Control.* 46(1) : 338-342.

Tsai, Y.H. Kung, H.F. Lin, Q.L. Hwang, J.H. Cheng, S.H. Wei, C.I. and Hwang, D.F. 2005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

"Occurrence of Histamine and Histamine-Forming Bacteria in Kimchi Products in Taiwan." *Food Chem.* 90(4) : 635-641.

Tsai, Y.H. Chang, S.C. Kung, H.F. Wei, C.I. and Hwang. D.F. 2005. "Histamine Production by Enterobacter aerogenes in Sailfish and Milkfish at Various Storage Temperatures." *Journal of Food Protection.* 68(8) : 1690-1695.

United States Department of Agriculture. 2016. Keep Food Safe! Food Safety Basics. [Online]. Available : https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/keep-food-safe-food-safety-basics/ct_index.

Valiollah, K. Vadood, R. Abolhassan, K. and Alireza, S. 2012. "Histamine-producing bacteria isolated from frozen longtail tuna (Thunnus tonggoh)." *African Journal of Microbiology.* 6(4) : 751-756.

Vlamis, A. Katikou, P. Rodriguez, I. Rey, V. Alfonso, A. Papazachariou, A. Zacharaki, T. Botana, A.M. and Botana, L.M. 2015. "First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate Prorocentrum minimum." *Toxins (Basel).* 7(5) : 1779-807.

Yoshinaga, D.H. and Frank, H.A. 1982. "Histamine-Producing bacteria in decomposing skipjack tuna (Katsuwonus pelamis)." *Applied and Environmental Microbiology.* 44(2) : 447-452.

Zaman, M.Z. Bakar, F.A. Jinap, S. and Bakar, J. 2011. "Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation." *International Journal of Food Microbiology.* 145(1) : 84-91.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้