ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร

Food Microbiology and Microbiological Analysis

สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2568

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ระดับ 9

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถ. ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

วุฒิการศึกษา - Ph.D. (Food Science), The University of Georgia, Athens, GA, USA
- วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วท.บ. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร
พิมพ์ครั้งที่ 4 (แก้ไขและเพิ่มเติม): มิถุนายน 2568
283 หน้า
ISBN 978-616-7367-11-8

สงวนลิขสิทธิ์

โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพฯ 10520 โทร. 0-2329-8000 ต่อ 3592

คำนำ

หนังสือเล่มนี้ ผู้เขียนได้เรียบเรียงขึ้นเพื่อใช้ประกอบการสอนปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางอาหารให้กับนักศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เนื้อหาที่สำคัญของหนังสือเล่มนี้ประกอบด้วย เทคนิคพื้นฐานในการทำปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาทางอาหารที่ใช้กันทั่วไปในการตรวจคุณภาพอาหารทางจุลินทรีย์ ได้แก่ เทคนิคการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด การตรวจหาและประเมินจำนวนเชื้อราและยีสต์ การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์บาดเจ็บ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพอุณหภูมิต่ำ และจำนวนจุลินทรีย์ทนความร้อนในอาหาร การหา D value และ Z value การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์มและ *Escherichia coli* การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่าง ๆ ในอาหารได้แก่ *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Vibrio parahaemolyticus* รวมทั้งการตรวจการเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์ และการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งผู้เขียนได้รวบรวมเนื้อหาจากตำราและคู่มือปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทางอาหารที่ทันสมัยทั้งในและต่างประเทศ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าหนังสือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักศึกษาและผู้ที่สนใจทั่วไป

ความดีของหนังสือเล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่และคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้กับผู้เขียน

สุรีย์ นานาสมบัติ

มิถุนายน 2568

ข้อควรปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ

1. เมื่อเข้ามาในห้องปฏิบัติการ ไม่ควรวางหนังสือและสิ่งของอื่นๆ บนโต๊ะบริเวณที่จะทำการทดลอง จัดบริเวณนั้นให้ว่างให้มีเฉพาะของที่ต้องใช้ในปฏิบัติการเท่านั้น เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดสีย้อม ลูปเขี่ยเชื้อ และอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น
2. สวมเสื้อคลุมที่สะอาดขณะทำการทดลอง มัดผมให้เรียบร้อยกรณีที่ผมยาวและล้างมือให้สะอาด
3. ทำความสะอาดโต๊ะบริเวณที่ทำการทดลองโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อทั้งก่อนและหลังการทดลอง
4. ไม่ดื่มหรือรับประทานอาหารหรือขนมขบเคี้ยวใด ๆ และปิดโทรศัพท์มือถือตลอดเวลาขณะอยู่ในห้องปฏิบัติการ
5. จุดตะเกียงแอลกอฮอล์อย่างระมัดระวัง วางบีกเกอร์บรรจุเอทานอลห่างตะเกียงอย่างน้อย 18 นิ้ว ไม่จุดตะเกียงทิ้งไว้นานเกินไปถ้าหากยังไม่ใช้
6. ในการใช้ปิเปตดูดสารละลายให้ใช้ลูกยางช่วยดูดสารละลาย ห้ามใช้ปากดูดปิเปตโดยเด็ดขาด
7. ไม่ทิ้งเศษกระดาษหรือเศษวัสดุทุกชนิดลงบนพื้นและในอ่างน้ำ
8. วางปิเปตและกระจกสไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะที่บรรจุน้ำยาฆ่าเชื้อที่จัดเตรียมไว้ให้เท่านั้นโดยให้น้ำยาฆ่าเชื้อท่วมปิเปตและกระจกสไลด์ อย่าวางไว้บนโต๊ะมิฉะนั้นอาจเกิดการปนเปื้อน
9. หลังจากเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ด้วยลูปเขี่ยเชื้อ แล้วต้องเผาไฟก่อนเพื่อฆ่าเชื้อ ก่อนที่จะวางลงบนโต๊ะ
10. เมื่อทำภาชนะบรรจุเชื้อแตกหรือทำเชื้อหก ให้คลุมบริเวณนั้นด้วยกระดาษชำระแล้วราดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อให้ท่วมและถูบริเวณดังกล่าวซ้ำด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ นำกระดาษชำระและเศษแก้วที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใส่ถุงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
11. ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่องปรับอากาศ ควรปิดพัดลมและปิดหน้าต่างในจุดที่กระแสลมจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้
12. จานเพาะเชื้อจะต้องมีฝาปิด หลอดหรือขวดเชื้อจะต้องมีจุกอุดตลอดเวลาถึงแม้ว่าการทดลองจะสิ้นสุดแล้วและต้องไม่วางหลอดเชื้อหรือขวดเชื้อที่มีเชื้อเจริญในอาหารเหลวในลักษณะเอียงจนทำให้จุกสำลีเปื้อนอาหารและเชื้อจนเป็นเหตุให้จุลินทรีย์เจริญบนจุกสำลีนั้นได้
13. จานเพาะเชื้อหรือหลอดเชื้อที่มีจุลินทรีย์อยู่เมื่อไม่ใช้แล้วจะต้องนำมานึ่งฆ่าเชื้อก่อนที่จะทำความสะอาดห้ามทิ้งลงถังขยะโดยที่ยังไม่ได้ฆ่าเชื้อเป็นอันขาดมิฉะนั้นเชื้อจะแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม
14. เมื่อเสร็จสิ้นปฏิบัติการแต่ละครั้งให้ปิดจุกขวดสารต่างๆ ทุกอย่างให้แน่นแล้วล้างมือให้สะอาดก่อนออกจากห้องปฏิบัติการทุกครั้ง

สารบัญ

		หน้า
บทปฏิบัติการที่ 1	การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด	1
บทปฏิบัติการที่ 2	การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ	25
บทปฏิบัติการที่ 3	การตรวจหา แยกเชื้อ และประเมินจำนวนเชื้อราและยีสต์ในอาหาร	31
บทปฏิบัติการที่ 4	การตรวจหาโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *Escherichia coli* ในอาหาร	51
บทปฏิบัติการที่ 5	การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทนความร้อนและการใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์	71
บทปฏิบัติการที่ 6	การศึกษาการเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์	81
บทปฏิบัติการที่ 7	การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์บาดเจ็บ	101
บทปฏิบัติการที่ 8	การตรวจหา *Salmonella* ในอาหาร	111
บทปฏิบัติการที่ 9	การตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร	145
บทปฏิบัติการที่ 10	การตรวจหา *Staphylococcus aureus* ในอาหาร	161
บทปฏิบัติการที่ 11	การตรวจหา *Bacillus cereus* ในอาหาร	175
บทปฏิบัติการที่ 12	การตรวจหา *Clostridium perfringens* ในอาหาร	187
บทปฏิบัติการที่ 13	การตรวจหา *Listeria monocytogenes* ในอาหาร	197
บทปฏิบัติการที่ 14	การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมของการแปรรูปอาหาร	211
ภาคผนวก ก	วิธีการใช้เครื่องจ่ายตัวอย่างลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ	223
ภาคผนวก ข	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและวิธีเตรียม	229
ภาคผนวก ค	สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	273
ภาคผนวก ง	วิธีการเตรียม McFarland Standard	279
ภาคผนวก จ	วิธีการย้อมแกรมและย้อมสปอร์	280
ภาคผนวก ฉ	ตาราง MPN	281

บทปฏิบัติการที่ 1
การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Standard Plate Count

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดสามารถทำได้หลายวิธี อาจตรวจนับจำนวนเซลล์โดยตรงหรือหามวลเซลล์ทั้งหมดจากตัวอย่างซึ่งจะผันแปรโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วิธีพื้นฐานที่ใช้กันมากก็คือวิธี Standard Plate Count (SPC) หรือ Aerobic Plate Count (APC) บางครั้งเรียกว่า Total Plate Count เป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารหรือส่วนผสมของอาหารกันมากที่สุดเพื่อประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหาร วิธีนี้ต้องเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยหลักการที่ว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเห็นเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงตรวจนับจำนวนโคโลนีหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมงจึงจะทราบผล สิ้นเปลืองแรงงานมาก ซึ่งไม่เหมาะกับอาหารที่ต้องการทราบผลอย่างรวดเร็วเพื่อตัดสินใจรับซื้อเช่น น้ำนมดิบ

การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

โดยทั่วไปการกระจายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างมักจะไม่สม่ำเสมอ เช่น ในผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์และปลา ส่วนใหญ่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนจำนวนมากบริเวณผิวมากกว่าภายใน นอกจากนั้นการกระจายตัวของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์หนึ่งอาจผันแปร เช่น ในชิ้นปลาสดส่วนต่างๆ จะมีการกระจายของแบคทีเรียมักจะไม่สม่ำเสมอโดยจะพบแบคทีเรียจำนวนค่อนข้างมากบริเวณ ครีบและท้องปลา ในผลิตภัณฑ์อาหารก็เช่นเดียวกัน บ่อยครั้งการกระจายตัวของแบคทีเรียไม่มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งกลุ่มสินค้าที่ผลิตขึ้นมาในช่วงเวลาเดียวกัน ตัวอย่างเช่นถ้าหากทำการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพียง 1 ตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดเดียวกันทั้งหมด 1,000 ตัวอย่าง จะไม่สามารถทราบได้ว่าผลการวิเคราะห์สามารถใช้เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ทั้งกลุ่มได้หรือไม่ ดังนั้นถ้าหากวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างยิ่งมากเท่าใดก็จะสามารถเข้าใจได้ถึงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์นั้นได้ดีขึ้น

การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ การทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน การทำเจือจางหลายๆ ระดับ (serial dilution) และการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงผิวหน้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนที่จะเริ่มวิเคราะห์ควรมั่นใจว่าทุกกระบวนการที่จะทำนั้นอยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ อุปกรณ์ทุกชนิดที่ใช้จะต้องผ่านการฆ่าเชื้อ บริเวณพื้นผิวที่จะปฏิบัติงานต้องผ่านการทำความสะอาดโดยใช้สารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 หรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรส์ความเข้มข้น 200 ppm หรืออาจใช้สารประกอบคลอรีนชนิดอื่นที่เหมาะสมก็ได้ ล้างมือให้สะอาดและฆ่าเชื้อที่มือด้วยสารฆ่าเชื้อที่ปลอดภัยต่อผิวหนัง ถ้าเป็นไปได้

แนะนำให้ปฏิบัติงานในตู้เขี่ยเชื้อ (vertical laminar flow cabinet) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหรือถ้าไม่มีตู้นี้ก็อาจปฏิบัติงานในบริเวณที่ใกล้เปลวไฟจากตะเกียงบุนเสน (Bunsen burner)

การทำเจือจางตัวอย่าง

อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตมาอย่างไม่ถูกสุขลักษณะอาจมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์สูงถึง 10^3-10^6 เซลล์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตรของอาหาร ในทางปฏิบัติจำนวนจุลินทรีย์ที่มากถึงระดับนี้ไม่สามารถนับได้บนจานเพาะเชื้อ การที่มีโคโลนีขึ้นหนาแน่นเกินไปบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์บางเซลล์อาจเกาะกันทำให้ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ผลการทดลองที่ได้จะไม่ถูกต้อง ดังนั้นก่อนที่จะตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร ควรทำเจือจางตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เสียก่อนเพื่อให้มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วงที่สามารถนับได้คือ 25-250 โคโลนี อาหารที่ค่อนข้างสะอาดอาจเจือจางถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-3} ส่วนอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนสูงอาจเจือจางถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-6}

ในการเจือจางตัวอย่าง กรณีที่ตัวอย่างอาหารมีความหนืดหรือเป็นอาหารแข็งนิยมทำเจือจางเริ่มต้นที่ระดับ 1:10 ซึ่งทำได้โดยชั่งตัวอย่าง 11 $\pm$ 0.1 กรัมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ผสมกับสารละลายทำเจือจาง (diluent) 99 มิลลิลิตร หรือ 10 $\pm$ 0.1 กรัมผสมกับสารละลายทำเจือจาง 90 มิลลิลิตร หรือ 25 $\pm$ 0.1 กรัมผสมกับสารละลายทำเจือจาง 225 มิลลิลิตร หรือ 50 $\pm$ 0.1 กรัมผสมกับสารละลายทำเจือจาง 450 มิลลิลิตร กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว ในการทำเจือจางที่ระดับความเจือจาง 1:10 จะผสมตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรเข้ากับสารละลายทำเจือจาง 9 มิลลิลิตร หรือ ตัวอย่าง 11 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายทำเจือจาง 99 มิลลิลิตร หรือ ตัวอย่าง 25 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายทำเจือจาง 225 มิลลิลิตร เมื่อคำนวณความเจือจางทั้งหมด ปริมาณตัวอย่างจะถูกนำไปบวกกับปริมาตรของสารละลายทำเจือจาง แต่ถ้าตัวอย่างเป็นของแข็งจะสมมติว่าตัวอย่างอาหารปริมาณ 1 กรัมเทียบเท่ากับปริมาตร 1 มิลลิลิตร (สมการที่ 1.1-1.3)

$$\frac{1\text{ml}}{9+1\text{ml}} = \frac{1\text{ml}}{10\text{ml}} = 1 \times 10^{-1} = 10^{-1} \qquad (1.1)$$

$$\frac{11\text{ml}}{99\text{ml}+11\text{ml}} = \frac{11\text{ml}}{110\text{ml}} = \frac{1\text{ml}}{10\text{ml}} = 1 \times 10^{-1} = 10^{-1} \qquad (1.2)$$

$$\frac{25\text{ml}}{225\text{ml}+25\text{ml}} = \frac{25\text{ml}}{250\text{ml}} = \frac{1\text{ml}}{10\text{ml}} = 1 \times 10^{-1} = 10^{-1} \qquad (1.3)$$

การทำเจือจางอีกวิธีหนึ่งคือ การทำเจือจางที่ระดับ 1:100 หลาย ๆ ระดับซึ่งทำได้ด้วยวิธีการเดียวกันโดยเริ่มต้นเติมตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายทำเจือจาง 99 มิลลิลิตรหรือ 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายทำเจือจาง 9.9 มิลลิลิตร ดังสมการที่ 1.4

$$\frac{1\text{ml}}{99+1\text{ml}} = \frac{1\text{ml}}{100\text{ ml}} = 0.01\text{ ml} = 1 \times 10^{-2} = 10^{-2} \qquad (1.4)$$

หลังจากผสมตัวอย่างกับสารละลายทำเจือจางแล้วจึงนำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการตีป่นเป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที ด้วยเครื่องตีป่นอาหาร ถ้าเป็นอาหารที่มีไขมันสูงเช่น เนย (butter) ควรใช้สารละลายทำเจือจางที่มีอุณหภูมิประมาณ 40°C เพื่อให้ง่ายต่อการผสม อย่างไรก็ตามปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แนะนำให้ใช้ 25 กรัม ยกเว้นมีตัวอย่างไม่เพียงพออาจใช้น้อยกว่านี้ได้ สำหรับการตีป่นอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกัน นิยมใช้เครื่องตีป่นอาหารที่เรียกว่า Stomacher แต่จะไม่เหมาะกับอาหารที่มีเปลือก ก้างหรือเมล็ดแข็งที่อาจจะทิ่มแทงถุงพลาสติกสำหรับตีป่นให้เป็นรูได้ จากนั้นจึงเจือจางตัวอย่างที่ตีป่นแล้วต่อไปหลาย ๆ ระดับ

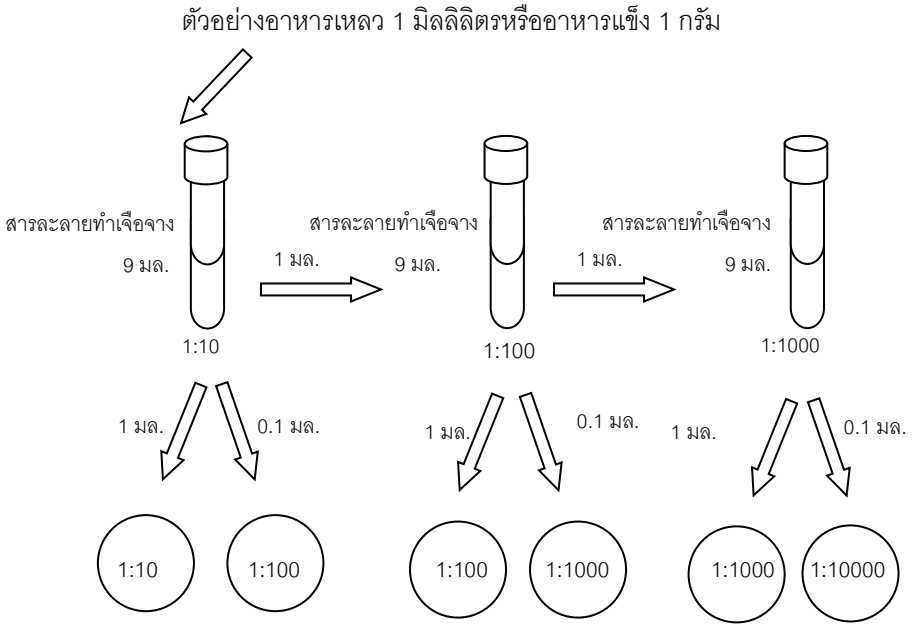
ในการทำเจือจางตัวอย่าง จะทำถึงระดับความเจือจางเท่าใดนั้นขึ้นกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่าง โดยทั่วไปจะไม่ทราบจำนวนจุลินทรีย์ที่แน่นอนในตัวอย่าง อย่างไรก็ตามการทราบข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนจุลินทรีย์ที่อาจตรวจพบได้ในตัวอย่าง จะทำให้สามารถคาดคะเนจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างได้ ดังนั้นจึงต้องทำการเจือจางตัวอย่างที่หลาย ๆ ระดับความเจือจาง (serial dilution) ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จะมีอย่างน้อย 1 ระดับความเจือจางที่มีจำนวนจุลินทรีย์เจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อในช่วง 25-250 โคโลนี ถ้าคาดว่าตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 2,500-250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม ควรเตรียมตัวอย่างให้มีความเจือจางในระดับ 1:100 และ 1:1000 การทำเจือจางหลาย ๆ ระดับทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันได้

สำหรับสารละลายที่ใช้ทำเจือจาง อาจใช้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.1% w/v peptone) หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.85 % w/v saline) หรืออาจใช้สารละลายทั้งสองชนิดนี้ผสมกันเรียกว่า สารละลายเปปโตนซาไลน์ (peptone-saline diluent) ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 และเปปโตนร้อยละ 0.1 หรืออาจใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชนิดที่เรียกว่า Butterfield's phosphate-buffered dilution water (0.6 mM KH_2PO_4, pH 7.2 สูตรในภาคผนวก ข) สารละลายทำเจือจางที่ International Organization for Standardization (ISO) แนะนำให้ใช้คือ สารละลายเปปโตนซาไลน์ เนื่องจากมีรายงานว่า สารละลายชนิดนี้ทำให้เกิดการฟื้นคืนสภาพของจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด จุดประสงค์

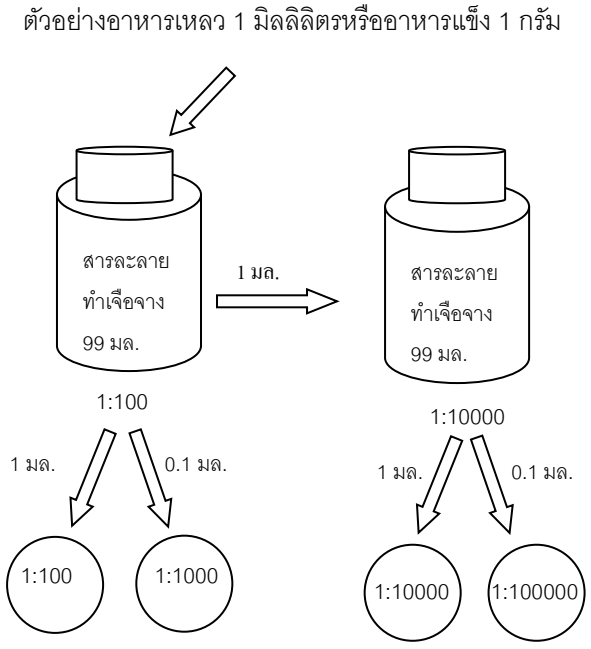
ของการใช้สารละลายทำเจือจางเหล่านี้ก็เพื่อป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติกทำให้เซลล์ยังคงมีชีวิต ไม่ตาย และไม่แบ่งตัวถ้าหากไม่ทิ้งไว้นานเกิน 30 นาทีหลังจากเจือจางตัวอย่าง

<u>ตัวอย่างการทำเจือจาง</u>

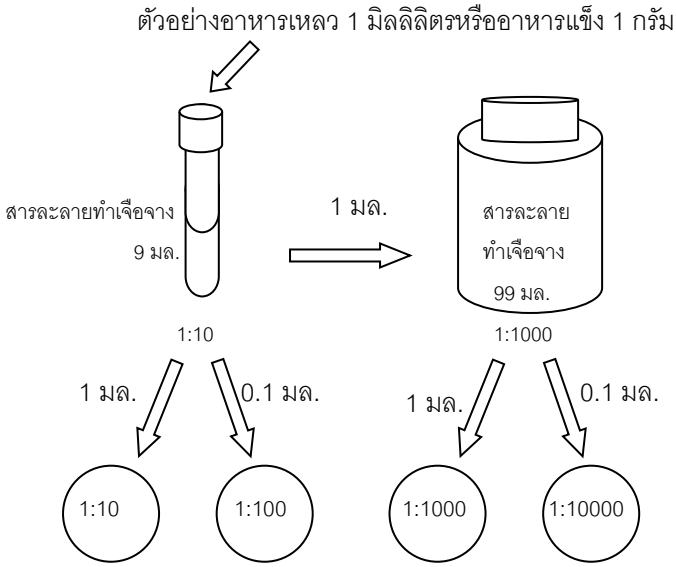
1. เริ่มเจือจางที่ระดับความเจือจาง 1:10 ใช้สารละลายทำเจือจาง 9 มิลลิลิตร



2. เริ่มเจือจางที่ระดับความเจือจาง 1:100 ใช้สารละลายทำเจือจาง 99 มิลลิลิตร



3. เริ่มเจือจางที่ระดับความเจือจาง 1:10 ใช้สารละลายทำเจือจางทั้ง 9 มิลลิลิตรและ 99 มิลลิลิตร



เทคนิคการถ่ายตัวอย่างลงบนจานเพาะเชื้อ

เทคนิคการถ่ายตัวอย่างลงบนจานเพาะเชื้อ (plating technique) ทำได้ 3 วิธี ได้แก่ เทคนิค pour plate, spread plate และ spiral plate กรณีที่ใช้เทคนิค pour plate จะต้องถ่ายตัวอย่างลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลวซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 47°C ลงไป 17-19 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตัวจึงนำไปบ่ม แต่ถ้าใช้เทคนิค spread plate เทคนิคนี้มีข้อดีคือสามารถสังเกตเห็นลักษณะโคโลนีได้ดีกว่า จุลินทรีย์จะไม่ได้รับบาดเจ็บจากความร้อนเหมือนกรณีที่ใช้เทคนิค pour plate และสามารถเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อไปศึกษาต่อได้โดยง่าย นิยมถ่ายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผิวหน้าแห้งซึ่งได้เตรียมไว้ล่วงหน้า (อาจปิเปตตัวอย่าง 0.1-0.5 มิลลิลิตรก็ได้แต่ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรเกิน 0.5 มิลลิลิตร เนื่องจากจะทำให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปียกเพราะตัวอย่างซึมลงไปไม่หมด) หลังจากเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าแล้วจึงนำไปบ่มระยะหนึ่ง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มของเซลล์ที่ทำให้เกิด 1 โคโลนี เรียกว่า Colony Forming Unit (CFU) ซึ่งใช้เป็นหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนโคโลนีนี้จะคำนวณในรูปของ CFU ต่อมิลลิลิตรหรือ CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง สำหรับเทคนิค spiral plate ใช้ในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในนม อาหารและเครื่องสำอาง เป็นวิธีที่ใช้อย่างเป็นทางการของ APHA (American Public Health Association) และ AOAC (the Association of Official Analytical Chemists) วิธีนี้เหมาะสำหรับอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่ตีป่นเป็นเนื้อเดียวกัน แต่จำเป็นจะต้องขจัดอนุภาคอาหารทั้งหมด

ก่อนโดยการกรองหรือทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นจึงจ่ายตัวอย่างลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องจ่ายตัวอย่างอัตโนมัติ (Automated Spiral Plater) ซึ่งเครื่องมือนี้จะประกอบด้วย เข็มจ่ายตัวอย่าง (dispensing stylus) ที่จะเคลื่อนจากบริเวณจุดศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อไปยังขอบจาน ในขณะเดียวกันจะจ่ายตัวอย่างปริมาณน้อยลงเรื่อยๆ โดยจะทราบปริมาณของตัวอย่างที่จ่ายลงบนแต่ละส่วนของจานเพาะเชื้อ ในการจ่ายตัวอย่างหนึ่งครั้งสามารถตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในช่วง 500-500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรได้

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ทำให้ทราบจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยประมาณในอาหาร ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม โดยทั่วไปเซลล์ของจุลินทรีย์จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มในอาหาร การตีป่นตัวอย่างอาหารอาจช่วยให้กลุ่มของจุลินทรีย์แตกออก การเขย่าตัวอย่างหรือเขย่าสารแขวนลอยจุลินทรีย์ อาจทำให้กลุ่มของจุลินทรีย์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามการกระทำเช่นนี้ไม่ได้เป็นการประกันว่าจะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ทุกเซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ดังนั้นแต่ละโคโลนี (CFU) ที่เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมาจากกลุ่มของเซลล์หรืออาจมาจากเซลล์เดี่ยว ๆ ก็ได้

นอกจากนี้ความถูกต้องในการตรวจนับจำนวนโคโลนี ยังถูกจำกัดโดยปัจจัยหลายประการ ได้แก่ การที่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสร้างโคโลนีให้เห็นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการขาดสารอาหารที่จำเป็นบางชนิด สภาพอากาศและอุณหภูมิของการบ่มที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ความชัดเจนของโคโลนีก็มีผลต่อความถูกต้องในการตรวจนับ ซึ่งขึ้นอยู่กับการแยกกันและลักษณะรูปร่างของโคโลนี นอกจากนี้สายตาที่เมื่อยล้าตาของผู้วิเคราะห์อาจทำให้ผลการทดลองที่ได้คลาดเคลื่อน ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้แก่ การทำให้อุปกรณ์ที่ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการที่ไม่เหมาะสม การชั่งหรือวัดปริมาตรของตัวอย่างหรือสารละลายทำเจือจางที่ไม่ถูกต้อง การกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอของตัวอย่างในสารละลายทำเจือจางและอาหารเลี้ยงเชื้อ การมีชิ้นส่วนของตัวอย่างในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออาจบดบังโคโลนีทำให้นับจำนวนได้ไม่ถูกต้อง การประเมินจำนวนโคโลนีที่ไม่ถูกต้องในจานเพาะเชื้อที่มีการเจริญแผ่ติดกัน (spreader) ของเชื้อปกคลุมผิวหน้าอาหารโดยที่ไม่มีลักษณะเป็นโคโลนี รวมทั้งความผิดพลาดในการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร (CFU ต่อกรัมของอาหาร) ถึงแม้ว่าจะมีข้อจำกัดดังกล่าว แต่ความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองอาจลดลงได้ ถ้าหากผู้วิเคราะห์ปฏิบัติตามวิธีการอย่างเคร่งครัดตั้งแต่การสุ่มตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง และการวิเคราะห์จนกระทั่งถึงการนับจำนวนโคโลนี

ความไวของวิธีการวิเคราะห์

เทคนิคการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี SPC สามารถทำให้จุลินทรีย์หลายชนิดเจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อเป็นโคโลนีที่สังเกตเห็นได้ ใช้วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่างตั้งแต่ 1-100

CFU ต่อกรัม ส่วนใหญ่ขีดจำกัดของจำนวนจุลินทรีย์ที่น้อยที่สุดที่จะสามารถวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีนี้คือ 10 CFU ต่อกรัมสำหรับอาหารแข็งและ 1 CFU ต่อมิลลิลิตรสำหรับอาหารเหลวเช่น น้ำนม และไม่มีขีดจำกัดสำหรับจำนวนจุลินทรีย์ที่มากที่สุดที่จะตรวจหาได้ด้วยวิธีนี้ เพราะตามทฤษฎีแล้ว สามารถที่จะทำเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับความเจือจางที่สูงมากเท่าที่ต้องการได้อย่างไม่จำกัด แต่ปกติหายากที่จะมีจุลินทรีย์ในอาหารมากกว่า 10^9 CFU ต่อกรัม

ในการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียที่ต้องการอากาศทั้งหมดในอาหาร ส่วนใหญ่นิยมใช้อาหาร Plate Count Agar (PCA) จำนวนโคโลนีที่นับได้ทราบกันดีในชื่อของ total colony counts หรืออาจเรียกว่า total viable counts หรือ aerobic colony counts หรือ aerobic plate counts อย่างไรก็ตาม ไม่มีคำจำกัดความใดที่จะถูกต้องทั้งหมด เนื่องจากไม่สามารถทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเจริญขึ้นได้ทั้งหมด จะมีเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิดที่ใช้เท่านั้นที่จะเจริญได้ภายใต้อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเท่านั้น บางทีถ้าบอกว่าจำนวนโคโลนีที่นับได้เป็น “total aerobic mesophilic colony count” (ใช้อาหาร PCA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง) น่าจะถูกต้องที่สุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้วิธีการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารด้วยวิธี Standard Plate Count
2. เพื่อเรียนรู้เทคนิค pour plate เทคนิค spread plate และ เทคนิค spiral plate

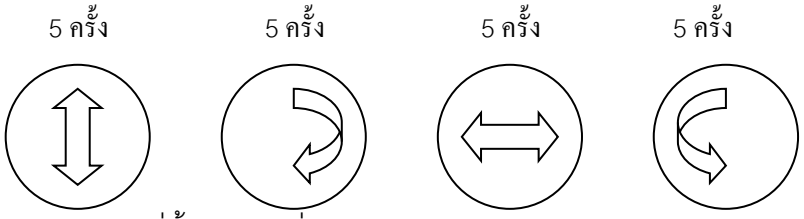
อุปกรณ์ (สำหรับตอนที่ 1 และ 2)

1. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ เนื้อบดสดและตัวอย่างของเหลวเช่น น้ำนมดิบ น้ำผลไม้คั้นสดและอื่นๆ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Plate Count Agar (PCA)
3. ขวดและหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1
4. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95
5. จานเพาะเชื้อทั้งชนิดแก้วและชนิดพลาสติก
6. แท่งแก้วงอและปิเปตที่ปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร
7. บีกเกอร์ มีด ปากคีบ ช้อนและกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
8. เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher) และถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ (stomacher bag) สำหรับตีป่น
9. เครื่องชั่งและเครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง (vortex mixer)
10. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ
11. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (dark-field Quebec colony count หรือชนิดอื่นที่เทียบเท่า)

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค pour plate

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อบด 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในภาชนะปลอดเชื้อจากนั้นถ่ายตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag) สำหรับใช้ตีป่นอาหาร
2. เติมสารละลายเปปโตน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) 225 มิลลิลิตรลงไปด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
3. ตีป่นตัวอย่างด้วยเครื่อง stomacher 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 เท่า
4. ทำการเจือจางต่อไป ตามรูปที่ 1.1 โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเติมลงในสารละลายเปปโตน 99 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} จากนั้นเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}และ 10^{-6} ควรผสมตัวอย่างให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex mixer ก่อนถ่ายตัวอย่างต่อไป
5. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ในการปิเปตตัวอย่างลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ยกฝาจานขึ้นในระดับที่สูงพอที่จะสอดปิเปตลงไปได้ ถือปิเปตในลักษณะทำมุม 45 องศา โดยให้ปลายปิเปตแตะที่ก้นจานเพาะเชื้อ ปล่อยตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงไปจนหมด
   <u>หมายเหตุ:</u> ในขณะปล่อยตัวอย่าง ให้จับปิเปตในลักษณะตั้งตรงตามแนวดิ่ง เมื่อปล่อยตัวอย่างจนหมดให้แตะปลายปิเปตอีก 1 ครั้งบริเวณจุดที่แห้งบนจานเพาะเชื้อโดยไม่ต้องเป่าไล่ตัวอย่างที่ค้างที่ปลายปิเปต
6. เติมอาหาร PCA ที่อุ่น ๆ (อุณหภูมิ 47°C) ลงในจานเพาะเชื้อที่เติมตัวอย่างไว้แล้วจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อทันที (ตามรูป) เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดีกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง คว่ำจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1.1)

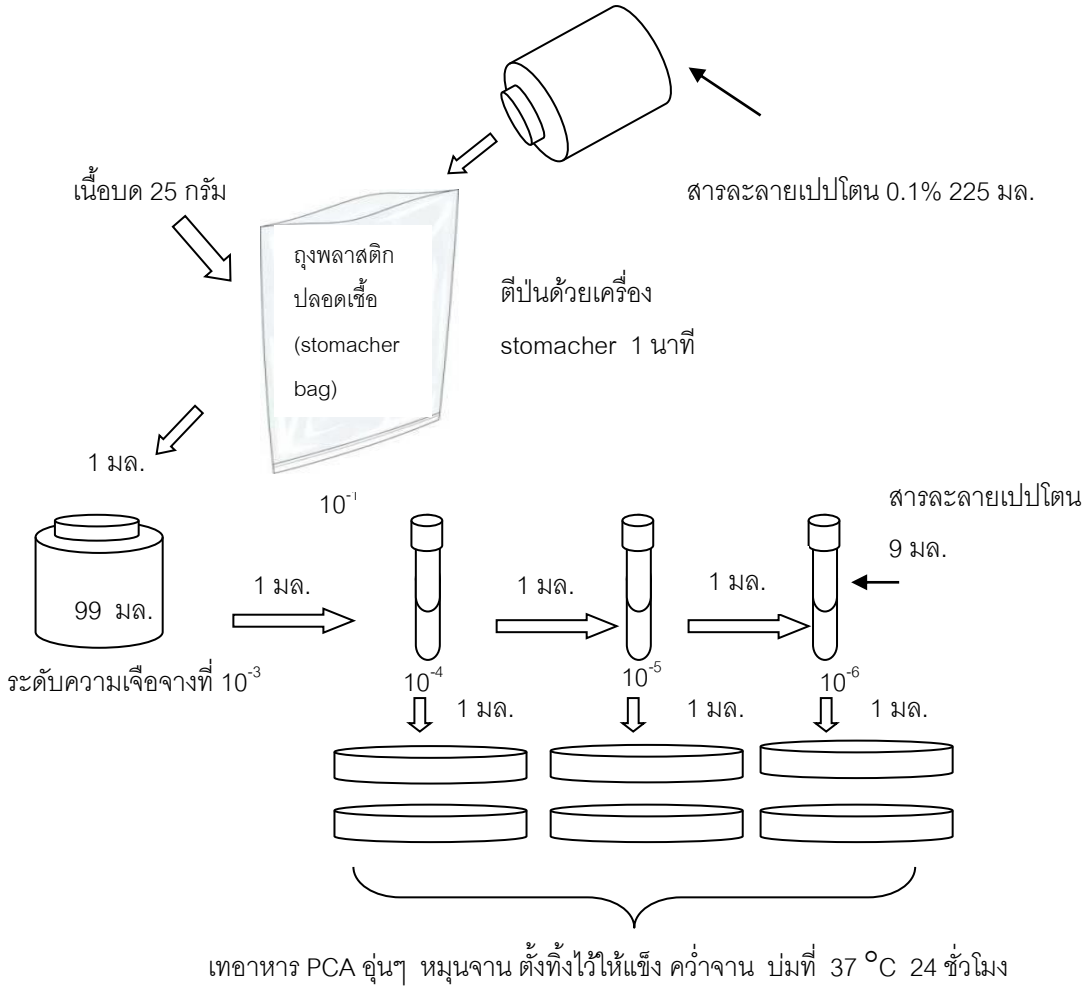


7. นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี คำนวณในรูปของ CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง

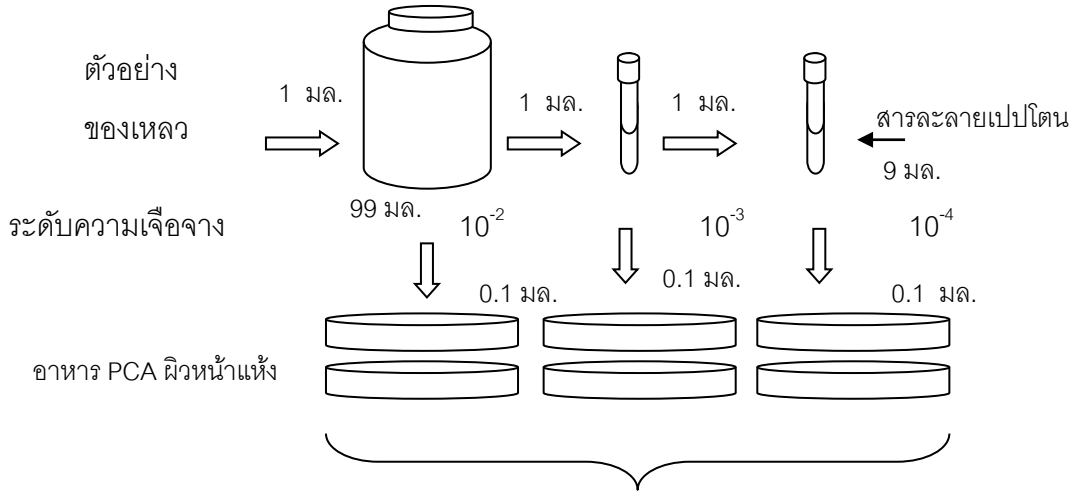
<u>ตอนที่ 2</u> การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค spread plate

1. ปิเปตตัวอย่างของเหลว (เช่น น้ำนมดิบ น้ำผลไม้คั้นสดหรืออื่นๆ) 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายเปปโตนปริมาตร 99 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}

2. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายเปปโตน ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:1000 หรือ 10^{-3} ทำการเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-4}
3. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ลงบนจานอาหาร PCA ระดับความเจือจางละ 2 จาน ปริมาตรจานละ 0.1 มิลลิลิตร ในการปิเปตตัวอย่างเพียง 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อให้ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดตัวอย่างขึ้นมาแล้วปล่อยลงไปในจานเพาะเชื้อจนถึงขีด 0.1 มิลลิลิตรถัดไป อย่าให้ปลายปิเปตแตะกับผิวของอาหารในจานเพาะเชื้อ
4. เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PCA ด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ (จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนผ่านเปลวไฟ ทิ้งไว้สัก 2-3 วินาที) คว่ำจานบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1.2)
5. นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี คำนวณในรูป CFU ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง
6. สังเกตโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อ บันทึกผลการทดลอง



รูปที่ 1.1 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อบดด้วยเทคนิค pour plate



เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วงอที่จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ ควั่จาน บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง

รูปที่ 1.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค spread plate

การนับจำนวนโคโลนีและการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยเทคนิค pour plate และ spread plate

ก) <u>การนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่วิเคราะห์โดยเทคนิค pour plate และ spread plate</u>

1. กรณีที่มีเชื้อเจริญปกติและมีจำนวนโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนี

   การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบน nonselective media เช่น PCA ควรนับทุกโคโลนีรวมทั้งโคโลนีที่มีขนาดเล็กมากๆ บันทึกระดับความเจือจางและจำนวนโคโลนีที่นับได้ แต่ถ้าตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งบน selective media หรือ differential media ให้นับโคโลนีที่ขึ้นบนจานที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 15-150 โคโลนี

2. กรณีที่มีเชื้อเจริญหนาแน่นและมีจำนวนมากกว่า 250 โคโลนี

   2.1 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ไม่ต้องนับแต่ให้บันทึกว่า “TNTC” หมายถึง มากเกินกว่าที่จะนับได้ (Too Numerous To Count)

   2.2 ถ้ามีจำนวนโคโลนี 4-10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับ 12 ตารางเซนติเมตร (12 ช่องสี่เหลี่ยม) โดยนับติดต่อกัน 6 ช่องในแนวนอนและ 6 ช่องในแนวตั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

   2.3 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แต่ดูไม่หนาแน่นจนเกินไปสามารถนับได้ ให้นับเพียง 4 ตารางเซนติเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

3. กรณีที่มีเชื้อขึ้นแต่มีลักษณะแผ่ไปทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้บันทึกว่า “SPR” (Spreader) ลักษณะของโคโลนีที่ไม่แยกนี้แบ่งเป็น 3 ลักษณะคือ 1) ลักษณะโคโลนีที่เรียงติดต่อกันเป็นสายไม่แยกกันอย่างเด่นชัด ลักษณะนี้เกิดจากการแตกออกของกลุ่มแบคทีเรียที่เกาะกัน 2) ลักษณะที่เกิดขึ้นในฟิล์มของน้ำระหว่างวุ้นและก้นจานและ 3) ลักษณะที่เกิดขึ้นในฟิล์มของน้ำที่ขอบหรือบนผิวของวุ้น ถ้าหากมีลักษณะของการแผ่ติดกันมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่บนจานอาหารให้บันทึกว่า “SPR” สำหรับลักษณะของโคโลนีที่เรียงติดกันเป็นสาย ถ้ามีเพียง 1 สาย ให้นับเป็น 1 โคโลนี แต่ถ้าโคโลนีที่เรียงติดกันเป็นสายนี้มีมากกว่า 1 สายและมีกำเนิดมาจากหลายแหล่ง ให้นับโคโลนีที่เรียงติดกันแต่ละสายจากแต่ละแหล่งเป็น 1 โคโลนี อย่านับแต่ละโคโลนีที่ติดกันนั้นเหมือนกับเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ในบางครั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Proteus* spp. สามารถสร้างโคโลนีใหญ่ที่แผ่ไปทั่วผิวหน้าส่วนใหญ่ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเช่นนี้สามารถเกิดขึ้นได้บนจานที่ทำด้วยทั้งเทคนิค pour plate และ spread plate ส่วนมากจานที่ทำด้วยเทคนิค spread plate พบบ่อยกว่า ถ้าเกิดการเจริญแผ่ของโคโลนีเพียง 1 จานจากจำนวน 2 จานของตัวอย่างเดียวกัน ให้นำผลการนับจำนวนโคโลนีเฉพาะของจานที่นับได้มาคำนวณ แต่ถ้าเกิดการเจริญแผ่เพียงส่วนเดียวของผิวหน้าอาหารเช่น เพียง 1 ใน 2 หรือ 1 ใน 4 ของผิวหน้าอาหาร ให้นับเฉพาะส่วนที่นับได้แล้วคูณด้วยตัวเลขสัดส่วนที่เหมาะสมของพื้นที่บนจานเพาะเชื้อเช่น ถ้านับจำนวนโคโลนีได้เพียงครึ่งจานให้คูณด้วย 2 หรือแต่ถ้านับได้เพียง 1 ใน 4 ของผิวหน้าอาหารให้คูณด้วย 4 ถ้าปัญหานี้เกิดบ่อยครั้งอย่างต่อเนื่องในตัวอย่างบางชนิดเช่น อาหารแห้งบางชนิด อาจแก้ปัญหาได้โดยการเททับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นด้วยวุ้นที่ปราศจากเชื้อเพื่อยับยั้งโคโลนีที่เจริญแผ่นี้ หรืออีกวิธีหนึ่งอาจเพิ่มความแข็งของวุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นโดยการเติมวุ้นบริสุทธิ์เพิ่มลงไป
4. ถ้าจานอาหารนั้นปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น ให้บันทึกว่า “LA” (Laboratory Accident)

ข) <u>การคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตรของอาหาร)</u>

การคำนวณหา CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยคูณจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้ หรือจำนวนโคโลนีเฉลี่ย (ถ้าทำซ้ำ 2 จาน) กับส่วนกลับของ dilution factor

Dilution Factor = ระดับความเจือจางเริ่มต้น × ระดับความเจือจางต่อมา × ปริมาณตัวอย่างที่เติมในจาน

$$\text{CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้}}{\text{ระดับความเจือจางเริ่มต้น} \times \text{ระดับความเจือจางต่อมา} \times \text{ปริมาณตัวอย่างที่เติมในจาน}}$$

CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = ส่วนกลับของ Dilution Factor × จำนวนโคโลนีที่นับได้

<u>ตัวอย่างที่ 1</u>: กรณีที่มีจำนวนโคโลนีที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนีที่ระดับความเจือจาง 1 ระดับ

เริ่มต้นเจือจางตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 1:100 โดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายทำเจือจาง 99 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางตัวอย่างต่อไปอีก 10 เท่า โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายทำเจือจาง 9 มิลลิลิตร

1.1 ถ้านับจำนวนโคโลนีได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จานที่ระดับความเจือจาง 1 ระดับ

-กรณีที่ทำด้วยเทคนิค pour plate เติมตัวอย่างที่ทำเจือจางครั้งหลังสุด (ระดับความเจือจาง 10^{-3}) 1.0 มิลลิลิตร นับจำนวนโคโลนีได้ 64 โคโลนีหลังจากบ่ม

Dilution Factor = $\frac{1}{100}\times\frac{1}{10}\times 1$ = $0.001 = 10^{-3}$

CFU ต่อมิลลิลิตร = 64×10^{3} = 6.4×10^{4}

-กรณีที่ทำด้วยเทคนิค spread plate เติมตัวอย่างที่ทำเจือจางครั้งหลังสุด 0.1 มิลลิลิตร นับจำนวนโคโลนีได้ 64 โคโลนีหลังจากบ่ม

Dilution Factor = $\frac{1}{100}\times\frac{1}{10}\times 0.1$ = $0.0001 = 10^{-4}$

CFU ต่อมิลลิลิตร = 64×10^{4} = 6.4×10^{5}

1.2 ถ้านับจำนวนโคโลนีได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 จานที่ระดับความเจือจาง 1 ระดับ

-กรณีที่ทำด้วยเทคนิค pour plate เติมตัวอย่างที่ทำเจือจางครั้งหลังสุด 1.0 มิลลิลิตร นับจำนวนโคโลนีได้ 64 และ 76 โคโลนีหลังจากบ่ม

Dilution Factor = $\frac{1}{100}\times\frac{1}{10}\times 1$ = 0.001 = 10^{-3}

CFU ต่อมิลลิลิตร = $\frac{64+76}{2}\times 10^{3}$ = 70×10^{3} = 7.0×10^{4}

-กรณีที่ทำด้วยเทคนิค spread plate เติมตัวอย่างที่ทำเจือจางครั้งหลังสุด 0.1 มิลลิลิตร นับจำนวนโคโลนีได้ 64 และ 76 โคโลนีหลังจากบ่ม

Dilution Factor = $\frac{1}{100}\times\frac{1}{10}\times 0.1$ = 0.0001 = 10^{-4}

CFU ต่อมิลลิลิตร = $\frac{64+76}{2}\times 10^{4}$ = 70×10^{4} = 7.0×10^{5}

<u>ตัวอย่างที่ 2</u>: กรณีที่มีจำนวนโคโลนีที่นับได้อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนีที่ระดับความเจือจาง 2 ระดับ ระดับความเจือจางละ 2 จาน

ถ้ามีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี นับได้ที่ระดับความเจือจางมากกว่าหนึ่งระดับ อาจคำนวณได้โดยใช้สูตรดังนี้

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = $\frac{C}{V\times(n_1+(0.1\times n_2))\times d}$

เมื่อ C = ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้ทุกจาน

V = ปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงไปในแต่ละจาน

n_1 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางต่ำ*

n_2 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางสูง

d = ระดับความเจือจางต่ำที่นับโคโลนีได้

*ระดับความเจือจางต่ำ หมายถึงตัวอย่างที่เจือจางน้อยที่สุดที่นับโคโลนีได้ เช่นถ้านับโคโลนีได้ที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ดังนั้นตัวอย่างที่เจือจางน้อยกว่าก็คือที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}

2.1 กรณีที่ทำด้วยเทคนิค pour plate

นับจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร 2 จานที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ได้ 168 และ 196 โคโลนี และที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ได้ 25 และ 27 โคโลนี เติมตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรในแต่ละจาน

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = $\frac{168+196+25+27}{1\times(2+(0.1\times 2))\times 10^{-2}} = \frac{416}{1\times 2.2}\times 10^{2} = 18909 = 1.9\times 10^{4}$

2.2 กรณีที่ทำด้วยเทคนิค spread plate

นับจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร 2 จานที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ได้ 168 และ 196 โคโลนี และที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ได้ 25 และ 27 โคโลนี เติมตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละจาน

CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = $\frac{168+196+25+27}{0.1\times(2+(0.1\times 2))\times 10^{-1}} = \frac{416}{1\times 2.2}\times 10^{2} = 18909 = 1.9\times 10^{4}$

<u>การรายงานผล</u>

ในการรายงานค่า CFU ต่อกรัม นิยมรายงานโดยเขียนเป็นเลขทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยเขียนเฉพาะตัวเลข 2 ตัวแรก ส่วนตัวเลขตัวที่ 3 ให้ปัดขึ้นหรือปัดลง ถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 6, 7, 8 หรือ 9 ให้ปัดขึ้น และถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 1, 2, 3 หรือ 4 ให้ปัดลง แต่ถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็นเลข 5 ให้ปัดขึ้นถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคี่ แต่ถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคู่ให้ปัดลง

ตัวอย่างเช่น ถ้าตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ 212 โคโลนีและ Dilution Factor = 10^{-6} คำนวณได้เท่ากับ $212\times 10^{6} = 2.12\times 10^{8} = 2.1\times 10^{8}$ CFU ต่อกรัม

<u>หมายเหตุ</u>

1. ถ้าไม่พบโคโลนีขึ้นเลยที่ทุก ๆ ระดับความเจือจาง จำนวนโคโลนีจะถูกประมาณว่าน้อยกว่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจหาได้ (minimum detection limit) ค่าขีดจำกัดน้อยที่สุดก็คือจำนวนโคโลนีที่นับได้ซึ่งเป็นผลมาจากการมีโคโลนี 1 โคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่ำสุด ตัวอย่างเช่น ถ้าวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างที่เจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยเทคนิค pour plate หลังบ่มไม่พบโคโลนีขึ้นเลย รายงานผลดังนี้ (คำนวณตามสูตรคำนวณหน้า 12)

CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = $< 1\times 10^{2} = < 100$

ดังนั้นจึงต้องรายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดว่า น้อยกว่า 1 เท่าของค่าความเจือจางต่ำสุดเช่น ถ้าระดับความเจือจางต่ำสุดเป็น 1:100 รายงานว่ามีจำนวนจุลินทรีย์

ทั้งหมดน้อยกว่า 100 CFU ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมถ้าทำด้วยเทคนิค pour plate แต่ถ้าทำด้วยเทคนิค spread plate รายงานว่า น้อยกว่า 1,000 CFU ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม

2. ถ้าทุก ๆ จานที่ทั้งสองระดับความเจือจางมีโคโลนีขึ้นน้อยกว่า 25 โคโลนีให้บันทึกจำนวนโคโลนีที่นับได้ตามความเป็นจริง แต่ให้รายงานว่า น้อยกว่า 25 × 1/d เมื่อ d คือ dilution factor ของจานเพาะเชื้อที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่มีโคโลนีขึ้นเช่น จากข้อมูลของจำนวนโคโลนีในจานที่ 1 และ จานที่ 2 (ตารางข้างล่าง) คำนวณหา CFU ต่อมิลลิลิตรหรือ CFU ต่อกรัมได้เท่ากับ 25 × $1/10^{-2}$ = น้อยกว่า 2,500 และเขียน “ESPC” (Estimate Standard Plate Count) หรือ “EAPC” (Estimate Aerobic Plate Count) กำกับไว้ด้วย เพื่อบอกให้ทราบว่าเป็นจำนวนที่ประมาณได้จากจำนวนโคโลนีที่ไม่ได้อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

<u>ตัวอย่าง</u>

จานที่	จำนวนโคโลนี		CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม (EAPC/ml หรือ EAPC/g)
	ระดับความเจือจางที่ 1:100	ระดับความเจือจางที่ 1:1000	
1	18	2	< 2,500
2	0	0	< 2,500

ที่มา: Maturin และ Peeler (2001)

3. ถ้าทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากทั้ง 2 ระดับความเจือจาง มีโคโลนีขึ้นมากกว่า 250 โคโลนี แต่ในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 100 โคโลนี ให้ประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจากจานที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นใกล้เคียง 250 มากที่สุดแล้วคูณด้วยส่วนกลับของ dilution factor ($1/10^{-3}$ = 1000) และเขียน “ESPC” (Estimate Standard Plate Count) หรือ “EAPC” (Estimate Aerobic Plate Count) กำกับไว้ด้วย

จานที่	จำนวนโคโลนี		CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม (EAPC/ml หรือ EAPC/g)
	1:100	1:1000	
1	TNTC	640	640,000 = 6.4×10^5

ที่มา: Maturin และ Peeler (2001)

4. ถ้าทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีโคโลนีขึ้นมากกว่า 100 โคโลนีในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ให้ประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดว่ามีมากกว่า 100 เท่าของส่วนกลับของ dilution factor ที่ระดับความเจือจางสูงสุด ($1/10^{-3}$ = 1000) คูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อเช่น จากข้อมูลของจำนวนโคโลนีในจานที่ 1 (ตารางข้างล่าง) คำนวณหา CFU ต่อมิลลิลิตรหรือ CFU ต่อกรัมได้เท่ากับ > 100 × 1000 × 65 = > 6,500,000 และจากจำนวนโคโลนีในจานที่ 2

คำนวณหา CFU ต่อมิลลิลิตรหรือ CFU ต่อกรัมได้เท่ากับ > 100 × 1000 × 59 = > 5,900,000 (ตัวอย่างข้างล่างนี้มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 110 โคโลนีในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร)

ตัวอย่าง

จานที่	จำนวนโคโลนี		CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม (EAPC/ml หรือ EAPC/g)
	1:100	1:1000	
1	TNTC	7,150 [(a)]	>6,500,000 = > 6.5×10^6
2	TNTC	6,490 [(b)]	>5,900,000 = > 5.9×10^6

[a] พื้นที่จานเพาะเชื้อ = 65 ตารางเซนติเมตร; [b] พื้นที่จานเพาะเชื้อ = 59 ตารางเซนติเมตร

ที่มา: Maturin และ Peeler (2001)

ตัวอย่างการคำนวณ

1. กรณีที่ทำ 1 จานที่แต่ละระดับความเจือจางด้วยเทคนิค pour plate เติมตัวอย่าง 1 มล.ต่อจาน

จำนวนโคโลนี			CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร
ความเจือจาง 10^{-1}	ความเจือจาง 10^{-2}	ความเจือจาง 10^{-3}	
TNTC	245	23	$245 \times 10^2 = 2.4 \times 10^4$
LA	206	SPR	$206 \times 10^2 = 2.1 \times 10^4$
228	48	2	$228 \times 10^1 = 2.3 \times 10^3$ $48 \times 10^2 = 4.8 \times 10^3$ เฉลี่ยได้ = 3.5×10^3
275	20	0	2.8×10^3 ESPC
LA	18	3	<2,500 ESPC
0	0	0	<10 ESPC
TNTC	TNTC	5873 (พื้นที่จาน 59 ซม^2)	>5.9×10^6 ESPC (ต้องเจือจางที่ระดับสูงขึ้น)
N/D	N/D	387	3.9×10^5 ESPC

N/D = ไม่ได้ข้อมูล

2. กรณีที่ทำซ้ำ 2 จานที่แต่ละระดับความเจือจางด้วยเทคนิค pour plate เติมตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจาน

จำนวนโคโลนี			CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม
ระดับความเจือจาง 10^{-1}	ระดับความเจือจาง 10^{-2}	ระดับความเจือจาง 10^{-3}	
TNTC TNTC	245 187	23 17	$((245+187)/2)10^{2} = 2.2 \times 10^{4}$
LA LA	289 293	18 22	$((289+293)/2)10^{2} = 2.9 \times 10^{4}$ ESPC
20 18	0 0	0 0	<250 ESPC
275 LA	20 18	0 0	2.8×10^{3} ESPC
LA LA	18 LA	3 4	<2,500 ESPC
0 0	0 0	0 0	<10 ESPC
210 278	18 20	0 0	$210 \times 10^{1} = 2.1 \times 10^{3}$

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค spiral plate

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่วิเคราะห์: ใช้ตัวอย่างของเหลวที่เจือจางแล้วของตอนที่ 2
2. เครื่องจ่ายตัวอย่างลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ (Automated Spiral Plater รุ่น Autoplate®4000 ของบริษัท Spiral Biotech, USA รูปที่ 1.3)
3. ชุดดักของเหลวที่ไม่ต้องการหลังจากการล้าง (vacuum trap for disposal of liquid) ประกอบด้วย vacuum flask และ vacuum source 50-60 cm Hg
4. ถ้วยใส่ตัวอย่างปลอดเชื้อ (sterile disposable cup)
5. อ่างพลาสติกปลอดเชื้อสำหรับใส่น้ำกลั่นจำนวน 2 อ่างและอ่างพลาสติกปลอดเชื้อสำหรับใส่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 1 อ่าง
6. อาหาร PCA ในจานเพาะเชื้อพลาสติก (disposable Petri dish) ขนาด 100 × 15 มิลลิเมตร
7. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

8. spiral grid ชนิด disposable Cling-On™ grid
9. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (dark-field Quebec colony count หรือชนิดที่เทียบเท่า)

รูปที่ 1.3 เครื่องจ่ายตัวอย่างลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ (Automated Spiral Plater)

วิธีการทดลอง

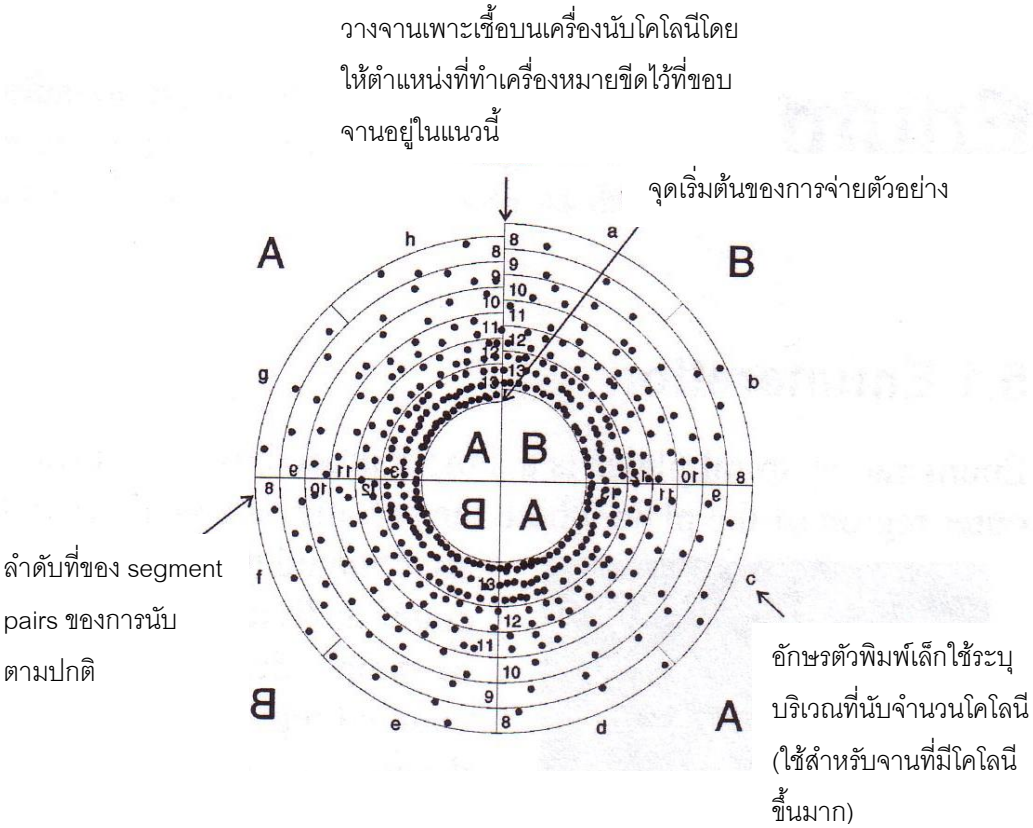
1. เทตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ที่เหลือจากการทดลองในตอนที่ 2 ในถ้วยใส่ตัวอย่าง (sterile disposable cup) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ก่อนใช้เครื่อง Automated Spiral Plater (รูปที่ 1.3)
2. ทำความสะอาดเข็มจ่ายตัวอย่างโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 5 จากนั้นจึงให้เครื่องดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ต้องการขึ้นไปในเข็มจ่าย แล้วจึงวางจานอาหาร PCA มีผิวหน้าแห้งลงบนแท่นวางจาน เปิดฝาจานออก แล้วจึงจ่ายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าอาหาร PCA (ทำซ้ำระดับความเจือจางละ 2 จาน) เมื่อจ่ายตัวอย่างเสร็จ ปิดฝาจานเพาะเชื้อทันทีที่เข็มจ่ายยกขึ้นจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นล้างเข็มจ่ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ควรตรวจสอบความปราศจากเชื้อของเครื่อง spiral plater สำหรับทุกๆ ชุดของตัวอย่างโดยทดลองให้เครื่องจ่ายน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนในจานอาหาร PCA)

หมายเหตุ: ตั้งรูปแบบการจ่ายเป็นแบบ Exponential 50 µl mode ซึ่งจะจ่ายตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตรโดยเครื่องจะจ่ายตัวอย่างน้อยลงเรื่อยๆ ตั้งแต่จุดศูนย์กลางถึงขอบจาน (ดูวิธีการใช้เครื่อง Automated Spiral Plater โดยละเอียดในภาคผนวก ก) และสามารถดูวีดีโอวิธีการใช้เครื่องได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

2. คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง
3. ตรวจนับจำนวนโคโลนี (manual counting) ตามวิธีการต่อไปนี้

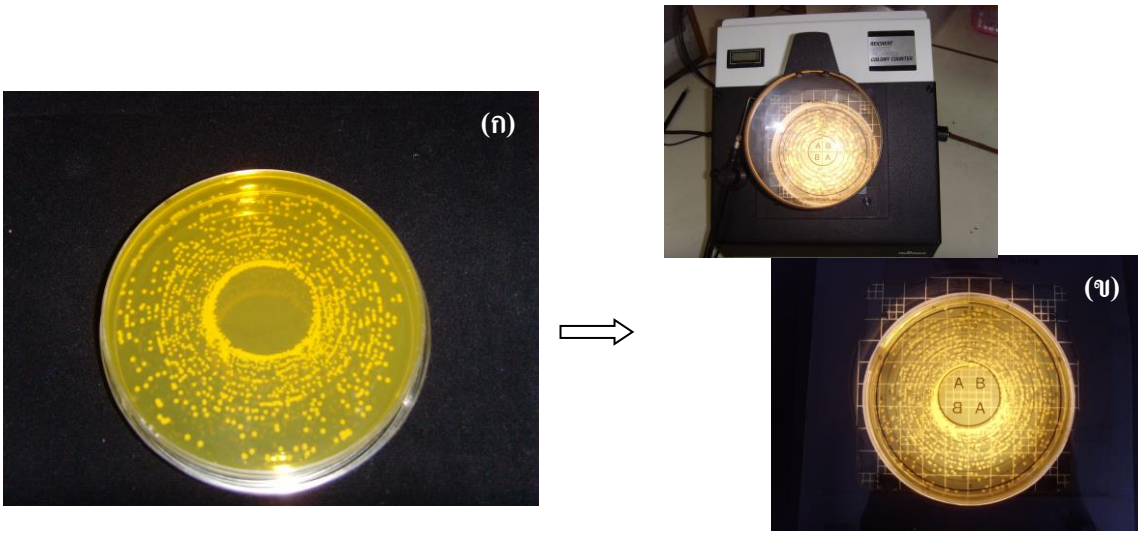
การนับจำนวนโคโลนีและการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยเทคนิค spiral plate

ในการนับจำนวนโคโลนี (manual counting) ต้องใช้ spiral grid วางทาบจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนับ ก่อนนับให้วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อคว่ำลงบนเครื่องนับโคโลนีโดยให้จุดที่ทำเครื่องหมายเริ่มต้นไว้อยู่ที่ตำแหน่ง 12 นาฬิกา วางแผ่น spiral grid ทาบกับจานให้ส่วนที่อยู่ในสุดอยู่ใน segment ที่ 13 อยู่ตรงกลางจานเพาะเชื้อ ดังรูปที่ 1.4 และ 1.5 จากนั้นทำตามวิธีการดังต่อไปนี้



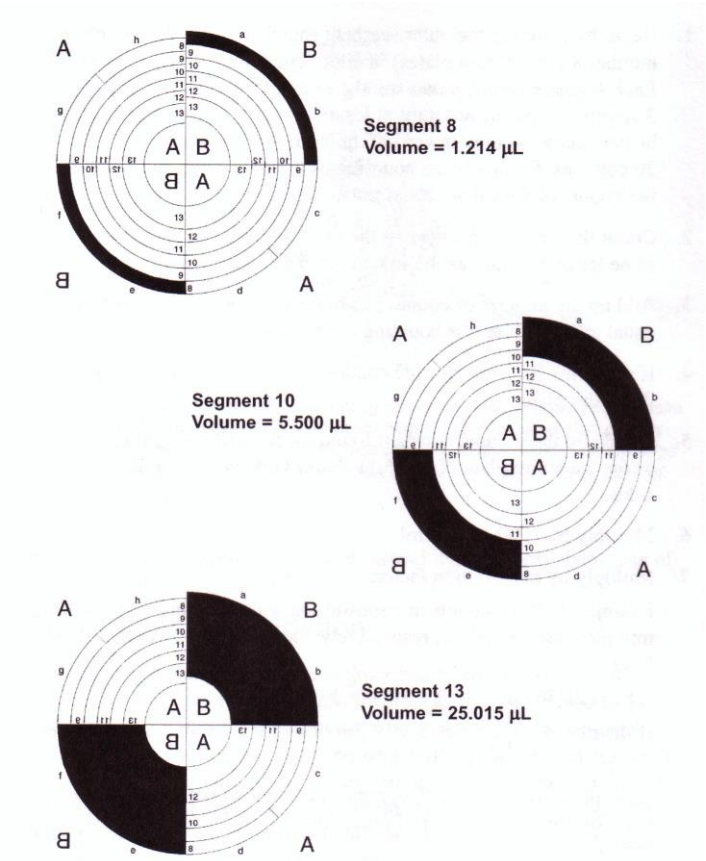
รูปที่ 1.4 การวาง counting grid ทาบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้น โดยให้จุดเริ่มต้นอยู่ที่ตำแหน่ง 12 นาฬิกา

ที่มา: Automated Spiral Plater User Guide, Spiral Biotech



รูปที่ 1.5 การเจริญของจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อที่จ่ายตัวอย่างด้วยเครื่อง Automated Spiral Plater
ก) ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
ข) การนับจำนวนโคโลนีจะต้องทาบด้วย spiral grid

1. เริ่มนับจำนวนโคโลนีที่วงนอกสุด (outer segment ที่ 8 สำหรับจานอาหารขนาด 100 มม.) โดยนับใน quadrant A หรือ quadrant B อย่างใดอย่างหนึ่ง นับจากข้างนอกเข้ามาข้างในจนกระทั่งได้อย่างน้อย 20 โคโลนี ถ้าในวงนอกสุด (เช่น segment ที่ 8) มีโคโลนีขึ้นน้อยกว่า 20 โคโลนีให้นับโคโลนีที่ขึ้นใน segment ที่ติดกันถัดเข้ามา (segment ที่ 9) จนกระทั่งได้อย่างน้อย 20 โคโลนี ถ้าหากมีโคโลนีขึ้นมากกว่า 20 โคโลนีใน segment สุดท้ายนั้น ก็ให้นับต่อไปจนครบทุกโคโลนี
<u>หมายเหตุ</u>: ไม่ต้องนับโคโลนีที่อยู่นอกวงที่ให้นับ
2. นับจำนวนโคโลนีใน segment เดียวกันด้านทะแยงมุมฝั่งตรงข้ามที่อยู่ใน quadrant เดียวกัน เช่น ถ้านับใน quadrant A ด้านบนก็ต้องนับใน quadrant A ด้านล่างฝั่งทะแยงมุม หรือถ้านับใน quadrant B ก็ต้องนับทั้งสองด้านเช่นเดียวกัน
<u>หมายเหตุ</u>: ถ้าจำนวนโคโลนีใน segment ที่ 8-13 น้อยกว่า 20 โคโลนีให้นับโคโลนีทั้งหมดในจาน
3. บวกจำนวนโคโลนีทั้งสองด้านเข้าด้วยกัน (ควรได้อย่างน้อย 40 โคโลนีถ้าไม่ได้นับทั้งจาน) แล้วหารด้วยค่าคงที่ของปริมาตร (volume constant ในตารางที่ 1.1) ตัวอย่างที่จ่ายลงบนจานครอบคลุมถึง segment สุดท้ายที่นับ (รวมปริมาตรที่จ่ายทั้งสองด้านดังรูปที่ 1.6) จากนั้นคูณด้วย 1000 แล้วคูณด้วยค่าคงที่ของระดับความเจือจางเช่น ถ้าจานที่นับโคโลนีนั้นเป็นจานที่ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-3} ก็ต้องคูณด้วย 10^{3}



รูปที่ 1.6 การนับจำนวนโคโลนีใน segment ทั้งสองด้าน
Segment ที่ระบายสีดำคือ segment ที่นับโคโลนี ปริมาตรของตัวอย่างที่เขียนไว้คือ ปริมาตรตัวอย่างรวมที่จ่ายลงบน segment ที่ระบายสีดำทั้งสองด้าน
ที่มา: Automated Spiral Plater User Guide, Spiral Biotech

ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างที่ 1: ถ้านับใน segment 8, 9 และ 10 ทั้งสองด้านของจานขนาด 100 มม. ได้ 28 และ 32 ตามลำดับ กรณีที่ตัวอย่างไม่ได้ผ่านการเจือจาง คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร) ได้ดังนี้ (ดูค่าคงที่ของปริมาตรตัวอย่างที่จ่ายได้ในตารางที่ 1.1)

$(28+32)/5.500\ \mu l = 10.9 \times 1000 = 1.09 \times 10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร

ถ้าตัวอย่างผ่านการเจือจาง 10 เท่า หรือเป็นตัวอย่างที่เจือจางที่ระดับ 10^{-1} ดังนั้นจึงต้องคูณอีก 10 ดังนี้

$10.9 \times 1000 \times 10 = 1.09 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ 2: ถ้านับใน segment 8 ทั้งสองด้านของจานขนาด 100 มม. ได้ 28 และ 20 ตามลำดับ กรณีที่ตัวอย่างไม่ได้ผ่านการเจือจาง คำนวนหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร) ได้ดังนี้

$(28+20)/1.214 \times 1000 = 39.5 \times 10^3 = 3.9 \times 10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร

ถ้าตัวอย่างผ่านการเจือจางที่ระดับ 10^{-3} ดังนั้นต้องคูณอีก 10^3 ดังนี้

$39.5 \times 1000 \times 10^3 = 39.5 \times 10^6 = 3.9 \times 10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ 3: ถ้านับทั้งจานได้ทั้งหมด 36 โคโลนีของจานขนาด 100 มม. กรณีที่ตัวอย่างไม่ได้ผ่านการเจือจาง คำนวนหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร) ได้ดังนี้

$(36)/50.03 \times 1000 = 7.2 \times 10^2$ CFU ต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ: ดูวีดีโอวิธีการคำนวณได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

ตารางที่ 1.1 ค่าคงที่ของปริมาตรตัวอย่างที่จ่ายลงบน segment ที่นับโคโลนีทั้งสองด้านโดยจ่ายตัวอย่างแบบน้อยลงเรื่อยๆ

Segment ที่	ปริมาตรที่จ่าย (50 ไมโครลิตรต่อจาน)		ปริมาตรที่จ่าย (100 ไมโครลิตรต่อจาน)	
	จานขนาด 100 มม.	จานขนาด 150 มม.	จานขนาด 100 มม.	จานขนาด 150 มม.
1	-	0.043	-	0.086
2	-	0.115	-	0.230
3	-	0.234	-	0.468
4	-	0.431	-	0.862
5	-	0.757	-	1.514
6	-	1.295	-	2.590
7	-	2.136	-	4.272
8	1.214	3.350	2.428	6.700
9	2.968	5.103	5.936	10.206
10	5.500	7.636	11.000	15.272
11	9.157	11.292	18.314	22.584
12	14.482	16.618	28.964	33.236
13	25.015	27.150	50.030	54.300
นับทั้งจาน	50.030	54.300	100.060	108.600

ที่มา: Automated Spiral Plater User Guide, Spiral Biotech

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อสดด้วยเทคนิค pour plate

จานที่	จำนวนโคโลนี			CFU ต่อกรัม
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อสดเท่ากับ..... CFU ต่อกรัม

2. ผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างเหลวด้วยเทคนิค spread plate

จานที่	จำนวนโคโลนี			CFU ต่อมิลลิลิตร
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างเหลวเท่ากับ..... CFU ต่อมิลลิลิตร

3. ผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างเหลวด้วยเทคนิค spiral plate

ระดับความเจือจาง	จานที่	Segment ที่	จำนวนโคโลนี (ด้านบน)	จำนวนโคโลนี (ด้านล่าง)	จำนวนโคโลนีรวม	CFU ต่อมิลลิลิตร
	1					
	2					
	1					
	2					
	1					
	2					
	1					
	2					

คำถามท้ายบท

1. ในการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหาร A-D ด้วยเทคนิค pour plate เติมตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มและนับจำนวนโคโลนีได้ผลการทดลองแสดงในตาราง จงคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม) ในตัวอย่างแต่ละชนิด

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนี			
	ระดับความเจือจางที่ 10^{-3}	ระดับความเจือจางที่ 10^{-4}	ระดับความเจือจางที่ 10^{-5}	ระดับความเจือจางที่ 10^{-6}
A	15	6	0	0
B	320	134	20	0
C	0	0	0	0
D	TNTC	376	207	89

2. จงบอกถึงข้อดีและข้อเสียของเทคนิค pour plate เทคนิค spread plate และเทคนิค spiral plate
3. เมื่อชั่งตัวอย่างอาหาร 11 กรัม ตีป่นกับสารละลายที่ใช้ทำเจือจาง 99 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายนี้ 1 มิลลิลิตร เติมในสารละลายที่ใช้ทำเจือจาง 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำเจือจางต่อไปอีก 1 ระดับความเจือจางโดยปิเปต 1 มิลลิลิตร เติมในสารละลายที่ใช้ทำเจือจาง 9 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 0.5 มิลลิลิตรลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากบ่มแล้วนับได้ 123 โคโลนี ตัวอย่างนี้มีจำนวนจุลินทรีย์กี่ CFU ต่อกรัม
4. ถ้าหากคาดว่าในตัวอย่างอาหารที่จะนำมาวิเคราะห์นั้น มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 10^6 CFU ต่อกรัม ควรจะทำการเจือจางอย่างไรจากตัวอย่างเริ่มต้น 25 กรัม เพื่อให้มีจำนวนโคโลนีเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วงที่สามารถนับได้

เอกสารอ้างอิง

American Public Health Association. 1993. Standard Methods for Examination of Dairy Products, 16th ed. APHA, Washington, DC.

Andrews, W.H., Hammack, T.S. 2003. Food sampling and preparation of sample homogenate. In: FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). Available from: www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-1-food-samplingpreparation-sample-homogenate 2 August 2021.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA.

Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. 2005. Food Microbiology Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.

Erkmen, O. 2022. Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/C2021-0-01219-0

Frank, J. 1998. Food Microbiology: Lab Manual. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, Georgia.

Maturin, L., Peeler, J.T. 2001. Aerobic plate count. In: FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). Available from: www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count 2 August 2021.

Mendonça, A.F., Juneja, V.K., Daraba, A. 2014. Total Viable Counts: Metabolic Activity Tests. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), pp. 610-617.

McLandsborough, L. 2005. Food Microbiology Laboratory. CRC Press, USA.

Roberts, D., Hooper, W., Greenwood, M. 1995. Practical Food Microbiology. Public Health Laboratory Service, London.

Roberts, D., Greenwood, M. 2003. Practical Food Microbiology, 3 rd ed. Blackwell Publishing Ltd., USA.

Spiral Biotech. Autoplate 4000®: Automated Spiral Plater User Guide. Spiral Biotech, Inc., Norwood, MA.

Swanson, K.M.J., Busta, F.F., Peterson, E.H., Johnson, M.G. 1992. Colony count methods. In: Vanderzant, C.,Splittstoesser, D. F. (Eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 75-79.

บทปฏิบัติการที่ 2
การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ

จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามอุณหภูมิที่จุลินทรีย์จะเจริญ ได้แก่ 1) กลุ่มจุลินทรีย์ไซโครฟายล์ (psychrophile) ในปี ค. ศ. 1902 Schmidt-Nielsen ได้ให้คำจำกัดความของไซโครฟายล์ว่า เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 0°C ในปัจจุบันไซโครฟายล์หมายถึงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C ถึง 20°C ไซโครฟายล์มีอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญที่ -5°C ถึง 5°C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 10°C ถึง 15°C และอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญที่ 15°C ถึง 20°C จึงคาดได้ว่าอาจพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์ที่มาจากทะเลหรือพบในแถบที่มีอากาศเย็นมาก ๆ และ 2) กลุ่มจุลินทรีย์ไซโครโทรฟ (psychrotroph) หรือจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ ในปี ค. ศ. 1960 ได้มีผู้แนะนำให้ใช้คำนี้เรียก กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5°C หรือต่ำกว่า ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในกลุ่มนักจุลชีววิทยาทางอาหารว่า ไซโครโทรฟเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 0°C ถึง 7°C ซึ่งจะสร้างโคโลนีให้เห็นได้บนอาหารแข็งหรือทำให้เกิดความขุ่นในอาหารเหลวภายใน 7-10 วัน

ไซโครโทรฟมีอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญระดับเดียวกับไซโครฟายล์ แต่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 25°C ถึง 30°C และมีอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญที่ 30°C ถึง 35°C ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิสูงสุดที่ไซโครฟายล์จะเจริญได้ ดังนั้นการที่ไซโครโทรฟเจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วงกว้างกว่า จึงคาดว่าจะพบจุลินทรีย์ประเภทนี้ในหลายแหล่งมากกว่าไซโครฟายล์โดยเฉพาะในอาหารแช่เย็น ไซโครโทรฟจึงเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการเสียของอาหารแช่เย็นมากกว่าไซโครฟายล์ อย่างไรก็ตามไซโครโทรฟบางชนิดสามารถเจริญได้อย่างน้อยที่อุณหภูมิสูงถึง 43°C ซึ่งจริงๆแล้วจุลินทรีย์กลุ่มนี้ก็คือจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) นั่นเอง

เนื่องจากไซโครโทรฟทุกชนิดไม่ได้เจริญในอัตราเดียวกันทั้งหมดในช่วงอุณหภูมิ 0°C ถึง 7°C ดังนั้นจึงแบ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ 1) กลุ่มยูริไซโครโทรฟ (eurypsychrotroph, eurys หมายถึง กว้าง) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สร้างโคโลนีให้เห็นจนกว่าจะบ่มเป็นเวลานานถึง 6-10 วัน และ 2) กลุ่มสตีโนไซโครโทรฟ (stenopsychrotroph, stenos หมายถึง แคบ) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างโคโลนีให้เห็นได้ภายใน 5 วัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจุลินทรีย์ไซโครโทรฟไม่สามารถเจริญได้บน nonselective medium เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 43°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ไซโครโทรฟสามารถเจริญได้ คุณสมบัติข้อนี้ใช้แยกจุลินทรีย์ไซโครโทรฟออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ไซโครโทรฟ อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei* และ *Yersinia*

enterocolitica (ATCC 27739) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 7°C ภายใน 10 วันแต่ก็เจริญได้ดีที่ 43°C ด้วย จุลินทรีย์เหล่านี้จัดเป็นยูริไซโครโทรฟ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญได้ดีที่ 43°C แต่เจริญได้ไม่ดีนักที่อุณหภูมิ 7°C เมื่อบ่มเป็นเวลา 10 วัน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในกลุ่มสตีโนไซโครโทรฟได้แก่ *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973) และ *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7965) จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 7°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40°C

จุลินทรีย์ไซโครโทรฟมีหลายชนิดแพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์และรา มีการศึกษาไซโครโทรฟที่เป็นแบคทีเรียมากกว่ายีสต์และเชื้อรา แบคทีเรียไซโครโทรฟมีทั้งชนิดที่มีรูปร่างท่อน รูปกลม และรูปเกลียว ชนิดที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์ แกรมบวกและแกรมลบ ชนิดที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ รวมทั้งชนิดที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ไซโครโทรฟส่วนใหญ่ที่พบในนมและผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์และสัตว์ปีก ปลาและอาหารทะเล ได้แก่ แบคทีเรียหลายชนิดในสกุล (genus) *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Alcaligene*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia, Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus, Leuconostoc*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ไซโครโทรฟที่พบบ่อยในอาหารได้แก่ *Pseudomonas* และ *Enterococcus* จุลินทรีย์เหล่านี้เจริญได้ที่อุณหภูมิแช่เย็นจึงทำให้เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ไข่ ผักผลไม้ และอาหารอื่นๆ ที่เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0°C ถึง 5°C เน่าเสีย สามารถทำให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติและตำหนิทางกายภาพของอาหาร การพบจุลินทรีย์เหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงการมีศักยภาพสูงในการทำให้อาหารเสียในระหว่างการเก็บรักษา จุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่ถูกทำลายโดยความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงมากนัก แต่ก็มีจุลินทรีย์ที่ต้านทานความร้อนได้ดีเช่นเชื้อ *Bacillus* และ *Clostridium* บางชนิดอาจอยู่รอดได้ การมีจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในอาหารที่ผ่านความร้อนบอกเป็นนัยว่าอาหารนั้นมีการปนเปื้อนหลังการผลิต และจุลินทรีย์เหล่านี้ยังเป็นแหล่งของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเอนไซม์ย่อยไขมันที่ทนความร้อน ซึ่งมีผลต่อการเสื่อมคุณภาพของอาหารหลังจากผ่านความร้อน

Pseudomonas และแบคทีเรียชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Acinetobacter*, *Shewanella* และ *Psychrobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ดีในสภาพที่ชื้น มีอุณหภูมิต่ำและมีกรดต่ำเช่น ในอาหารดิบแช่เย็นและบนผิวของอุปกรณ์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารซึ่งทำความสะอาดไม่ดีพอ แบคทีเรียเหล่านี้ต้องการอากาศในการเจริญ มักพบที่ผิวของอาหารที่เก็บไว้ในสภาพที่มีอากาศโดยเฉพาะอาหารที่มีโปรตีนสูง การเสียของอาหารโดยแบคทีเรียเหล่านี้มักทำให้เกิดลักษณะที่ไม่พึงปรารถนา เกิดกลิ่นเหม็นผิดปกติ บางครั้งมีการสร้างเมือกและทำให้เกิดสีที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นสีเขียว ทำให้เนื้อดิบเกิดกลิ่นผิดปกติ ทำให้เกิดเมือกที่ผิวของเนื้อและสัตว์ปีกแช่เย็นและทำให้น้ำนมแช่เย็นมี

รสขม นอกจากนี้แบคทีเรียไซโครโทรฟเหล่านี้ยังเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้ผักสลัดและผักสดชนิดต่าง ๆ เน่าเสีย การเน่าเสียของอาหารมักสังเกตเห็นได้เมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ 10^7-10^8 เซลล์ต่อกรัมของอาหาร สำหรับไซโครโทรฟชนิดอื่นเช่น *Alteromonas*, *Photobacterium* และ *Vibrio* มีความสำคัญต่อการเน่าเสียของปลา ส่วนเชื้อ *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* และ *Yersinia* ทำให้ผักแช่เย็นเน่าเสีย แบคทีเรียไซโครโทรฟเป็นแหล่งของเอนไซม์ protease ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิดซึ่งปฏิกิริยาหลักของเอนไซม์นี้สามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อถนอมกลิ่นรสของอาหาร

การที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ ระบบต่าง ๆ ของเซลล์จะต้องทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ระบบเอนไซม์ วิถีการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ตลอดจนความสามารถในการให้สารผ่านเข้าออกจากเซลล์ กลไกการเจริญที่อุณหภูมิต่ำอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานกระตุ้นระดับต่ำ การมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนรูปของโปรตีนในไรโบโซม และการเปลี่ยนรูปของเอนไซม์ในระหว่างการเจริญ เซลล์จะเมแทบอไลต์สารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันที่อุณหภูมิต่ำอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงที่อุณหภูมิ 7°C หรือต่ำกว่า การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีส่วนน้อยอาจเกิดขึ้นในช่วงแรกของการเจริญของแบคทีเรียไซโครโทรฟบางชนิด และอาจใช้เวลานานถึงหลายสัปดาห์จึงจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัสของอาหารแช่เย็น

ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารแช่เย็น ทำได้โดยใช้เทคนิคเช่นเดียวกับการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่จะต้องบ่มที่อุณหภูมิ 5-7°C อย่างน้อย 7 วัน หรืออาจบ่มที่อุณหภูมิ 7°C 10 วันถ้าใช้เทคนิค pour plate หรือ 7°C 7-8 วันถ้าใช้เทคนิค spread plate และถ้าบ่มที่อุณหภูมิ 17°C จะต้องบ่ม 16 วัน การบ่มที่อุณหภูมิต่ำทำให้มีจำนวนโคโลนีขึ้นมากกว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูง การใช้เทคนิค spread plate เพื่อไม่ให้เซลล์ของจุลินทรีย์เสียหายจากความร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังหลอมเหลวซึ่งอาจทำให้มีโคโลนีขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยกว่าความเป็นจริง ในการทดลองนี้จะวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำในเนื้อหมูบดและน้ำนมดิบแช่เย็น โดยจะนำตัวอย่างเนื้อหมูบดและน้ำนมดิบที่แช่เย็นไว้เป็นเวลา 7 วันมาตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟ ศึกษาลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ประเภทนี้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เรียนรู้วิธีการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟ
2. เพื่อให้เรียนรู้ลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์และการติดสีแกรมของแบคทีเรียไซโครโทรฟ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ เนื้อบด และตัวอย่างเหลวเช่น น้ำนมดิบ น้ำผลไม้คั้นสด หรืออื่นๆที่แช่

เย็นเป็นเวลา 7 วัน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Plate Count Agar (PCA)
3. สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95
4. สีย้อมและสารเคมีสำหรับย้อมแกรม (ภาคผนวก ค)
5. จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร และแท่งแก้วงอ
6. ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่น (stomacher bag)
7. เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher) และเครื่องผสมอาหารในหลอดทดลอง (vortex mixer)
8. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 5°C

วิธีการทดลอง

1. ตรวจสอบลักษณะปรากฏของเนื้อบดและตัวอย่างของเหลวเช่น น้ำนมดิบ น้ำผลไม้คั้นสด หรืออื่นๆที่แช่เย็นเป็นเวลา 7 วันเช่น สี และกลิ่น
2. นักศึกษาแต่ละกลุ่มจะได้รับเนื้อบดและตัวอย่างของเหลว ให้วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟด้วยเทคนิค spread plate ด้วยวิธีการดังนี้

   2.1 เนื้อบด

   ชั่งเนื้อบดที่แช่เย็นเป็นเวลา 7 วัน ปริมาณ 25 กรัมใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อและเติมสารละลายเปปโตน ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที ทำการเจือจางจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-7} ด้วยสารละลายเปปโตน จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้ายคือระดับความเจือจางที่ 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร PCA ที่มีผิวหน้าแห้ง ระดับความเจือจางละ 2 จาน

   2.2 ตัวอย่างเหลว

   ปิเปตตัวอย่างของเหลวที่ผ่านการแช่เย็นเป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-7} และทำการทดลองเช่นเดียวกับกรณีของเนื้อบด
3. เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทุกจานด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ (ทำให้ปราศจากเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนผ่านเปลวไฟ ทิ้งไว้สัก 2-3 วินาที)
4. คว่ำจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 14 วัน นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในรูป CFU ต่อกรัมของตัวอย่างแช่เย็น และเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างสดจากบทปฏิบัติการที่ 1
5. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร PCA ของทั้งสองตัวอย่าง นำมาย้อมแกรม บันทึกลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์และการติดสีแกรม เปรียบเทียบลักษณะเซลล์

บันทึกผลการทดลอง

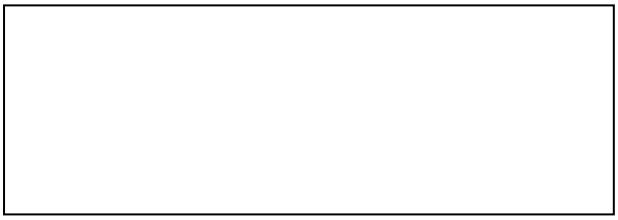
1. ผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในเนื้อบดที่แช่เย็นเป็นเวลา 7 วัน

จานที่	จำนวนโคโลนี			CFU ต่อกรัม
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

จำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในเนื้อบดแช่เย็นเท่ากับ..... CFU ต่อกรัม

ลักษณะรูปร่างการเรียงตัวและการติดสีแกรม .....

จงวาดภาพจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในเนื้อบดแช่เย็น



กำลังขยายทั้งหมดของภาพ = ...

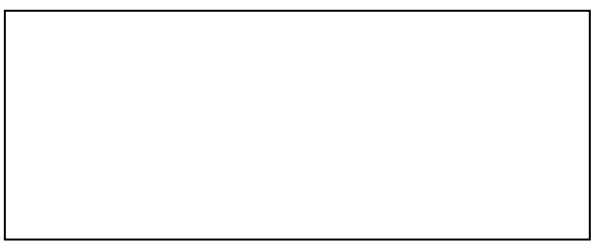
2. ผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในตัวอย่างของเหลวที่แช่เย็นเป็นเวลา 7 วัน

จานที่	จำนวนโคโลนี			CFU ต่อมิลลิลิตร
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

จำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในตัวอย่างของเหลวแช่เย็นเท่ากับ.....CFU ต่อมิลลิลิตร

ลักษณะรูปร่างการเรียงตัวและการติดสีแกรม .....

จงวาดภาพจุลินทรีย์ไซโครโทรฟในตัวอย่างของเหลวแช่เย็น



กำลังขยายทั้งหมดของภาพ =

คำถามท้ายบท

1. ถ้าต้องการตรวจหาจำนวนไซโครโทรฟในผักสดแช่เย็นด้วยเทคนิค spread plate จงอธิบายวิธีการตรวจหา ถ้าทำการเจือจางถึง 10^{-7} และปิเปตใส่จานอาหาร PCA จานละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 2 จาน นำไปบ่มและมีโคโลนีขึ้น นับได้ 134 และ 156 โคโลนี จงคำนวนหาจำนวนไซโครโทรฟในผักสดแช่เย็น
2. จุลินทรีย์ไซโครฟายล์ต่างกับไซโครโทรฟอย่างไร กลุ่มใดที่มีบทบาทต่อการเสียของอาหารแช่เย็น
3. แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำในสกุลใดที่พบบ่อยในอาหารแช่เย็น อาหารแช่เย็นที่เสียโดยแบคทีเรียไซโครโทรฟจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

เอกสารอ้างอิง

Adams, M.R., Moss, M.O. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. 2005. Food Microbiology Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.

Cousin, M.A., Jay, J.M., Vasavada, P.C. 1992. Psychrotrophic microorganisms. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 153-168.

Frank, J. 1998. Food Microbiology: Lab Manual. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, Georgia.

Harrigan, W. F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology, 3rd ed. Academic Press, Great Britain.

Herrera, A.G. 2001. Psychrotrophic microorganisms. In: Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L. (Eds.), Food Microbiology Protocols. Humana Press Inc., New Jersey, pp. 3-10.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, New York.

บทปฏิบัติการที่ 3
การตรวจหา แยกเชื้อ และประเมินจำนวนเชื้อราและยีสต์ในอาหาร

กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ว่าฟังไจ (fungi) รวมถึงเชื้อรา (mold) และยีสต์ (yeast) ซึ่งพบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติเป็นสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryotic microorganisms) มีนิวเคลียสที่แท้จริง ฟังไจมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ฟังไจต้องการออกซิเจนในการเจริญ เจริญได้ที่ช่วง pH และอุณหภูมิค่อนข้างกว้างคือ pH 2 ถึง >9 และระหว่างอุณหภูมิ 10-35°C เชื้อราบางชนิดอาจเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่านี้ ความต้องการน้ำในการเจริญของเชื้อราค่อนข้างต่ำ ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ a_w 0.85 หรือต่ำกว่า แต่ความต้องการน้ำสำหรับการเจริญของยีสต์จะสูงกว่าของเชื้อรา เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ (multicellular microorganism) มีโครงสร้างเป็นเส้นใยที่เรียกว่าไฮฟี (hyphae) เส้นใยที่เจริญแตกแขนงออกไปมากมายเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) ซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายด้วยตาเปล่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือบนอาหารทั่วไป เชื้อราเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรีย มักจะต้องใช้เวลาหลายวันจึงจะสร้างโคโลนีให้เห็น ส่วนยีสต์นั้นเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (unicellular organism) โคโลนีของยีสต์มีลักษณะคล้ายโคโลนีของแบคทีเรียแต่จะทึบแสงกว่า และเซลล์ของยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้โดยการสร้างสปอร์หรือโดยการแตกหน่อ (budding) แต่บางชนิดอาจสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spore) การสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศมีความสำคัญในการจัดจำแนกเชื้อราและยีสต์

เชื้อราและยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

ฟังไจถูกจัดจำแนกเป็น subkingdom โดยอาศัยการที่เส้นใยมีผนังกั้นหรือไม่ (septation of mycelia) และจัดจำแนกเป็น phyla โดยอาศัยความสามารถในการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spores) และชนิดของสปอร์แบบอาศัยเพศที่สร้างขึ้น (ตารางที่ 3.1) เชื้อราและยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปตามธรรมชาติจึงเป็นต้นเหตุของการเสียของอาหารหลายชนิด การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้บนอาหารอาจสังเกตได้จากการเกิดจุดเน่าขนาดต่าง ๆ กัน เกิดเมือกและเส้นใยสีขาวหรือเกิดการสร้างสปอร์สีต่างๆ ทำให้อาหารมีกลิ่นรสผิดปกติ โดยทั่วไปเชื้อราและยีสต์เจริญช้ากว่าแบคทีเรียและมีความต้องการสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญน้อยกว่าแบคทีเรียหรืออาจเรียกว่า มีความจู้จี้ (fastidious) น้อยกว่าแบคทีเรีย ดังนั้นจุลินทรีย์พวกนี้จึงเจริญในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าแบคทีเรียโดยเฉพาะสภาพที่มีความเข้มข้นของกรด เกลือ และน้ำตาลสูงรวมทั้งสภาพที่แห้ง ฉะนั้นจึงมักทำให้เกิดปัญหาการเน่าเสียของอาหารประเภทกึ่งเน่าเสียได้ง่าย(semi-perishable food) โดยเฉพาะเมล็ดธัญชาติ ถั่วต่าง ๆ และผลไม้โดยอาจเข้าทำลายในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยวและระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้ยัง

อาจพบได้ในอาหารที่ผ่านการแปรรูปมาอย่างไม่ถูกสุขลักษณะเช่น เครื่องดื่มที่มีน้ำตาลและกรด แยม ขนมหวาน ผลไม้แห้ง ผักดอง อาหารที่ถนอมไว้ด้วยเกลือ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ และอาจเจริญได้ตามอุปกรณ์และภาชนะในโรงงานแปรรูปอาหาร เชื้อราและยีสต์หลายชนิดที่ทำให้อาหารเสียแสดงในตารางที่ 3.2 การตรวจพบเชื้อราและยีสต์จำนวนมากในอาหารอาจบ่งบอกถึงสุขลักษณะในการผลิต การขนส่งและการเก็บรักษาที่ไม่ดี การใช้อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้องหรืออาจมีการปนเปื้อนหลังการผลิต การปนเปื้อนของเชื้อราและยีสต์ในอาหารก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค การควบคุมการเจริญของเชื้อราทำได้โดยป้องกันไม่ให้สปอร์ของเชื้อราเข้าสู่อาหาร การปรับอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของการเก็บรักษา การเปลี่ยนแปลงระดับออกซิเจน อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้อาจไม่สามารถป้องกันการทำให้คุณภาพและความปลอดภัยของอาหารเปลี่ยนแปลงไปในทุกสถานการณ์ที่มีสาเหตุมาจากการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจหาเชื้อราในอาหารรวมทั้งในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการแปรรูป การบรรจุและการเก็บรักษา

การผลิตอาหารหมักบางชนิดใช้ประโยชน์จากกระบวนการหมักโดยเชื้อราและยีสต์ ตัวอย่างเช่น การใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตไวน์ ขนมปัง และผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ การใช้เชื้อรา *Penicillium* spp. ในการบ่มเนยแข็ง นอกจากนี้เชื้อรายังมีประโยชน์ในการผลิตส่วนผสมของอาหาร เช่น *Mucor* spp. ใช้ผลิตเอนไซม์เรนเนทซึ่งใช้ตกตะกอนน้ำนมที่ใช้ทำเนยแข็ง

เชื้อราหลายชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ เนื่องจากสามารถสร้างสารพิษปนเปื้อนลงในอาหาร สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ส่วนใหญ่ทนความร้อนได้ จึงไม่ถูกทำลายหลังการแปรรูปถึงแม้ว่าเชื้อราที่สร้างสารพิษจะถูกทำลายไปแล้วก็ตาม สารพิษจากเชื้อราอาจมาจากส่วนผสมอาหารที่ผลิตจากวัตถุดิบที่มีเชื้อราเจริญอยู่เช่น แป้งข้าวโพดที่ทำจากข้าวโพดที่มีเชื้อราเจริญในระหว่างการเก็บรักษา เชื้อราอาจลดจำนวนลงระหว่างการเก็บรักษาแต่สารพิษยังคงอยู่ในอาหาร ดังนั้นในการตรวจคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หาสารพิษจากเชื้อราด้วย สารพิษจากเชื้อรามีโครงสร้าง คุณสมบัติ และความเป็นพิษผันแปรแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของสารพิษ เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) มีสมบัติในการก่อมะเร็งได้ค่อนข้างสูง และโอคลาทอกซิน (ochratoxin) ทำให้เกิดพิษต่อไต เชื้อราและยีสต์ที่เจริญในอาหารที่เป็นกรดอาจใช้สารที่เป็นกรดไปในระหว่างการเจริญเป็นผลให้ pH ของอาหารเพิ่มขึ้น สภาพนี้จะทำให้แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยกรดในตอนแรกเจริญได้

โครงสร้างพื้นฐานของเชื้อรา

เชื้อรา (filamentous fungi) มักจะถูกจำแนกชนิดโดยอาศัยโครงสร้างพื้นฐานซึ่งสามารถสังเกตได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการจัดแบ่งเชื้อราเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

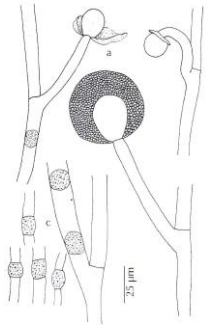
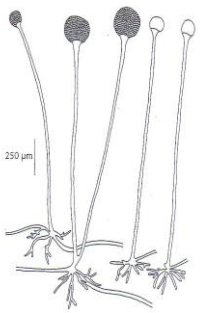
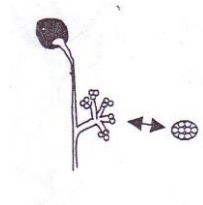
micro-fungi และ macro-fungi เชื้อรากลุ่ม micro-fungi ได้แก่ Zygomycetes, Ascomycetes และ Fungi Imperpecti ส่วนเชื้อรากลุ่ม macro-fungi ได้แก่ Basidiomycetes (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะของฟังไจ

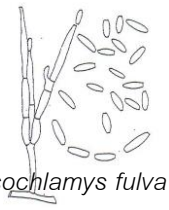
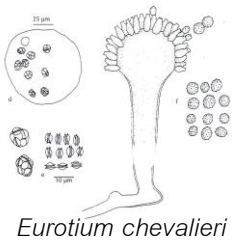
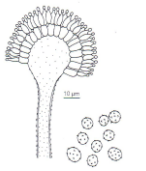
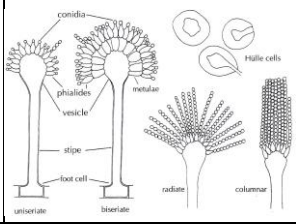
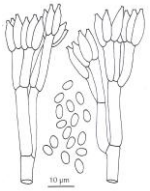
ศักดิ์ (Division)	การสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น (septate hyphae)	การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual sporulation)	การสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual sporulation)	หมายเหตุ
Zygomycota	สร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น (nonseptate mycelium)	สร้าสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile sporangiospores)	สร้างไซโกสปอร์ (zygospore)	เป็นราชั้นต่ำ ไม่ใช่พวกที่ชอบสภาพแห้ง (not xerophilic) ไม่ต้านทานความร้อนและสารเคมี แทบจะไม่สร้างสารพิษ
Ascomycota	สร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น (septate mycelium)	สร้างโคนิเดียหรือโคนิดิโอสปอร์ (conidia or conidiospores)	สร้างแอสโคสปอร์ (ascospore)	เป็นราชั้นสูง ส่วนใหญ่ชอบสภาพแห้ง (xerophilic) มักจะทนความร้อนและสารเคมี
Basidiomycota	สร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น	แทบจะไม่สร้าง	สร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore)	เป็นราชั้นสูงได้แก่ เห็ด รา สนิม (rusts) เห็ดลูกฝุ่น (puff balls) และเห็ดวุ้น (jelly fungi) ไม่สำคัญต่อการเสียของอาหาร
Deuteromycota	สร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น	สร้างโคนิเดีย	ไม่สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ	เป็นราชั้นสูง บางชนิดชอบสภาพแห้ง ไม่ต้านทานความร้อน บางชนิดทนต่อสารเคมี สร้างสารพิษได้

ที่มา: Jay และคณะ (2005); Yousef และ Carlstrom (2003)

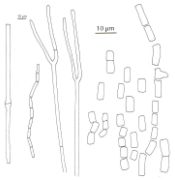
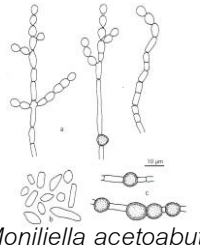
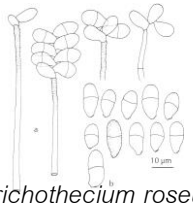
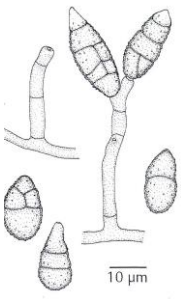
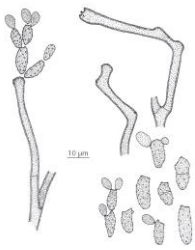
ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย

สกุล (Genus)	สมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนก	Microscopic morphology	สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหาร
เชื้อรา: *Zygomycota*			
Mucor	เส้นใยไม่มีผนังกั้น สร้างโคโลนีคล้ายปุยสำลี สร้างสปอร์ผิวเรียบและมักแตกแขนง ไม่สร้างไรซอยด์ (rhizoid) *M. racemosus* โคโลนีสีขาวเมื่อแก่มีสีน้ำตาลเทา สปอร์รูปร่างรีถึงเกือบกลม	 *Mucor racemosus*	เจริญบนเนื้อแช่เย็นทำให้เกิดตำหนิเรียก“whiskers” ทำให้เกิดจุดดำบนเนื้อแกะแช่แข็งและเจริญบนขนมปัง *M. racemosus* แพร่กระจายในดิน อาหาร โดยเฉพาะในนม ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวเจ้า มะเขือเทศ ชา
Rhizopus	เส้นใยไม่มีผนังกั้นมีสโตรอน (stolons) และไรซอยด์ มี collumellae รูปร่างคล้ายร่ม สปอร์ขนาดใหญ่ มีสีเข้มจนถึงสีอ่อน อับสปอร์ (sporangia) มีสีเข้ม *R. stolonifer* มีโคโลนีสีน้ำตาลเทา	 *Rhizopus stolonifer*	เป็นราขนมปัง (bread mold) ทำให้ผลไม้เน่าแบบ watery soft rot ทำให้เกิดจุดดำบนเนื้อวัว เบคอนและเนื้อแกะแช่แข็ง *Rhizopus stolonifer* สร้าง zygospore สีดำน้ำตาล
Thamnidium	เส้นใยไม่มีผนังกั้น มีอับสปอร์บนเส้นใยที่แตกแขนงมากมาย มีกลุ่มถุงเล็กๆ (sporangioles) รวมทั้งอับสปอร์ (มักอยู่บนก้านเดียวกัน)		*T. elegans* เจริญบนเนื้อแช่เย็น ทำให้เกิดตำหนิที่เรียกว่า “whiskers” บนเนื้อวัว พบในดินและบนเนื้อสัตว์
เชื้อรา: *Ascomycota*			
Neosartorya	โคโลนีสีขาวเป็นปุยคล้ายสำลี โคนิเดียสีเทา เขียว cleistothecia สีขาว แอสโคสปอร์ (ascospore) ไม่มีสี		แอสโคสปอร์ทนความร้อน ทำให้น้ำผลไม้ที่บรรจุขวดหรือบรรจุกระป๋องเน่าเสีย ไม่ชอบสภาพแห้ง

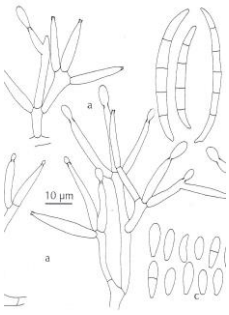
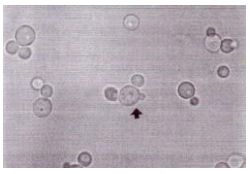
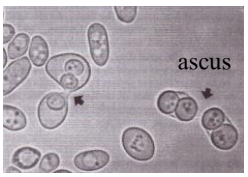
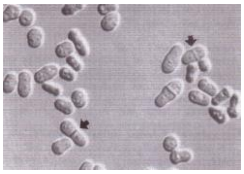
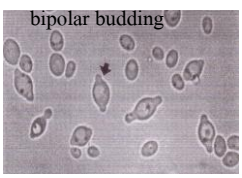
ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (ต่อ)

สกุล (Genus)	สมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนก	Microscopic morphology	สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหาร
Byssochlamys	โคโลนีเป็นปุยคล้ายสำลี *B. fulva* โคโลนีมีสีเหลืองออก น้ำตาลจนถึงสีเขียวมะกอก ไม่มีแอสโคคราพ(ascocarp)	 *Byssochlamys fulva*	สร้างแอสโคสปอร์ทนความร้อนได้ดี ทำให้น้ำผลไม้ที่บรรจุกระป๋องหรือบรรจุขวดเน่าเสีย
Eurotium (Anamorph: *Aspergillus glaucus* group)	Cleistothecia สีเหลืองสว่าง แอสโคสปอร์มีสีเหลืองซีด รูปร่างกลมถึงเกือบกลม โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore)มีผนังเรียบ โคนิเดียมีผิวขุขระ	 *Eurotium chevalieri*	ชอบสภาพแห้ง ทำให้แยม เยลลี่และองุ่นเน่าเสีย สร้างสารพิษเช่น physcion, echinulin
เชื้อรา: *Deuteromycota*			
Aspergillus (Teleomorph: *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartoya* และสกุลอื่นๆ)	เจริญเร็ว โคโลนีมีสีขาว เหลือง เหลืองน้ำตาล น้ำตาลถึงดำ Vesicle, phialides, metulae และ conidia ประกอบกันเป็น conidial head หลายชนิด สร้าง Hülle cells (เซลล์ที่มีผนังหนาเรียบ)	 *Aspergillus flavus* 	พบปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด บางชนิดสร้างสารพิษเช่น *A. flavus* โคนิเดียสีเหลืองเขียว พบบ่อยบนถั่ว เครื่องเทศ เมล็ดพืชที่มีน้ำมัน เมล็ดธัญชาติ
Penicillium	โคโลนีเจริญส่วนมากมีสี โทนเขียว บางครั้งสีขาว *P. digitatum* สร้างโคนิเดีย สีเขียวเหลือง *P. italicum* สร้างโคนิเดียสีเทาเขียว *P. roqueforti* สร้างโคนิเดียสีเขียว	 *Penicillium italicum* *Penicillium roqueforti*	ทำให้เกิดโรคเน่าสีน้ำเงินหรือเขียวในผลไม้ตระกูลส้ม พบบ่อยบนมาการิน (margarine) เนยแข็ง และอาหารที่มีไขมัน ใช้ในการหมักอาหารเช่น blue cheeses

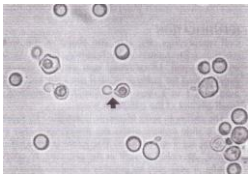
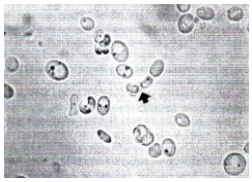
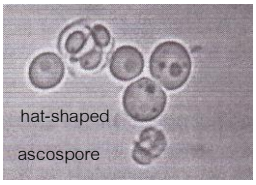
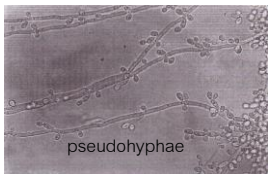
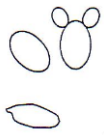
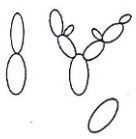
ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (ต่อ)

สกุล (Genus)	สมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนก	Microscopic morphology	สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหาร
Geotrichum	สร้างอาร์โทโคนิเดีย (arthroconidia) โคโลนีสีขาว สร้างโคนิเดียไม่มีสี มีรูปร่างทรงกระบอก	 *Geotrichum candidum*	เป็น machinery mold ทำให้เกิด soft rot ในผลไม้ตระกูลส้ม ลูกพีช พบบ่อยในผลิตภัณฑ์นม
Moniliella	สร้างโคโลนี ตอนแรกมีสีครีม ต่อมามีสีเข้มขึ้นถึงดำน้ำตาล สร้างซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium) เช่นเดียวกับยีสต์	 *Moniliella acetoabutens*	*Moniliella acetoabutens* ชอบกรด มักจะพบในผักผลไม้ดองและน้ำส้มสายชู มีรายงานว่าพบในน้ำผลไม้ น้ำเชื่อม
Trichothecium	สร้างโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ยาว สร้างโคนิเดีย รูปไข่	 *Trichothecium roseum*	ราสีชมพูเจริญบนผลไม้ พบบ่อยบนเมล็ดธัญชาติเช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลีและข้าวโพด
Alternaria	สร้างโคนิเดียใหญ่รูปร่างรี เมื่อโตเต็มที่มีสีน้ำตาลซีดถึงน้ำตาลเข้มปานกลาง สร้างโคนิดิโอฟอร์ สั้น มีขนาด 40-70 × 3-4 ไมโครเมตร สีน้ำตาลซีด ผนังเรียบ บางครั้งแตกแขนง	 *Alternaria alternata*	ทำให้เกิดโรคเน่าสีน้ำตาลถึงสีดำในแอปเปิ้ล มะเดื่อ ผลไม้ตระกูลส้ม หลายชนิดพบบ่อยบนผลไม้ ผัก เมล็ดธัญชาติ ผ้าและพื้นผิวที่ชื้น สร้างสารพิษเช่น altenuene, alternariol
Cladosporium	โคโลนีสีเขียว เขียวมะกอก น้ำเงินเข้ม ดำ หรือน้ำตาล บางชนิดสร้างโคนิเดียรูปคล้ายผลเลมอน แตกแขนงมาก	 *Cladosporium herbarum*	ทำให้เกิดจุดดำบนเนื้อ บางชนิดทำให้เนย (butter) และเนยเทียม (margarine) เน่าเสีย เป็น field fungus เจริญบนข้าวบาร์เล่ย์และข้าวสาลี

ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (ต่อ)

สกุล (Genus)	สมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนก	Microscopic morphology	สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหาร
Fusarium	โคโลนีเป็นปุยสีขาว ครีม เหลือง ชมพู แดงม่วง สร้างโคนิดิโอฟอร์ที่บางครั้งแตกแขนงซับซ้อน แตกแขนงน้อยหรือไม่แตกแขนง สร้างโคนิเดียใหญ่ (macroconidia) รูปเคียว และสร้าง microconidia	 *Fusarium proliferatum*	ทำให้เกิดโรคเน่าสีน้ำตาลในผลไม้ตระกูลส้ม และสับปะรด เจริญบนเมล็ดธัญชาติ ทำให้เบคอน เนื้อแช่เย็นเน่าเสียและเป็นสาเหตุของการอ่อนนิ่มของผักดอง
ยีสต์: *Ascomycota*			
Saccharomyces	สร้างโคโลนีสีขาวหรือครีม แตกหน่อได้รอบเซลล์ (multilateral budding) สปอร์รูปร่างกลม ไม่หมักน้ำตาลแลคโตส	 *Saccharomyces cerevisiae*	*S. cerevisiae* ปนเปื้อนทำให้เครื่องดื่มเสียโดยเกิดการหมัก บางสายพันธุ์ทนวัตถุกันเสีย
Zygosaccharomyces	แตกหน่อได้รอบเซลล์ สร้าง 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส (ascus) หมักน้ำตาลได้ดีมาก	 *Zygosaccharomyces bailli*	*Z. bailli* ทนสารกันเสียได้ดีมาก เจริญได้ที่ a_w 0.8, pH 1.8 *Z. rouxii* -osmophilic yeast (a_w0.62)
Schizosaccharomyces	แบ่งเซลล์โดยเกิด fission อาจสร้างเส้นใยแท้และอาร์โทสปอร์ สร้าง 4-8 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส	 *Schizosaccharomyces pombe*	*S. pombe* ทนต่อความดันออสโมติกสูงได้ดี และต้านทานต่อวัตถุกันเสีย
Hanseniaspora	แตกหน่อที่ขั้วเซลล์ 2 ข้าง เซลล์คล้ายผลเลมอน สร้าง 2-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1แอสคัส	 *Hanseniaspora valbyensis*	พบบนผลมะเดื่อ มะเขือเทศ ผลไม้ตระกูลส้ม สตรอเบอรี่และน้ำผลไม้

ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (ต่อ)

สกุล (Genus)	สมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนก	Microscopic morphology	สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหาร
Debaryomyces	แตกหน่อได้รอบเซลล์ แอสโคสปอร์รูปร่างกลม หรือรูปไข่ สร้างซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium)	 *Debaryomyces hansenii*	เจริญในน้ำเกลือ เนยแข็ง *D. hansenii* ทนเกลือสูง เจริญที่ a_w 0.65 ทำให้โยเกิร์ต น้ำส้มเข้มข้นเสีย
Kluyveromyces	แตกหน่อได้รอบเซลล์ หมักน้ำตาลได้ดี *K. marxianus*: แอสโคสปอร์รูปไต (kidney-shaped)	 *Kluyveromyces marxianus*	พบในผลิตภัณฑ์นม *K. marxianus* ทำให้เนยแข็งเน่าเสีย
Pichia	แตกหน่อได้รอบเซลล์ สร้าง 4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส สร้างอาร์โทสปอร์ สร้างซูโดไมซีเลียม	 *Pichia anomala*	พบบนปลาและกุ้งสด *P. membranaefaciens*: ทนสารกันเสีย สร้างฟิล์มบนผักดอง มะกอก ซอส
ยีสต์: *Deuteromycota*			
Candida	เซลล์รูปร่างกลม รูปร่างเป็นทรงกระบอก รูปไข่ ยาวรี สร้างซูโดไมซีเลียม พบบ่อยในเนื้อบดสด	 *Candida tropicalis*	*C. krusei*: ทนสารกันเสีย สร้างฟิล์มบนผักดอง *C. parapsilosis*: ทำให้เนยแข็ง มาการีนเน่าเสีย
Crytococcus	แตกหน่อได้รอบเซลล์ ไม่หมักน้ำตาล		พบบนสตรอเบอรี่ ปลาทะเล กุ้งและเนื้อวัวบดสด
Rhodotorula	แตกหน่อได้รอบเซลล์ ไม่หมักน้ำตาล สร้างเม็ดสี สีส้ม หรือสีชมพู		พบบนสัตว์ปีก กุ้ง ปลาและเนื้อวัวสด บางชนิดเจริญที่ผิวของ butter
Brettanomyces	แตกหน่อได้รอบเซลล์ สร้าง ogival cells (ปลายด้านหนึ่งแหลมอีกด้านหนึ่งมน)		ทำให้เบียร์ soft drink ไวน์ ผักดองเสีย เชื้อ *B. intermidius* พบมาก เจริญได้ที่ pH 1.8

ที่มา: Yousef และ Carlstrom (2003); Samson และคณะ (2004)

วิธีการตรวจสอบและเพาะเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ในอาหาร

การตรวจวิเคราะห์เชื้อราและยีสต์ในอาหาร ทำได้ 3 วิธีคือ

1. วิธีการตรวจหาเชื้อราบนตัวอย่างอาหารโดยตรง (Direct examination)

อาหารที่เสียโดยเชื้อราและยีสต์ เป็นไปได้ที่จะตรวจสอบด้วยตาเปล่า ตามด้วยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากการเจริญขึ้นเป็นโคโลนีของเชื้อราและยีสต์ปกติมักเกิดขึ้นที่ผิวของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามในการสังเกตจะต้องกระทำทันทีหลังจากที่มีการเจริญเกิดขึ้น เพราะถ้ามีการจับต้องหรือเคลื่อนย้ายผลิตภัณฑ์ อาจทำให้โครงสร้างของเชื้อราและยีสต์ที่จะสังเกตเห็นได้หลุดออกไป ถ้าพบการเจริญของเชื้อราและยีสต์ก็ควรตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป โดยทำการเตรียมสไลด์ขึ้น นำชิ้นส่วนของตัวอย่างใส่ลงในของเหลวที่เติมลงบนสไลด์ (mounting fluid) เช่น กรดแลคติกผสมสีย้อมอะนิลีนบลู (aniline blue)

2. วิธีการเจือจางตัวอย่าง (Dilution plating method)

วิธีนี้สามารถทำได้ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เป็นวิธีที่เหมาะกับการตรวจนับจำนวนยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว หนึ่งโคโลนีจึงเจริญมาจากหนึ่งเซลล์ และยังใช้ได้ดีกับการแยกเชื้อราจากอาหารแต่ไม่เหมาะกับการประเมินจำนวนเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราที่เจริญประกอบด้วยเส้นใยมากมายและสร้างสปอร์จำนวนมากจึงทำให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากด้วยถึงแม้ว่าจะมีมวลเซลล์ของเชื้อราเพียงเล็กน้อยก็ตาม เซลล์ของชิ้นส่วนเส้นใย และสปอร์จำนวนมากนี้มีโอกาสที่จะเจริญเป็นโคโลนีมากมายบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงขึ้นอยู่กับความมากน้อยในการทำให้ตัวอย่างอาหารเป็นเนื้อเดียวกันในขั้นตอนการตีป่นอาหาร เนื่องจากในขณะตีป่นอาหารจะทำให้เส้นใยของเชื้อราแตกหักออก ฉะนั้นปริมาณของเชื้อราในอาหารจึงไม่อาจประเมินได้จากจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่นับได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. วิธีการวางตัวอย่างลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct plating method)

วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับอาหารทุกชนิด โดยเฉพาะสำหรับการตรวจหา เพาะเลี้ยงและแยกเชื้อราจากอาหารที่เป็นชิ้นเล็ก ๆ ได้แก่ เมล็ดธัญชาติและเมล็ดถั่ว วิธีนี้จะวางตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ส่วนมากจะชะล้างผิวของตัวอย่างก่อนด้วยสารละลายคลอรีนที่เตรียมใหม่ ๆ เพื่อให้สิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนเช่น ฝุ่นละอองและสิ่งอื่นๆ หลุดออกไป ขั้นตอนนี้จำเป็นต้องกระทำเพื่อให้เชื้อราที่เจริญอยู่ภายในตัวอย่างสามารถเจริญขึ้นได้ แต่อาจงดขั้นตอนการชะล้างผิวของตัวอย่างได้ในกรณีที่มีเชื้อราที่ต้องการตรวจสอบเจริญอยู่ที่ผิว และเชื้อรานี้เป็นส่วนหนึ่งของเชื้อราที่เจริญเข้าไปในอาหารเช่น เมล็ดข้าวสาลีที่จะนำไปใช้ในการผลิตแป้งสาลี ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะแสดงเป็นร้อยละของการปนเปื้อนด้วยเชื้อราในตัวอย่าง ในการตรวจสอบเชื้อรา

แต่ละชนิดในอาหารรวมถึงเชื้อราที่สร้างสารพิษ วิธีการวางตัวอย่างโดยตรงจะมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการเจือจางตัวอย่าง แต่จะมีประสิทธิภาพต่ำในการตรวจหายีสต์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เรียนรู้วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อราและยีสต์ในอาหารด้วยวิธีต่างๆ
2. เพื่อเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า a_w สูงและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า a_w ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราและยีสต์จากอาหาร

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ เมล็ดถั่ว เมล็ดธัญชาติชนิดต่างๆ ผลไม้สด ผลไม้แห้ง ผลไม้แช่อิ่ม ผลไม้เน่าเสีย น้ำผลไม้ และอาหารที่มีการเจริญของเชื้อราชนิดต่างๆ
2. เชื้อราที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้แก่ *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Alternaria alternate*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma harzianum* และ *Penicillium citrinum*
3. ยีสต์ที่ทำให้อาหารเสียได้แก่ *Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia membranaefaciens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zygosaccharomyces rouxii*
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่

   - Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อราและยีสต์จากตัวอย่างอาหารสดหรืออาหารที่มีค่า a_w สูง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโรสเบนกอล (rose bengal) จะไวต่อแสง เนื่องจากสารยับยั้งจะเกิดขึ้นถ้าหากได้รับแสงนาน 2 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเตรียมเสร็จแล้วควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ในที่มืด

   - Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18, a_w 0.955) ใช้เลี้ยงเชื้อราจากอาหารที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.95 ได้แก่ ฟังไจที่ชอบสภาพแห้ง (xerophilic fungi) เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* หลายชนิด และ *Xeromyces bisporus* จากอาหารที่มีค่า a_w ต่ำหรืออาหารแห้ง เช่น เมล็ดธัญชาติ ถั่ว แป้ง เครื่องเทศ และอื่นๆ DG18 ไม่เหมาะสำหรับตรวจหาเชื้อราในผักและผลไม้

   - Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC) ใช้กรณีที่ไม่มีปัญหาจากเชื้อราที่เจริญอย่างรวดเร็ว

- Potato Dextrose Agar (Acidified PDA) ที่ปรับค่า pH ให้ได้ประมาณ 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริก เตรียมได้โดยเติมสารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร PDA (อุณหภูมิ 45°C) เขย่าให้เข้ากัน ก่อนที่จะเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ
- Plate Count Agar (PCA) ที่เติมคลอแรมฟินิคอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตรใช้เลี้ยงยีสต์ราทั่วไป
- Malt Extract Agar (MEA) (pH~ 5.0) เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์จากอาหารที่มีเชื้อราน้อยกว่ายีสต์ เช่น น้ำผลไม้ และโยเกิร์ต แต่ถ้าตัวอย่างอาหารมีเชื้อราอยู่มากเช่น เนยแข็ง ควรใช้ DRBC
- Malt Extract Yeast Extract 50% Glucose Agar (MY 50G, a_w 0.89)
- Malt Extract Yeast Extract 5% Salt 12 % Glucose (MY 5-12) Agar และ Malt Extract Yeast Extract 10% Salt 12 % Glucose (MY 10-12) Agar อาหาร MY 5-12 และ MY 10-12 เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ที่ชอบสภาพแห้งที่เจริญในอาหารเค็ม (halophilic xerophile)

<u>หมายเหตุ</u> การเติมสารปฏิชีวนะและสารละลายกรดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีจุดประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คลอแรมฟินิคอลไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนขณะฆ่าเชื้อ การเตรียมสารละลาย (stock solution) ของคลอแรมฟินิคอล ทำได้โดยชั่งคลอแรมฟินิคอล 0.1 กรัมใส่ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรและเติมสารละลายนี้ (40 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 960 มิลลิลิตรก่อนนำไปฆ่าเชื้อ (บรรจุ stock solution ไว้ในขวดสีชา เก็บไว้ได้ 1 เดือนในตู้เย็น)

5. สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างอาหาร (diluents) ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นสารละลายที่เหมาะสำหรับทำเจือจางตัวอย่างอาหารที่มีทั้งเชื้อราและยีสต์หรือ อาจใช้สารละลายชนิดอื่น เช่น สารละลายเกลือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นก็ได้ การเติมสารที่ช่วยให้เปียก (wetting agent) เช่น พอลิซอร์บิแทน 80 (polysorbitan 80) หรือทวีน 80 (Tween 80) อาจเหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์บางชนิด ในกรณีที่ตรวจหาจำนวนยีสต์จากอาหารที่มีน้ำตาลสูงเช่น ผลไม้แห้ง ผลไม้แช่อิ่ม และน้ำผลไม้เข้มข้น ควรเติมน้ำตาลซูโครสหรือกลูโคสหรือกลีเซอรอลร้อยละ 20 ลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติก (osmotic shock)
6. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และสารละลายคลอรีนความเข้มข้นร้อยละ 0.4
7. สารละลายสำหรับเตรียมสไลด์ได้แก่ สารละลายกรดแลคติกผสมคอตตอลบลู (cotton blue) หรืออะนิลีนบลู (aniline blue) และของเหลวเชียร์สำหรับเติมลงบนสไลด์ (Shear's mounting fluid)
8. จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ปากคีบ และแท่งแก้วงอ
9. สไลด์ (glass slides) กระจกปิดสไลด์ (coverslips) และแท่งแก้วรูปตัววี (V-shaped glass rod)

10. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) และพาสเจอร์ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ (sterile pasteur pipette)
11. ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่นด้วยเครื่อง stomacher (stomacher bag)
12. เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher) ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C และเครื่องวัดค่า a_w
13. กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟิ้นหลังสว่าง (bright-field microscope) และกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereomicroscope)

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> การศึกษาเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (Microscopic observation of foodborne fungi)

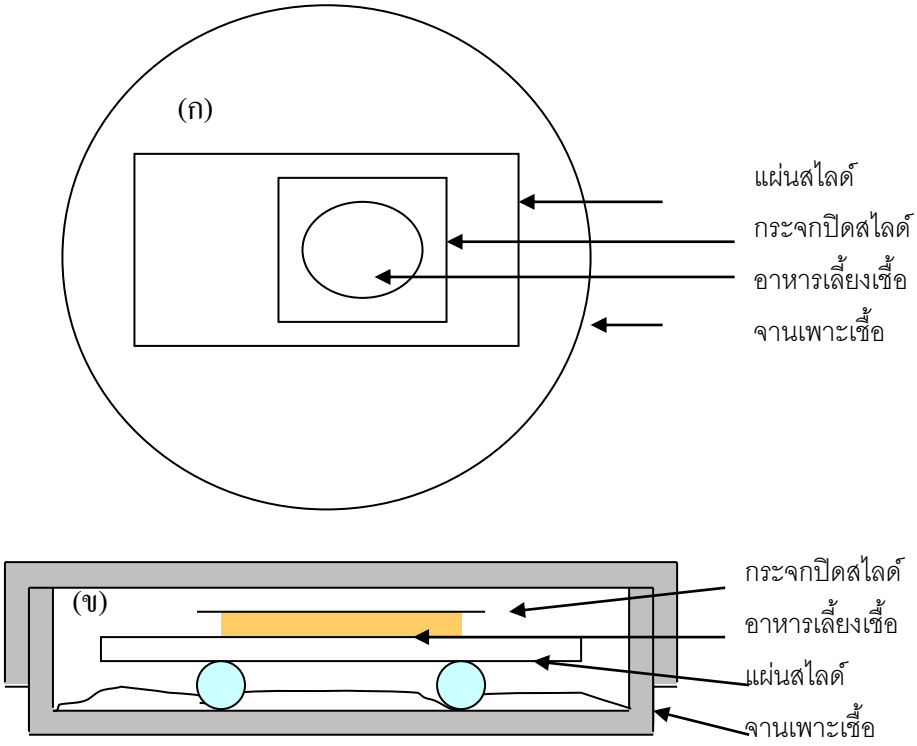
ก) การเตรียมและสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อราและยีสต์

1. ทำการถ่ายเชื้อราบริสุทธิ์แต่ละชนิดลงบนผิวหน้าอาหาร PDA (1 species ต่อจาน) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดงเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อราจากหลอดทดลอง แตะลงบนตรงกลางผิวหน้าอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ 3 จุดห่างประมาณ 1 นิ้ว สำหรับเชื้อยีสต์ให้ใช้ลูปเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง จากนั้นแตะเชื้อยีสต์มาลากบนผิวหน้าอาหาร MEA แบบ simple streak นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
2. หลังจากที่โคโลนีขึ้นแล้วสังเกตลักษณะปรากฏ (macroscopic appearance) บันทึก สี ลักษณะของโคโลนีและเส้นใย วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ตรวจดูเส้นใยและโคนิเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ วาดรูปโครงสร้างของเชื้อราบริสุทธิ์แต่ละชนิด

ข) เทคนิคการเตรียม slide culture ของเชื้อราและยีสต์

1. หลอมอาหาร PDA และอาหาร MEA ที่บรรจุในหลอดทดลอง ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิ 45°C
2. ทำความสะอาดแผ่นสไลด์ ล้างให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้ปากคีบคีบแผ่นสไลด์จุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ลนผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น วางแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วบนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วซึ่งมีกระดาษทิชชูรองอยู่ที่ก้นจาน
3. ใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ปราศจากเชื้อดูดอาหาร PDA (สำหรับเชื้อรา) และอาหาร MEA (สำหรับยีสต์) ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
4. นำเข็มเขี่ยเชื้อมาเผาไฟจนร้อนแดง แล้วเขี่ยเชื้อรา แตะลงบนผิวหน้าอาหาร PDA บนแผ่นสไลด์ กรณีเชื้อยีสต์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อยีสต์มาลากบนผิวหน้าอาหาร MEA 3 เส้น ปิดทับผิวหน้าอาหารด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อ (จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนผ่านเปลวไฟ)

5. เทน้ำกลั่นลงบนกระดาษทิชชูที่วางไว้ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจดูการสร้างไมซีเลียมและซูโดไมซีเลียมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่าและ 40 เท่า วาดรูปเส้นใยของเชื้อราและโครงสร้างอื่น ๆ ที่เห็น



รูปที่ 3.1 การเตรียม slide culture ของเชื้อราและยีสต์
(ก) ภาพด้านบน (ข) ภาพด้านข้าง

<u>ตอนที่ 2</u> การประเมินจำนวนเชื้อราและยีสต์ในอาหารด้วยวิธีการเจือจางตัวอย่าง (Dilution Plating)

1. ทำการวัดค่า a_w ของตัวอย่างอาหาร โดยตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆบรรจุใส่ตลับพลาสติกสำหรับวัดค่า a_w ประมาณ 2 ใน 3 ของปริมาตรตลับ นำไปวัดค่า a_w ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเครื่องวัด a_w
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เทใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อแล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที ในกรณีที่มีเชื้อราอยู่ภายในเมล็ดธัญชาติหรือเมล็ดถั่วควรแช่ไว้ในสารละลายเปปโตนเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปตีป่น
3. เจือจางตัวอย่างจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

4. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ 2 ชนิดที่มีผิวหน้าแห้งได้แก่ Acidified PDA และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า a_w 1 ชนิด (กลุ่มที่ได้รับตัวอย่างที่มีน้ำตาลสูงให้ใช้ MY 50 G และกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างที่มีเกลือสูงให้ใช้ MY5-12 หรือ MY10-12) ใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ไม่ต้องคว่ำจาน ไม่ควรซ้อนกันมากกว่า 3 จานเมื่อบ่มจนครบ 5 วัน นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนี ถ้าไม่มีการเจริญ ให้บ่มต่ออีก 2 วัน รายงานผลเป็นค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ถ้าไม่มีโคโลนีใด ๆ ขึ้นเลยให้รายงานว่ามีจำนวนเชื้อราและยีสต์น้อยกว่า 1 เท่า ของระดับความเจือจางต่ำสุด เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีและสังเกตลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด
5. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2-3 โคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด นำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเขี่ยเชื้อมาลากบนผิวหน้าอาหารในหลอด PDA slant บ่มจนกระทั่งเชื้อเจริญและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อการจำแนกชนิดต่อไป

<u>ตอนที่ 3</u> การประเมินจำนวนเชื้อราในอาหารด้วยวิธีการวางตัวอย่างลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct Plating)

ก) กรณีที่ไม่ชะล้างผิวของตัวอย่างอาหาร

1. ทำการวัดค่า a_w ของตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเครื่องวัด a_w
2. นำตัวอย่างอาหารไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อทำลายแมลงที่ติดมากับตัวอย่างซึ่งอาจขัดขวางการวิเคราะห์
3. ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัมใส่ในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ ทำให้ปากคีบปลอดเชื้อโดยจุ่มในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นำมาลนไฟ (ควรเตรียมไว้ใช้หลาย ๆ อันเพื่อป้องกันไม่ให้ร้อนจนเกินไปจากการลนไฟหลายครั้ง) ใช้ปากคีบนี้คีบตัวอย่างวางลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ควรใช้ DRBC หรือ RBC สำหรับตัวอย่างมีค่า a_w สูง แต่ถ้าตัวอย่างมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.95 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า a_w เช่น DG 18 โดยวางตัวอย่าง 5-10 ชิ้นต่อจาน วางให้ครบ 50 ชิ้น
4. ซ้อนจานเพาะเชื้อ 3-5 จาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C 5 วันถ้าไม่พบการเจริญ บ่มต่ออีก 2 วัน
5. คำนวณการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละ เช่น ถ้ามีเชื้อราขึ้นบนตัวอย่างทั้ง 50 ชิ้น ให้รายงานผลการเกิดเชื้อรา (moldiness) เป็นร้อยละ 100 ถ้ามีเชื้อราเจริญบนตัวอย่าง 32 ชิ้น ก็รายงานผลเป็นร้อยละ 64 ผู้ที่มีประสบการณ์มากอาจคำนวณหาปริมาณของเชื้อราในแต่ละสกุลได้เช่น *Aspergillus* หรือ *Penicillium* จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (10X)
6. ทำการเตรียมสไลด์เพื่อตรวจดูลักษณะของเชื้อราเช่นเดียวกับตอนที่ 1 นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า วาดภาพเชื้อราที่เห็น

ข) กรณีที่ต้องทำการชะล้างผิวของตัวอย่างอาหาร

1. เตรียมสารละลายคลอรีนความเข้มข้นร้อยละ 0.4 สวมถุงมือยางถ้าหากต้องสัมผัสสาร
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อขนาด 300 มิลลิลิตรเติมสารละลายคลอรีนความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ลงไปจนท่วมตัวอย่าง แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 2 นาที ถ่ายสารละลายคลอรีนออกแล้วชะล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
3. ทดลองขั้นต่อไปเหมือนกับกรณีตัวอย่างที่ไม่ชะล้างผิวทุกประการ ตั้งแต่การวางตัวอย่างลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ การบ่มและอ่านผล เปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 2 วิธีเพื่อที่จะตัดสินว่าการเกิดของเชื้อรามาจากที่ผิวของตัวอย่างหรือภายในตัวอย่าง สังเกตการเจริญของเชื้อรา
4. เขี่ยโคโลนีของเชื้อรานำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA หรืออาหารชนิดอื่นๆ เพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

บันทึกผลการทดลอง

1. ตารางบันทึกผลการศึกษาลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย

ชื่อเชื้อรา/ยีสต์ที่ศึกษา	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา	ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราบนสไลด์
1. ……..		
2. ……..		
3. ……..		
4. ……..		

ตารางบันทึกผลการศึกษาลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (ต่อ)

ชื่อเชื้อรา/ยีสต์ที่ศึกษา	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา	ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราบนสไลด์
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		

ตารางบันทึกผลการศึกษาลักษณะของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย (ต่อ)

ชื่อเชื้อรา/ยีสต์ที่ศึกษา	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา	ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราบนสไลด์
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		

2. ผลการประเมินจำนวนเชื้อราและยีสต์ในอาหารด้วยวิธีการเจือจางตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....

ค่า a_w ของตัวอย่างอาหารเท่ากับ.....

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ 1).....และ 2) .....

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1.....

.....

.....

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2.....

.....

.....

จานที่	จำนวนโคโลนีบน Acidified PDA			CFU ต่อกรัม
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์ด้วย Acidified PDA

เท่ากับ.....CFU ต่อกรัม

จานที่	จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า a_w (.....)			CFU ต่อกรัม
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า a_w

เท่ากับ.....CFU ต่อกรัม

3. ผลการตรวจหาเชื้อราในอาหารด้วยวิธีการวางตัวอย่างลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....

ค่า a_w ของตัวอย่างอาหารเท่ากับ.....

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ.....

มีส่วนประกอบอะไรบ้าง.....

.....

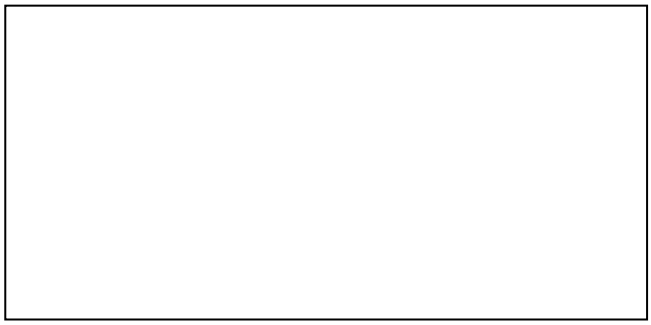
จำนวนชิ้นของตัวอย่างที่มีเชื้อราขึ้นเท่ากับ.....ชิ้น

ร้อยละของการปนเปื้อนเชื้อราเท่ากับเท่าไรจากจำนวนทั้งหมด 50 ชิ้น แสดงวิธีคำนวณ.....

.....

<u>จงวาดภาพของเชื้อราที่เห็นบนสไลด์</u>

ก)



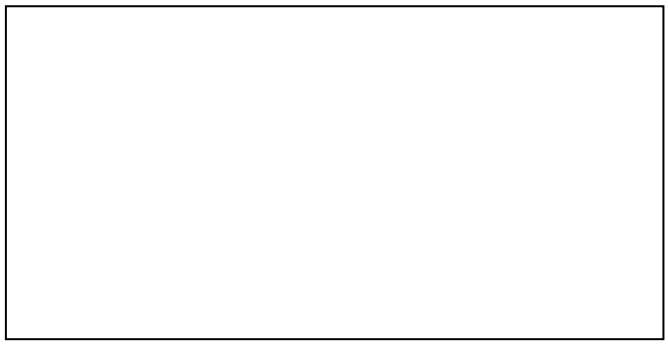
กำลังขยายทั้งหมดของภาพ = ...

จงอธิบายรายละเอียด

.....

.....

ข)



กำลังขยายทั้งหมดของภาพ = ...

กำลังขยายทั้งหมดของภาพ = ...

จงอธิบายรายละเอียด

.....

.....

คำถามท้ายบท

1. จงบอกชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มี a_w สูงและอาหารที่มี a_w ต่ำมาอย่างละ 2 ชนิด และบอกชื่อสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหารชนิดนั้น
2. เชื้อราและยีสต์คือจุลินทรีย์ประเภทใด ต่างกันอย่างไร จงยกตัวอย่างเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเสียมาอย่างละ 2 ชนิด แต่ละชนิดพบในอาหารชนิดใด
3. ถ้าต้องการทราบจำนวนยีสต์ทั้งหมดในกล้วยตากควรเทคนิคอะไร และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใด
4. ถ้าต้องการประเมินการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกขี้หนูสด ควรเทคนิคอะไร จงอธิบาย

เอกสารอ้างอิง

Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. 2005. Food Microbiology Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.

Harrigan, W.F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology, 3rd ed. Academic Press, Great Britain.

Harley, J.P. 2005. Microbiology, 6th ed. McGraw-Hill Higher Education, New York.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1994. Modern methods for detecting and enumerating foodborne Fungi. In: P. Patel (Ed.). Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology. Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp. 232-254.

Rojo, M.C., López, F.N.A., Lerena, M.C., Mercado, L., Torres, A., Combina, M. 2015. Evaluation of different chemical preservatives to control *Zygosaccharomyces rouxii* growth in high sugar culture media. Food Control. 50: 349-355.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A., Bandler, R. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 18: Yeasts, molds, and mycotoxins. In: Bacteriological Analytical Manual (BAM). Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm 13 June 2014.

Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

บทปฏิบัติการที่ 4
การตรวจหาโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *Escherichia coli* ในอาหาร

Escherichia coli เดิมคือ *Bacterium coli* commune ถูกจำแนกชนิดในปี ค.ศ. 1885 โดยกุมารแพทย์ชาวเยอรมันชื่อ Theodor Escherich แบคทีเรีย *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ในวงศ์ Enterobacteriaceae เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) พบในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป ถึงแม้ว่าเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่จะไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค แต่ในบางครั้งก็เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อโดยเฉพาะกับคนหรือสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในปี ค.ศ. 1892 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Shardinger ได้เสนอให้ใช้ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย (fecal contamination) เนื่องจาก *E. coli* มีมากในอุจจาระของคนและสัตว์จึงพบได้ไม่บ่อยนักในสิ่งอื่น ๆ และสามารถตรวจหาได้ง่ายเนื่องจากเชื้อชนิดนี้หมักน้ำตาลแลคโตสได้ การแยก *E. coli* จึงทำได้ง่ายกว่าการแยกจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นการพบ *E. coli* ในอาหารหรือน้ำจึงบ่งบอกถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย ซึ่งเป็นไปได้ที่อาจจะพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคปนเปื้อนอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามการใช้ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ถึงการมีจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นในทางปฏิบัติไม่แน่นอนเสมอไป เนื่องจากยังมี enteric bacteria ชนิดอื่นอีกเช่น *Citrobacter*, *Klebsiella* และ *Enterobacter* ที่สามารถหมักแลคโตสได้เช่นเดียวกับ *E. coli* ดังนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้รวมทั้ง *Escherichia* จึงจัดเป็น enteric bacteria กลุ่มโคลิฟอร์ม (coliforms) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถหมักแลคโตสให้กรดและแก๊สภายใน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35°C และเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียโคลิฟอร์มสกุลใหม่คือ *Raoultella* ซึ่งเดิมเป็นส่วนหนึ่งของแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* อาจเรียกได้ว่าเป็นโคลิฟอร์มสกุลที่ 5 บางครั้งแบคทีเรีย *Arizona hinshawii* และ *Hafnia alvei* บางสายพันธุ์ก็สามารถหมักแลคโตสได้แต่โดยทั่วไปมักจะไม่หมักแลคโตสภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ *Pantoea agglomerans* บางสายพันธุ์ก็สามารถหมักแลคโตสได้ภายใน 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

โคลิฟอร์มเหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบทั่วไปที่ไม่ก่อโรคคือ เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารหลายชนิด มีรายงานว่าโคลิฟอร์มเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง -2°C และที่อุณหภูมิสูงถึง 50°C เจริญในอาหารได้ช้าที่อุณหภูมิ 5°C และเจริญได้ในช่วง pH 4.4-9.0 และ *E. coli* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว มีไดแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแร่ธาตุอื่น ๆ โคลิฟอร์มเจริญได้ดีบนอาหาร Nutrient Agar สร้างโคโลนีให้เห็นได้ภายใน 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C คาดว่าในสภาพที่เหมาะสมจะพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มจำนวนมากในอาหารหลายชนิด นอกจากนี้โคลิฟอร์มยังสามารถเจริญได้ในสภาพ

ที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) ซึ่งปกติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นจึงใช้ประโยชน์ข้อนี้ในการแยกโคลิฟอร์มจากหลาย ๆ แหล่ง

ถึงแม้ว่าการตรวจหาโคลิฟอร์มจะทำได้ง่าย แต่ก็ไม่เสมอไปที่การพบโคลิฟอร์มจะเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายทุกครั้งเนื่องจากในสิ่งแวดล้อมทั่วไปก็พบโคลิฟอร์มได้เช่นกัน ประเด็นนี้จึงเป็นเหตุผลของการนำฟีคอลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) มาใช้เพื่อบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย ฟีคอลโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียกลุ่มย่อยในโคลิฟอร์มกลุ่มใหญ่ ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่เจริญและหมักแลคโตสที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของการบ่มตามปกติ ดังนั้นจึงอาจเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าโคลิฟอร์มทนความร้อน (thermotolerant coliforms) ในการวิเคราะห์หาฟีคอลโคลิฟอร์มในอาหาร จะทำการถ่ายเชื้อจากอาหารเหลว Lauryl Sulfate Tryptose (LST) ลงในอาหาร *E. coli* (EC) broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45.5°C ยกเว้น ตัวอย่างน้ำ สัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือกแข็ง (shellfish) และน้ำจากบริเวณที่จับสัตว์น้ำประเภทนี้ซึ่งจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44.5°C แบคทีเรียในกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มประกอบด้วย *E. coli* เป็นส่วนใหญ่ แต่เชื้อ enteric bacteria บางชนิดเช่น *Klebsiella* ก็สามารถหมักแลคโตสที่อุณหภูมิเหล่านี้ได้เช่นกัน จึงจัด *Klebsiella* เป็นฟีคอลโคลิฟอร์มด้วย ดังนั้นการพบแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงไม่แน่นอนเสมอไปว่าจะต้องเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำ *E. coli* มาใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนี (indicator microorganism) เพื่อใช้บ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหารทางจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอีก ดังนั้นจึงมีแบคทีเรีย 3 กลุ่มที่ใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนีซึ่งได้แก่ 1) โคลิฟอร์ม การตรวจหาโคลิฟอร์มใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพด้านสุขลักษณะของน้ำหรือใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ทั่วไปด้านสุขลักษณะในสิ่งแวดล้อมของการแปรรูปอาหาร นักจุลชีววิทยาใช้จุลินทรีย์ดัชนีเป็นแนวทางที่จะตัดสินว่าอาหารนั้นผ่านการผลิตมาอย่างถูกสุขลักษณะหรือเหมาะสมหรือไม่ เช่น น้ำนมพาสเจอร์ไรส์จะปราศจากแบคทีเรียโคลิฟอร์มได้ถ้าผ่านกระบวนการผลิตมาอย่างเหมาะสมหรือไม่มีการปนเปื้อนหลังการพาสเจอร์ไรส์ 2) ฟีคอลโคลิฟอร์ม เป็นแบคทีเรียกลุ่มย่อยของแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ยังคงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สำหรับสัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือกและน้ำจากบริเวณที่จับสัตว์น้ำประเภทนี้และ 3) *E. coli* ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย หรือบ่งชี้ถึงการแปรรูปอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ วิธีการส่วนใหญ่ที่ใช้ตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ในขั้นต้นอาศัยหลักการพื้นฐานของการหมักแลคโตสโดยจุลินทรีย์

การประเมินจำนวนโคลิฟอร์มด้วยวิธี Most Probable Number

วิธี Most Probable Number (MPN) เป็นวิธีที่ใช้กันมากในการประเมินจำนวนโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่เป็นของเหลว แต่ก็สามารถใช้กับอาหารที่เป็นของแข็งได้ด้วย วิธีนี้อาศัยหลักสถิติในการคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ มีประโยชน์มากในกรณีที่ตัวอย่างมีจำนวนจุลินทรีย์น้อย (น้อยกว่า 100 เซลล์ต่อกรัม) โดยเฉพาะตัวอย่างน้ำ น้ำนมและอาหารที่จะมีอนุภาคอาหารไปบดบังโคโลนีที่ขึ้น ทำ

ให้ผลการนับจำนวนโคโลนีไม่ถูกต้อง ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN จะทำการเจือจางตัวอย่างที่หลายระดับความเจือจาง (serial dilution) ตั้งแต่ระดับความเจือจางต่ำไปจนถึงระดับความเจือจางสูงพอที่จะไม่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลืออยู่ ควรผสมตัวอย่างให้กระจายตัวเข้ากันเป็นเนื้อเดียวก่อนที่จะถ่ายตัวอย่างไปยังระดับความเจือจางสูงขึ้น ซึ่งจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางหลาย ๆ ระดับ (3 ระดับความเจือจางติดต่อกันเป็นอย่างน้อย) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม ระดับความเจือจางละ 3 หลอดหรือ 5 หลอด หลังบ่มสังเกตผลที่เกิดขึ้นโดยตรวจหาการมีหรือไม่มีจุลินทรีย์ในแต่ละหลอด ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบเช่น ในการตรวจหาโคลิฟอร์มจะสังเกตการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักแลคโตสซึ่งบ่งบอกถึงการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้ เมื่อผลที่ได้เป็นบวกแสดงให้เห็นว่า มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อยหนึ่งเซลล์ในตัวอย่างที่ทำการเจือจางนั้น ผลการวิเคราะห์ที่น่าพอใจก็คือ การไม่เกิดแก๊สในหลอดทดลองส่วนใหญ่ที่ระดับความเจือจางสูงสุด (มีตัวอย่างปริมาณน้อยที่สุด) และการเกิดแก๊สในหลอดทดลองส่วนใหญ่ที่ระดับความเจือจางต่ำสุด จากนั้นจะต้องทำการทดสอบยืนยันในขั้นต่อไปก่อนที่จะคำนวณหา “ค่า MPN” ของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตัวอย่างนั้น ซึ่งจะประเมินได้จากรูปแบบของผลบวกที่สังเกตเห็นได้จากตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับ โดยใช้ตาราง MPN ซึ่งเป็นตารางทางสถิติ (statistical table) เช่น ถ้ารูปแบบของผลบวกเป็น 3-1-0 ที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับ จะถูกแปลเป็นค่า MPN ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น การประเมินจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN ไม่เหมือนกับวิธี SPC เนื่องจากผลที่ได้ไม่ได้มาจากการนับจำนวนโคโลนีโดยตรง ดังนั้นผลการวิเคราะห์จึงค่อนข้างผันแปรมากกว่าผลที่ได้จากการนับจำนวนโคโลนีด้วยวิธี SPC และมีแนวโน้มที่จะได้ค่าสูงกว่าวิธี SPC ความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN อาจปรับปรุงได้โดยการเพิ่มจำนวนหลอดอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในแต่ละระดับความเจือจาง ตามทฤษฎีแล้วถ้าหากตัวอย่างมีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ 1.2-1.5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตรจะให้ความถูกต้องสูงสุด

ในการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Presumptive test เป็นการทดสอบคร่าว ๆ ถึงการมีแบคทีเรียโคลิฟอร์ม
2. Confirmed test เป็นการยืนยันผลการทดสอบในขั้น presumptive
3. Completed test เป็นการทดสอบขั้นสมบูรณ์ว่าในตัวอย่างนั้นมีแบคทีเรียโคลิฟอร์มอยู่หรือไม่

โดยทั่วไปในการตรวจหาโคลิฟอร์มและฟีคอลโคลิฟอร์ม จะทำการทดสอบใน 2 ขั้นตอนแรก แต่การตรวจหา *E. coli* ต้องทำครบทั้ง 3 ขั้นตอน นอกจากนี้วิธี MPN ยังแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ วิธี MPN แบบที่ใช้อาหารเหลวระดับความเจือจางละ 3 หลอด (3-tube MPN test) 5 หลอด (5-tube MPN test) และ 10 หลอด (10-tube MPN test) วิธี MPN แบบที่ใช้หลอดอาหารเหลวชุดละ 3 หลอดใช้ในการวิเคราะห์อาหารส่วนใหญ่ ส่วนวิธี MPN แบบ 5 หลอดใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

ทะเล สัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือก (bivalve molluscan shellfish) และแบบ 10 หลอดใช้สำหรับการวิเคราะห์น้ำดื่มบรรจุขวดหรือตัวอย่างที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนน้อย นอกจากวิธี MPN แล้วการตรวจหาโคลิฟอร์มยังอาจทำได้โดยการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet Red Bile Agar ซึ่งใช้จะนิวทรัลเรด (neutral red) เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่หมักแลคโตสได้จะมีโคโลนีสีชมพู

ความไวของการทดสอบด้วยวิธี MPN

วิธี MPN นอกจากจะใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นของเหลวแล้ว ยังใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นของแข็งด้วย ในกรณีตัวอย่างเหลวจะไม่ยุ่งยากมากนัก เนื่องจากสามารถนำตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการทำเจือจางมาวิเคราะห์ได้เช่น สามารถใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรหรือ 10 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดอาหารเหลว โดยตัวอย่างเหลว 1 มิลลิลิตรที่เติมลงไปในหลอดจะเจือจางและมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าตัวอย่างเดียวกันที่เติมในปริมาตร 10 มิลลิลิตรเป็น 10 เท่า นั่นคือ การใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะแทนการทำเจือจางที่ระดับสูงขึ้นถัดไปของการทำเจือจางแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) ดังนั้นในกรณีที่วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างเหลวด้วยวิธี MPN แบบ 3 หลอด จำนวนจุลินทรีย์ต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 3 เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตร (0.3 เซลล์ต่อ 10 มิลลิลิตรหรือ 0.03 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร) เมื่อระดับความเจือจางต่ำสุดของตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการเจือจางเป็น 10 มิลลิลิตรต่อหลอด ถ้าระดับความเจือจางต่ำสุดที่ตรวจสอบเป็น 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ดังนั้นความไวในการตรวจสอบ (test sensitivity) หรือจำนวนจุลินทรีย์ต่ำสุดที่จะตรวจหาได้คือ 30 เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตรหรือ 3 เซลล์ต่อ 10 มิลลิลิตรหรือ 0.3 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร

ในกรณีอาหารแข็ง การตรวจสอบจะค่อนข้างยุ่งยากกว่าเนื่องจากต้องนำตัวอย่างมาตีป่นให้เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายทำเจือจางเพื่อให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} ก่อนที่จะเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาจเติมตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ลงไป 1 มิลลิลิตร (ปริมาณตัวอย่าง 0.1 กรัม) หรือ 10 มิลลิลิตร (ปริมาณตัวอย่าง 1.0 กรัม) เพราะฉะนั้นในการคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ในรูปของค่า MPN จึงต้องคำนึงถึงทั้งระดับการเจือจางและปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงไปของแต่ละระดับความเจือจางด้วย ดังนั้นสำหรับอาหารแข็ง ความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี MPN แบบ 3 หลอดคือ 3 เซลล์ต่อตัวอย่างอาหาร 10 กรัมหรือ 0.3 เซลล์ต่อ 1 กรัมเมื่อปริมาตรตัวอย่างสูงสุด (ระดับความเจือจางต่ำสุด) ที่ตรวจสอบต่อหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร (ของตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}) ซึ่งมีปริมาณตัวอย่าง 1 กรัมต่อหลอด และเมื่อปริมาตรตัวอย่างสูงสุดที่ตรวจสอบต่อหลอดเป็น 1 มิลลิลิตร (ของตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}) ซึ่งมีปริมาณตัวอย่าง 0.1 กรัมต่อหลอด จะมีความไวของการตรวจสอบเพียง 3 เซลล์ต่อตัวอย่างอาหาร 1 กรัม อย่างไรก็ตามถ้าตรวจสอบด้วยวิธี MPN แบบ 5 หลอด ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับความเจือจางละ 5 หลอด หรือถ้าใช้วิธี MPN แบบที่มี

จำนวนหลอดสูงกว่านี้ก็จะมีความไวในการตรวจสอบแตกต่างกัน สิ่งสำคัญคือจะต้องเลือกใช้ตาราง MPN ในการคำนวณให้ถูกต้อง

ดังนั้นวิธี MPN จึงมีประโยชน์ในกรณีที่ตัวอย่างมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยเกินกว่าที่จะตรวจหาได้ด้วยวิธี SPC เช่น มีน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อกรัม ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีจำนวนจุลินทรีย์น้อย การใช้วิธี MPN จะมีความไวสูงกว่าวิธี SPC แต่ถ้าตัวอย่างมีจำนวนจุลินทรีย์มากเช่น 100 เซลล์ต่อกรัม การใช้วิธี SPC จะให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำกว่า นอกจากนี้ยังใช้วิธี MPN ในการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* และ *Vibrio parahaemolyticus*

การทดสอบยืนยันเชื้อ *E. coli* โดยการทดสอบ IMViC

การทดสอบ IMViC (IMViC test) เป็นการทดสอบ 4 อย่างคือ Indole production (I), Methyl red test (M), Voges-Proskauer test (Vi) และ Citrate utilization test (C) ดังนี้

1. การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole test)

การผลิตอินโดล (indole) จากทริปโทเฟน (tryptophan) เป็นคุณลักษณะของจุลินทรีย์หลายชนิด การทดสอบอินโดลใช้ในการแยกความแตกต่างของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae เช่น *E. coli* ในการทดสอบอินโดลจะใส่เชื้อที่จะทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทริปโทเฟนเช่น Tryptone Broth ปริมาตร 5 หรือ 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังบ่มหยด Kovàcs' reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ ถ้าเกิดสีแดงที่ผิวภายใน 1 นาทีแสดงว่าให้ผลบวก

2. การทดสอบเมทิลเรด (Methyl red test)

การทดสอบเมทิลเรดใช้แยกความแตกต่างของแบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นกลุ่มย่อย coli หรือ เป็นกลุ่มย่อย 'aerogenes' แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดหมักกลูโคส บางสายพันธุ์หมักได้ดีมาก หลังบ่ม 48 ชั่วโมง เชื้อในกลุ่มย่อย 'coli' ผลิตกรดเพียงพอที่จะทำให้อาหาร peptone-phosphate growth medium ที่มีกลูโคส (ร้อยละ 0.5 น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นกรดเพื่อว่าค่า pH จะได้ลดลงต่ำกว่า 4.4 แต่ถ้าเป็นแบคทีเรียกลุ่มย่อย 'aerogenes' จะไม่สร้างกรดมากแต่จะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกลางปริมาณมากและใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักให้หมดไปทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 6-7 การเติมสารอินดิเคเตอร์ methyl red ลงไปในหลอดเชื้อหลังจากบ่ม 48 ชั่วโมงช่วยแยกความแตกต่างของแบคทีเรียที่สร้างกรดได้เหล่านี้ ถ้าเกิดสีแดงคือให้ผลบวก แต่ถ้าเกิดสีเหลืองคือให้ผลลบ สำคัญที่จะต้องบ่มเชื้อให้ครบเวลา ถ้าบ่มไม่นานพออาจให้ผลบวกหลอก (false positive)

3. การทดสอบ Voges-Proskauer (Voges-Proskauer test)

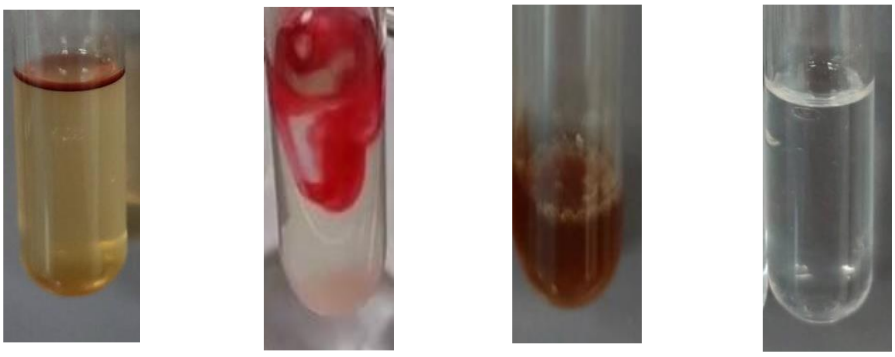
ถึงแม้ว่า acetylmethylcarbinol (acetoin) จะถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิด แต่การทำ Voges-Proskauer (VP) test ใช้เพื่อแยกความแตกต่างของโคลิฟอร์มเป็นหลักและมักใช้ร่วมกับ methyl red test เนื่องจากทั้ง 2 การทดสอบนี้จะให้ผลที่ตรงข้ามกันสำหรับโคลิฟอร์มที่หมักแลคโตส

ได้ เช่นโคลิฟอร์มที่ให้ผลการทดสอบ methyl red เป็นลบ ก็จะให้ผลการทดสอบ VP เป็นบวกและในทางกลับกันโคลิฟอร์มที่ให้ผลการทดสอบ methyl red เป็นบวก ก็จะให้ผลการทดสอบ VP เป็นลบ ถ้าผลการทดสอบ methyl red เป็นลบแสดงว่าค่า pH ของอาหารมากกว่า 4.4 ขณะที่ผลการทดสอบ VP เป็นบวกชี้ให้เห็นว่า acetoin ได้ถูกผลิตขึ้น

VP test หลายๆ รูปแบบได้ถูกพัฒนาขึ้น ส่วนใหญ่มีความผันแปรในเรื่องของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่ม รวมทั้งอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการให้สีของปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับ methyl red test ที่ใช้กันมากคือ MR-VP medium มีอุณหภูมิและเวลามาตรฐานสำหรับการบ่มเช่น บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง หลังบ่มตรวจสอบการสร้าง acetoin ได้โดยเติมสารละลายแอลฟา-แนฟทอลและสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเขย่าเพื่อให้ออกซิเจนแล้วตั้งทิ้งไว้สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดสีชมพูคือให้ผลบวก

4. การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization)

การทดสอบการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียวนี้ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนโดยเฉพาะแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และการทดสอบนี้อาจใช้แยกความแตกต่างของ *Salmonella* บางซีโรไทป์ที่ปกติไม่ค่อยพบ หลักการของการทดสอบนี้อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนเกลือของกรดอินทรีย์ไปเป็น alkaline carbonates ซึ่งจะทำให้เกิด alkaline reaction ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ



(ก) (ข) (ค) (ง)

รูปที่ 4.1 การทดสอบ IMViC เพื่อยืนยันเชื้อ *Escherichia coli*

(ก) การสร้างอินโดล เกิดสีแดง (ให้ผลบวก) (ข) การทดสอบเมทิลเรด เกิดสีแดง (ให้ผลบวก)

(ค) การทดสอบ MR-VP ไม่เกิดสีชมพู (ให้ผลลบ) (ง) การทดสอบการใช้ซิเตรท ใส (ให้ผลลบ)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เรียนรู้วิธีการตรวจหาโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ด้วยวิธี MPN
2. เพื่อให้เรียนรู้วิธีการตรวจหาโคลิฟอร์มโดยการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารแข็ง

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารได้แก่ แซนวิช น้ำผลไม้ ส้มตำ ยำ และอาหารอื่น ๆ ที่จำหน่ายตามบาทวิถี
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST) ที่มีหลอดดักแก๊ส Brilliant Green Lactose Bile Broth, 2% (BGLB) ที่มีหลอดดักแก๊ส *E. coli* (EC) broth ที่มีหลอดดักแก๊ส Levin's Eosin Methylene Blue (L-EMB) Agar, Violet Red Bile (VRB) Agar, Plate Count Agar (PCA) Slant, Tryptone Broth, MR-VP Medium และ Citrate Broth
3. สารเคมีที่ใช้ทดสอบได้แก่ โคแวกซ์รีเอเจนท์ (Kovac's reagent) สารละลายแอลฟา-แนฟทอล(∝-naphthol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ในเอทานอล สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้นร้อยละ 40 เมทิลเรด (methyl red) และ ครีเอติน (creatin)
4. Butterfield's phosphate-buffered water และสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
5. สีย้อมและสารเคมีชนิดต่าง ๆ สำหรับย้อมแกรม (ดูในภาคผนวก ค)
6. จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง หลอดดักแก๊ส ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร และห่วงเขี่ยเชื้อ
7. ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่นอาหาร
8. เครื่องตีป่นอาหาร เครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง และตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> การตรวจหาจำนวนโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ด้วยวิธี MPN

1. Presumptive test สำหรับการตรวจหาโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E. coli*

ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ในโถป่นความเร็วสูงที่ปราศจากเชื้อ (high-speed blender jar) ถ้าเป็นอาหารแช่แข็งควรนำมาทำให้อ่อนนุ่มโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-5°C เป็นเวลาน้อยกว่า 18 ชั่วโมงแต่ไม่ต้องทำให้ละลาย จากนั้นเติม Butterfield's phosphate-buffered water ปริมาตร 450 มิลลิลิตรลงไป ตีป่นเป็นเวลา 2 นาที ถ้ามีตัวอย่างน้อยกว่า 50 กรัมชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติม Butterfield's phosphate-buffered water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นเช่นเดียวกันจะได้ตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} เจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-5}แล้วปิเปตตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจาง (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร LST ที่มีหลอดดักแก๊ส (หรืออาจใช้อาหาร Lactose broth ก็ได้) ระดับความเจือจางละ 3 หลอดรวม 15 หลอด (ทำให้เสร็จภายในเวลาไม่เกิน 15 นาที ตั้งแต่ตีป่นตัวอย่างจนกระทั่งเติมตัวอย่างลงในอาหารเหลว) จากนั้นนำหลอดอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง หลอดที่เกิดแก๊สอย่างน้อย 10% ของหลอดดักแก๊สถือว่าให้ผลบวก ส่วนหลอดที่เกิดแก๊สเพียงเล็กน้อยและหลอดที่ไม่เกิดแก๊สให้บ่มต่อไปอีก 24 ± 2 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

แล้วนำหลอดที่เกิดแก๊สไปทดสอบยืนยันในขั้นต่อไป

2. Confirmed test

2.1 การทดสอบยืนยันสำหรับโคลิฟอร์ม

ใช้ลูปที่ปราศจากเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเหลว LST ทุกหลอดที่เกิดแก๊สหนึ่งลูปเต็มลงในหลอดอาหารเหลว BGLB หลอดต่อหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}C$ เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดแก๊ส นับจำนวนหลอดที่เกิดแก๊สเพื่อยืนยันการเกิดแก๊สของหลอดอาหาร LST ในขั้น presumptive นำไปคำนวณหาค่า MPN ของโคลิฟอร์มจากตาราง MPN สำหรับ 3 หลอดในภาคผนวก ฉ

2.2 การทดสอบยืนยันสำหรับฟีคอลโคลิฟอร์มและ *E. coli*

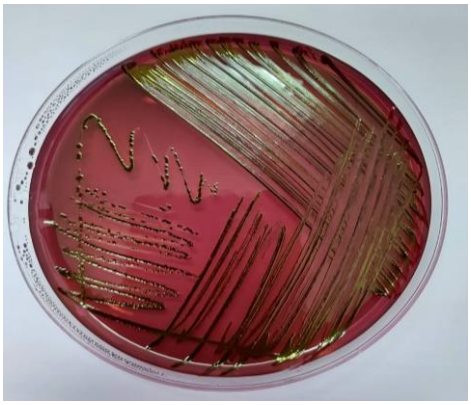
ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ต่างกันที่ใช้อาหาร EC broth แทนอาหาร BGLB และบ่มที่อุณหภูมิ $45.5 \pm 0.2^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดแก๊ส ถ้าไม่มีแก๊สเกิดขึ้น บ่มต่อไปอีก 48 ± 2 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่เกิดแก๊ส นำไปคำนวณหาค่า MPN ของฟีคอลโคลิฟอร์มจากตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด หากจะวิเคราะห์หา *E. coli* ขั้นต่อไป ทำตามวิธีการในข้อ 3

<u>หมายเหตุ</u>: การวิเคราะห์หาฟีคอลโคลิฟอร์มทำที่อุณหภูมิ $45.5 \pm 0.2^{\circ}C$ สำหรับอาหารทั้งหมดยกเว้น ตัวอย่างน้ำ สัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือก (shellfish) และน้ำจากบริเวณที่จับสัตว์น้ำประเภทนี้จะบ่มที่อุณหภูมิ $44.5 \pm 0.2^{\circ}C$

3. Completed test สำหรับการตรวจหา *E. coli*

การทำ completed test สำหรับตรวจหา *E. coli* ทำได้โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร EC broth ลากลงบนผิวหน้าอาหาร L-EMB Agar ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}C$ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นโคโลนีของ *E. coli* โคโลนีของ *E. coli* จะมีขนาดเล็ก ลักษณะกลมสีเข้มตรงกลางเกือบมีสีดำและที่ผิวอาจมีหรือไม่มีสีเขียวเหลือบเป็นเงาโลหะ (metallic sheen) (รูปที่ 4.2) เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *E. coli* จากอาหาร L-EMB มาลากลงบนผิวอาหารใน PCA slants นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}C$ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และใช้สำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป

<u>หมายเหตุ</u>: การจำแนกชนิดเพียง 1 โคโลนี (ในจำนวน 5 โคโลนี) ก็เพียงพอหากได้ผลสรุปว่าเป็นเชื้อ *E. coli* ถ้าหากหลอดอาหาร EC ที่มาของโคโลนีนี้ให้ผลบวก ไม่จำเป็นต้องทดสอบทั้ง 5 โคโลนี



รูปที่ 4.2 ลักษณะของโคโลนีของ *E. coli* บนอาหาร L-EMB Agar
โคโลนีมีขนาดเล็กลักษณะกลมสีเข้มตรงกลางเกือบมีสีดำและที่ผิวมีสีเขียวเหลือบเป็นเงาโลหะ

จากนั้นนำเชื้อที่เจริญบนอาหาร PCA มาย้อมแกรม สังเกตรูปร่างของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ ถ้าหากเชื้อที่ทดสอบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้น ให้ทำการทดสอบปฏิกิริยา IMViC ต่อไป และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหาร LST อีกครั้งเพื่อยืนยันการสร้างแก๊ส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ขั้นต่อไปทำการทดสอบ IMViC

3.1 การทดสอบการสร้างอินโดล

การทดสอบนี้ทำได้โดยถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงในอาหาร Tryptone Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมโคแวกซ์รีเอเจนท์ลงไป 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้าผลการสร้างอินโดลเป็นบวกจะเกิดชั้นสีแดงที่ผิวหน้าอาหาร

3.2 การทดสอบ Voges-Proskauer

การทดสอบนี้ทำได้โดยถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงในอาหาร MR-VP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารที่บ่มแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเปล่าที่ปราศจากเชื้อและเติมสารละลายแอลฟา-แนฟทอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน ถ้าต้องการเร่งปฏิกิริยาให้เติมครีเอติน 2-3 เกล็ดแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดสีชมพู ถ้าเกิดสีชมพูแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นบวกคือมีการสร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินอล (acetylmethyl carbinol) และ 2,3 บิวทิรีนไกลคอล (2,3 butylene glycol)

3.3 การทดสอบเมทิลเรด

ในการทดสอบเมทิลเรดทำได้โดยบ่มอาหาร MR-VP ที่เหลือหลังจากทำ MR-VP test แล้วต่อไปอีก 48 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นหยดเมทิลเรด 5 หยดลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าให้ผลบวก การเกิดสีแดงชี้ให้เห็นว่าอาหารมีค่า pH 4.2 หรือต่ำกว่า 4.2 แต่ถ้าเกิดสีเหลืองแสดงว่าให้ผลลบ

3.4 การทดสอบการใช้ซิเตรท

การทดสอบนี้ทำได้โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อที่จะทดสอบใส่ในอาหาร Koser's Citrate Broth บ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}C$ 96 ชั่วโมง ถ้าอาหารขุ่นอย่างชัดเจนคือให้ผลบวก

<u>การแปลผลการทดสอบ</u>

เชื้อใดที่ให้ผลการทดสอบต่อไปนี้สรุปว่าเป็นเชื้อ *E. coli*

1. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ หมักแลคโตสและสร้างแก๊สภายใน 48 ชั่วโมงที่ $35^{\circ}C$
2. ให้รูปแบบของผลการทดสอบ IMViC ดังนี้คือ + + - - (สำหรับ biotype 1) หมายถึงการทดสอบอินโดลและการทดสอบเมทิลเรดให้ผลบวก ส่วนการทดสอบ Voges-Proskauer และการทดสอบการใช้ซิเตรทให้ผลลบ หรือ - + - - (สำหรับ biotype 2) หมายถึงการทดสอบอินโดลให้ผลลบ การทดสอลเมทิลเรดให้ผลบวก การทดสอบ Voges-Proskauer และการทดสอบการใช้ซิเตรทให้ผลลบ เมื่อได้ผลการทดลองถึงขั้นนี้ นับจำนวนหลอดอาหาร EC ที่มีเชื้อ *E. coli* ที่ทั้ง 5 ระดับความเจือจางเพื่อนำมาคำนวณหาค่า MPN ของ *E. coli*

<u>หมายเหตุ</u>: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

<u>ตอนที่ 2</u> วิธีตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารแข็ง

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่น 2 นาทีและทำการเจือจางถึง 10^{-5}
2. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่แต่ละระดับความเจือจาง (10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลง ในจานอาหารเปล่าที่ปราศจากเชื้อ ระดับความเจือจางละ 2 จาน
3. เทอาหาร Violet Red Bile (VRB) Agar ที่มีอุณหภูมิ $48^{\circ}C$ ลงไปจานละ 10 มิลลิลิตร หมุนจานเพื่อให้ตัวอย่างผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้แข็ง จากนั้นเทอาหาร VRB ทับลงไปอีก 5 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเจริญแผ่ที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง
4. คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35^{\circ}C$ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
5. ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีสีม่วงแดงและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตรหรือใหญ่กว่าและมีโซนการตกตะกอนของกรดน้ำดี (bile acids) รอบ ๆ โคโลนีในจานที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนี (ควรเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์ โดยนำเชื้อ *E. coli* มาลากบนอาหาร VRB บ่มที่อุณหภูมิ $35^{\circ}C$ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
6. ทำการยืนยันว่าโคโลนีที่สงสัยเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 10 โคโลนี ถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีลงในหลอดอาหาร BGLB ที่มีหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ $35^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดแก๊ส ถ้าไม่เกิดแก๊สให้บ่มต่อไปอีก 24 ชั่วโมง

ถ้าหลอดที่เกิดแก๊สนั้นมีฝ้าเกิดขึ้นด้วย ควรเขี่ยเชื้อมาย้อมแกรมเพื่อให้แน่ใจว่าแก๊สที่เกิดขึ้นนั้นมาจากแบคทีเรียแกรมลบไม่ใช่แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* ที่หมักแลคโตสได้

7. คำนวณหาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (CFU ต่อกรัมของอาหาร) จากจำนวนโคโลนีที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

<u>การคำนวณหาค่า MPN</u>

การสันนิษฐานที่สำคัญซึ่งช่วยในการสนับสนุนการหาจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างด้วยวิธี MPN คือ แบคทีเรียในตัวอย่างกระจายตัวแบบสุ่ม เซลล์แต่ละเซลล์อยู่แยกกัน ไม่เกาะกันเป็นกลุ่ม ในแต่ละหลอดอาหารเหลว ถึงแม้ว่าจะมีแบคทีเรียเพียงเซลล์เดียวก็สามารถทำให้เกิดการเจริญหรือการเปลี่ยนแปลงที่สามารถตรวจสอบได้โดยแต่ละหลอดเป็นอิสระต่อกัน

สาระสำคัญของวิธี MPN ก็คือการเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับความเจือจางที่บางครั้งอาจไม่พบจุลินทรีย์มีชีวิตอยู่เลย เฉพาะจุลินทรีย์ที่มีชีวิตนั้นที่จะถูกเพาะเลี้ยงให้เจริญในอาหารเหลว ผลที่บันทึกได้จากการวิเคราะห์ก็คือ จำนวนหลอดที่พบการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นที่แต่ละระดับความเจือจางซึ่งสามารถใช้ในการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างเริ่มต้น ซึ่งในความเป็นจริงแล้วสามารถพบแบคทีเรียในตัวอย่างได้ในรูปที่อยู่ต่อกันเป็นสาย ไม่แยกออกจากกันเมื่อผ่านการเตรียมและเจือจางตัวอย่างแล้ว ค่า MPN ที่ได้จริงๆ ควรจะรายงานในรูปของ growth units (GU) หรือ colony-forming unit (CFU) ไม่ใช่รายงานเป็นจำนวนเซลล์แต่ละเซลล์ แต่เพื่อที่จะให้ง่าย การคำนวณค่า MPN ที่จะอธิบายนี้จะกล่าวถึง GU หรือ CFU ในรูปของเซลล์แบคทีเรียเดี่ยวๆ

ค่า MPN คือจำนวนของแบคทีเรียที่มีในตัวอย่างที่ตรวจสอบซึ่งเป็นไปได้มากที่สุด เป็นค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ประมาณได้ดังสมการ

$$\sum_{j=1}^{k} \frac{g_j m_j}{1-\exp(-\lambda m_j)} = \sum_{j=1}^{k} t_j m_j$$

เมื่อ exp (x) หมายถึง e^x และ K คือจำนวนระดับความเจือจาง

g_j คือจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (หรือมีการเจริญ) ที่ระดับความเจือจาง j

m_j คือ ปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงในหลอดแต่ละหลอดที่ระดับความเจือจาง j

t_j คือจำนวนหลอดที่ระดับความเจือจาง j

ในปี ค.ศ. 1915 McCrady ได้ตีพิมพ์การประมาณจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตที่วิเคราะห์โดยวิธี MPN อย่างถูกต้องเป็นครั้งแรก หลังจากนั้นก็มีนักวิจัยอีกหลายท่านที่ได้ตีพิมพ์หลักทางสถิติ

พื้นฐานเกี่ยวกับเรื่องนี้เรื่อยมา จนกระทั่งในปี 1983 De Man ได้ตีพิมพ์วิธีหาระดับความเชื่อมั่น (confidence interval method) ซึ่งได้ถูกดัดแปลงเป็นตาราง MPN ในภาคผนวก ฉ ของหนังสือเล่มนี้

การคำนวณหาค่า MPN และค่าขีดจำกัดของความเชื่อมั่น (confidence limits หรือ confidence intervals) ดูได้จากตาราง MPN ค่าขีดจำกัดของความเชื่อมั่น หมายถึงค่าที่ชี้ให้เห็นถึงช่วงของจำนวนจุลินทรีย์ที่แท้จริงที่มีในตัวอย่างนั้น ซึ่งได้แก่จำนวนสูงสุดถึงจำนวนต่ำสุดของค่าขีดจำกัดของความเชื่อมั่นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยครอบคลุมจำนวนที่ประมาณได้จากค่า MPN ในการหาค่า MPN ทำได้โดยนำรูปแบบของผลบวก (จำนวนหลอดที่เกิดแก๊สที่ระดับความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ) มาหาค่า MPN จากตาราง (มิลลิลิตรหรือกรัม ใช้แทนกันได้) การเลือกรูปแบบของผลบวกที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ มีหลักการดังนี้

<u>กรณีที่ 1</u> เมื่อมีหลอดที่ให้ผลบวกครบทุกหลอดที่ระดับความเจือจาง 1 หรือมากกว่า 1 ระดับความเจือจาง

-เมื่อมีหลอดที่ให้ผลบวกครบทุกหลอดให้เลือกระดับความเจือจางสูงสุด (คือระดับความเจือจางที่มีปริมาณตัวอย่างน้อยที่สุด) ที่ให้ผลบวกครบทุกหลอด (ถึงแม้ว่าที่ระดับความเจือจางต่ำกว่าจะให้ผลลบก็ตาม) แล้วเลือกอีก 2 ระดับความเจือจางที่สูงกว่าระดับความเจือจางสูงสุดนั้น (ดูตัวอย่าง ก ข และ ค ในตารางที่ 4.1)

-ถ้ามีหลอดที่ให้ผลบวกที่ระดับความเจือจางสูงกว่าระดับความเจือจางที่ให้ผลบวกครบทุกหลอดมากกว่า 2 ระดับขึ้นไป ให้เลือกระดับความเจือจางต่ำสุด (ของรูปแบบความเจือจาง 3 ระดับที่จะเลือก) เป็นระดับความเจือจางที่สูงขึ้นถัด (จากระดับความเจือจางที่ให้ผลบวกครบทุกหลอดนั้น) ไปอีก 1 ระดับ แล้วเลือกอีก 2 ระดับความเจือจางถัดไป: ดูตัวอย่าง ง)

-ถ้าเลือกระดับความเจือจางสูงสุดที่ให้ผลบวกครบทุกหลอดและเลือกอีก 2 ระดับความเจือจางที่สูงกว่าแล้วยังคงมีหลอดที่ให้ผลบวกที่ระดับความเจือจางสูงกว่านั้น ให้รวมจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกนั้นเข้ากับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของระดับความเจือจางสูงสุดที่เลือก (ดูตัวอย่าง จ)

-ถ้าเลือกระดับความเจือจางสูงสุดที่ให้ผลบวกครบทุกหลอดแล้วต้องเลือกอีก 2 ระดับความเจือจางที่สูงกว่า แต่มีเหลือไม่ครบ ให้เลื่อนระดับความเจือจางต่ำสุดที่จะเลือกลงมา (ดูตัวอย่าง ฉ)

-ถ้าปรากฏว่าหลอดอาหารเหลวที่ทุกระดับความเจือจาง ให้ผลบวกครบทั้งหมดให้เริ่มเลือกที่ระดับความเจือจางสูงสุด 3 ระดับ (ดูตัวอย่าง ช)

<u>กรณีที่ 2</u> เมื่อไม่มีระดับความเจือจางใดที่ให้ผลบวกครบทุกหลอด

ให้เลือกระดับความเจือจางต่ำสุด 3 ระดับ (ดูตัวอย่าง ซ) แต่ถ้าเลือกระดับความเจือจางต่ำสุดจำนวน 3 ระดับแล้วยังคงมีหลอดที่ให้ผลบวกที่ระดับความเจือจางสูงกว่าระดับความเจือจางสูงสุดที่เลือก ให้รวมจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกนั้นเข้ากับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของระดับความเจือจางสูงสุดที่เลือก (ดูตัวอย่าง ญ)

ค่า MPN จากตารางสำหรับ 3, 5 และ 10 หลอด ในภาคผนวก ฉ ใช้ได้โดยตรงกับการที่มีปริมาณตัวอย่างในหลอดเป็น 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัมต่อหลอดที่ทั้ง 3 ระดับความเจือจางของรูปแบบการให้ผลบวกที่เลือก แต่ถ้าปริมาณตัวอย่างในหลอดแตกต่างไปจากนี้ต้องผันค่าที่อ่านได้จากตารางให้ใช้ได้กับตัวอย่างที่วิเคราะห์ โดยนำค่า MPN ต่อกรัมที่อ่านได้มาหารด้วยปริมาณตัวอย่างในหลอดที่ระดับความเจือจางกึ่งกลางของระดับความเจือจาง 3 ระดับที่เลือกแล้ว คูณด้วยปริมาณตัวอย่างของระดับความเจือจางกึ่งกลางจากตาราง ดังตัวอย่าง ฉ ช ซ และ ญ ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างการคำนวณหาค่า MPN และค่า confidence limit

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (จาก 5 หลอด/ระดับความเจือจาง)					รูปแบบของผลบวก (3 ระดับความเจือจางที่เลือก)
	1 กรัม	0.1 กรัม	0.01 กรัม	0.001 กรัม	0.0001 กรัม	
ก	5	5	1	0	0	5-1-0
ข	4	5	1	0	0	5-1-0
ค	5	5	4	1	0	5-4-1
ง	5	4	4	1	0	4-4-1
จ	5	4	4	0 (+1)	1	4-4-1
ฉ	5	5	5	5	2	5-5-2
ช	5	5	5	5	5	5-5-5
ซ	0	0	1	0	0	0-0-1
ญ	4	4	1 (+1)	1	0	4-4-2

ตัวอย่าง ก และ ข

รูปแบบที่เลือก (เพื่อนำไปหาค่า MPN และค่า confidence limit จากตารางMPN สำหรับ 5 หลอด): 5-1-0 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = 33 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

= ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = 33

ค่า confidence limit (จากตาราง) = ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 10 - 100

ตัวอย่าง ค

รูปแบบที่เลือก : 5-4-1 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = 170 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

= ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = 170

ค่า confidence limit (จากตาราง) = ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 58 - 400

ตัวอย่าง ง และ จ

รูปแบบที่เลือก : 4-4-1 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = 40 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

= ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = 40

ค่า confidence limit (จากตาราง) = ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 14 - 100

ตัวอย่าง ฉ

รูปแบบที่เลือก : 5-5-2 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.01, 0.001 และ 0.0001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = 540 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = $\frac{540}{0.001}$ x 0.01 = 5,400

ค่า confidence limit (จากตาราง) = 150 - 1,700

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 1,500 - 17,000

ตัวอย่าง ช

รูปแบบที่เลือก : 5-5-5 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.01, 0.001 และ 0.0001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = > 1,600 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = > $\frac{1,600}{0.001}$ x 0.01 = > 16,000

ค่า confidence limit (จากตาราง) = 700 - infinity

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 7,000 - infinity

ตัวอย่าง ซ

รูปแบบที่เลือก : 0-0-1 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 1.0, 0.1 และ 0.01 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = 1.8 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = $\frac{1.8}{0.1}$ x 0.01 = 0.18

ค่า confidence limit (จากตาราง) = 0.09 - 6.8

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 0.009 - 0.68

ตัวอย่าง ญ

รูปแบบที่เลือก : 4-4-2 (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ 1.0, 0.1 และ 0.01 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = 47 (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = $\frac{47}{0.1}$ x 0.01 = 4.7

ค่า confidence limit (จากตาราง) = 15 - 120

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = 1.5 - 12.0

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการตรวจหาจำนวนโคลิฟอร์ม ฟีคอลโคลิฟอร์มและ *E. coli* ด้วยวิธี MPN

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ.....

1.1 Presumptive test

ระดับความเจือจาง	ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดแก๊ส) ใน LST broth			
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
10^{-1}	0.1				
10^{-2}	0.01				
10^{-3}	0.001				
10^{-4}	0.0001				
10^{-5}	0.00001				

1.2 Confirmed test

1.2.1 Confirmed test สำหรับการตรวจหาโคลิฟอร์ม

ระดับความเจือจาง	ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดแก๊ส) ใน BGLB broth			
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
10^{-1}	0.1				
10^{-2}	0.01				
10^{-3}	0.001				
10^{-4}	0.0001				
10^{-5}	0.00001				

<u>การคำนวณหาค่า MPN ต่อกรัมและค่า confidence limit ของโคลิฟอร์ม</u>

รูปแบบที่เลือก (เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด) : ..... (จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์..... , ... และ ..... กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = ...(จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = ...

ค่า confidence limit (จากตาราง) = ...

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = ...

1.2.2 Confirmed test สำหรับการตรวจหาฟีคอลโคลิฟอร์ม

ระดับความเจือจาง	ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดแก๊ส) ใน EC broth			
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
10^{-1}	0.1				
10^{-2}	0.01				
10^{-3}	0.001				
10^{-4}	0.0001				
10^{-5}	0.00001				

การคำนวณหาค่า MPN ต่อกรัมและค่า confidence limit ของฟีคอลโคลิฟอร์ม

รูปแบบที่เลือก: .....(จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์.....,..... และ ..... กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = ... (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = ...

ค่า confidence limit (จากตาราง) =.....

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = ...

1.3 Completed test สำหรับการตรวจหา *E . coli*

1.3.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร EMB และผลการย้อมแกรม

รหัสโคโลนี	ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร EMB	ผลการย้อมแกรม
1		
2		
3		
4		
5		
เชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์		

1.3.2 การทดสอบ IMViC

รหัสโคโลนี	ชนิดของการทดสอบ			
	Indole production	Methyl red test	Voges-Proskauer test	Citrate Utilization test
1				
2				
3				
4				
5				

1.3.3 สรุปผลการตรวจหา *E. coli* ด้วยวิธี MPN

ระดับความเจือจาง	ตัวอย่าง/หลอด (กรัม)	จำนวนหลอด EC broth ที่มี *E. coli*			
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
10^{-1}	0.1				
10^{-2}	0.01				
10^{-3}	0.001				
10^{-4}	0.0001				
10^{-5}	0.00001				

<u>การคำนวณหาค่า MPN ต่อกรัมและค่า confidence limit ของ *E. coli*</u>

รูปแบบที่เลือก: .....(จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์.....,..... และ ..... กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = ... (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = ...

ค่า confidence limit (จากตาราง) = ...

ค่า confidence limit ของตัวอย่าง = ...

2. วิธีการตรวจนับโคโลนีบนอาหาร VRB

2.1 จำนวนโคโลนีบนอาหาร VRB

ระดับความเจือจาง	จำนวนโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *E. coli*		
	จานที่ 1	จานที่ 2	เฉลี่ย

2.2 การทดสอบยืนยัน

รหัสโคโลนีที่ทดสอบ	การเกิดแก๊สใน BGLB broth	ผลการย้อมแกรม
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

2.3 คำนวณหาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม = ... CFU ต่อกรัม

คำถามท้ายบท

1. จงคำนวณหาค่า MPN ของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (ต่อกรัมของตัวอย่าง) จากผลการทดลองดังต่อไปนี้

ตัวอย่าง	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (จาก 5 หลอด/ระดับความเจือจาง)				
	0.1 มล.	0.01 มล.	0.001 มล.	0.0001 มล.	0.00001 มล.
ก	5	5	3	0	0
ข	5	5	3	2	0
ค	0	3	0	0	0
ง	5	4	3	1	1
จ	5	5	4	1	1

2. แบคทีเรียโคลิฟอร์มมีความสำคัญอย่างไร ทำไมจึงใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนีในการประเมินคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร
3. แบคทีเรียฟีคอลโคลิฟอร์มต่างกับโคลิฟอร์มอย่างไร จงอธิบายวิธีการทดสอบยืนยันสำหรับฟีคอลโคลิฟอร์มว่าจะต้องทำการทดสอบอย่างไร
4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดใช้ในทดสอบขั้นสมบูรณ์เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างที่วิเคราะห์มี *E. coli* จงบอกลักษณะโคโลนีของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้
5. การทดสอบ IMViC คือการทดสอบอะไรบ้าง กรณีเป็นเชื้อ *E. coli* จะให้ผลการทดสอบ IMViC เป็นอย่างไร อธิบายผลของการทดสอบแต่ละชนิด

เอกสารอ้างอิง

Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.

Blodgett, R. 2010. Bacteriological Analytical Manual Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/Laboratory Methods/ucm 109656.htm 13 June 2014.

Feng, P., Weagant, S.D., Grant, M.A. 2002. Bacteriological Analytical Manual Chapter 4: Enumeration of *Escherichia* coli and the coliform bacteria (February 2013 Version). Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948. htm 13 June 2014.

Frank, J.F. 1998. Food Microbiology: LAB Manual. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, Georgia.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed., Springer Science+Business Media, Inc., New York.

Peeler, J.T., Houghtby, G.A., Rainosek, A.P. 1992. The most probable number technique. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 105-120.

Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

บทปฏิบัติการที่ 5
การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทนความร้อนและการใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์

การใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การพาสเจอร์ไรส์และการสเตอริไลซ์ เป็นวิธีการที่ใช้กันมากที่สุดในการแปรรูปอาหาร การพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) หมายถึง การใช้ความร้อนระดับที่ไม่สูงมาก แต่สูงเพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ไม่สร้างสปอร์ทั้งหมด และพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียจำนวนมากจนทำให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บยาวนานขึ้น เช่น อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์น้ำนมคือ 62.8°C 30 นาที (Low Temperature Long Time, LTLT) และ 71.7°C 15 วินาที (High Temperature Short Time, HTST) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์นี้เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทนความร้อนได้ดีที่สุดได้แก่ เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งทำให้เกิดวัณโรค และ *Coxiella burnetti* ซึ่งทำให้เกิดโรค Q fever นอกจากนี้ยังเพียงพอที่จะทำลาย ยีสต์รา แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่มีจุลินทรีย์ 2 กลุ่มที่อาจจะมีชีวิตรอดจากการทำลายด้วยการพาสเจอร์ไรส์คือ จุลินทรีย์ทนความร้อน (thermoduric microorganism) และจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic microorganism)

จุลินทรีย์ทนความร้อน เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รอดได้เมื่อเผชิญกับสภาพที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่ไม่จำเป็นต้องเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงนั้น จุลินทรีย์ชนิดนี้รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อนอาหารที่อุณหภูมิ 60°C ถึง 80°C โดยทั่วไปแบคทีเรียทนความร้อนเจริญที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 15°C ถึง 37°C แบคทีเรียทนความร้อนที่พบปนเปื้อนในไข่ได้แก่ *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ส่วนแบคทีเรียทนความร้อนที่แยกได้จากน้ำนมบ่อยครั้งได้แก่ *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* และ แบคทีเรียในกลุ่ม coryneform จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ปนเปื้อนมาจากเต้านมวัว อุปกรณ์ และเครื่องมือเครื่องใช้ที่ไม่สะอาด เนื่องจากการพบจุลินทรีย์ทนความร้อนจำนวนมากเกี่ยวข้องกับการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นจึงใช้ปริมาณจุลินทรีย์ทนความร้อนช่วยบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการทำความสะอาดอุปกรณ์ และตรวจหาแหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอีกด้วย

จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่ระดับอุณหภูมิสูง เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่เพียงแต่จะอยู่รอดที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น แต่ยังต้องการอุณหภูมิสูงเพื่อการเจริญและกิจกรรมเมแทบอลิกอีกด้วย (metabolic activity) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus* และ *Clostridium* ซึ่งมีความสำคัญมากที่สุดในอาหาร แบคทีเรียที่ชอบเจริญที่ระดับอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria)ในอุตสาหกรรมนม หมายถึงจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในนมและผลิตภัณฑ์นมที่อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่าปกติ (≥ 55°C) และรวมถึงสภาวะที่ใช้ใน

การพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT ด้วย แบคทีเรียประเภทนี้อาจสะสมอยู่เป็นเวลานานในเครื่องพาสเจอร์ไรส์แบบต่อเนื่อง (HTST pasteurizer) แบคทีเรียชนิดที่พบบ่อยในน้ำนมคือ *Bacillus* ซึ่งจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในนมและผลิตภัณฑ์นมที่เก็บอยู่ในสภาพอุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน ในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ประเภทนี้ทำได้โดยวิธีการเช่นเดียวกับวิธี Standard Plate Count ด้วยเทคนิค pour plate หรือ spread plate เพียงแต่นำไปบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติ (55 ± 1°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น Thermophilic count ต่อมิลลิลิตร หรือ ต่อกรัมของอาหาร

ในการถนอมอาหารหลายชนิด จำเป็นต้องใช้ความร้อนช่วยในการทำลายจุลินทรีย์ การใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ถ้าหากเซลล์ของจุลินทรีย์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิเฉพาะค่าหนึ่ง เซลล์จะตายในอัตราคงที่ ดังนั้นเพื่อที่จะให้เข้าใจการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนจึงจำเป็นที่จะต้องเข้าใจหลักการเกี่ยวกับเรื่องนี้

ค่า Decimal reduction time

ค่า Decimal reduction time หรือ *D* value คือเวลาที่ใช้ ณ อุณหภูมิหนึ่งที่จะทำลายจุลินทรีย์ไปร้อยละ 90 ของจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นหรือเวลาที่ใช้ในการทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลง 1 log cycle โดยจะแสดงในรูป D_T = *t* นาที เมื่อ T คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อน (°C หรือ °F) และ *t* คือ เวลา (นาที) ที่ใช้ในการทำให้จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลง 1 log cycle ดังนั้นจึงเป็นการวัดความไวต่อความร้อน (heat sentivity) หรือความต้านทานต่อความร้อน (heat resistance) ของจุลินทรีย์ สามารถหาค่า *D* ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$D_T = \frac{t}{\log a - \log b}$$

เมื่อ a คือจำนวนเซลล์เริ่มต้น และ b คือจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ T (°C หรือ °F) เป็นเวลา *t* นาที เมื่อความแตกต่างระหว่าง a กับ b เป็น 1 log cycle ดังนั้น log a ลบกับ log b มีค่าเท่ากับ 1 ดังนั้นค่า *D* จึงเท่ากับ *t* ถ้าค่า $D_{121°C}$ ของเชื้อชนิดหนึ่งเท่ากับ 1 นาที หมายถึง จำนวนเซลล์ร้อยละ 90 ของจำนวนเซลล์เริ่มต้นถูกทำลายภายใน 1 นาทีที่อุณหภูมิ 121°C

อีกวิธีหนึ่ง สามารถหาค่า *D* ได้โดยการเขียนกราฟการรอดชีวิตของเซลล์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ T กับระยะเวลาที่ให้ความร้อน ในอุดมคติ กราฟที่ได้จะเป็นกราฟเส้นตรง สามารถที่จะประมาณค่า –log ของจำนวนเซลล์ เพื่อที่จะให้มีจำนวนเซลล์เหลือรอดน้อยมาก ๆ เช่น เหลือเซลล์หรือสปอร์ที่รอดชีวิตเพียง 1 เซลล์หรือ 1 สปอร์เท่านั้นในอาหาร 10 กรัม หรือ 100 กรัม หรือ 1000 กรัม ดังนั้นจึงสามารถใช้กราฟนี้ออกแบบตัวแปรสำหรับกระบวนการให้ความร้อนเพื่อให้เหลือปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ต่ำที่สุดในอาหาร

หลักการให้ความร้อนแบบ 12 *D* (12-*D* concept)

ในการให้ความร้อนอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ (pH > 4.6) เช่นอาหารประเภทเนื้อ ข้าวโพด ถั่ว และอื่นๆ ต้องคำนึงถึงการทำลายสปอร์ของ *Clostridium botulinum* เป็นสำคัญเนื่องจากเชื้อชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทนความร้อนได้สูงสุด จึงได้มีผู้คิดหลักการ 12 *D* (12-*D* concept) ขึ้นมาเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการให้ความร้อนอาหารกระป๋อง ซึ่งก็หมายถึง การให้ความร้อนในระดับต่ำสุดกับอาหารที่จะสามารถลดปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตของ *C. botulinum* ลงเหลือ 10^{-12} หรือลดลง 12 log cycle ถ้ายิ่งมีปริมาณสปอร์เริ่มต้นน้อยเท่าใด ก็จะยิ่งมีปริมาณสปอร์เหลืออยู่น้อยลงมากเท่านั้นหลังจากผ่านความร้อน และมีโอกาสน้อยมากที่อาหารนั้นจะมีสปอร์ที่มีชีวิตรอด การใช้หลักการให้ความร้อนแบบ 12 *D* ก็เพื่อที่จะประกันความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค โดยใช้กับอาหารที่มีค่า pH สูงกว่า 4.6 เนื่องจากสปอร์ของ *C. botulinum* ไม่งอกและไม่สร้างสารพิษที่ระดับ pH ต่ำกว่า 4.6

ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

ค่า *D* ไม่ใช่ค่าคงที่ แต่จะผันแปรขึ้นกับปัจจัยต่างๆ หลายชนิดได้แก่ 1) ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ต่างชนิดและต่างสายพันธุ์กันโดยทั่วไปจะมีความต้านทานต่อความร้อนต่างกัน เชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจมีคุณสมบัติต้านทานความร้อนได้สูงตามธรรมชาติอยู่แล้วเช่น เชื้อ *Salmonella* Senftenberg 775w สามารถต้านทานความร้อนได้ดีกว่า *Salmonella* ซีโรไทป์อื่น 2) สภาพการเจริญของจุลินทรีย์มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปเซลล์ในระยะ log phase ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนมากกว่าเซลล์ในระยะ stationary phase 3) การปรับตัวของจุลินทรีย์ต่อความร้อน (heat adaptation) มีผลทำให้จุลินทรีย์ต้านทานความร้อนได้ดีขึ้นเช่น เมื่อทำให้เซลล์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จะทำให้เซลล์มีการต้านทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้ดียิ่งขึ้น เช่น ในปี ค. ศ. 1986 Mackey และ Derrick ได้พบว่าเมื่อนำเซลล์ของ *S.* Typhimurium ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ไปบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติ ที่อุณหภูมิ 42°C, 45°C และ 48°C ช่วงระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับสูงขึ้น (55°C) พบว่า *S.* Typhimurium สามารถต้านทานความร้อนได้ดีขึ้นตามอุณหภูมิของการบ่มที่เพิ่มขึ้น การต้านทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิระดับสูงขึ้นนี้เรียกว่า induced thermotolerance 4) การเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์กับผิวของสิ่งใดสิ่งหนึ่งมีผลทำให้จุลินทรีย์สามารถต้านทานต่อความร้อนได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่อยู่อย่างอิสระไม่เกาะกับสิ่งใดเช่น จากการวิจัยของ Humphrey และคณะ ในปี ค. ศ. 1997 พบว่าค่า $D_{58^\circ C}$ ของ *S.* Typhimurium DT104 ที่เกาะติดอยู่กับเนื้อหมูมีค่ามากกว่า 10 นาที ขณะที่ค่า $D_{58^\circ C}$ ของเซลล์อิสระมีค่าเพียง 2 นาที เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dhir และ Dodd ในปี ค. ศ. 1995 พบว่า เซลล์ของ *S.* Enteritidis ที่เกาะอยู่กับผิวของแก้วและโลหะสแตนเลสมีค่า $D_{52^\circ C}$ มากกว่าค่า $D_{52^\circ C}$ ของเซลล์อิสระถึง 2 เท่า ดังนั้นในการทำลาย

จุลินทรีย์ที่ติดอยู่กับผิวของอุปกรณ์ควรคำนึงถึงการใช้ความร้อนที่เหมาะสม และ 5) ลักษณะทางเคมีและกายภาพของอาหารมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์เช่น ถ้ามีการเพิ่มปริมาณของแข็ง ลดปริมาณน้ำ ลดค่า pH โดยการเติมกรดอินทรีย์หรือแม้แต่การเติมกรดอินทรีย์ต่างชนิดกันในอาหารก็มีผลทำให้จุลินทรีย์ต้านทานความร้อนได้ต่างกัน การเติมเกลือหรือน้ำตาลก็มีผลทำให้จุลินทรีย์ทนความร้อนได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การมีสารเคมีบางชนิดในอาหารเช่น แบคเทอริโอซิน สาร EDTA พอลิฟอสเฟต ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส ทำให้แบคทีเรียบางชนิดเช่น *Salmonella* ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนมากขึ้น ดังนั้นในการใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์จึงควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ซึ่งมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคเนื่องจากจุลินทรีย์อาจรอดชีวิตจากกระบวนการแปรรูปอาหารและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้โดยมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเช่น การปรับปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณกรด และค่า water activity (a_w) ของอาหารที่อาจมีผลทำให้จุลินทรีย์ต้านทานความร้อนได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้ถึงวิธีการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทนความร้อน วิธีการหาค่า *D* และค่า *Z*
2. เพื่อเรียนรู้ถึงปัจจัยที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารได้แก่ น้ำนมดิบ
2. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Nutrient Broth (NB) และ Plate Count Agar (PCA)
4. หลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นและสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10 หลอดละ 9 มิลลิลิตร
5. สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
6. หลอดทดลองปราศจากเชื้อ จานเพาะเชื้อ ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร และแท่งแก้วงอ
7. rack สำหรับใส่หลอดทดลอง และ เทอร์โมมิเตอร์
8. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และ อ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 58°C, 64°C, 62.8° C และ 70°C

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทนความร้อน(Thermoduric count / Laboratory pasteurization count) ด้วยวิธี Low-Temperature/Long-Time (LTLT) Pasteurization

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบ 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ (ระวังอย่าให้ตัวอย่างอาหารเกาะที่ข้างหลอดเหนือระดับอาหารเหลวเพราะอาหารที่ติดข้างหลอดอาจอาจได้รับความร้อนไม่ถึงระดับที่ต้องการ) จากนั้นปิดฝาหลอดทดลอง
2. หลังจากที่อุณหภูมิของอ่างน้ำคงที่ 62.8 ± 0.5° C แล้ววาง rack สำหรับใส่หลอดทดลองลงไปในอ่างน้ำ นำหลอดใส่ตัวอย่างอาหารแช่ในอ่างน้ำนี้ ระดับน้ำควรอยู่เหนือระดับของอาหารเหลวประมาณ 4 เซนติเมตรหรือมากกว่า จุ่มเทอร์โมมิเตอร์ลงในหลอดอาหารเพื่อวัดอุณหภูมิ
3. เริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิเข้าใกล้ 62.8°C หรือต่ำกว่าไม่เกิน 0.5°C (อุณหภูมิของตัวอย่างควรขึ้นถึง 62.8°C ภายใน 5 นาที) จับเวลาจนครบ 30 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองออกจากอ่างน้ำนำมาทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิต่ำกว่า 10°C โดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง
4. ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทนความร้อนด้วยวิธี Standard Plate Count โดยเจือจางตัวอย่างอาหารจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} ตรวจนับจำนวนเซลล์โดยเทคนิค spread plate บนอาหาร PCA คว่ำจานแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. นับจำนวนโคโลนีในจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทนความร้อนต่อตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร (Thermoduric count หรือ Laboratory pasteurization count ต่อมิลลิลิตร)

<u>ตอนที่ 2</u> การหา *D* value และ *Z* value

1. ถ่ายเชื้อ *E. coli* ปริมาณ 1 ลูปเต็มจากหลอดอาหาร NA slant ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดเชื้อในอาหาร NB ที่บ่มแล้ว มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตน จากนั้นทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากการล้างครั้งสุดท้าย
2. เติมสารแขวนลอยเซลล์ของ *E. coli* ลงในหลอด suspending media จำนวน 6 หลอด (เขียนข้างหลอดว่า 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 วินาที) หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ให้แต่ละกลุ่มใช้ suspending media เพียง 1 ชนิดซึ่งได้แก่ น้ำกลั่น และสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10 และหาค่า *D* เพียง 1 ระดับอุณหภูมิเท่านั้นจาก 3 ระดับอุณหภูมิคือ 58°C, 64°C และ 70°C) หลอดที่ 1 (หลอดที่เขียนข้างหลอดว่า 0 วินาที) เป็นหลอดที่ไม่ต้องนำไปผ่านความร้อน เก็บหลอดนี้ไว้เพื่อนำไปตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต
3. ตั้งอุณหภูมิของอ่างน้ำร้อนที่ 58°C, 64°C และ 70°C แล้ววาง rack สำหรับใส่หลอดทดลองลงไปในอ่างน้ำร้อน นำหลอดควบคุมอุณหภูมิที่มีสารชนิดเดียวกับสารที่ใช้เป็น suspending

media ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มีเทอร์โมมิเตอร์เสียบอยู่ในหลอดควบคุม) และหลอด suspending media ที่เหลืออีก 5 หลอดซึ่งได้เติมสารแขวนลอยเซลล์ของ *E. coli* แล้ว มาแช่ในอ่างน้ำร้อนพร้อมๆ กัน เมื่ออุณหภูมิในหลอดควบคุมถึงระดับที่ต้องการ เริ่มจับเวลาทันที เมื่อครบ 30 วินาที ยกหลอดที่เขียนว่า 30 วินาที ออกจากอ่างน้ำร้อน ทำให้เย็นทันที แล้วจับเวลาต่อไปเมื่อครบ 60 วินาที ยกหลอดที่เขียนว่า 60 วินาที ออกมาอีก 1 หลอด ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ ไปจนครบ 150 วินาที

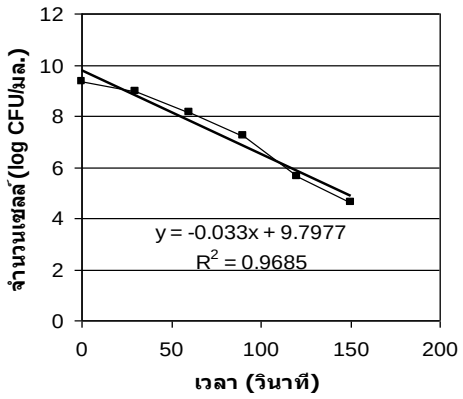
4. ทำการเจือจางเชื้อในหลอดที่ไม่ได้ผ่านความร้อน (หลอดที่เขียนว่า 0 วินาที) และหลอดที่ผ่านการให้ความร้อนที่เวลาต่างกันคือ 30, 60, 90, 120 และ 150 วินาที โดยทำการเจือจางไปเรื่อยๆ ถึงระดับความเจือจางที่คาดว่าจะมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในช่วง 25-250 โคโลนี ปิเปตตัวอย่างในแต่ละหลอดผ่านการเจือจางที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้าย (ตารางที่ 5.1) ลงบนผิวหน้าอาหาร PCA ปริมาตรจานละ 0.1 มิลลิลิตรแล้วเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอที่ปลอดเชื้อ เพื่อตรวจหาจำนวน *E. coli* ที่มีชีวิตในแต่ละหลอดด้วยเทคนิค spread plate

ตารางที่ 5.1 ระดับความเจือจางของตัวอย่างที่จะปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PCA ด้วยเทคนิค spread plate

ระยะเวลาที่ผ่านความร้อน (วินาที)	ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย		
	58°C	64°C	70°C
0	10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}	10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}	10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}
30	10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}	10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}	10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}
60	10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}	10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}	10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}
90	10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}	10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}	10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
120	10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}	10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}
150	10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}

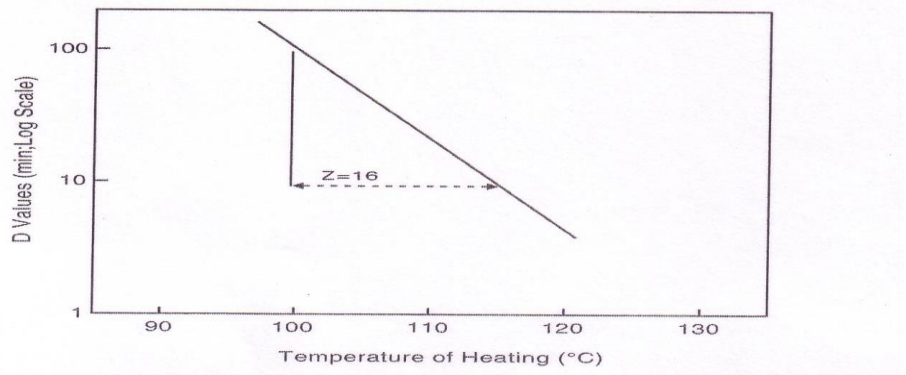
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ในจานที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี
6. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อน (log CFU ต่อมิลลิลิตร) กับเวลา จากนั้นหาสมการเส้นตรงเพื่อนำมาคำนวนหาค่า *D* โดยค่า *D* เท่ากับ -1/slope ให้นักศึกษาแต่ละกลุ่มรายงานผลการคำนวณค่า *D* ใน suspending media ชนิดที่ใช้พร้อมทั้งบอกอุณหภูมิที่ให้ความร้อนด้วย
7. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของค่า *D* กับอุณหภูมิที่ให้ความร้อน (58°C, 64°C และ 70°C) จะได้กราฟการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน (thermal destruction curve, TDC

หรือ thermal death time curve, TDT) และหาสมการเส้นตรง เพื่อคำนวนหาค่า *Z* (*Z* value) โดยค่า *Z* เท่ากับ -1/slope ค่า *Z* ก็คือ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (°C หรือ°F) ที่ทำให้ค่า *D* ลดลง 1 log cycle ค่า *Z* บอกถึงความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ระดับต่างกัน ทำให้สามารถหากระบวนการให้ความร้อนระดับเดียวกันที่ระดับอุณหภูมิของการให้ความร้อนต่างกันได้ เช่น ในการให้ความร้อนจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง คำนวณหาค่า *Z* ได้ 10 °C ชี้ให้เห็นว่า ถ้าค่า *D* ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็น 50 นาที ดังนั้นค่า *D* ที่อุณหภูมิ 110 °C จะเป็น 5 นาที และที่อุณหภูมิ 120°C จะเป็น 0.5 นาที



รูปที่ 5.1 กราฟการอยู่รอดของ *Salmonella* Typhimurium DT104 และการหาค่า *D* ที่อุณหภูมิ 60° ($D_{60°C}$) ในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1: จากภาพ D value เท่ากับ $\frac{-1}{-0.033}$ เท่ากับ 30.3 วินาที

ที่มา: Nanasombat (2001)



รูปที่ 5.2 ตัวอย่างกราฟ Thermal Death Time และการหาค่า *Z*

ที่มา: Ray (2004)

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ.....°C

   เพื่อหาค่า *D* ที่อุณหภูมิ …… °C ของแบคทีเรีย.....

   ชนิดของ suspending media ที่ใช้คือ.....

เชื้อในหลอดที่ 1 (ให้ความร้อน 0 วินาที)

จานที่	จำนวนโคโลนี			จำนวนเซลล์เริ่มต้น (CFU ต่อมิลลิลิตร)
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

เชื้อในหลอดที่ 2 (ให้ความร้อน 30 วินาที)

จานที่	จำนวนโคโลนี			จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร)
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

เชื้อในหลอดที่ 3 (ให้ความร้อน 60 วินาที)

จานที่	จำนวนโคโลนี			จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร)
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

เชื้อในหลอดที่ 4 (ให้ความร้อน 90 วินาที)

จานที่	จำนวนโคโลนี			จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร)
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

เชื้อในหลอดที่ 5 (ให้ความร้อน 120 วินาที)

จานที่	จำนวนโคโลนี			จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร)
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

เชื้อในหลอดที่ 6 (ให้ความร้อน 150 วินาที)

จานที่	จำนวนโคโลนี			จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร)
	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	ระดับความเจือจางที่.....	
1				
2				

3. ผลการคำนวณหาค่า *D* และค่า *Z* ใน suspending media ชนิดต่างๆ

ชนิดของ suspending media	อุณหภูมิ (^{o}C)	*D* value	*Z* value
น้ำกลั่น	58		
	64		
	70		
สารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10	58		
	64		
	70		

คำถามท้ายบท

1. จุลินทรีย์ในกลุ่ม Thermoduric และ Thermophilic ต่างกันอย่างไร มีความสำคัญต่ออาหารอย่างไร และการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มทำได้อย่างไร
2. ค่า Decimal reduction time หมายถึงอะไร และบ่งบอกคุณสมบัติของจุลินทรีย์ในด้านใด
3. จากค่า *D* ที่นักศึกษาหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตกับเวลาที่ให้ความร้อน จงหาว่าจะใช้เวลานานเพียงใดในการให้ความร้อนจนทำให้จำนวนเซลล์ลดลง 12*D*

4. จากข้อมูลการคำนวณหาค่า *D* และ ค่า *Z* จงเปรียบเทียบการใช้ suspending media ต่างชนิดกันที่ใช้ในการทดลองนี้ว่ามีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์อย่างไร

เอกสารอ้างอิง

Banwart, G. J. 1989. Basic Food Microbiology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

Collins-Thompson, D.L., Bunning, V.K. 1992. Thermoduric microorganisms and heat resistance measurements. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 169-238.

Dhir, V.K., Dodd, C.E.R. 1995. Susceptibility of suspended and surface-attached *Salmonella* Enteritidis to biocides and elevated temperature. Applied and Environmental Microbiology. 61: 1731-1738.

Doyle, M.E., Mazzotta, A.S. 2000. Review of studies on the thermal resistance of salmonellae. Journal of Food Protection. 63: 779-795.

Frank, J.F., Christen, G.L., Bullerman, L.B. 1992. Tests for groups of microorganisms. In: Marshall, R.T. (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D C.

Humphrey, T. J., Wilde, S. J., Rowbury, R. J. 1997. Heat tolerance of *Salmonella typhimurium* DT104 isolates attached to muscle tissue. Letters in Applied Microbiology. 25: 265-268.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.

McLandsborough, L. 2005. Food Microbiology Laboratory. CRC Press, USA.

Nanasombat, S. 2001. Heat Adaptation Induced Cross-Protection Against Osmotic Stress in *Salmonella* Typhimurium DT104 and its Survival in Dried Foods. Ph. D. Thesis. The University of Georgia, USA.

Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology, 3rd ed. CRC Press, New York.

Mackey, B. M., Derrick, C. M. 1987. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. Journal of Applied Bacteriology 61: 389-393.

บทปฏิบัติการที่ 6
การศึกษาการเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์

การผลิตอาหารกระป๋องเป็นการใช้ความร้อนสูงในระดับสเตอริไลซ์ (อุณหภูมิสูงกว่า 100°C ภายใต้ความดัน) เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญเช่น จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียให้หมดไป การที่จะให้ความร้อนสูงระยะเวลานานเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของอาหาร สำหรับการให้ความร้อนอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ (low-acid foods, pH $\geq$ 4.6) มีจุดประสงค์เพื่อทำลายสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทนความร้อนได้สูงสุดเพื่อที่อาหารจะปราศจากจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดใดๆ ในการที่จะให้ความร้อนกับอาหารมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร ปริมาณสปอร์ในอาหาร ค่าพีเอชของอาหาร สภาวะในการเก็บรักษา และปัจจัยอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น ผักกระป๋องที่มีกรดต่ำและเนื้อกระป๋องที่ไม่ได้เติมเกลือต้องผ่านความร้อนถึง 12*D* (12*D* process) หรือ botulinum cook ซึ่งหมายถึงการให้ความร้อนเป็นระยะเวลานานพอที่จะลดปริมาณสปอร์ของ *C. botulinum* ลง 12 log cycle สปอร์ของ *C. botulinum* เป็นสปอร์ที่สามารถงอกได้ที่อุณหภูมิ 43°C หรือสูงกว่า (thermophilic spore) หลังจากสปอร์งอกอาจเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 30°C

อย่างไรก็ตาม สปอร์ของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียบางชนิดซึ่งสามารถต้านทานความร้อนได้สูงกว่าสปอร์ของ *C. botulinum* อาจรอดชีวิตได้หลังผ่านความร้อนสูงซึ่งถ้าหากจะทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงนี้ ต้องเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการทำลายเชื้อในอาหารกระป๋องให้สูงขึ้น การทำเช่นนี้จะทำให้คุณภาพทางโภชนาการและลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก ดังนั้นจึงพยายามที่จะถนอมลักษณะดังกล่าวโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมากภายในระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย การทำลายจุลินทรีย์ในลักษณะเช่นนี้เรียกว่า commercial sterility หรือการทำให้ปลอดเชื้อทางการค้าซึ่งหมายถึงการใช้ความร้อนในการทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถเจริญได้ในอาหารภายใต้สภาพปกติซึ่งไม่ได้แช่เย็น ซึ่งสภาพของการให้ความร้อนเช่นนี้จะทำให้มีจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเหลืออยู่น้อยมาก ตัวอย่างเช่น อาจมีสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้สูงซึ่งไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรคเหลือรอด สปอร์ที่รอดชีวิตนี้จะเจริญได้ก็ต่อเมื่อเก็บอาหารกระป๋องไว้ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นสิ่งสำคัญ 2 ประการที่ควรทำในการป้องกันการเน่าเสียของอาหารกระป๋องก็คือ ต้องให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่ำที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ก่อนที่จะผ่านกระบวนการผลิตและต้องเก็บอาหารกระป๋องไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C เพราะสปอร์ที่ทนอุณหภูมิสูงในการฆ่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง

สำหรับการผลิตอาหารกระป๋องประเภทที่มีกรดสูงซึ่งมี pH ต่ำกว่า 4.6 จะให้ความร้อนเพื่อทำลายเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดและสปอร์บางชนิด ถึงแม้ว่าค่า pH ที่ต่ำจะยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของ *C. botulinum* ได้ แต่สปอร์ของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียบางชนิดซึ่งเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติและทนกรดได้ดีจะสามารถงอก และเจริญได้ถ้าเก็บอาหารนั้นไว้ที่อุณหภูมิสูงแม้เพียงระยะเวลาสั้นก็ตาม ส่วนสปอร์ของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางซึ่งทนความร้อนสูงได้ดีก็สามารถรอดชีวิตจากการให้ความร้อนอาหารที่มีกรดสูงได้เช่นกัน แต่ไม่สามารถงอกได้ที่ระดับพีเอชต่ำ ในกรณีของอาหารเนื้อกระป๋องที่เติมเกลือหรืออาหารที่ลดค่า a_w หรือเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น การทำลายจุลินทรีย์สามารถใช้ความร้อนในระดับต่ำลงได้

โดยทั่วไป การเสียของอาหารกระป๋องเกิดขึ้นไม่บ่อยนัก แต่ถ้ามีการเสียเกิดขึ้นจะต้องมีการตรวจสอบอย่างเหมาะสม ถ้ามีการบวมของกระป๋องเกิดขึ้นก็มักจะบ่งบอกถึงการเสียของอาหารภายในกระป๋อง ในระหว่างการเสียของอาหาร กระป๋องอาจเปลี่ยนรูปจากลักษณะปกติไปเป็นลักษณะกระทบโป่ง (flipper หรือ springer) ลักษณะ soft swell หรือลักษณะ hard swell อย่างไรก็ตาม การเสียของอาหารอาจไม่ใช่สาเหตุเดียวที่ทำให้กระป๋องมีลักษณะผิดปกติ การบรรจุอาหารมากเกินไปในกระป๋อง (overfilling) การบุบของกระป๋องจากแรงกระทบ (denting) และการปิดฝากระป๋องขณะเย็นก็อาจเป็นสาเหตุให้กระป๋องเกิดลักษณะที่ผิดปกติได้เช่นกัน การเสียโดยการกระทำของจุลินทรีย์และแก๊สไฮโดรเจนซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของกรดในอาหารกับโลหะจากตัวกระป๋อง อาจเป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำให้กระป๋องบวม นอกจากนี้การเก็บอาหารกระป๋องไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงโดยเฉพาะในฤดูร้อนก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยเพิ่มการบวมของกระป๋อง อย่างไรก็ตาม มีจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สร้างแก๊สเจริญในอาหารกระป๋องและทำให้อาหารเสียโดยไม่เกิดลักษณะผิดปกติของกระป๋อง

การเสียของอาหารกระป๋อง

การเสียของอาหารกระป๋อง ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการกระทำของจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ทนความร้อนเกือบทั้งหมด แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารมี 2 สกุลได้แก่ *Clostridium* และ *Bacillus* สำหรับ *Clostridium* มีทั้งชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (strict anaerobes) และชนิดที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) แต่ชอบเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศมากกว่า ส่วนพวก *Bacillus* มีตั้งแต่ชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobes) ไปจนถึงพวกที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ การเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์มาจากสาเหตุที่สำคัญ 3 ประการได้แก่ 1) การทำให้เย็นไม่เพียงพอหรือเก็บอาหารไว้ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง 2) ให้ความร้อนไม่เพียงพอเป็นผลให้จุลินทรีย์ชนิดที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางอยู่รอดและเจริญ

ได้และ 3) การรั่วของกระป๋อง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอก การเสียของอาหารกระป๋องมีหลายประเภทได้แก่

1. การเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์สร้างสปอร์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic sporeformers)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการเสีย 3 ประเภทของอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำเช่นข้าวโพด ถั่ว เนื้อสัตว์ เมื่อเก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมเช่น ที่อุณหภูมิ 43°C แม้แต่ในระยะเวลาสั้น

1.1 Flat Sour Spoilage

กระป๋องไม่บวม แต่อาหารภายในกระป๋องเป็นกรดมากขึ้นเนื่องจากเกิดการงอกของสปอร์และการเจริญของเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ การงอกของสปอร์เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 43°C หรือสูงกว่า แต่การเจริญเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่า (30°C หรือสูงกว่า) เชื้อชนิดนี้หมักคาร์โบไฮเดรต ให้กรดแต่ไม่ให้แก๊สและทำให้มีกลิ่นรสผิดปกติ

1.2 Thermophilic Anaerobic (T.A.) Spoilage

การเสียแบบนี้ มีสาเหตุมาจากการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ เช่น *Clostridium thermosaccharolyticum* เชื้อชนิดนี้สร้างแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณมาก ทำให้กระป๋องบวม มีกลิ่นเปรี้ยวและกลิ่นเหมือนเนยแข็ง (sour and cheesy odor)

1.3 Sulfide Stinker Spoilage

การเสียประเภทนี้ มีสาเหตุมาจากการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญคือ *Desulfotomaculum nigrificans* กระป๋องไม่บวม แต่อาหารภายในจะมีสีเข้มดำขึ้นและมีกลิ่นไข่เน่าเนื่องจากแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างขึ้น แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งสร้างขึ้นจากกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์จะละลายในของเหลว และทำปฏิกิริยากับเหล็กเกิดสีดำของเหล็กซัลไฟด์ ทั้งการงอกของสปอร์และการเจริญจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 43°C หรือสูงกว่า

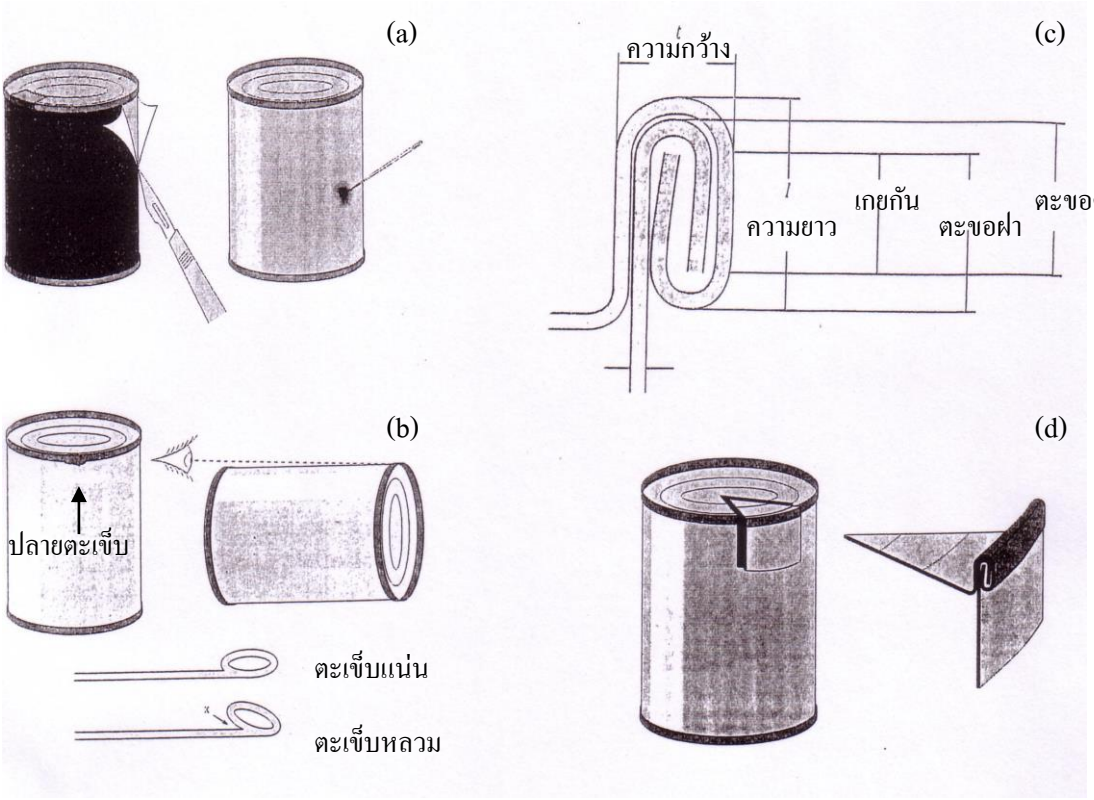
2. การเสียของอาหารกระป๋องเนื่องจากให้ความร้อนไม่เพียงพอ (underprocessing)

การให้ความร้อนไม่เพียงพอในการทำลายจุลินทรีย์ อาจมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดในการทำงานของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อเนื่องจากความผิดปกติในการทำงานของเทอร์โมมิเตอร์ และอุปกรณ์สำหรับควบคุมอื่นๆ การให้ความร้อนไม่เพียงพออาจเป็นสาเหตุทำให้สปอร์ของ *Clostridium* และ *Bacillus* บางชนิดอยู่รอด งอก เจริญและเป็นสาเหตุการเสียของอาหารในเวลาต่อมา *C. botulinum* เป็นแบคทีเรียชนิดที่มีความสำคัญมากที่สุดซึ่งจะเจริญและสร้างสารพิษอันตราย การเน่าเสียของอาหารโดยเชื้อ *C. botulinum* เกิดขึ้นจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน *C. butyricum* และ *C. pasteurianum* ก็สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดระเหย แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสาเหตุทำให้กระป๋องบวมได้เช่นกัน *C. sporogenes*, *C. putrefacience* และ *C. botulinum* สามารถย่อยสลายโปรตีนให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมอแคปแทน (mercaptans) อินโดล

(indole) สคาโทล (skatole) แอมโมเนีย แก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสาเหตุการบวมของกระป๋อง สำหรับสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ชอบเจริญในสภาพไม่มีอากาศซึ่งอยู่รอดจะไม่เจริญในกระป๋อง แต่ถ้าเป็นสปอร์ของ *Bacillus* spp. ชนิดที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศจะเจริญได้ในกระป๋อง สร้างกรดและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เช่น *B. subtilis* และ *B. coagulans* นอกจากนี้การมีอาหารเสียในกระป๋องโดยไม่พบจุลินทรีย์มีชีวิต อาจเป็นเพราะการเสียของอาหารเกิดขึ้นก่อนการให้ความร้อนหรือเชื้อตายในระหว่างเก็บรักษา

3. การเสียของอาหารกระป๋องเนื่องจากกระป๋องรั่ว

การรั่วของกระป๋องเกิดจากตำหนิที่ตัวกระป๋องและรูที่เกิดจากการทิ่มแทงด้วยวัตถุในระหว่างการขนส่ง จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำที่ใช้ทำให้เย็นอาจเข้าสู่ภายในกระป๋องทางรูเล็ก ๆ ที่ตัวกระป๋องหรือทางตะเข็บกระป๋องที่ไม่ดี (รูปที่ 6.1 และ 6.2)

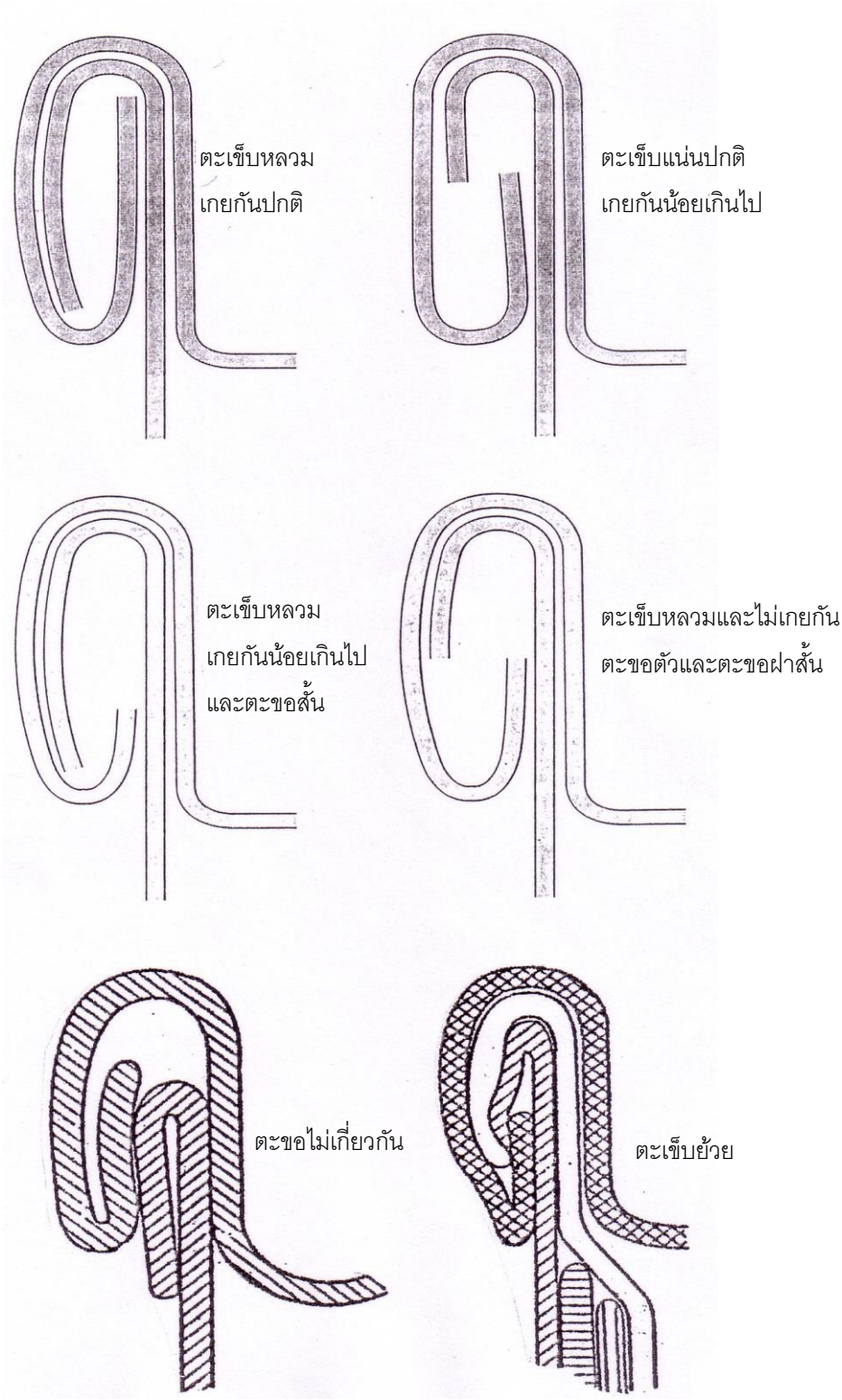


รูปที่ 6.1 การตรวจสอบกระป๋องขั้นต้น

(a) รอยสนิมและรูรั่ว (b) ลักษณะปรากฏของตะเข็บกระป๋อง

(c) ส่วนต่างๆ ของตะเข็บกระป๋อง (d) ภาพตัดของตะเข็บกระป๋อง

ที่มา: Roberts และคณะ (1995)



รูปที่ 6.2 ตะเข็บกระป๋องที่ผิดปกติ

ที่มา: Roberts และคณะ (1995); รัตนา (2529)

การพบแบคทีเรียหลายชนิดจากสิ่งแวดล้อมทั้งรูปร่างท่อน และรูปร่างกลมชี้ให้เห็นถึงการรั่วของกระป๋อง จุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารกระป๋องอาจเป็นสาเหตุการเสียของอาหารได้หลายแบบซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์โดยเฉพาะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้อาหารนั้นไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ในการสุ่มตัวอย่างอาหารกระป๋องมาตรวจสอบการเสียโดยจุลินทรีย์ ควรสุ่มตัวอย่างมามากพอที่จะให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ แต่เมื่อทราบถึงสาเหตุการเสียที่แน่นอนแล้ว การเพาะเลี้ยงเชื้อจากอาหารกระป๋องจำนวน 4-6 กระป๋องก็เพียงพอ แต่ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อจากอาหารกระป๋องมากถึง 10-50 กระป๋องก่อนที่จะค้นพบสาเหตุการเสียของอาหารได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้ถึงลักษณะการเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์
2. เพื่อเรียนรู้การตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋อง

อุปกรณ์

1. อาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำและอาหารกระป๋องที่มีกรดสูงได้แก่ ข้าวโพดกระป๋อง ถั่วกระป๋อง มะเขือเทศกระป๋อง สับปะรดกระป๋อง เงาะกระป๋อง น้ำสับปะรดกระป๋อง และอื่นๆ
2. แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus sterothermophilus*, *Bacillus coagulans, Clostridium sporogenes*, *Clostridium thermosaccharolyticum* และ *Escherichia coli*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Bromcresol Purple Dextrose Broth (BCP), Cooked Meat Medium (CMM), Nutrient Agar (NA), Acid Broth (AB) และ Malt Extract Broth (MEB)
4. สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95
5. สีย้อมและสารเคมีชนิดต่าง ๆ สำหรับย้อมแกรมและย้อมสปอร์
6. อุปกรณ์ชนิดต่างๆที่จำเป็นได้แก่ อุปกรณ์สำหรับเปิดกระป๋อง เครื่องมือวัดความดันหรือเครื่องมือวัดสุญญากาศ (pressure guage หรือ vacuum guage) และกล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ต่อการเสียของอาหารกระป๋อง

<u>สัปดาห์ที่ 1</u> การเตรียมอาหารกระป๋องสำหรับเติมเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

1. ล้างกระป๋องด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วเช็ดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เปิดฝากระป๋องข้าวโพดหรือถั่วในน้ำเกลือด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยเจาะรูที่ฝากระป๋องด้วยที่เปิดกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. เทน้ำเกลือในกระป๋องเล็กน้อยลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อเพื่อให้เกิดที่ว่างของอากาศใต้ฝากระป๋อง
3. ถ่ายเชื้อ *B. sterothermophilus*, *B. coagulans*, *C. sporogenes*, *C. thermosaccharolyticum* และ *E. coli* ลงในข้าวโพดหรือถั่วกระป๋องจำนวน 5 กระป๋อง 1 กระป๋องต่อ 1 เชื้อ
4. ปิดรูบนกระป๋องด้วยโลหะหลอม จากนั้นบรรจุแต่ละกระป๋องลงในถุงพลาสติกซ้อนกัน 2 ใบ รัดปากถุงให้แน่นด้วยยาง
5. นำกระป๋องทั้ง 5 ใบไปบ่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้

   - กระป๋องที่เติมเชื้อ *C. thermosaccharolyticum* และ *B. sterothermophilus* บ่มที่ 55°C
   - กระป๋องที่เติมเชื้อ *C. sporogenes* และ *B. coagulans* บ่มที่อุณหภูมิ 37°C
   - กระป๋องที่เติมเชื้อ *E. coli* บ่มที่อุณหภูมิ 37°C

   หมายเหตุ: ถ้ากระป๋องเริ่มบวมในระหว่างบ่ม ควรนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

สัปดาห์ที่ 2 การศึกษาการเสียของอาหารในกระป๋องที่เติมเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

1. สังเกตลักษณะของกระป๋อง แล้วเปิดกระป๋องอย่างระมัดระวังโดยใช้อุปกรณ์สำหรับเปิดกระป๋องที่ปราศจากเชื้อ ถ้ากระป๋องบวมในระหว่างการเปิดกระป๋อง ให้ถือกรวยพลาสติกในลักษณะคว่ำไว้ด้านบนของกระป๋องเพื่อป้องกันของเหลวหรืออาหารในกระป๋องที่จะพุ่งออกมา สังเกตลักษณะของอาหารที่เสีย การเกิดแก๊ส ดมกลิ่นของอาหารและบันทึกผล
2. เทของเหลวในกระป๋องลงในบีกเกอร์ ปิดบีกเกอร์ด้วยฝาจานเพาะเชื้อ เก็บไว้ใช้เตรียมสไลด์
3. ใช้ลูปที่ปลอดเชื้อแตะของเหลวจากอาหารกระป๋องมาเกลี่ยเป็นฟิล์มบางๆ บนสไลด์ ทำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ย้อมแกรมและย้อมสปอร์ตามวิธีการในภาคผนวก ค แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า วาดภาพเซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์ที่เห็น

ตอนที่ 2 การตรวจสอบการเน่าเสียของอาหารกระป๋องที่สุ่มตัวอย่างมาจากตลาด

ก) การเตรียมกระป๋องที่จะตรวจสอบการเน่าเสีย

เก็บตัวอย่างอาหารกระป๋องเก่าชนิดที่มีกรดต่ำ (pH > 4.6) และชนิดที่มีกรด (pH < 4.6) ชนิดละ 1 กระป๋อง บันทึกรายละเอียดเช่น ชนิดของอาหาร วันเดือนปีที่ผลิต รหัสของกระป๋อง วัดขนาดของกระป๋อง โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงของกระป๋อง (หน่วยวัดเป็นนิ้ว) ดึงฉลากออก

ตรวจสอบลักษณะภายนอกของกระป๋อง สังเกตลักษณะผิดปกติของกระป๋องได้แก่ รอยบุบ รอยสนิม รอยกัดกร่อน รูเล็กๆ หรือรอยรั่ว ถ้าหากกระป๋องบวม บันทึกลักษณะการบวม จำแนกแต่ละกระป๋องตามลักษณะผิดปกติที่อาจพบได้แก่

- Flat หมายถึงลักษณะของกระป๋องที่ฝากระป๋องทั้งสองด้านโค้งเข้าด้านใน แบนหรือเว้า
- Flipper หมายถึงลักษณะกระทบโป่งซึ่งเกิดจากกระป๋องมีสุญญากาศน้อยทำให้ก้นและฝาโป่งออกได้ง่ายเมื่อมีแรงมากระทบด้านข้าง เมื่อกระทบด้านหนึ่งอีกด้านหนึ่งจะโป่งออก

- Springer หมายถึงลักษณะของกระป๋องซึ่งฝาด้านหนึ่งโป่งออกอย่างถาวร เมื่อใช้แรงกดลงไปที่ฝาด้านที่โป่งออกนี้ ฝาด้านนี้จะบุบลงไปด้านใน แต่ฝาอีกด้านหนึ่งจะโป่งออก
- Soft swell หมายถึงลักษณะของกระป๋องที่ฝาทั้งสองด้านโป่งออกแต่ยังสามารถรับแรงกดดันขนาดปานกลางได้
- Hard swell หมายถึงลักษณะของกระป๋องที่ฝาทั้งสองด้านโป่งออกและไม่สามารถรับแรงกดดันได้ การบวมที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะทำให้กระป๋องเสียรูปร่างไปเลย เรียกลักษณะของกระป๋องที่บวมจนเสียรูปร่างนี้ว่า บัคเคิล (buckle)

ข) <u>การถ่ายอาหารออกจากกระป๋องเพื่อการตรวจสอบ</u>

วัดความดันหรือสุญญากาศภายในกระป๋องโดยใช้เครื่องมือวัดความดันหรือเครื่องมือวัดสุญญากาศภายในกระป๋อง ชั่งน้ำหนักทั้งหมดของอาหารกระป๋อง (total weight) จากนั้นเปิดกระป๋องด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในสภาพแวดล้อมที่ปราศจากเชื้อเท่าที่จะเป็นไปได้เช่น ในตู้ปลอดเชื้อ (vertical laminar air flow) ถ่ายอาหารทั้งหมดออกจากกระป๋องลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ แยกของเหลวและเนื้ออาหารออกจากกันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ชั่งน้ำหนักเนื้ออาหารไม่รวมของเหลว (drained weight) จากนั้นปิเปตของเหลวใส่บีกเกอร์เพื่อนำไปวัด pH ด้วยเครื่องวัดพีเอช (อย่าใช้กระดาษวัดพีเอช) และเพื่อการตรวจเชื้อในขั้นต่อไป บันทึกลักษณะปรากฏ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อสัมผัสและคุณภาพของอาหารโดยรวม (ห้ามชิมอาหารโดยเด็ดขาด) นำอาหารที่เหลือไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เก็บไว้ในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์ซ้ำ สังเกตลักษณะภายในและภายนอกของกระป๋องเช่น บันทึกลักษณะการรั่ว ความผิดปกติของตะเข็บกระป๋อง การกัดกร่อนในกระป๋อง ชั่งน้ำหนักกระป๋องเปล่าและคำนวณหาน้ำหนักสุทธิ (net weight) และร้อยละของน้ำหนักเนื้ออาหารไม่รวมของเหลว ตามสูตรดังนี้

$$\text{น้ำหนักสุทธิ} = \text{น้ำหนักทั้งหมด} - \text{น้ำหนักกระป๋องเปล่า}$$

$$\text{น้ำหนักเนื้ออาหารไม่รวมของเหลว (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักเนื้ออาหาร}}{\text{น้ำหนักสุทธิ}} \times 100$$

ค) <u>การตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ (low-acid food, pH > 4.6)</u>

1 ถ่ายของเหลวหรือส่วนของของเหลวและอาหารในกระป๋อง 1-2 มิลลิลิตร หรืออาหารแข็ง 1-2 กรัมลงในอาหาร Cooked Meat Medium (CMM) จำนวน 4 หลอดที่ผ่านการต้มไล่อากาศแล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็วถึงอุณหภูมิห้องและอาหาร Bromcresol Purple Dextrose Broth (BCP) อีก 4 หลอด นำอาหาร CMM 2 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 96-120 ชั่วโมงและอีก 2

หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ส่วนอาหาร BCP 2 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 96-120 ชั่วโมงและอีก 2 หลอดนำไปบ่มที่ 55°C 24-48 ชั่วโมง

2. ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในหลอดอาหาร BCP และอาหาร CMM ทุก ๆ 24 ชั่วโมงจนครบเวลาการบ่ม ถ้าไม่พบการเจริญในหลอดใดเลยให้รายงานผลว่าไม่พบ แต่ถ้ามีการเจริญให้เขี่ยเชื้อจากหลอดที่มีการเจริญแต่ละหลอดลากลงบนอาหาร NA จำนวน 2 จาน นำจานหนึ่งไปบ่มในสภาพมีอากาศและส่วนอีกจานหนึ่งบ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิระดับเดียวกับหลอดเริ่มต้น (35°C หรือ 55°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบ่มอาหาร CMM หลอดเดิมต่อไปอีก 5 วันที่อุณหภูมิ 35°C เพื่อการตรวจหาสารพิษ ถ้าพบโคโลนีลักษณะต่างกันบนจานอาหาร NA เขี่ยเชื้อจากโคโลนีลักษณะต่างๆนั้นถ่ายลงในอาหาร CMM แล้วนำไปบ่ม (ตามแผนภูมิในตารางที่ 6.1) พร้อมทั้งถ่ายเชื้อลงในหลอด NA slant ด้วยบ่มจนเชื้อเจริญ จากนั้นเขี่ยเชื้อจากหลอด NA slant ไปย้อมแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า สังเกตรูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีของเซลล์ วาดรูปเซลล์ที่เห็น

ตารางที่ 6.1 แผนภูมิการเพาะเชื้อจากอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ

หลอดอาหารเริ่มต้น	การถ่ายเชื้อ	เชื้อบริสุทธิ์	การศึกษาคุณลักษณะ
CMM และ BCP 35°C	ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพมีอากาศ 35°C → growth	- ลากบน NA slant → ย้อมแกรม - ถ่ายเชื้อลง CMM (บ่ม 35°C) → ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพไร้อากาศ 35°C	
	ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพไร้อากาศ 35°C → growth	-ถ่ายเชื้อลง CMM → ย้อมแกรม	- -ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพมีอากาศ 35°C
CMM และ BCP 55°C	ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพมีอากาศ 55°C → growth	- ลากบน NA slant → ย้อมแกรม - ถ่ายเชื้อลง CMM (บ่ม 55°C) → ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพไร้อากาศ 55°C	
	ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพไร้อากาศ 55°C → growth	-ถ่ายเชื้อลง CMM → ย้อมแกรม	ถ่ายลง NA plate บ่มสภาพมีอากาศ 55°C

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

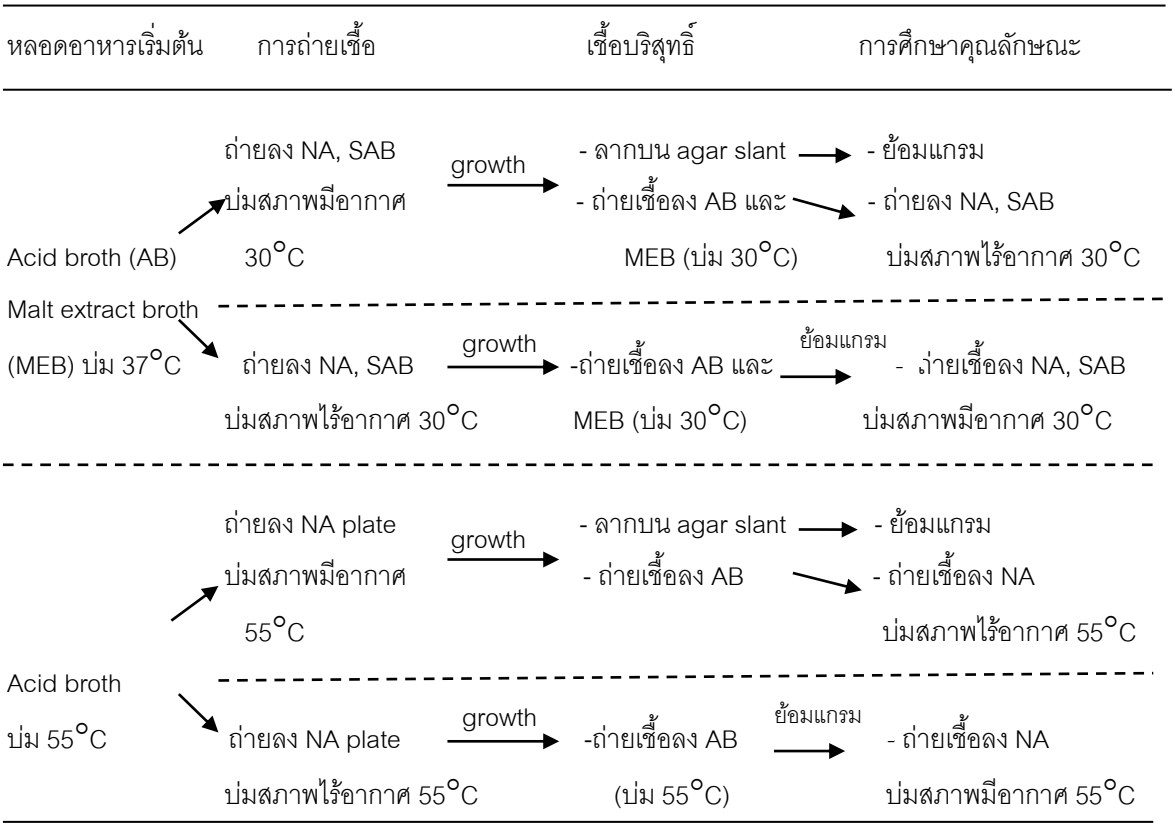
หมายเหตุ: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

3. ถ้าพบเชื้อหลายชนิดจากอาหาร BCP ให้บันทึกลักษณะเซลล์ ถ้าพบแบคทีเรียรูปท่อนในอาหาร CMM ซึ่งพบเชื้อหลายชนิดปะปนกัน ให้ทดสอบการสร้างสารพิษในอาหาร CMM ตามวิธีการของ Landry และคณะ (2001) แต่ถ้าพบแบคทีเรียแกรมบวกหรือแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Bacillus* หรือ *Clostridium* เท่านั้น ไม่มีแบคทีเรียลักษณะอื่น ให้ตรวจหาว่าแบคทีเรียนั้นสร้างสปอร์หรือไม่ ในบางกรณีเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกที่แก่อาจย้อมติดสีแกรมลบ ควรทดสอบการสร้างสารพิษของเชื้อด้วย

ง) <u>การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่มีกรด (acid food, pH ≤ 4.6)</u>

1. ถ่ายอาหารจากกระป๋อง 1-2 มิลลิลิตรหรือ 1-2 กรัมลงในอาหาร Acid Broth (AB) จำนวน 4 หลอดและอาหาร Malt Extract Broth (MEB) จำนวน 2 หลอด นำหลอดอาหาร AB 2 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมงและอีก 2 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนอาหาร MEB 2 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 6.2 แผนภูมิการเพาะเชื้อจากอาหารกระป๋องที่มีกรด



SAB, Sabouraud's dextrose agar

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

2. หลังจากบ่มครบเวลา บันทึกผลในแต่ละหลอดว่ามีการเจริญหรือไม่ สำหรับหลอดที่มีการเจริญ ให้แยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เขี่ยเชื้อมาเกลี่ยเป็นฟิล์มบางๆ บนสไลด์เพื่อการย้อมแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า สังเกตรูปร่างการเรียงตัว การติดสีของเซลล์และสปอร์ บันทึกผล พร้อมทั้งวาดรูปเซลล์ที่เห็น ทำการแยกเชื้อต่อไปตามแผนภูมิในตารางที่ 6.2

<u>การแปลผลการตรวจสอบ</u>

1. ถ้าตรวจพบแบคทีเรียเฉพาะประเภทที่สร้างสปอร์ได้ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 35°C ในอาหารกระป๋องที่มีตะเข็บปกติดีไม่รั่วชี้ให้เห็นว่าอาหารกระป๋องนั้นผ่านความร้อนไม่เพียงพอ (underprocessing) เนื่องจากจุลินทรีย์ภายนอกไม่สามารถเข้าไปภายในกระป๋องได้ แต่ถ้าพบการเจริญและการสร้างแก๊สของจุลินทรีย์จากอาหารกระป๋องในอาหาร CMM ที่อุณหภูมิ 55°C และเกิดกลิ่นเนยแข็งชี้ให้เห็นว่าอาหารกระป๋องนั้นเสียโดยจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง และไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (thermophilic anaerobes) เช่น *C. thermobutylicum* สำหรับการเจริญในอาหาร CMM ที่อุณหภูมิ 35°C ซึ่งมีการสร้างแก๊สและเกิดกลิ่นเหม็นเน่า แสดงว่าอาจมีแบคทีเรีย *Clostridium* รูปท่อนสร้างสปอร์ ควรตรวจสอบการสร้าง botulinal toxin ในอาหาร CMM ที่เชื้อเจริญด้วยถึงแม้ว่าจะไม่พบสารพิษในอาหารก็ตามเพราะการมีสปอร์ที่มีชีวิตของ *C. botulinum* ชี้ให้เห็นถึงอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นกับผู้บริโภค ดังนั้นควรเรียกคืนอาหารกระป๋องทั้งหมดที่มีรหัสเดียวกัน สำหรับการสร้างกรดของเชื้อจากอาหารกระป๋องที่มีกรดสูงหรือกรดต่ำในอาหาร BCP ที่อุณหภูมิ 35°C และ/หรือ 55°C ชี้ให้เห็นถึงการเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางได้แก่ เชื้อ *Bacillus thermoacidurans* หรือ *B. coagulans* และ/หรือจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงเช่น *B. sterothermophilus* ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียแบบ flat-sour แต่ถ้าอาหารจากกระป๋องทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นตั้งแต่เริ่มต้น กรณีนี้จะไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด การมีเชื้อเจริญหรือไม่นั้นต้องตรวจสอบโดยการถ่ายเชื้อใส่หลอดอาหารใหม่
2. การเน่าเสียของอาหารที่เป็นกรดมักมีสาเหตุมาจาก lactobacilli และยีสต์ อาหารกระป๋องส่วนใหญ่ที่มีจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงจะไม่เจริญที่อุณหภูมิของการเก็บรักษาตามปกติแต่จะเจริญและทำให้อาหารเสียเมื่อเก็บอาหารกระป๋องนั้นไว้ที่อุณหภูมิสูง (50-55°C) แบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงได้แก่ *B. thermoacidurans* และ *B. sterothermophilus* ทำให้อาหารกระป๋องที่มีกรดสูงและกรดต่ำเสียแบบ flat-sour เช่นการเสียของมะเขือเทศและน้ำมะเขือเทศ กระป๋องจะไม่บวมแต่อาหารจะมีกลิ่นผิดปกติ จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเสียเป็นพวกที่ต้องการอากาศ สร้างสปอร์ได้ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางหรืออุณหภูมิสูง สำหรับการเสียของมะเขือเทศ ลูกแพร์ ผลมะเดื่อและสับปะรดที่มีสาเหตุจาก *C. pasteurianum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้และไม่ต้องการอากาศในการเจริญ จะทำให้เกิดแก๊สและกลิ่นกรดบิวทิริกในอาหารที่เสีย

ส่วนเชื้อ *C. thermosaccharolyticum* ซึ่งไม่ต้องการอากาศในการเจริญเป็นสาเหตุทำให้กระป๋องบวมและทำให้อาหารมีกลิ่นเนยแข็ง ส่วนอาหารกระป๋องที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนมักพบแบคทีเรียทั้งพวกที่สร้างสปอร์และพวกที่ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะการเสียคล้ายกับการเสียของอาหารในกระป๋องที่รั่ว

3. การพบแบคทีเรียรูปท่อนและรูปกลมปะปนกัน ชี้ให้เห็นถึงการรั่วของกระป๋องหรือกระป๋องอาจจะไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ส่วนใหญ่กระป๋องจะบวม
4. การที่พบว่าอาหารภายในกระป๋องมีค่าพีเอช กลิ่น และลักษณะปรากฏผิดปกติ คาดว่าน่าจะมีจุลินทรีย์จำนวนมากเจริญในอาหาร แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรากฏว่าไม่มีเชื้อใดเจริญเลย ลักษณะเช่นนี้บ่งบอกถึงการเสียของอาหารก่อนที่จะนำมาบรรจุกระป๋อง
5. ถ้าไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่บวม การบวมอาจเนื่องมาจากการเกิดแก๊สไฮโดรเจนโดยปฏิกิริยาเคมีของอาหารกับโลหะภายในกระป๋อง ปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นผันแปรขึ้นอยู่กับระยะเวลาและสภาพในการเก็บรักษา จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงซึ่งไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (thermophilic anaerobe) จะสร้างแก๊ส และลักษณะการเสียของอาหารอาจคล้ายกับการเสียของอาหารโดยจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงที่ทำให้เกิดการบวมของกระป๋องอันเนื่องมาจากการสร้างแก๊สไฮโดรเจน การย่อยสลายของอาหารทางเคมีอาจเป็นผลให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น สภาพนี้พบได้ในอาหารเข้มข้นที่มีน้ำตาลและกรดเช่น ซอสมะเขือเทศ กากน้ำตาล เนื้อบด และผลไม้ที่มีน้ำตาลสูง ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วขึ้นถ้าเก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิสูง
6. ถ้าแยกเชื้อได้จากกระป๋องที่มีสภาพปกติซึ่งมีสภาพสุญญากาศเหมาะสม แต่ตรวจไม่พบเชื้อจากการนำอาหารมาเกลี่ยเป็นฟิล์มบาง ๆ โดยตรงบนสไลด์แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อจากการปนเปื้อนในขณะปฏิบัติการ เพื่อการยืนยันให้เจาะรูที่กระป๋องของอาหารกระป๋องอื่นที่ไม่เสียแล้วถ่ายเชื้อที่เจริญนี้ลงไป ปิดรูบนกระป๋อง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วัน ถ้ามีการบวมของกระป๋องหรืออาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าเชื้อนี้อาจไม่ได้มาจากอาหารในกระป๋องเริ่มต้น แต่ถ้ากระป๋องยังคงไม่บวม ให้เปิดกระป๋องด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C และ 55°C ด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้างต้น ถ้าเชื้อเจริญแต่อาหารยังมีสภาพปกติไม่เน่าเสียแสดงว่า อาหารกระป๋องนั้นผ่านการฆ่าเชื้อในสภาพที่ทำให้ปลอดเชื้อทางการค้า (commercial sterile) เนื่องจากยังคงมีเชื้อที่รอดชีวิตแต่ไม่เจริญในสภาพการเก็บรักษาปกติ

ตารางที่ 6.3 การจำแนกชนิดของอาหารตามค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร

อาหารที่มีกรดต่ำ (low- acid foods, pH > 4.6)	อาหารที่มีกรด (acid foods, pH ≤ 4.6)
เนื้อสัตว์	มะเขือเทศ
อาหารทะเล	สับปะรด มะม่วง
น้ำนม	ผลไม้ตระกูลส้ม
อาหารเนื้อผสมผัก	ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวเช่น สตรอเบอรี่ เชอรี่ และอื่นๆ
สปาเก็ตตี้	กระหล่ำปลีดอง (sauerkraut)
ผักเช่น ข้าวโพด ถั่ว หน่อไม้ฝรั่ง ฟักทอง	ผักดองชนิดต่างๆ

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

ตารางที่ 6.4 จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียที่เป็นสาเหตุของการเกิดกรดสูงและกรดต่ำในผักและผลไม้

ชนิดของการเน่าเสีย	pH	ตัวอย่างอาหาร
Thermophilic		
Flat-sour	≥ 5.3	ข้าวโพด ถั่ว
Thermophilic[(a)]	≥ 4.8	ผักโขม ข้าวโพด
Sulfide spoilage[(a)]	≥ 5.3	ข้าวโพด ถั่ว
Mesophilic		
Putrefactive anaerobes[(a)]	≥ 4.8	ข้าวโพด หน่อไม้ฝรั่ง
Butyric anaerobes	≥ 4.0	มะเขือเทศ ถั่ว
Aciduric flat-sour [(a)]	≥ 4.2	น้ำมะเขือเทศ
Lactobacilli	4.5-3.7	ผลไม้ชนิดต่างๆ
ยีสต์และเชื้อรา	≤ 3.7	ผลไม้ชนิดต่างๆ

[(a)] แบคทีเรียที่สร้างสปอร์

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

ตารางที่ 6.5 ลักษณะการเสียของอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ

กลุ่มของจุลินทรีย์	ลักษณะที่ปรากฏ	
	สภาพของกระป๋อง	อาหารภายในกระป๋อง
Flat-sour	กระป๋องไม่บวม เป็นไปได้ว่ามีการสูญเสียสภาพการเป็นสุญญากาศ	อาหารมักมีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง ค่า pH ลดต่ำลงอย่างชัดเจน มีรสเปรี้ยว อาจมีกลิ่นผิดปกติเล็กน้อย บางครั้งของเหลวขุ่นมากขึ้น
Thermophilic anaerobe	กระป๋องบวม อาจระเบิด	อาหารเกิดการหมัก มีรสเปรี้ยว มีกลิ่นเนยแข็งหรือกลิ่นกรดบิวทิริก
Sulfide spoilage	กระป๋องไม่บวม เกิดแก๊สไฮโดรเจน ซัลไฟด์	อาหารมักมีสีดำ มีกลิ่นไข่เน่า
Putrefactive anaerobe	กระป๋องบวม อาจระเบิด	อาหารบางส่วนอาจถูกย่อยสลาย ค่า pH สูงกว่าปกติเล็กน้อย มีกลิ่นเหม็น
Aerobic sporeformers	กระป๋องอาจบวมหรือไม่ก็ได้ แต่มักจะไม่บวม ยกเว้นเนื้อที่ถนอมไว้ด้วยไนเตรทและน้ำตาล	-

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

ตารางที่ 6.6 ลักษณะการเสียของอาหารกระป๋องที่เป็นกรด

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะที่ปรากฏ	
	สภาพกระป๋อง	อาหารภายในกระป๋อง
Bacillus sterothermophilus (ในน้ำมะเขือเทศที่เสียแบบ flat-sour)	กระป๋องไม่บวม สภาพสุญ-ญากาศเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย	ค่า pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย มีกลิ่นผิดปกติ
Butyric anaerobes (ในมะเขือเทศและน้ำมะเขือเทศ)	กระป๋องบวม อาจระเบิด	อาหารเกิดการหมัก มีกลิ่นกรดบิวทิริก
Nonsporeformers (ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก)	กระป๋องบวม มักระเบิด	อาหารมีกลิ่นกรด

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

ตารางที่ 6.7 การวินิจฉัยการเสียของอาหารกระป๋องโดยจุลินทรีย์

ลักษณะปรากฏ	สาเหตุการเสีย	
	ได้รับความร้อนไม่เพียงพอ	กระป๋องรั่ว
สภาพของกระป๋อง	กระป๋องอาจบวมหรือไม่บวม โดยทั่วไปตะเข็บมีสภาพปกติ	กระป๋องบวม อาจแสดงตำหนิตามปกติ[a]
ลักษณะอาหาร	อาหารเกิดการหมัก	อาหารเกิดการหมักและหนืด
กลิ่น	กลิ่นปกติ กลิ่นเปรี้ยวหรือเหม็นเน่า	กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นเหม็น
ค่า pH	ค่อนข้างคงที่	ผันแปรมาก
การตรวจหาจุลินทรีย์ (ใช้กล้องจุลทรรศน์และการเพาะเลี้ยงเชื้อ)	พบเฉพาะแบคทีเรียรูปท่อน สร้างสปอร์ได้	พบจุลินทรีย์หลายชนิดปะปนกัน มักพบแบคทีเรียรูปท่อนและรูปกลมที่อุณหภูมิปกติ
	เจริญที่ 35°C และ/หรือ 55°C บางชนิดอาจเจริญได้ในอาหารพิเศษเช่น เชื้อในน้ำมะเขือเทศ และ acid agar ถ้าอาหารไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อเลยจะพบแบคทีเรียรูปกลม รูปท่อน ยีสต์และเชื้อราอยู่ปะปน	-
ประวัติการพบอาหารกระป๋องเสีย	การเสียมักพบในบางส่วนของชุดสินค้าที่บรรจุ	การเสียเกิดกระจัดกระจาย
	ในอาหารที่เป็นกรด การวินิจฉัยอาจทำได้ไม่ชัดเจนนัก อาจพบจุลินทรีย์ชนิดคล้ายๆ กันในอาหารกระป๋องที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอและในอาหารที่บรรจุในกระป๋องที่รั่ว	-

[a] การรั่วอาจไม่ได้เป็นเพราะกระป๋องมีตำหนิเท่านั้น แต่อาจเป็นเพราะสาเหตุอื่นเช่น การปนเปื้อนในน้ำที่ใช้ทำให้เย็น

ที่มา: Landry และคณะ (2001)

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลของการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ต่อการเสียของอาหารกระป๋อง

ชนิดของจุลินทรีย์และภาพของเซลล์และสปอร์	ชนิดของอาหารกระป๋อง.....			
	ลักษณะของกระป๋อง	ลักษณะของอาหาร	การเกิดแก๊ส	กลิ่นของอาหาร
B. coagulans				
B. stearothermophilus				
C. sporogenes				
C. thermosaccharolyticum				
E. coli				

2. การตรวจสอบการเสียของอาหารกระป๋องที่สุ่มตัวอย่างมาจากตลาด

2.1 ลักษณะทั่วไป

ลักษณะที่ตรวจสอบ	ชนิดของอาหารกระป๋องที่นำมาตรวจสอบ	
	อาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ (pH >4.6): …….....	อาหารกระป๋องที่มีกรด (pH < 4.6): …….....
รหัสของกระป๋อง		
วัน เดือน ปีที่ผลิต		
ขนาดกระป๋อง: เส้นผ่าศูนย์กลาง (นิ้ว) ความสูง (นิ้ว)		
ลักษณะของกระป๋องภายนอก		
ลักษณะของกระป๋องภายใน		
ลักษณะของอาหารภายในกระป๋อง		
ความดันสุญญากาศ (นิ้วปรอท)		
ช่องว่างในกระป๋อง(headspace) ระหว่างฝากระป๋องกับระดับอาหาร (นิ้ว)		
น้ำหนักทั้งหมด (กรัม)		
น้ำหนักกระป๋องเปล่า (กรัม)		
น้ำหนักสุทธิ (กรัม)		
น้ำหนักเนื้ออาหาร (กรัม)		
น้ำหนักเนื้ออาหาร (ร้อยละ)		
ค่า pH ของอาหาร		

2.2 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 อาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ	ระยะเวลาการบ่ม (ชั่วโมง)	การเจริญของจุลินทรีย์			
		+ / -	ย้อมแกรม	ย้อมสปอร์	รูปร่างและลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ (วาดภาพ)
CCM 35°C หลอดที่ 1					
CCM 35°C หลอดที่ 2					
CCM 55°C หลอดที่ 1					
CCM 55°C หลอดที่ 2					
BCP 35°C หลอดที่ 1					
BCP 35°C หลอดที่ 2					
BCP 55°C หลอดที่ 1					
BCP 55°C หลอดที่ 2					

+ หมายถึงเจริญ (เกิดความขุ่น); - หมายถึงไม่เจริญ (ไม่เกิดความขุ่น)

จุลินทรีย์ที่พบอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ น่าจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม.....
.....
สาเหตุการเสียของอาหารกระป๋องนี้อาจเป็นเพราะ.....
.....

2.2.2 อาหารกระป๋องที่มีกรด

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่บ่ม	ระยะเวลาการบ่ม (ชั่วโมง)	การเจริญของจุลินทรีย์			
		+ / -	ย้อมแกรม	ย้อมสปอร์	รูปร่างและลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ (วาดภาพ)
AB 30°C หลอดที่ 1					
AB 30°C หลอดที่ 2					
AB 55°C หลอดที่ 1					
AB 55°C หลอดที่ 2					
MEB 30°C หลอดที่ 1					
MEB 30°C หลอดที่ 2					

+ หมายถึงเจริญ (เกิดความขุ่น); - หมายถึงไม่เจริญ (ไม่เกิดความขุ่น)

จุลินทรีย์ที่พบอาหารกระป๋องที่มีกรดน่าจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม.....
สาเหตุการเสียของอาหารกระป๋องนี้อาจเป็นเพราะ.....
.....
.....

คำถามท้ายบท

1. commercial sterility หมายถึงอะไร จำเป็นสำหรับการผลิตอาหารกระป๋องประเภทไหน ทำไมจึงต้องทำลายจุลินทรีย์ในลักษณะนี้
2. อาหารในกลุ่ม low-acid food และ acid food คืออาหารประเภทใด อาหารแต่ละกลุ่มมีค่า pH ในช่วงใด วิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องทั้งสองกลุ่มต่างกันอย่างไร
3. การเสียของอาหารกระป๋องที่เชื้อสร้างแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณมาก ทำให้กระป๋องบวม มีกลิ่นเปรี้ยวและกลิ่นเหมือนเนยแข็ง คาดว่าน่าจะเป็นการเสียประเภทใด จุลินทรีย์ชนิดใดเป็นสาเหตุของการเสีย
4. การเสียของอาหารกระป๋องเนื่องจากให้ความร้อนไม่เพียงพอ อาจพบจุลินทรีย์ชนิดใดบ้าง
5. จุลินทรีย์ชนิดใดเป็นสาเหตุของ flat sour spoilage
6. จุลินทรีย์ชนิดใดเป็นสาเหตุของ sulfide stinker spoilage

เอกสารอ้างอิง

รัตนา อัตตปัญโญ 2529. เอกสารประกอบการสอนวิชาควบคุมคุณภาพอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Brown, A.E. 2005. Benson's Microbiological Applications, 9th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Montville, T.J., Matthews, K.R. 2005. Food Microbiology: An Introduction. ASM Press, Washington, D C.

Landry, W.L.,Schwab, A.H., Lancette, G.A. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 21A: Examination of canned foods. Available from: http://www.fda.gov/Food/Food ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109398.htm. 29 July 2014.

Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology, 3rd ed. CRC Press, New York.

Roberts, D., Hooper, W., Greenwood, M. 1995. Practical Food Microbiology. Public Health Laboratory Service, London, UK.

บทปฏิบัติการที่ 7
การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์บาดเจ็บ

เซลล์ของจุลินทรีย์และสปอร์ที่เผชิญกับสภาวะเครียดในสิ่งแวดล้อมที่ไม่รุนแรงมากนักอาจเกิดการบาดเจ็บแต่ไม่ตาย (sublethal injury) เซลล์บาดเจ็บจะไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีสารยับยั้งซึ่งปกติเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บสามารถทนได้ เซลล์บาดเจ็บอาจสามารถรักษาตัวเองจนฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรงได้ดังเดิมในสภาพที่มีสารอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยทั่วไปในอาหารและส่วนผสมมักมีจุลินทรีย์มีชีวิตที่มีสภาพทางสรีรวิทยาของเซลล์บกพร่อง หรืออยู่ในสภาพบาดเจ็บเนื่องจากการเผชิญกับสภาวะเครียดในสิ่งแวดล้อม สภาวะไม่เหมาะสมซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บได้แก่ สภาพต่างๆ ที่ใช้ในการแปรรูปและเก็บรักษาอาหาร รวมทั้งสภาพที่ใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหาร สภาวะที่ใช้ในการแปรรูปอาหารที่อาจทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บได้แก่ การให้ความร้อนเช่น การพาสเจอร์ไรส์ การสเตอริไลซ์ และการลวก การใช้ความเย็นเช่น การแช่เย็น การแช่แข็ง และการทำให้ละลาย การลดความชื้นหรือการลดค่า a_w เช่น การทำแห้งโดยใช้เครื่องพ่นแห้ง (spray dryer) เครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (roller dryer) การทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหย การเติมเกลือ น้ำตาล การฉายรังสี การใช้วัตถุกันเสียและกรดชนิดต่างๆ เช่น กรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิก การใช้สารเคมีทำความสะอาดเช่น สารประกอบคลอรีนและสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quarternary ammonium compound) รวมทั้งสารยับยั้งที่เกิดจากกระบวนการหมักอาจทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บได้ สำหรับสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์ที่อาจทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บได้แก่ การย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในสภาพแวดล้อมใหม่เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบซับซ้อนชนิดใหม่ซึ่งมีสารอาหารแตกต่างจากเดิม การใช้น้ำกลั่นในการทำเจือจางและการทำให้เซลล์ได้รับอากาศโดยบังเอิญ

หลังจากจุลินทรีย์เผชิญกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาพเครียด จะมีประชากรของจุลินทรีย์ 3 ประเภทด้วยกันได้แก่ เซลล์ที่ไม่บาดเจ็บ (non-injured cell) เซลล์บาดเจ็บที่สามารถรักษาตัวเองให้ฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรงได้ดังเดิม (injured cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) (ภาพที่ 7.1) ปริมาณเซลล์ทั้ง 3 ประเภทนี้ผันแปรขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ สภาพไม่เหมาะสมและระยะเวลาที่จุลินทรีย์เผชิญกับสภาพไม่เหมาะสมนั้นรวม ทั้งวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาจำนวนเซลล์บาดเจ็บ

เซลล์บาดเจ็บหมายถึงเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากเผชิญต่อสภาวะเครียด แต่สูญเสียลักษณะบางประการเช่น เซลล์บาดเจ็บสามารถสร้างโคโลนีได้บน nonselective media แต่ไม่สามารถเจริญขึ้นได้บน selective media ซึ่งมีสารยับยั้งที่ใช้คัดเลือกให้จุลินทรีย์ที่ต้องการให้เจริญขึ้นแต่ยับยั้ง

จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (selective compound) การเพิ่มขึ้นของความไวต่อสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ปกติเซลล์สามารถทนได้เป็นหนึ่งในคุณลักษณะของเซลล์บาดเจ็บที่แตกต่างจากคุณลักษณะของเซลล์ปกติที่ไม่บาดเจ็บ สารยับยั้งดังกล่าวได้แก่ สารลดแรงตึงผิว (surface-active compounds) เช่น เกลือน้ำดี (bile salt) ดีออกซีโซเลต (deoxycholate) โซเดียมคลอไรด์ สารเคมีบางชนิดได้แก่ ลิเทียมคลอไรด์ (LiCl) บิสมัทซัลไฟต์ (bismuthsulfite) เตตราไทโอเนต (tetrathionate) ไฮโดรไลติก เอนไซม์ เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) อาร์เอ็นเอเอส (RNase) สารปฏิชีวนะ สีย้อมเช่น คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) บรินเลียนซ์กรีน (brilliant green) และกรดชนิดต่าง ๆ สารยับยั้งบางชนิดสามารถยับยั้งการรักษาตัวเองของเซลล์บาดเจ็บ ขณะที่บางชนิดอาจเป็นพิษและเป็นสาเหตุการตายของเซลล์บาดเจ็บ

รูปที่ 7.1 ผลของการเผชิญต่อสภาวะเครียดของเซลล์จุลินทรีย์
ที่มา: Wu (2008)

ดังนั้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่อาจเป็นอันตราย เซลล์อาจจะถูกทำลายจนทำให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ และการปฏิบัติหน้าที่ของส่วนประกอบของเซลล์ตามปกติไม่อาจเกิดขึ้นได้ เซลล์จะไม่สามารถแบ่งตัวได้ในสภาพเดิมที่เซลล์เคยเจริญและเพิ่มจำนวนซึ่งจะสังเกตได้จากการที่ไม่มีโคโลนีขึ้นบนอาหารแข็งหรือการที่ไม่เกิดความขุ่นในอาหารเหลว หรือการที่เซลล์ผลิตสารบางชนิดได้ในปริมาณน้อยจากสารตั้งต้นปริมาณที่เหมาะสม สิ่งที่เกิดขึ้นเหล่านี้บ่งชี้ถึงภาวะการบาดเจ็บของเซลล์ เซลล์บาดเจ็บส่วนมากได้รับความเสียหายที่ผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มชั้นนอกรวมทั้งเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ได้รับอันตรายได้ง่ายจากสารยับยั้งหลายชนิดที่เติมลงใน selective media หรือสารต้านจุลินทรีย์ต่างๆ โดย

จะสูญเสียความสามารถในการกั้นสารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ เซลล์จะสูญเสียองค์ประกอบของเซลล์สู่ภายนอก การแช่แข็งและการทำแห้งจะทำให้เซลล์เสียหายตามลักษณะนี้ มีรายงานว่า *Escherichia coli* ที่บาดเจ็บจากการแช่แข็งจะปล่อยกรดอะมิโน รวมทั้งกรดไรโบนิวคลิอิกและเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ความเสียหายยังเกิดขึ้นกับโมเลกุลของไลโพพอลิแซคคาไรด์ในเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบที่ได้รับบาดเจ็บจากการแช่แข็งอีกด้วย ส่วนเซลล์ที่บาดเจ็บจากความร้อนจะปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์เนื่องจากเยื่อหุ้มชั้นนอกได้รับความเสียหาย อาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ดีเอ็นเอ (DNA) ไรโบโซม และเอนไซม์ยังได้รับความเสียหายอีกด้วย เช่น มีรายงานว่า *Staphylococcus aureus* ที่ได้รับบาดเจ็บจากความร้อนจะปล่อยโพแทสเซียม กรดอะมิโนและโปรตีนออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการลดลงของ catabolic capabilities และกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องในเมแทบอลิซึมของกลูโคส และมีรายงานว่า กรดไรโบโซมอลไรโบนิวคลีอิก (ribosomal ribonucleic acid) เกิดการแตกสลายภายในเซลล์ของ *S. aureus* และ *Salmonella* Typhimurium ที่บาดเจ็บจากความร้อน โดยทั่วไปถ้าให้เซลล์บาดเจ็บอยู่ในสภาพที่เหมาะสม เซลล์มักจะรักษาอาการบาดเจ็บนั้นได้และเริ่มเจริญต่อไป แต่ถ้าการบาดเจ็บนั้นรุนแรงเกินไป การรักษาตัวเองจนฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรงก็อาจไม่เกิดขึ้นในสภาพปกติ หรือถ้าหากเซลล์บาดเจ็บอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานานเซลล์อาจจะตาย โดยจะไม่มีการรักษาตัวเองให้กลับฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรงได้อีกต่อไป

นอกจากนี้เซลล์บาดเจ็บทำให้ช่วง lag phase ยาวนานขึ้นกว่าในกรณีของเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บเพื่อที่จะใช้เวลาในการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์และเพื่อสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิกที่จำเป็นสำหรับการเจริญ ดังนั้นเซลล์บาดเจ็บจึงเป็นเซลล์ที่สามารถซ่อมแซมความเสียหายภายในเซลล์ได้ หรือทำให้เกิดการฟื้นคืนสภาพและได้รับความสามารถในการสร้างโคโลนีบนอาหาร selective media กลับคืนมา แตกต่างจากเซลล์ที่ตายแล้วซึ่งจะไม่สามารถสร้างโคโลนีขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ว่าจะอยู่ในสภาวะใด ๆ ก็ตาม

การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์บาดเจ็บ

ในทางอุดมคติ วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารหรือตัวอย่างอื่นๆ ควรจะตรวจหาได้ทั้งจำนวนเซลล์ปกติที่แข็งแรงและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ จุลินทรีย์บาดเจ็บมีความสำคัญเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ปกติ ข้อควรทราบเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาจุลินทรีย์บาดเจ็บได้แก่ 1) เซลล์บาดเจ็บจะได้รับอันตรายได้ง่ายอย่างชั่วคราวจาก selective compound หลายชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงไม่สามารถรักษาตัวเองให้ฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรงและไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาพที่มีสารยับยั้ง 2) ความไวต่อสารยับยั้งนี้อาจเป็นผลเนื่อง จากเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย 3) การบาดเจ็บนี้ผันกลับได้โดยเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บจะสามารถรักษาตัวเองได้อย่าง

สมบูรณ์จนฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรงได้ดังเดิมถ้าหากอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nonselective medium ที่ประกอบด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเซลล์บาดเจ็บที่ฟื้นคืนสภาพนี้จะมีความต้านทานต่อสารยับยั้ง รวมทั้งมีความสามารถในการเจริญและเพิ่มจำนวนกลับคืนมา ดังนั้นในการที่จะเพาะเลี้ยงหรือแยกจุลินทรีย์บาดเจ็บจำเป็นต้องทำให้เซลล์บาดเจ็บนั้นรักษาตัวเองและเพิ่มจำนวนได้ก่อน 4) อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการรักษาตัวเองผันแปรขึ้นอยู่กับลักษณะของสภาวะเครียดที่เซลล์ได้รับ ตามปกติเซลล์จะสามารถรักษาตัวเองจากการบาดเจ็บได้ภายใน 1 ถึง 6 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความมากน้อยของการบาดเจ็บและลักษณะของสภาวะเครียดที่เซลล์ได้รับ การซ่อมแซมไรโบโซมและเยื่อหุ้มเซลล์จำเป็นต่อการฟื้นคืนสภาพของเซลล์ที่บาดเจ็บจากความร้อน การแช่แข็ง การทำแห้งและการฉายรังสี

การเติมสารเคมีบางชนิดเช่น ไพรูเวต (pyruvate) และคะตะเลส (catalase) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยขจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ใน selective media และ nonselective media ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดและตรวจพบได้มากขึ้น รวมทั้งเซลล์ของโคลิฟอร์มและ *Staphylococcus* ที่เผชิญต่อสภาวะเครียดในอาหาร เนื่องจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการหายใจหรือเพอร์ออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในอาหารที่เชื้อเจริญอยู่อาจเป็นพิษต่อเซลล์บาดเจ็บ นอกจากนี้มีผู้กล่าวว่า แมกนีเซียมจำเป็นต่อการซ่อมแซมเพื่อการรักษาตัวเองหลังจากเซลล์ได้รับการบาดเจ็บแต่ไม่ตาย และการเติมทวีน 80 (tween 80) และแมกนีเซียมคลอไรด์ลงใน selective medium รวมทั้งการเสริมธาตุเหล็กช่วยเพิ่มการฟื้นคืนสภาพของจุลินทรีย์บาดเจ็บได้

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบซับซ้อน (complex media) หรือการเติมส่วนประกอบที่เฉพาะลงไปสามารถช่วยปกป้องเซลล์ของจุลินทรีย์จากการบาดเจ็บโดยความร้อนและการแช่แข็งได้ เช่นองค์ประกอบนมได้แก่ ฟอสเฟต แลคโตส และเคซีนให้ผลดี รวมทั้งน้ำตาลซูโครสช่วยปกป้องเซลล์จากการบาดเจ็บโดยความร้อนได้ มีรายงานว่าน้ำตาลและโพลีออล (polyols) ที่ยังไม่ถูกเมแทบอไลซ์ เช่น อะราบิโนส ไซโลส และซอร์บิทอลปกป้องเซลล์จากการบาดเจ็บโดยความร้อนระดับต่ำได้

จากการศึกษาผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการบาดเจ็บของ *E. coli* (ตารางที่ 7.1) พบว่าเซลล์ก่อนแช่แข็งเจริญได้ในอาหาร nonselective media (TSA) และ selective media (TSDA; TSA ที่เติมดีออกซีโชเลตความเข้มข้นร้อยละ 0.075) แสดงว่าเซลล์สามารถทนต่อสารยับยั้งได้ หลังจากการแช่แข็งและทำให้ละลายปรากฏว่าปริมาณเซลล์ที่ตายมีมากถึงร้อยละ 93.9 ปริมาณเซลล์ที่ตายหาได้จากการนำจำนวนเซลล์ที่เจริญบนอาหาร TSA ก่อนแช่แข็งลบกับจำนวนเซลล์ที่เจริญบนอาหาร TSA หลังแช่แข็ง (เซลล์ที่เจริญบนอาหาร TSA ได้แก่ เซลล์ปกติที่ไม่บาดเจ็บและเซลล์บาดเจ็บที่ได้รักษาตัวเองและเพิ่มจำนวนขึ้น) ส่วนจำนวนเซลล์บาดเจ็บหลังแช่แข็งหาได้จากการนำจำนวนเซลล์ที่เจริญบนอาหาร TSA หลังแช่แข็งลบกับจำนวนเซลล์ที่เจริญบน TSDA หลังแช่แข็ง

(เซลล์ที่เจริญบน TSDA คือเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บเพราะเซลล์บาดเจ็บไวต่อสารยับยั้งจึงไม่สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้)

ตารางที่ 7.1 ผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการตายและการบาดเจ็บของ *E. coli* NCSM

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนเซลล์กลุ่มย่อย (CFU ต่อมิลลิลิตร)
		ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็งที่ (-20°C 16 ชั่วโมง)	
TSA (Tryptic Soy Agar)	Nonselective media	2.8×10^8	1.7×10^7	จำนวนเซลล์ที่ตาย: $2.8 \times 10^8 - 1.7 \times 10^7$ (93.9%)
TSDA (Tryptic Soy Agar + deoxycholate 0.075%)	selective media	2.7×10^8	3.5×10^6	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต -เซลล์ไม่บาดเจ็บ: 3.5×10^6 -เซลล์บาดเจ็บ: $1.7 \times 10^7 - 3.5 \times 10^6$ (79.4%)

ความสำคัญของจุลินทรีย์บาดเจ็บ

ดังที่ได้ทราบแล้วว่า กระบวนการต่างๆ ในการแปรรูปอาหารและการทำความสะอาดอุปกรณ์ สามารถทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บได้ จึงเป็นไปได้ที่อาหารและอุปกรณ์ต่างๆจะเป็นที่สะสมของจุลินทรีย์บาดเจ็บ การบาดเจ็บของจุลินทรีย์มีความสำคัญในทางจุลชีววิทยาด้วยเหตุผลหลายประการด้วยกัน

1. การตรวจหาจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

เซลล์บาดเจ็บที่สามารถฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรง (reversibly injured cell) กำลังได้รับความสนใจจากนักจุลชีววิทยาทางอาหาร เนื่องจากจุลินทรีย์บาดเจ็บมีแนวโน้มที่จะแบ่งตัวและเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้นเซลล์บาดเจ็บควรถูกตรวจพบถ้ามีอยู่ในอาหาร โดยทั่วไปในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารด้วยวิธีพื้นฐาน ได้มีการนำ selective media หลายชนิดมาใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์เฉพาะที่ต้องการตรวจหา แต่จุลินทรีย์บาดเจ็บอาจไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านั้น ทำให้ตรวจสอบไม่ได้ว่ามีจุลินทรีย์นี้อยู่ อาหารที่มีเซลล์บาดเจ็บที่สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษได้จึงผ่านข้อกำหนดของคุณภาพอาหารทางจุลินทรีย์และถูกนำไปจำหน่าย เมื่อ

จุลินทรีย์เหล่านั้นมีการรักษาตัวเองจนคืนสภาพเป็นเซลล์ปกติ ก็จะเจริญขึ้นโดยมีความรุนแรงของเชื้อตามปกติและก่อโรคอาหารเป็นพิษถ้าคนรับประทานอาหารนั้นเข้าไป เชื้ออาจมีชีวิตรอดในทางเดินอาหารหรืออีกนัยหนึ่งจุลินทรีย์บาดเจ็บนี้อาจรักษาตัวเองแล้วเจริญในอาหารต่อไป ทำให้อาหารมีอายุการเก็บสั้น

2. การยืดอายุการเก็บของอาหาร

การที่จุลินทรีย์บาดเจ็บไวต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำเอาสภาพที่ไม่เหมาะสมต่างๆ มาใช้ในการถนอมอาหารเช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ การใช้วัตถุกันเสียและสภาพอื่นๆ ในการทำลายเซลล์และสปอร์ที่บาดเจ็บ ทำให้เซลล์บาดเจ็บไม่สามารถรักษาตัวเองจนฟื้นคืนกลับเป็นเซลล์ที่แข็งแรงได้ จึงเป็นการลดโอกาสที่เซลล์บาดเจ็บจะเจริญและทำให้อาหารเสีย

3. การส่งเสริมการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา

ปัจจุบันได้มีการเก็บรักษากล้าเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพแช่แข็งหรือแช่แข็งแห้ง เป็นที่ทราบดีว่าสภาพทั้งสองนี้เป็นสาเหตุการตายและการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ ดังนั้นถ้าหากมีการศึกษากลไกต่างๆ ในการตายและการบาดเจ็บของจุลินทรีย์เพื่อหยุดเหตุการณ์เหล่านี้ก็เป็นไปได้ที่จะช่วยให้จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ได้นานและยังคงมีคุณลักษณะที่ต้องการ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เรียนรู้ถึงวิธีการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์บาดเจ็บ
2. เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการบาดเจ็บของ *Escherichia coli*
3. เพื่อศึกษาผลของสารป้องกันความเย็นต่อการอยู่รอดของ *Escherichia coli*

อุปกรณ์

1. เชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Nutrient Broth (NB), Tryptic Soy Agar (TSA) และ Violet Red Bile (VRB) Agar
3. สารที่ใช้แขวนลอยเซลล์ (suspending medium) ได้แก่ น้ำกลั่น สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 สารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10
4. หลอดทดลอง และ ขวดแก้วทนความเย็นขนาดเล็ก
5. จานเพาะเชื้อ ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร แท่งแก้วงอ และห่วงเขี่ยเชื้อ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
7. ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C และตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C

วิธีการทดลอง

1. ถ่ายเชื้อ *E. coli* จากหลอดอาหาร NA 1 ลูปเต็ม ลงในอาหาร NB 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตน จากนั้นทำให้ได้สารแขวนลอยของเซลล์ 5 มิลลิลิตรหลังจากการล้างครั้งสุดท้าย
3. ทำการเจือจางเซลล์ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ด้วยสารละลายทำเจือจางต่างชนิดกันทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น สารละลายเปปโตน สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 และสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10
4. ตรวจหาปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิค spread plate โดยปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์ที่แต่ละระดับความเจือจางที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนอาหาร TSA และ VRB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์ที่เหลือที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ลงในขวดแก้วทนความเย็นปราศจากเชื้อระดับความเจือจางละ 2 ขวด ปริมาตรขวดละ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งแข็งตัว (ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง)
6. นำขวดทนความเย็นทั้งหมดที่นำไปแช่แข็งออกมาทำให้ละลาย โดยที่แต่ละระดับความเจือจางให้นำขวดหนึ่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลายอย่างรวดเร็ว (rapid thaw) ส่วนอีกขวดหนึ่ง นำไปแช่น้ำเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 5°C ทันทีหลังจากเอาออกจากตู้เย็นเพื่อให้ละลายอย่างช้า (slow thaw) บันทึกเวลาที่ใช้ในการทำให้ละลายอย่างสมบูรณ์
7. ตรวจหาปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิค spread plate เช่นเดียวกับข้อ 4 โดยปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์ 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละระดับความเจือจาง (10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4}) ลงบนอาหาร TSA และ VRB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. คำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ตาย และเซลล์ที่บาดเจ็บในแต่ละตัวอย่าง
9. เปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่มอื่นๆ

<u>การคำนวณหาปริมาณเซลล์บาดเจ็บ</u>

1. จำนวนโคโลนี (CFU ต่อมิลลิลิตร) บนอาหาร TSA คือ จำนวนเซลล์ที่แข็งแรงและเซลล์ที่บาดเจ็บ
2. จำนวนโคโลนี (CFU ต่อมิลลิลิตร) บนอาหาร VRB คือ จำนวนเซลล์ที่แข็งแรง (เพราะเซลล์ที่บาดเจ็บไม่สามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้เนื่องจากมีสารยับยั้ง)

3. จำนวนเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บ (ร้อยละ) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบน VRB}}{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA}} \times 100$

4. จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (ร้อยละ) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA - จำนวนโคโลนีบน VRB}}{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA}} \times 100$

5. ปริมาณเซลล์ที่ตาย (ร้อยละ) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA - จำนวนโคโลนีบน TSA}}{\text{(ก่อนแช่แข็ง) (หลังแช่แข็ง)}} \times 100$

จำนวนโคโลนีบน TSA ก่อนแช่แข็ง

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการตรวจนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียก่อนการแช่แข็ง

แบคทีเรียที่ใช้คือ.....

สารละลายทำเจือจางที่ใช้คือ.....

ก่อนการแช่แข็ง

จานที่	จำนวนโคโลนี						CFU ต่อมิลลิลิตร	
	ระดับความเจือจางที่.....		ระดับความเจือจางที่.....		ระดับความเจือจางที่.....			
	TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB
1								
2								

จำนวนเซลล์บน TSA ก่อนแช่แข็ง = ... CFU ต่อมิลลิลิตร

จำนวนเซลล์บน VRB ก่อนแช่แข็ง = ... CFU ต่อมิลลิลิตร

2. ผลการตรวจนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียหลังการแช่แข็ง

2.1 หลังการแช่แข็ง (ละลายเร็ว) : เวลาที่ใช้ในการละลาย.....นาที

จานที่	จำนวนโคโลนี						CFU ต่อมิลลิลิตร	
	ระดับความเจือจางที่.....		ระดับความเจือจางที่.....		ระดับความเจือจางที่.....			
	TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB
1								
2								

จำนวนเซลล์บาดเจ็บ (ร้อยละ) = ……

……

จำนวนเซลล์ที่ตาย (ร้อยละ) = ……

……

2.2 <u>หลังการแช่แข็ง (ละลายช้า)</u> : เวลาที่ใช้ในการละลาย.....นาที

จานที่	จำนวนโคโลนี						CFU ต่อมิลลิลิตร	
	ระดับความเจือจางที่.....		ระดับความเจือจางที่.....		ระดับความเจือจางที่.....			
	TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB
1								
2								

จำนวนเซลล์บาดเจ็บ (ร้อยละ) = ……

……

จำนวนเซลล์ที่ตาย (ร้อยละ) = ……

……

คำถามท้ายบท

1. จงยกตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อและชนิดของสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์บาดเจ็บ
2. จุลินทรีย์บาดเจ็บมีความสำคัญอย่างไร การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์บาดเจ็บ ทำได้อย่างไร
3. จากการทดลองที่ได้ใช้สารแขวนลอยเซลล์ต่างชนิดกันเช่น น้ำกลั่น สารละลายเปปโตน สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 และสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10 สารต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อการมีชีวิตรอดของ *E. coli* อย่างไร สารชนิดใดบ้างที่มีผลช่วยป้องกันเซลล์จากการบาดเจ็บและตายระหว่างการแช่แข็งและการทำให้ละลาย
4. จากผลการทดลอง การทำให้ละลายอย่างช้าๆและการทำให้ละลายอย่างรวดเร็วมีผลต่อการบาดเจ็บและการตายของ *E. coli* อย่างไร ทำไมจึงเป็นเช่นนั้น

เอกสารอ้างอิง

Foegeding, P.M., Ray, B. 1992. Repair and detection of injured microorganisms. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, 3rd ed. Washington, D C, pp. 121-134.

Frank, J. 1998. Food Microbiology: Lab Manual. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, Georgia.

Hurst, A. 1977. Bacterial injury: a review. Canadian Journal of Microbiology. 23(8): 935-944.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, New York.

Ray, B. 1996. Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Inc., New York.

Wu, V.C.H. 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. Food Microbiology. 25: 735-744.

บทปฏิบัติการที่ 8
การตรวจหา *Salmonella* ในอาหาร

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบในแฟมมิลี Enterobacteriaceae มีรูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) หมักกลูโคสให้กรดและแก๊ส สามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งพลังงาน ส่วนใหญ่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์และไม่ไฮโดรไลส์ยูเรีย พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่รอดได้ดีในสภาพที่ไม่เหมาะสมเช่น สภาพที่มีสารอาหารต่ำ สภาพที่มีอุณหภูมิและ pH ไม่เหมาะสม ส่วนใหญ่ไม่ทนความร้อน ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากไข่และเนื้อสัตว์อาจทนความร้อน การทำแห้งและแช่แข็งอาจไม่สามารถทำลายเชื้อชนิดนี้ได้ทั้งหมด แหล่งที่อยู่อาศัยหลักของ *Salmonella* คือในลำไส้ของสัตว์ ดังนั้นอาหารที่มาจากสัตว์เช่น เนื้อสด ไข่ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์นมมักปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้ สำหรับอาหารชนิดอื่นที่อาจพบ *Salmonella* ได้แก่ ไอศกรีม อาหารที่มีไข่เป็นส่วนผสม สลัด แซนวิช ผักและผลไม้ อาหารเหล่านี้อาจเป็นพาหะที่สำคัญที่จะนำโรคซาลโมเนลโลซีส (salmonellosis) มาสู่คนและสัตว์ การปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้บ่อยครั้งมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination) จากอุปกรณ์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella*

ลักษณะของโรคที่เกิดจาก *Salmonella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในคนที่เรียกว่า โรคซาลโมเนลโลซีส โรคนี้แบ่งออกได้เป็นหลายรูปแบบ รวมทั้งแบบที่เป็นพาหะที่ไม่แสดงอาการ *Salmonella* บางซีโรไทป์ เช่น *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Newport และซีโรไทป์อื่นๆ เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคโดยเฉพาะ gastroenteritis (หรือ enterocolitis) ในคนและสัตว์ ซึ่งเป็นโรคซาลโมเนลโลซีสรูปแบบที่พบบ่อยที่สุด *Salmonella* อย่างน้อย 150 ซีโรไทป์ทำให้เกิดโรคนี้ ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย ปวดท้องเป็นไข้ หนาว อาเจียนและปวดหัว ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการ (incubation period) ประมาณ 12-36 ชั่วโมง และมีอาการของโรค 1-4 วัน ส่วนเชื้อ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi ทำให้เกิด enteric fever ในคนซึ่งพบน้อยกว่าร้อยละ 5 ของบรรดาผู้ป่วยที่เป็นโรคซาลโมเนลโลซีส ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย ปวดท้อง ปวดหัวและมีไข้สูง ช่วงเวลา incubation period อยู่ระหว่าง 1-7 สัปดาห์ ผู้ป่วยมีอาการในช่วง 1-8 สัปดาห์ และ *S.* Choleraesuis ทำให้เกิด bacteremia การติดเชื้อ *S.* Choleraesuis ในคนมีอัตราการตายสูง

การตรวจหาและแยกเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร

การตรวจหา *Salmonella* ที่ได้ผลเชื่อถือได้ขึ้นอยู่กับแผนการสุ่มตัวอย่างที่ดีและการใช้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากในอาหารมักจะมี *Salmonella* จำนวนน้อยและบ่อยครั้งที่เชื้อชนิดนี้เผชิญกับสภาวะเครียดในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอน pre-enrichment เพื่อทำให้เซลล์ของ *Salmonella* ที่บาดเจ็บฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรง เจริญและเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่ตรวจพบได้ ในขั้นนี้จะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญซึ่งก็คือ nonselective enrichment broth จากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงไปในอาหาร selective enrichment broth ตามด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง selective differential agar เพื่อคัดเลือกเชื้อในขั้นต่อไป จากนั้นจึงทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical screening) และทดสอบยืนยันทางซีโรวิทยา (serological confirmation)

1. Pre-enrichment

อาหารเหลวที่เหมาะสมในขั้น pre-enrichment ตามทฤษฎีควรจะเป็นอาหารที่ทำให้เซลล์มีการซ่อมแซมองค์ประกอบของเซลล์ที่เสียหาย มีการเจือจางสารพิษหรือสารยับยั้ง และมีสารอาหารที่มีคุณค่าที่จะทำให้เชื้อ *Salmonella* เพิ่มจำนวนได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* โดยทั่วไปอาหาร Lactose Broth เป็นอาหารที่ใช้กันมากแต่มีข้อจำกัดเนื่องจาก *Salmonella* ส่วนใหญ่ไม่ใช้แลคโตส เมื่อมีการแข่งขันเจริญกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้แลคโตสซึ่งมีอยู่ในตัวอย่างอาหาร จะมีผลทำให้ค่า pH ลดลง จึงจำกัดการเจริญของเชื้อ ดังนั้นอาหาร Lactose Broth จึงเหมาะสมกับตัวอย่างอาหารบางชนิดเท่านั้น ชนิดของ pre-enrichment broth ที่เหมาะสมและวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับอาหารต่างชนิดกันจะแตกต่างกัน (ตารางที่ 8.2) การเติมบริลเลียนซ์กรีน (brilliant green) หรือคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) หรือมาลาไคท์กรีน (malachite green) ปริมาณน้อยลงไปใน pre-enrichment broth ช่วยแก้ปัญหาการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียแกรมบวกจำนวนมากเช่น Buffered Peptone Water ที่เติมมาลาไคท์กรีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ใช้เป็น pre-enrichment broth ได้ดีในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ในนมผง ในปี ค. ศ. 1973 Gomez และคณะ ได้พัฒนาอาหาร Glucose-Inorganic Salts Medium (M-9) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ที่เผชิญสภาวะเครียดต่อความร้อน ความแห้งและสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ในการคืนรูปตัวอย่างอาหารแห้งอาจมีผลต่อการฟื้นคืนสภาพของ *Salmonella* จึงได้มีผู้แนะนำว่าในการคืนรูปนมผงเริ่มแรกควรใช้อัตราส่วนของปริมาณตัวอย่างนมผงต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:2 จากนั้นจึงเจือจางจนถึงระดับความเจือจาง 1:9 ส่วนการวิเคราะห์อาหารที่มีไขมันสูง ควรเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) จะช่วยให้ตรวจพบ *Salmonella* ได้มากขึ้น เนื่องจากสารนี้ช่วยกระจายอนุภาคของไขมันที่มี *Salmonella* อยู่ โดยทั่วไปจะบ่ม pre-enrichment broth ที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. Selective enrichment

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วยสารยับยั้งที่ช่วยคัดเลือกให้เชื้อ *Salmonella* เจริญได้และช่วยให้การเจริญของ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือก (selective plating media) ในขั้นต่อไปง่ายขึ้นโดยสารยับยั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น สารยับยั้งที่นิยมใช้ได้แก่ เกลือน้ำดี (bile salt) เตตราไทโอเนต (tetrathionate) ซีลีไนต์ (selenite) และสีย้อมได้แก่ บรินเลียนซ์กรีนและมาลาไคท์กรีน ตัวอย่างของอาหารเหลวที่ใช้คัดเลือก (selective enrichment broth) *Salmonella* ให้เจริญขึ้นได้แก่ 1) Selenite Cystine (SC) Broth มีซีลีไนต์ เป็นสารยับยั้งและมีซีสทีน (cystine) ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Salmonella* 2) Tetrathionate (TT) Broth มีเตตราไทโอเนต และเกลือน้ำดีเป็นสารยับยั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่เหมาะกับ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ปรับตัวอาศัยอยู่เฉพาะในสัตว์บางชนิด (host-adapted serovars) 3) Tetrathionate Brilliant Green (TBG) Broth และ 4) Rappaport-Vassiliadis (RV) Broth มีมาลาไคท์กรีนและแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นสารยับยั้งและมีค่า pH ต่ำ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหนึ่งที่เลือกใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นอาหาร แต่อาจตรวจไม่พบ *S.* Typhi และ *S.* Dublin ถ้าใช้อาหาร RV Broth ควรเติมตัวอย่างที่ผ่านการบ่มจากขั้น pre-enrichment ลงไปในอาหาร selective enrichment broth ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:100 แต่ถ้าใช้ SC Broth และ TT Broth อัตราส่วนของตัวอย่างต่ออาหารเหลวควรเป็น 1:10 สำหรับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม ถ้าใช้ selective enrichment broth ทั่วไปจะบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C แต่ถ้าใช้ RV Broth ควรบ่มที่อุณหภูมิสูงถึง 41-42°C ซึ่งจำเป็นต่อการคัดเลือกให้เชื้อ *Salmonella* เจริญขึ้น ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำกว่านี้เชื้อที่เจริญแข่งขันอาจเจริญได้

3. Selective plating

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ให้เจริญขึ้นชนิดที่นิยมใช้ทุกชนิดมีส่วนผสมของสารที่สามารถทำให้เชื้อ *Salmonella* เจริญเป็นโคโลนีที่แตกต่างกับโคโลนีของเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* สารที่เติมลงไปก็เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น สีย้อมชนิดต่าง ๆ เกลือน้ำดี และสารชนิดอื่นๆ ซึ่งโดยทั่วไปอาศัยหลักการที่ *Salmonella* ส่วนใหญ่ไม่สามารถหมักแลคโตสและในบางกรณีไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นเช่น ซูโครสและซาลิซิน (salicin) โดยทั่วไปจะแยกความแตกต่างของ *Salmonella* กับเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ได้โดยอาศัยความสามารถในการสร้างหรือไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ รวมทั้งความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ใช้ในการคัดเลือก ได้แก่ Brilliant Green Agar (BGA), Brilliant Green Sulfa (BGS), Bismuth Sulfite Agar (BSA), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (มีดีออกซีโชเลตยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก) และ Hektoen Enteric Agar (HE) การสร้างกรดจากกลูโคสหรือการใช้ซูโครสจะทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้เปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้ Rambach Agar (มีดีออกซีโชเลตเป็นสารยับยั้ง) ในการตรวจหา *Salmonella* ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดนี้อาศัยการสร้างกรดจากโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) ทำให้โคโลนีที่ขึ้นมีสีต่างกัน เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* สร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) ทำให้แยกความแตกต่างของ *Proteus* ออกจากแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ชนิดอื่น อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ โดยปกติจะทำให้โคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* เจริญภายใน 18-24 ชั่งโมงหลังบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C ยกเว้นในอาหาร BSA ซึ่งอาจต้องบ่มเป็นเวลานานถึง 48 ชั่วโมง โคโลนีของ *Salmonella* จึงจะเจริญ จากการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อในการตรวจหา *Salmonella* สามารถจัดลำดับประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ BSA > BGS > BGA > Rambach > XLD > HE นอกจากนี้ยังมี selective media ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ได้อีกได้แก่ Deoxycholate Citrate Agar (DCA), Deoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose (DHL) Agar, Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV), MacConkey Agar และ *Salmonella Shigella* Agar สามารถจัดระดับความสามารถของอาหารเลี้ยงเชื้อในการคัดเลือก *Salmonella* ได้ดังนี้ 1) ชนิดที่มีความสามารถในการคัดเลือกต่ำ (low selective) ได้แก่ MacConkey Agar 2) ชนิดที่มีความสามารถในการคัดเลือกปานกลาง (intermediate selective) ได้แก่ XLD, DCA, SS, HE และ DHL และ 3) ชนิดที่มีความสามารถในการคัดเลือกสูง (high selective) ได้แก่ BGA, BSA และ MSRV อย่างไรก็ตามไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่มีประสิทธิภาพเชื่อถือได้ 100 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นจึงควรใช้ selective media มากกว่า 1 ชนิด

4. การทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมีของ *Salmonella* อาศัยคุณลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้ในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ การมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซีเลส (lysine decarboxylase) และเอนไซม์ยูรีเอส (urease) และการที่เชื้อไม่สามารถสร้างกรดจากแลคโตสและซูโครส สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น เพื่อแยกความแตกต่างและคัดเลือกแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* นิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ 1) Triple Sugar Iron (TSI) Agar ใช้ในการทดสอบความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ การใช้กลูโคส แลคโตส และซูโครสและ 2) Lysine Indole Motility (LIM) หรืออาจใช้ Lysine Iron Agar (LIA) ในทดสอบการดีคาร์บอกซิเลตไลซีน การสร้างอินโดล และการเคลื่อนที่ หลังจากที่ได้เชื้อที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่น่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* แล้ว ขั้นต่อไปเป็นการทดสอบยืนยันด้วยวิธีทางซีโรวิทยาโดยใช้โอแอนติซีรัม (somatic (O) polyvalent antiserum) เอชแอนติซีรัม (flagella (H) polyvalent antiserum) และแอนติซีรัมเฉพาะสำหรับเชื้อ *Salmonella* แต่ละกลุ่ม

5. การทดสอบทางซีโรวิทยา

การทดสอบทางซีโรวิทยา (serological test หรือ serotyping) เป็นการทดสอบที่ใช้กันมากในแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม enteric ที่ก่อโรคเช่น *Salmonella* และ *Escherichia* หลักการของการ

ทดสอบนี้ก็คือ การใช้แอนติบอดีเฉพาะ (specific antibody หรือ antiserum) ในการจำแนกแอนติเจน (antigen) ของแบคทีเรีย การทดสอบทางซีโรวิทยาทำให้สามารถจำแนก *Salmonella* ได้เป็นหลายซีโรไทป์ (serotype) หรือซีโรวาร์ (serovar) ตามองค์ประกอบของโอแอนติเจนหรือโซมาติกแอนติเจน (Somatic (O) antigen) เอชแอนติเจนหรือแฟลกเจลลาแอนติเจน (Flagella (H) antigen) และเคแอนติเจนหรือแคปซูลาแอนติเจน (Capsular (K) antigen) โอแอนติเจนเป็นองค์ประกอบในส่วนของเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ทนความร้อน ทนแอลกอฮอล์และกรดเจือจาง เอชแอนติเจนเป็นองค์ประกอบในส่วนของแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ของ *Salmonella* เป็นแอนติเจนที่ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายด้วยแอลกอฮอล์และกรด ส่วนเคแอนติเจนเป็นแอนติเจนในส่วนของแคปซูลที่คลุมรอบนอกโอแอนติเจนซึ่งถูกทำลายด้วยความร้อน ในปัจจุบันเชื้อ *Salmonella* ถูกจัดจำแนกไว้มากกว่า 2,400 ซีโรไทป์

การทดสอบทางซีโรวิทยา เมื่อใช้กับเชื้อ *Salmonella* จะทำให้สามารถจัดสปีชีส์และซีโรไทป์ของเชื้อชนิดนี้ให้อยู่เป็นกลุ่ม ๆ (group) ได้ตามความคล้ายกันของโอแอนติเจนซึ่งมีมากกว่า 60 โอแอนติเจน โดยจัดเป็นกลุ่ม A (group A มีโอแอนติเจน 1, 2, 12) ถึง Z (ตรงกับ group 50) ตามด้วยกลุ่ม 51 ถึง 67 ตัวอย่างเช่น *S.* Hirschfeldii, *S.* Choleraesuis, *S.* Oranienburg และ *S.* Montevideo จัดอยู่ในกลุ่ม C_1 เนื่องจากมีโอแอนติเจน 6 และ 7 เหมือนกัน (ตารางที่ 8.1) และเมื่อทราบกลุ่มของเชื้อแล้วต้องทำการจำแนกเอชแอนติเจนต่อไปเพื่อจะได้ทราบชื่อซีโรไทป์ สำหรับเอชแอนติเจน *Salmonella* ส่วนใหญ่มี 2 เฟส (phase) คือ เฟส 1 (phase 1 หรือ specific phase) ใช้สัญลักษณ์เป็นอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก และเฟส 2 (phase 2 หรือ group phase) ใช้สัญลักษณ์เป็นตัวเลขอะราบิค เอชแอนติเจน เฟส 2 ใน *Salmonella* บางชนิดอาจตรวจไม่พบก็ได้เช่น *S.* Oranienburg, *S.* Typhi และ *S.* Gallinarum เป็นต้นเมื่อทดสอบทางซีโรวิทยาของ *S.* Choleraesuis อย่างสมบูรณ์แล้วจะได้โอแอนติเจนและเอชแอนติเจนเป็น 6, 7, c, 1, 5 (ตารางที่ 8.1) ฉะนั้นเชื้อ *Salmonella* กลุ่มย่อยนี้ก็คือซีโรวาร์ที่มีชื่อว่า Choleraesuis

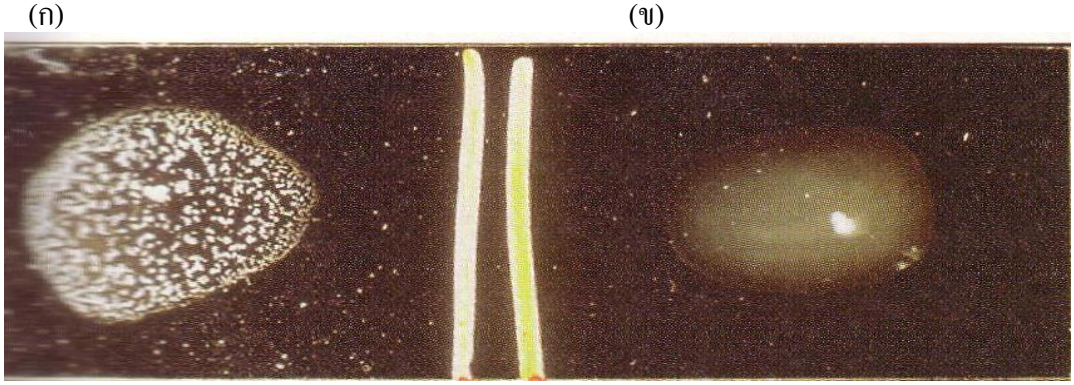
ในการทดสอบทางซีโรวิทยา ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของจุลินทรีย์กับแอนติซีรัมบนกระจกสไลด์ (slide agglutination) (รูปที่ 8.1) หรือในหลอดทดลอง (tube agglutination) (รูปที่ 8.2) โดยจะเขี่ยเชื้อแบคทีเรียมาใส่ลงในหยดแอนติซีรัม ซึ่งเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยแอนติบอดีสำหรับใช้ในการจัดจำแนกชนิดของ *Salmonella* ถ้าในแอนติซีรัมมีแอนติบอดีเฉพาะที่จะจับกับแอนติเจนนั้นๆ ก็จะเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม โดยเซลล์ของแบคทีเรียหรือแอนติเจนนั้นจะเชื่อมกับแอนติบอดีทำให้เกิดกลุ่มของเซลล์ที่มีแอนติบอดีเป็นตัวเชื่อม (รูปที่ 8.3) สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 8.1 โครงสร้างแอนติจีนิก (antigenic structure) ของ *Salmonella* บางชนิดที่พบบ่อย

กลุ่ม	ซีโรวาร์ (ซีโรไทป์)	โอแอนติเจน*	เอชแอนติเจน	
			เฟส 1	เฟส 2
A	*S.* Paratyphi A	*1*, 2, 12	A	(1, 5)
B	*S.* Schottmuelleri	*1*, 4, (5), 12	B	1, 2
	S. Typhimurium	*1*, 4, (5), 12	i	1, 2
C_1	*S.* Hirschfeldii	6, 7, (vi)	c	1, 5
	S. Choleraesuis	6, 7	(c)	1, 5
	S. Oranienburg	6, 7	m, t	-
	S. Montevideo	6, 7	g, m, s (p)	(1, 2, 7)
C_2	*S.* Newport	6, 8	e, h	1, 2
D	*S.* Typhi	9, 12, (Vi)	d	-
	S. Enteritidis	*1*, 9, 12	g, m	(1, 7)
	S. Gallinarum	*1*, 9, 12	-	-
E_1	*S.* Anatum	3, 10	e, h	1, 6

*ตัวเอียง หมายถึงเกี่ยวข้องกับ phage conversion; ในวงเล็บ ( ) หมายถึงอาจมี

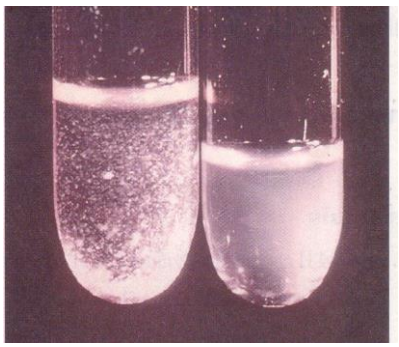
ที่มา: Jay และคณะ (2005)



รูปที่ 8.1 ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มบนสไลด์ (ก) ลักษณะปรากฏของปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก
(ข) ลักษณะปรากฏของปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ

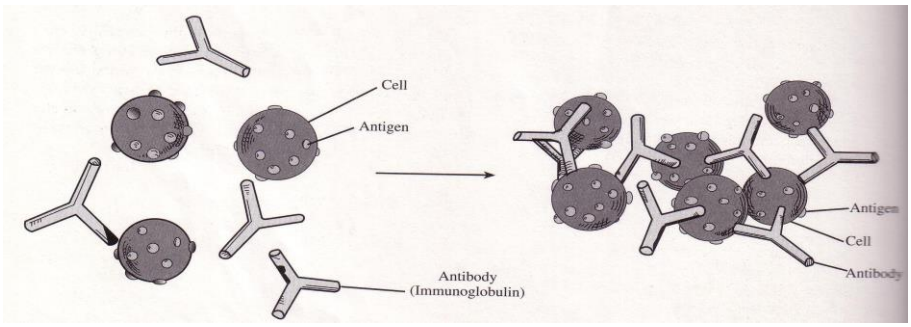
ที่มา: Wistreich (1997)

(ก) (ข)



รูปที่ 8.2 ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มในหลอดทดลอง (ก) ลักษณะปรากฏของปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก (ข) ลักษณะปรากฏของปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ

ที่มา: Wistreich (1997)



รูปที่ 8.3 ปฏิกริยาการเกาะกลุ่ม: แอนติเจนเชื่อมกับแอนติบอดีทำให้เกิดกลุ่มของเซลล์

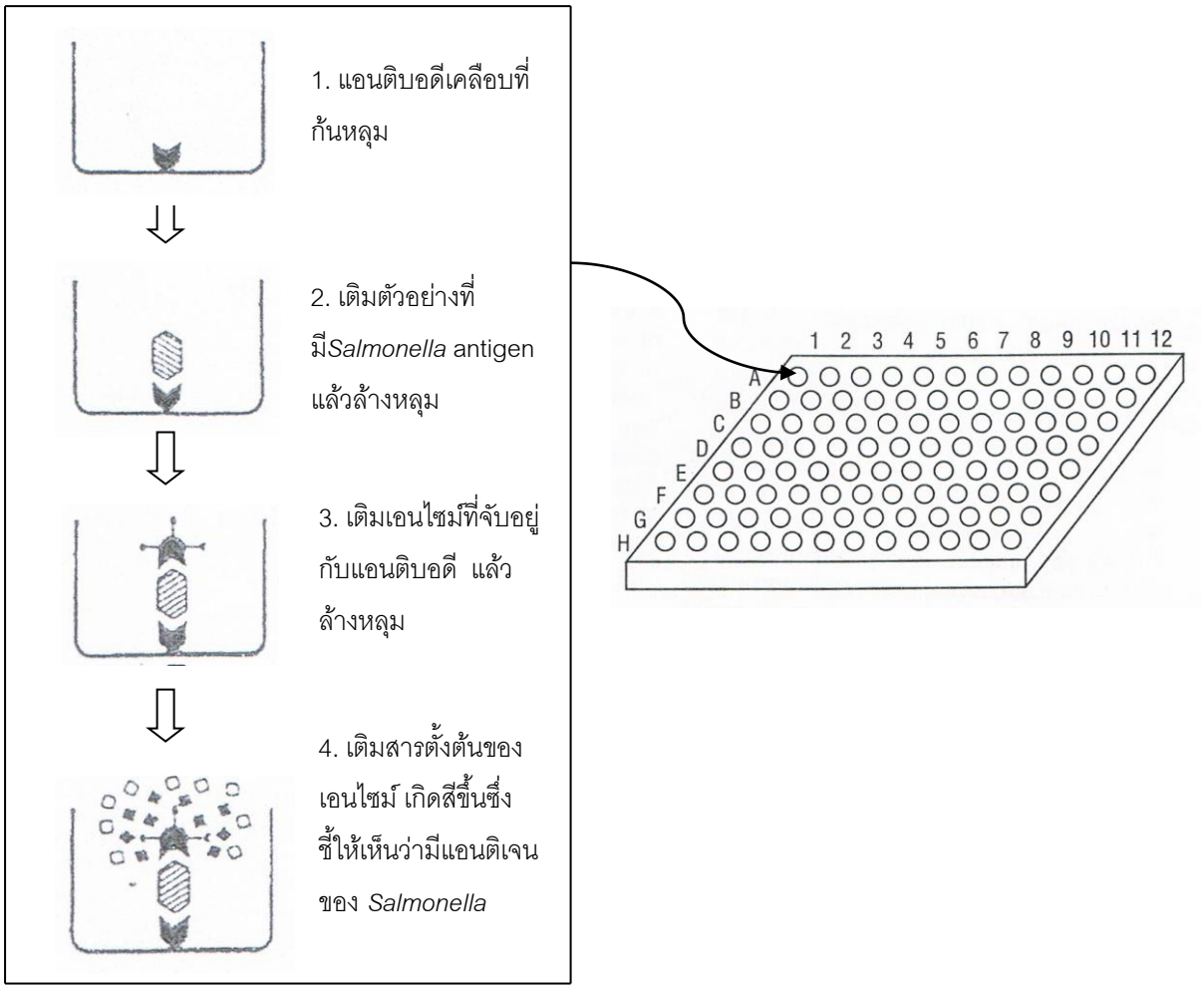
ที่มา: Wistreich (1997)

การตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธีที่รวดเร็ว

การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารเป็นปัญหาที่สำคัญในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลกซึ่งได้มีรายงานการพบ *Salmonella* ในอาหารหลายชนิดได้แก่ ไข่ สัตว์ปีก เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ช็อกโกแลต เครื่องเทศและนมผง เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ในอาหารเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคซาลโมเนลโลซีส ในการหาสาเหตุของการเกิดโรคระบาดจาก *Salmonella* จำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจหาเชื้อชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งมีความสำคัญต่อการจำกัดการเกิดโรค การตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธีมาตรฐาน (standard method หรือ conventional method) นั้นใช้แรงงานมากและทราบผลช้า (ประมาณ 5 วัน) ดังนั้นวิธีการตรวจหา *Salmonella* ที่รวดเร็วจึงได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน

เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหา *Salmonella* อย่างรวดเร็ว โดยมีการนำวิธีการด้านอิมมูโนวิทยามาใช้ วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีหนึ่งที่ประสบความสำเร็จในการใช้ตรวจหา *Salmonella* ในอาหาร ELISA เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและใช้กันมากในการตรวจหา *Salmonella* โดย Mattingly และ Gehle (1984) ได้ปรับปรุงวิธี Enzyme-Linked Immunoassay (EIA) ที่สามารถทำได้ภายในเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง วิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจหา *Salmonella* ที่มีในตัวอย่างน้อยกว่า 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรได้ เทคนิค sandwich ELISA นอกจากจะใช้ในการตรวจหา *Salmonella* แล้วยังใช้ ในการตรวจหา virulence factors ได้แก่สารพิษ (toxins) ต่างๆ ได้อีกด้วย ปัจจุบันมีผู้ผลิตชุดทดสอบชนิด sandwich ELISA ขึ้นจำหน่ายกันมากโดยมีการใช้ affinity-purified polyclonal หรือ monoclonal antibodies แต่ไม่มีชุดทดสอบใดเลยที่มีความจำเพาะกับ *Salmonella* อย่างสมบูรณ์ นักวิจัยได้มุ่งที่จะพัฒนาให้ชุดทดสอบมีความจำเพาะต่อสกุลของจุลินทรีย์โดยให้มีความจำเพาะที่แคบลงเพื่อตรวจหาแบคทีเรียชนิดนี้ เชื้อ *Salmonella* ซีโรไทป์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้แก่ *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis การตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลรวดเร็ว เป็นวิธีที่ใช้แอนติบอดีตรวจจับแอนติเจนเช่น lipopolysaccharide antigen และ porins ของ *Salmonella* Typhi ตัวอย่างชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีจำหน่าย เช่น ชุดตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี ELISA ของ TECRA ประเทศออสเตรเลีย และ Salmonella-Tek Organon Teknika ของบริษัท วิธีนี้สามารถตรวจหา *Salmonella* ที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหารที่ผ่านขั้นตอน enrichment แล้วซึ่งทำได้โดยเคลือบผิวของหลุมใน microtiter plate ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* เมื่อหยอดตัวอย่างลงในหลุมที่เคลือบด้วยแอนติบอดีนั้น แอนติเจนของ *Salmonella* ก็จะจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ในหลุมถ้าหากมี *Salmonella* ปะปนอยู่ จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีชนิดที่สอง (เช่น peroxidase conjugated anti-*Salmonella*) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่เชื่อมต่ออยู่กับเอนไซม์ที่เหมาะสมซึ่งได้แก่ เอนไซม์ horse radish peroxidase (ปกติจะเรียกสั้นๆ ว่า conjugate ซึ่งก็คือ แอนติบอดี IgG ที่จับอยู่กับเอนไซม์ horse radish peroxidase (IgG-HRP) ในสารละลายของ bovine serum albumin ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน สารละลาย phosphate buffer saline ที่ปราศจากเชื้อ แล้วจึงนำไปบ่ม แอนติบอดีที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์นี้จะจับกับสารประกอบเชิงซ้อนของแอนติเจนกับแอนติบอดีชนิดแรก (antigen – primary antibody complex) หลังจากบ่มจะขจัดแอนติบอดีอิสระซึ่งไม่ได้จับกับเอนไซม์ออกโดยการล้างแล้วเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์นั้นลงไป (เช่นสาร 3, 3′, 5, 5′-tetramethylbenzidine หรือ TMB substrate) จะเกิดปฏิกิริยาที่ให้สีขึ้นซึ่งแสดงว่าตัวอย่างนั้นมีเชื้อ *Salmonella* หลังจากเติมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยาเช่น สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 10 สามารถทราบผลได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืน

แสงชนิดพิเศษ (microplate reader) ที่สามารถ scan หลุมต่าง ๆ ของ microtiter plate ได้ วิธีการนี้เรียกว่า double antibody sandwich ELISA (รูปที่ 8.4)



รูปที่ 8.4 Double antibody sandwich ELISA สำหรับการตรวจหา *Salmonella*

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้ถึงวิธีการตรวจหาและแยกเชื้อ *Salmonella* ในอาหารด้วยวิธีพื้นฐานและวิธีที่รวดเร็ว
2. เพื่อเรียนรู้ถึงวิธีการทดสอบยืนยันเชื้อ *Salmonella* ทางชีวเคมีและทางซีโรวิทยา

ตอนที่ 1 การตรวจหา *Salmonella* โดยวิธี Conventional Method (Andrews และคณะ, 2014)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ ไข่ไก่สด เนื้อหมูสด เนื้อไก่สด และเนื้อวัวสด
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Lactose Broth (LB), Trypticase (Tryptic) Soy Broth (TSB), Tetrathionate (TT) broth, Selenite Cystine (SC) Broth, Rappaport-Vassiliadis (RV)

Medium, M-Broth, Bismuth Sulfite (BS) Agar, Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar, Hektoen Enteric (HE) Agar, Triple Sugar Iron (TSI) Agar, Lysine Iron Agar (LIA), Urea Broth, Lysine Decarboxylase Broth, Phenol Red Dulcitol Broth, Tryptone Broth, Potassium cyanide (KCN) Broth และ Malonate Broth

3. แอนติซีรัมที่ใช้ได้แก่ *Salmonella* polyvalent A-I antiserum, *Salmonella* group B antiserum, *Salmonella* group C antiserum, *Salmonella* group D antiserum, *Salmonella* group E antiserum, *Salmonella* group G antiserum และอื่น ๆ
4. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ซึ่งเตรียมได้โดยเจือจางแอลกอฮอล์ 100% ปริมาตร 700 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หรือเจือจางแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 700 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 950 มิลลิลิตร
5. สารละลาย iodine/potassium iodide ซึ่งเตรียมได้โดยละลาย potassium iodide 100 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 200-300 มิลลิลิตร เติมไอโอดีน 50 กรัมลงไปแล้วให้ความร้อนโดยคนสม่ำเสมอจนไอโอดีนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงถ้าไม่ใช้ทันที)
6. สารสำหรับใช้ในการทดสอบได้แก่ สารละลาย bromcresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และโคแวกซ์รีเอเจนท์ (Kovacs' reagent)
7. จานเพาะเชื้อ ปิเปต แผ่นสไลด์ ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ ปากคีบ กรรไกร และถุงพลาสติกปลอดเชื้อใช้ตีป่น
8. เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader) และเครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง (vortex mixer)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42-43°C และตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C

วิธีการทดลอง

I. การเตรียมตัวอย่างอาหารสำหรับการแยกเชื้อ *Salmonella*

1. ไข่แดงผง ไข่ขาวผง ไข่ทั้งฟองผง น้ำนม (หางนม น้ำนมที่มีไขมันนมร้อยละ 2 และบัตเตอร์มิลค์) ผงสำเร็จรูปสำหรับทำผลิตภัณฑ์ขนมอบ (prepared powdered mixes สำหรับทำเค้ก คุกกี้ โดนัทและขนมปัง) อาหารทารก และอาหารสำหรับผู้ป่วยที่ให้รับประทานทางปากและทางสายยางซึ่งมีไข่เป็นส่วนผสม

กรณีที่เป็นตัวอย่างแช่แข็ง ไม่ต้องทำให้ละลายก่อนวิเคราะห์ แต่ถ้าต้องทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้นเพื่อให้สามารถแบ่งตัวอย่างได้ ควรทำให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อลดการบาดเจ็บของ *Salmonella* และชะลอการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์อื่นที่เจริญแข่งขัน โดยทำที่อุณหภูมิ 45°C เป็น

เวลา 15 นาทีในอ่างน้ำที่มีการกวนหรือที่อุณหภูมิ 2-5°C ภายใน 18 ชั่วโมง จากนั้นชั่งตัวอย่าง 25 กรัมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในขวดฝาเกลียวปากกว้างขนาด 500 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างที่ไม่เป็นผง เติมอาหาร Lactose Broth (LB) ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 225 มิลลิลิตร แต่ถ้าตัวอย่างเป็นผง เติมอาหาร LB ลงไปเพียง 15 มิลลิลิตรก่อนแล้วจึงคนด้วยช้อนที่ปราศจากเชื้อแล้วค่อย ๆ เติมอาหาร LB ลงไปอีก 3 ส่วนคือ 10, 10 และ190 มิลลิลิตร (รวมทั้งหมดเป็น 225 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันดีจนกระทั่งตัวอย่างแขวนลอยอยู่โดยไม่จับเป็นก้อน ปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดยแกว่งขวดแล้ววัดค่า pH ด้วยกระดาษวัด pH ถ้าจำเป็นให้ปรับค่า pH ให้ได้ 6.8 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัลหรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัลที่ปลอดเชื้อ ปิดฝา ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปวัดค่า pH สุดท้าย คลายฝาเกลียวประมาณ ¼ รอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2. ไข่

2.1 ไข่ทั้งเปลือก (Shell eggs)

ไข่ที่เปลือกแตกไม่ควรนำมาใช้เป็นตัวอย่าง ขจัดสิ่งที่ติดมากับผิวเปลือกไข่ออก แล้วขจัดการปนเปื้อนที่ผิวเปลือกโดยชะล้างด้วยสารละลายที่ใช้ขจัดการปนเปื้อน (disinfection solution) ซึ่งก็คือสารละลายผสมของแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 (ethyl alcohol หรือ isopropyl alcohol) 3 ส่วนกับสารละลาย iodine/potassium iodide 1 ส่วน การเตรียมสารละลายผสมนี้ทำได้โดยเติมสารละลาย iodine/potassium iodide ปริมาตร 250 มิลลิลิตรกับสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 750 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันดี แช่ไข่ใน disinfection solution นี้เป็นเวลา 10 วินาที นำไข่ออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง แต่ละตัวอย่างควรประกอบด้วยไข่ 20 ฟองจากทั้งหมด 50 ตัวอย่างต่อ 1 โรงเรือนที่เลี้ยงไก่ไข่ ทำให้เปลือกไข่แตกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 4 ลิตรหรือภาชนะอื่นที่เหมาะสมด้วยมือที่สวมถุงมือ (เปลี่ยนถุงมือเมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง) ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยอุปกรณ์ปลอดเชื้อจนกระทั่งไข่แดงผสมเข้ากันดีกับไข่ขาว ทำการ preenrich ตัวอย่างไข่ 20 ฟองด้วยอาหารเหลว Trypticase Soy Broth (TSB ที่มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง) ปริมาตร 2 ลิตรผสมให้เข้ากันด้วยอุปกรณ์ปลอดเชื้อ ปิดภาชนะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีการในข้อ II

2.2 ไข่เหลวทั้งฟอง (Liquid whole eggs)

รวมตัวอย่างไข่ที่จะทดสอบทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตรเข้าด้วยกันจะได้ตัวอย่างไข่ที่รวมกัน (composite sample) ปริมาตรทั้งหมด 375 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 96 ± 2 ชั่วโมง แล้วเติม TSB ที่มีเฟอรัสซัลเฟตปริมาตร 3,375 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่ง วัดค่า pH ด้วย

กระดาษวัดพีเอช ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ± 0.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีการในข้อ II

2.3 ไข่ต้ม (ไข่ไก่ ไข่เป็ด และอื่นๆ)

กรณีที่มีเปลือกอยู่ ให้เอาเปลือกออกด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ ชั่งไข่ขาวและไข่แดงที่บดผสมกันแล้ว 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร เติมอาหาร TSB ที่ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟตปริมาตร 225 มิลลิลิตร แกว่งภาชนะเพื่อผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีการในข้อ II

3. เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อเทียม ผลพลอยได้จากเนื้อสัตว์ ปลาป่น เนื้อป่น และกระดูกป่น

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อเติมอาหาร LB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที ถ่ายส่วนผสมที่ตีป่นแล้วลงในขวดปากกว้างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 500 มิลลิลิตรหรือภาชนะอื่นที่เหมาะสมแล้วปิดฝาขวดให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที (สำหรับตัวอย่างอาหารที่เป็นผงหรือบดละเอียดมาแล้ว อาจไม่จำเป็นต้องตีป่น) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีการในข้อ II

4. กัวกัม (guar gum)

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ลงในภาชนะปลอดเชื้อ เตรียมสารละลายเซลลูเลส (cellulase) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (เติมเซลลูเลส 1 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 2-5°C ได้ 2 สัปดาห์) ใส่อาหาร LB ปริมาตร 225 มิลลิลิตรที่ผสมกับสารละลายเซลลูเลส 2.25 มิลลิลิตร ในขวดฝาเกลียวปากกว้างขนาด 500 มิลลิลิตร ขณะที่คนอย่างแรงด้วย magnetic stirrer เทตัวอย่าง 25 กรัมผ่านกรวยแก้วปราศจากเชื้อลงไปในขวดอาหาร LB นั้น ปิดฝา ตั้งภาชนะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที คลายฝา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงไม่ต้องปรับ pH ทำการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีการในข้อ II

5. น้ำส้มพาสเจอร์ไรส์และไม่พาสเจอร์ไรส์ น้ำแอปเปิ้ลและแอปเปิ้ลไซเดอร์พาสเจอร์ไรส์

เติมตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ลงในขวดฝาเกลียวปากกว้างขนาด 500 มิลลิลิตรที่มี Universal Preenrichment Broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แกว่งภาชนะ ไม่ต้องปรับ pH ตั้งภาชนะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที คลายฝาขวดแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อ *Salmonella* ตามวิธีการของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้อย

ตารางที่ 8.2 ชนิดของ pre-enrichment broth ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อาหารชนิดต่างๆ

ชนิดของอาหารที่วิเคราะห์	Pre-enrichment broth	การเตรียมตัวอย่าง
ไข่ผง ส่วนผสมสำเร็จรูปสำหรับทำเบเกอรี่ อาหารทารก อาหารผู้ป่วยที่มีไข่เป็นส่วนผสม	Lactose Broth	ผสมให้เข้ากัน
ไข่ทั้งเปลือก ไข่เหลว ไข่ต้ม (ไข่ไก่ ไข่เป็ด และอื่นๆ)	Trypticase Soy Broth ที่เติมเฟอรัสซัลเฟต Trypticase Soy Broth ที่ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต	ผสมให้เข้ากัน ผสมให้เข้ากัน
นมผงขาดมันเนย นมผงพร้อมมันเนย	Brilliant Green Water (น้ำกลั่น 1 ลิตรเติมสารละลายบรินเลียนซ์กรีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร)	ผสมให้เข้ากัน
เคซีน - lactic casein - rennet casein - sodium caseinate	 Universal Preenrichment Broth Lactose Broth Lactose Broth	 ผสมให้เข้ากัน ผสมให้เข้ากัน ผสมให้เข้ากัน
แป้งถั่วเหลือง (soy flour)	Lactose Broth	ผสมให้เข้ากัน
พาสต้า (noodles, macaroni, spaghetti) egg rolls เนยแข็ง โด (dough) สลัด (ไก่ ไข่ แฮม ปลาทูน่า) ผักและผลไม้สด แห้ง และแช่แข็ง สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง และปลา	Lactose Broth	ตีป่นให้เข้ากัน
ยีสต์แห้ง (dried yeast,active and inactive)	Trypticase Soy Broth	ผสมให้เข้ากัน
ส่วนผสมสำหรับใส่หน้าขนม (Frosting and topping mixes)	Nutrient Broth	ผสมให้เข้ากัน
พริกไทยดำ พริกไทยขาว ลูกผักชี ผงพริก ยี่หร่า (cumin) โรสแมรี่ (rosemary) เมล็ดงา (sesame seed) ไทม์ (thyme) และผักแห้ง	Trypticase Soy Broth	ผสมให้เข้ากัน

ที่มา: Andrews และ Hammack (2005)

ตารางที่ 8.2 ชนิดของ pre-enrichment broth ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของอาหารที่วิเคราะห์	Pre-enrichment broth	การเตรียมตัวอย่าง
หัวหอมชนิดผงและเกล็ด กระเทียมชนิดผงและเกล็ด	Trypticase Soy Broth ที่มีสาร K_2SO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5	ผสมให้เข้ากัน
ออร์สไปรส์ (allspice) ออริกาโน (oregano) และ อบเชย (cinnamon)	Trypticase Soy Broth	ผสมให้เข้ากัน โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเหลว เท่ากับ 1:100
กานพลู	Trypticase Soy Broth	ผสมให้เข้ากัน โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเหลว เท่ากับ 1:1000
ลูกกวาดและสารเคลือบ (รวมทั้งช็อกโกแลต)	นมผงขาดมันเนยคืนรูปที่เติมสารละลายบรินเลียนซ์กรีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.45 มิลลิลิตร	ตีป่นให้เข้ากัน
มะพร้าว	Lactose Broth (เติม steamed tergitol anionic 7 หรือ steamed triton X-100)	ผสมให้เข้ากัน
เจลาติน	Lactose Broth (เติมสารละลายพาเพน (papain) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร)	ผสมให้เข้ากัน
เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อเทียม ผลพลอยได้จากเนื้อ สารที่ได้จากเนื้อ ปลาป่น เนื้อป่นและกระดูกป่น	Trypticase Soy Broth	ตีป่นให้เข้ากัน ถ้าเป็นผงอาจไม่ต้องตีป่น

ที่มา: Andrews และ Hammack (2005)

6. ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

เมื่อเก็บตัวอย่างโดยการถูพื้นผิวด้วยไม้พันสำลีปลอดเชื้อแล้วใส่ไม้พันสำลีนี้ลงในถุงปลอดเชื้อที่มี Dey-Engley broth (สูตรการเตรียม ดูใน BAM online) ปริมาตรเพียงพอ ขนส่งโดยบรรจุไว้ในกล่องโฟมหรือกระติกน้ำแข็งที่บรรจุแผ่นเจลแช่แข็งเพื่อทำให้ตัวอย่างเย็น แต่ไม่ถูกแช่แข็ง ถ้าไม่วิเคราะห์ตัวอย่างทันทีควรแช่เย็นไว้ที่ที่อุณหภูมิ 4 ± 2°C ควรวิเคราะห์ภายใน 48 ± 2 ชั่วโมง

ใส่ไม้พันสำลีที่จะวิเคราะห์ลงในขวดบรรจุอาหาร LB ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 225 มิลลิลิตร แกว่งภาชนะ ปิดฝา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่ง วัดค่า pH ด้วยกระดาษวัดพีเอช ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ± 0.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีการในข้อ II

7. อาหารชนิดอื่นๆ

การเตรียมตัวอย่างอาหารชนิดอื่น ๆ ทำตามวิธีการใน Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online (www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm)

II. การตรวจหาและแยกเชื้อ *Salmonella*

1. ปิดฝาขวดตัวอย่างอาหารให้แน่น และเขย่าตัวอย่างอาหารที่บ่มแล้ว

   กัวกัม: ปิเปตตัวอย่างอาหารที่บ่มแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว SC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปิเปตตัวอย่างอาหารเดิมอีก 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว TT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

   อาหารชนิดอื่น: ปิเปตตัวอย่างอาหารที่บ่มแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว RV ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและปิเปตอีก 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว TT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. บ่ม Selective enrichment media ในข้อ 1 ดังนี้

   อาหารที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนมาก: บ่มอาหารเหลว RV ที่อุณหภูมิ 42 ± 0.2°C เป็นเวลา 24± 2 ชั่วโมงและบ่มอาหารเหลว TT ที่อุณหภูมิ 43 ± 0.2°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

   อาหารที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อย: บ่มอาหารเหลว RV ที่อุณหภูมิ 42 ± 0.2°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงและบ่มอาหารเหลว TT ที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

   กัวกัม: บ่มอาหารเหลว SC และ TT ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

3. ผสมอาหารที่บ่มแล้วในหลอดจากข้อ 2 ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ใช้ลูปปราศจากเชื้อแตะอาหาร TT ที่บ่มแล้ว (10 ไมโครลิตร) ลากลงบนอาหาร selective agar ที่มีผิวหน้าแห้ง 3 ชนิดด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้แก่ อาหาร Bismuth Sulfite (BS) Agar (ควรเตรียมก่อนใช้ 1 วันแล้วเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้) อาหาร Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)

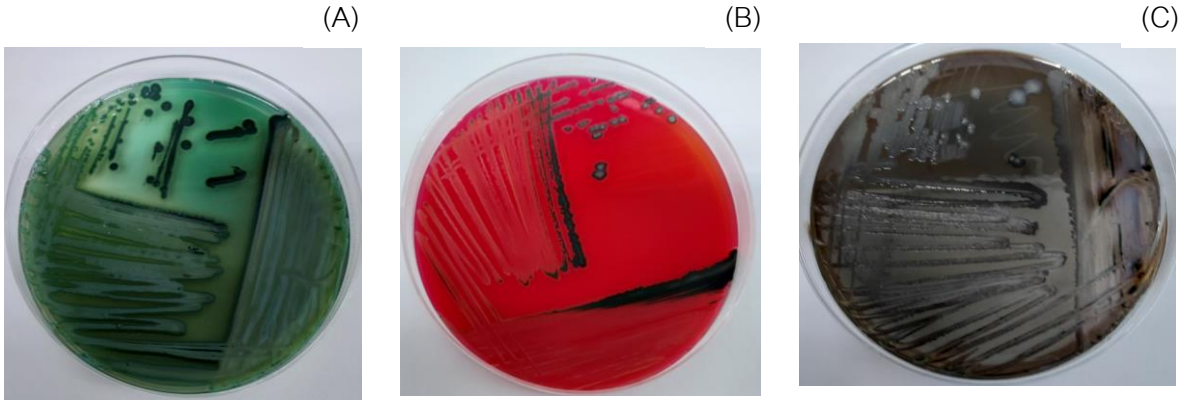
Agar และอาหาร Hektoen Enteric (HE) Agar สำหรับอาหาร RV หรือ SC ที่บ่มแล้วทำเช่นเดียวกันกับอาหาร TT นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

4. ตรวจดูโคโลนีบนอาหาร selective agar ทั้ง 3 ชนิดว่า มีโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *Salmonella* หรือไม่ โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย 2 โคโลนีหรือมากกว่า 2 โคโลนีถ้าพบลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Salmonella* (typical *Salmonella* colony) บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด เป็นดังนี้

   ก) Hektoen Enteric (HE) Agar โคโลนีสีน้ำเงินเขียวหรือน้ำเงินที่มีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง *Salmonella* อาจสร้างโคโลนีที่มีจุดสีดำขนาดใหญ่ตรงกลางเรียบมันวาวหรืออาจมีสีดำเกือบทั้งโคโลนี (รูปที่ 8.5 A)

   ข) Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar โคโลนีสีชมพูที่มีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง *Salmonella* อาจสร้างโคโลนีที่มีจุดสีดำขนาดใหญ่ตรงกลางเรียบมันวาวหรืออาจมีสีดำเกือบทั้งโคโลนี (รูปที่ 8.5 B)

   ค) Bismuth Sulfite (BS) Agar โคโลนีสีน้ำตาล เทาหรือดำ บางครั้งมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) บริเวณผิวของอาหารโดยรอบมักมีสีน้ำตาลตอนแรกและอาจเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อบ่มนานขึ้น (เรียกว่า halo effect) (รูปที่ 8.5 C)



รูปที่ 8.5 Typical colony ของ *Salmonella* Welterreden บนอาหาร HE (รูป A) XLD (รูป B) และBS (รูป C)

ในกรณีที่ไม่พบลักษณะที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *Salmonella* ให้เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ลักษณะของโคโลนี *Salmonella* (atypical *Salmonella* colony) บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

   ง) HE and XLD Agars โคโลนีที่มีลักษณะอื่นที่ไม่ใช่ลักษณะของโคโลนี *Salmonella* จะมีสีเหลืองโดยมีหรือไม่มีจุดดำบน HE และ XLD ถ้าไม่พบลักษณะที่น่าจะเป็นโคโลนีของเชื้อ

Salmonella บน HE หรือ XLD หลังจากบ่ม 24 ± 2 ชั่วโมง ให้เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะอื่นมาจำนวน 2 โคโลนีหรือมากกว่า 2 โคโลนี (เช่น โคโลนีสีเหลืองที่มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางบน HE หรือ XLD)

จ) BS Agar โคโลนีที่มีลักษณะอื่นที่ไม่ใช่ลักษณะของโคโลนี *Salmonella* จะมีสีเขียวและอาหารรอบ ๆ จะมีสีคล้ำเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ถ้าไม่พบลักษณะที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *Salmonella* บน BSA หลังจากบ่ม 24 ± 2 ชั่วโมง ให้บ่มต่อไปอีก 24 ± 2 ชั่วโมง แต่ถ้าพบลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Salmonella* ให้เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย 2 โคโลนีหรือมากกว่า 2 โคโลนี ถ้ายังไม่พบอีกให้เขี่ยเชื้อจากลักษณะอื่นมา (เช่น โคโลนีสีเขียวและโดยรอบโคโลนีมีสีดำเข้มเล็กน้อยหรือไม่มีลักษณะนี้)

5. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะตรงกลางโคโลนีเบา ๆ ถ่ายเชื้อลงใน Triple Sugar Iron (TSI) slant โดยการลาก (streak) ที่ผิวหน้าของ slant และแทง (stab) ลงไปจนถึงก้นหลอด จากนั้นใช้เข็มอัน เดิมไม่ต้องเผาไฟ แทงลงในหลอดอาหาร Lysine Iron Agar (LIA) ถึงก้นหลอด (butt) 2 ครั้งแล้วลากที่ส่วนของผิวหน้าลาดเอียง (slant) เนื่องจากปฏิกิริยา lysine decarboxylation เป็นปฏิกิริยาที่เกิดในสภาพไร้อากาศอย่างแท้จริง อาหาร LIA slant จะต้องมีส่วนของ butt ที่ลึก (4 ซม.) เก็บจานอาหารที่มีโคโลนีที่เขี่ยเชื้อแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 5-8°C

(หมายเหตุ: ในห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจใช้ Lysine Indole Motility (LIM) medium ในการทดสอบ แทนอาหาร LIA คือ หลังจากใส่เชื้อในอาหาร TSI ตามวิธีดังกล่าวแล้วจะใช้เข็มอันเดิมไม่ต้องเผาไฟ แทง (stab) ลงในหลอดอาหาร LIM แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันกับอาหาร TSI)

6. นำหลอดอาหาร TSI และ LIA ที่ถ่ายเชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ปิดฝาหลอดไว้อย่างหลวม ๆ เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่มีอากาศขณะบ่มเพื่อป้องกันการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มากเกินไป ปกติเชื้อ *Salmonella* ที่เพาะเลี้ยงไว้ในหลอดอาหาร TSI จะทำให้ส่วนของบริเวณที่ลาดเอียง (slant) เป็นด่าง (alkaline) คือมีสีแดง และส่วนของก้นหลอด (butt) เป็นกรด (acid) คือมีสีเหลือง โดยมีหรือไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ถ้าอาหารมีสีดำแสดงว่ามีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์) ส่วนในหลอดอาหาร LIA เชื้อ *Salmonella* โดยทั่วไปจะทำให้เกิด alkaline reaction (เกิดสีม่วง) ที่ส่วนของ butt แต่ถ้าส่วนของ butt เกิดสีเหลืองแสดงว่าเกิด acidic reaction (ให้ผลลบ) *Salmonella* ส่วนใหญ่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหาร LIA เชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* บางชนิดให้ปฏิกิริยาสีแดงอิฐที่ส่วนของ LIA slant (รูปที่ 8.6)

ควรเก็บเชื้อทั้งหมดที่ให้สีม่วงที่ส่วนของก้นหลอด (alkaline butt) ในอาหาร LIA ไว้ (โดยไม่ต้องคำนึงปฏิกิริยาใน TSI) เนื่องจากน่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* แล้วนำมาทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และซีโรวิทยา (serological test) ต่อไป ส่วนเชื้อที่ทำให้ส่วนของก้นหลอด

ของอาหาร LIA เป็นกรด (acid butt) และทำให้ส่วนของบริเวณที่ลาดเอียงในหลอดอาหาร TSI มีสีแดง (เป็นด่าง หรือ alkaline slant) และส่วนของก้นหลอดอาหาร TSI เป็นกรดคือมีสีเหลือง (acid butt) มีโอกาสเป็นเชื้อ *Salmonella* ด้วยเช่นกัน ควรนำมาทดสอบทางชีวเคมีและซีโรวิทยาต่อไป ส่วนเชื้อที่ทำให้ส่วนของก้นหลอดของอาหาร LIA เป็นกรด และในหลอดอาหาร TSI ทำให้ทั้งส่วนของบริเวณที่ลาดเอียงมีสีเหลือง (acid slant) และส่วนของก้นหลอดมีสีเหลืองด้วย (acid butt) ทิ้งไปได้เพราะไม่น่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* แต่ถ้าผลการทดสอบในอาหาร TSI ไม่พบเชื้อที่มีลักษณะที่น่าจะเป็น *Salmonella* ให้เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่น่าสงสัย (โคโลนีลักษณะอื่น) ที่ขึ้นบนจานอาหาร Selective media มาถ่ายลงในอาหาร TSI และ LIA ถ้าพบลักษณะที่น่าจะใช่ *Salmonella* เก็บหลอดอาหาร TSI ไว้ทดสอบต่อไป

(<u>หมายเหตุ</u>: ในกรณีที่ใช้อาหาร LIM ในการทดสอบตรวจผลดังนี้คือ ในอาหาร LIM จะตรวจดูสีของอาหารก่อนเพื่อดูผลของการทดสอบไลซีน (lysine) *Salmonella* ส่วนใหญ่จะให้ผลเป็นบวก คืออาหารมีสีม่วง แต่ถ้าให้ผลลบอาหารจะมีสีเหลือง จากนั้นตรวจดูการเคลื่อนที่ (motility) *Salmonella* ส่วนใหญ่มีแฟลกเจลลาจะให้ผลบวกซึ่งสังเกตจากความขุ่นของอาหารรอบรอยแทงยกเว้น *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum ซึ่งไม่มีแฟลกเจลลาจะให้ผลการเคลื่อนที่เป็นลบ อาหารจะไม่ขุ่น จากนั้นทดสอบอินโดล (indole) โดยเปิดฝาหลอดทดลองแล้วหยดโคแวกซ์รีเอเจนท์ปริมาตร 0.2-0.3 มิลลิลิตร (3-4 หยด) ลงไปบนผิวหน้าของอาหาร LIM ถ้าเป็น *Salmonella* จะต้องให้ผลลบคือเกิดสีเหลือง ถ้าให้ผลบวกจะเกิดสีแดง)

รูปที่ 8.6 ผลการทดสอบที่คาดว่าน่าจะใช่เชื้อ *Salmonella* ในอาหาร TSI และ LIA: ฝาหลอดสีขาวคือ TSI และฝาหลอดสีชมพูคือ LIA

ทำการทดสอบทางชีวเคมีและการจำแนกชนิดโดยวิธีทางซีโรวิทยา (biochemical and serological tests) จะทำกับเชื้อดังต่อไปนี้:

a) เชื้อในหลอดอาหาร TSI ทั้งหมด 3 หลอด ที่คาดว่าน่าจะใช่ *Salmonella* (3 presumptive TSI cultures) ซึ่งเขี่ยเชื้อมาจากอาหาร selective agar ที่มีเชื้อที่เขี่ยมาจากหลอดอาหาร RV medium และอีก 3 presumptive TSI cultures ซึ่งเขี่ยเชื้อมาจากอาหาร selective agar ที่มีเชื้อที่เขี่ยมาจากหลอดอาหาร TT medium

b) ทดสอบเชื้อจำนวนอย่างน้อย 6 TSI cultures สำหรับตัวอย่าง 25 กรัมต่อ 1 ตัวอย่างที่จะต้องวิเคราะห์หรือ 375 กรัมต่อ 1 ตัวอย่างรวมกัน (composite sample)

หมายเหตุ: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

III **การจำแนกชนิดของ *Salmonella***

1. เชื้อผสม (mixed culture)

ถ้าไม่มั่นใจว่าเชื้อจากหลอดอาหาร TSI เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ปฏิบัติดังนี้คือ เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหาร TSI ซึ่งดูไม่น่าจะเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (มีเชื้อหลายชนิดผสมกัน) ลากลงบนผิวหน้าอาหาร MacConkey agar, HE agar และ XLD agar

ก) MacConkey agar โคโลนีที่น่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* จะไม่มีสี บางครั้งมีสีดำตรงกลางโคโลนี บางครั้งจะมีปริเวณของ precipitated bile ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียนี้

ข) HE agar โคโลนีที่น่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* ดูในข้อ II (4ก)

ค) XLD agar โคโลนีที่น่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* ดูในข้อ II (4ข)

2. เชื้อบริสุทธิ์

ถ้ามั่นใจแล้วว่าเชื้อจากหลอดอาหาร TSI เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ทำการทดสอบต่อไปตามวิธีการดังต่อไปนี้

ก) urease test (conventional)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI แต่ละหลอด (ที่ให้ผลบวกคืออาจเป็นเชื้อ *Salmonella*) ลงในหลอดอาหาร Urea Broth เนื่องจากบางครั้งอาหาร Urea Broth ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วง-แดง (ให้ผลบวก) เมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้นจึงควรใช้หลอดอาหาร Urea Broth ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเป็นหลอดควบคุมด้วย นำหลอดอาหาร Urea Broth ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

ข) Optional urease test (วิธีที่รวดเร็ว)

ถ้าไม่ทำตามวิธีดั้งเดิมในข้อ ก อาจทำโดยใช้วิธีที่รวดเร็วก็ได้ซึ่งทำได้โดย ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI 1 ลูปเต็ม แต่ละหลอด (ที่ให้ผลบวกคืออาจเป็นเชื้อ

Salmonella) ลงในหลอดอาหาร Rapid Urea Broth นำหลอดอาหาร Rapid Urea Broth ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หลอดที่ให้ผลบวก คัดทิ้งทั้งหมด เอาเฉพาะเชื้อจากหลอดอาหาร TSI ที่ให้ผล urease test เป็นลบ คือสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงไปทดสอบขั้นต่อไป

3. **การทดสอบเชื้อที่มีโอกาสจะเป็นเชื้อ *Salmonella* (ให้ผลการทดสอบยูรีเอสเป็นลบ)**
   Lysine Decarboxylase Broth: ถ้าการทดสอบในอาหาร LIA ให้ผลเป็นที่น่าพอใจก็ไม่จำเป็นต้องทำซ้ำ แต่ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในอาหาร LIA ให้ผลไม่ชัดเจน ทำการทดสอบต่อไปใน Lysine Decarboxylase Broth เพื่อตรวจหาว่าเชื้อสร้าง lysine decarboxylase หรือไม่ การทดสอบนี้ทำได้โดยถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI ลงในหลอดอาหารเหลว Lysine Decarboxylase Broth ปิดจุกแน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ตรวจผลทุกๆ 24 ชั่วโมง *Salmonella* จะทำให้เกิดสีม่วง (ให้ผลบวก) ทั่วทั้งหลอดอาหาร (alkaline reaction) แต่ถ้าให้ผลลบจะเกิดสีเหลืองทั่วทั้งหลอดอาหาร แต่ถ้าอาหารมีสีที่ไม่ชัดเจนคือไม่ให้ทั้งสีม่วงหรือเหลือง ให้หยดสารละลาย bromcresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ลงไป 2-3 หยด และอ่านผลอีกครั้ง

ก) Phenol red dulcitol broth หรือ purple broth base ที่เติม dulcitol ร้อยละ 0.5 การทดสอบนี้ทำได้โดยถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI ลงในหลอดอาหาร Phenol red dulcitol broth ปิดฝาอย่างหลวมๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ตรวจผลหลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลบวกซึ่งจะทราบได้จากการเกิดฟองแก๊สในหลอดดักแก๊สและอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (พีเอชเป็นกรด) ถ้าให้ผลลบจะไม่เกิดการสร้างแก๊สและสีของอาหารทั่วทั้งหลอดเป็นสีแดง (ถ้าใช้ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์) หรือเป็นสีม่วง (ถ้าใช้ bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์)

ข) Tryptone (หรือ Tryptophane) Broth การทดสอบนี้ทำได้โดยถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI ลงในหลอดอาหาร Tryptone Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วดำเนินการต่อดังนี้:

1. Potassium cyanide (KCN) Broth ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากอาหาร Tryptone Broth ที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร KCN Broth ให้ความร้อนที่ขอบจุกคอร์กที่เคลือบด้วยแวกซ์จนปิดสนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ตรวจผลหลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง ถ้าพบการเจริญ (อาหารขุ่น) แสดงว่าให้ผลบวก *Salmonella* ส่วนใหญ่ไม่เจริญในอาหารเหลวชนิดนี้ (อาหารไม่ขุ่น)

2. Malonate Broth ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากอาหาร Tryptone Broth ที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร เนื่องจากบางครั้งอาหาร Malonate Broth ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (ให้

ผลบวก) เมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้นจึงควรใช้หลอดอาหาร Malonate Broth ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเป็นหลอดควบคุมด้วย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ตรวจผลหลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลลบ (อาหารมีสีเขียวไม่เปลี่ยนแปลง)

3. <u>การทดสอบอินโดล (Indole test)</u> ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจากอาหาร Tryptone Broth ที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเปล่า จากนั้นเติม Kovacs' reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลลบคือไม่เกิดสีแดงเข้มที่ผิวของอาหารเหลว แต่ถ้าเกิดสีส้มหรือชมพูโดยทันทีให้บันทึกผลเป็นบวกลบ (±) และถ้าให้ผลบวกกับการทดสอบอินโดลสรุปว่าไม่ใช่เชื้อ *Salmonella*

4. <u>Serological polyvalent flagella (H) test</u> ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI agar slant ที่ทดสอบแล้วว่าให้ผล urease test เป็นลบ ลงในอาหารเหลวชนิดใดชนิดหนึ่งดังนี้ 1) BHI Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จนกระทั่งสังเกตเห็นได้ว่ามีการเจริญเกิดขึ้น (เพื่อที่จะทำการทดสอบในวันเดียวกัน) หรือ 2) Trypticase Soy Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24± 2 ชั่วโมง (เพื่อที่จะทำการทดสอบในวันถัดไป) เติมสารละลายเกลือที่เติมฟอร์มาลีน (formalinized physiological saline solution) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปในหลอดอาหารเหลวที่บ่มแล้ว ในการทดสอบทำได้ดังนี้ ปิเปต *Salmonella* polyvalent flagella (H) antiserum ที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองสำหรับทำ serological test ขนาด 10 × 75 มิลลิเมตรหรือ 13 × 100 มิลลิเมตร จากนั้นเติม antigen (อาหารเหลวที่ผ่านการบ่มและเติมฟอร์มาลีนแล้ว) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการทดสอบชุดควบคุมโดยเติม formalinized physiological saline solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเข้ากับ antigen ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 48-50°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ สังเกตทุกๆ 15 นาที อ่านผลครั้งสุดท้ายเมื่อครบ 1 ชั่วโมงดังนี้

<u>ถ้าให้ผลบวก (positive)</u> คือเกิด agglutination (เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีคือ เกิดเกล็ดตะกอนขึ้นมากมายในหลอดเชื้อที่ทดสอบ แต่ไม่เกิดเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มในหลอดควบคุม

<u>ถ้าให้ผลลบ (negative)</u> คือไม่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มทั้งในหลอดเชื้อที่ทดสอบและในหลอดควบคุม

<u>ไม่จำเพาะ(nonspecific)</u> คือเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มทั้งในหลอดเชื้อที่ทดสอบและในหลอดควบคุม ทดสอบเชื้อที่ให้ผลลักษณะนี้ด้วย Spicer-Edwards antisera

(<u>หมายเหตุ</u>: ถ้าเชื้อที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับการทดสอบอินโดล ให้ผลลบกับ polyvalent flagella (H) test หรือให้ผลบวกกับ KCN test และให้ผลลบกับ lysine decarboxylase test ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* ทิ้งไปได้เลย)

5. Serological somatic (O) test for *Salmonella*

a) Polyvalent somatic (O) test หยด *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum หรือแอนติซีรัม Polyvalent A – I บนกระจกสไลด์ 1 หยด และเขี่ยเชื้อจากหลอด TSI slant มาทดสอบกับแอนติซีรัมนี้โดยกวนให้เข้ากันดีกับแอนติซีรัม จากนั้นเอียงสไลด์ไปมาหลายๆ ครั้ง สังเกตปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มที่เกิดขึ้นจะเห็นภายในเวลา 30 – 60 วินาที เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้แอนติซีรัมรวมหลายชนิดจึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น *Salmonella* กลุ่มใด อาจเป็นกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งระหว่างกลุ่ม A ถึงกลุ่ม I ในกรณีที่ให้ผลบวกกับ Polyvalent A – I จากนั้นทดสอบหากลุ่ม (group) ในข้อถัดไป

b) Somatic (O) group test ทำการทดสอบกับแอนติซีรัมแต่ละกลุ่ม (*Salmonella* somatic group (O) antisera เช่น แอนติซีรัมที่เฉพาะต่อกลุ่ม A, B, C_1, C_2, C_3, D_1, D_2, E_1, E_2, E_3, E_4, F, G, H, I, Vi และอื่นๆ ถ้าให้ผลบวกหรือเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับแอนติซีรัมกลุ่มใด รายงานว่าเป็น *Salmonella* ในกลุ่มนั้น

(หมายเหตุ: ถ้าหากต้องการทราบชื่อซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* ต้องทดสอบกับเอชแอนติซีรัมต่อไปซึ่งต้องใช้เอชแอนซีรัมหลายชนิด หรืออาจจะส่งเชื้อไปส่งไปทดสอบต่อได้ที่ศูนย์ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี ก็ได้เพื่อตรวจรายละเอียดว่าเป็น *Salmonella* ซีโรไทป์ใด ทางศูนย์จะทดสอบทางชีวเคมี ทดสอบหากลุ่มของเชื้อ *Salmonella* (O antigen) อีกครั้งและทดสอบหาเอชแอนติเจนของ*Salmonella* และนำผลของการทดสอบทั้งโอแอนติเจนและเอชแอนติเจนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางของ antigenic formular ของ *Salmonella* ทำให้ทราบชื่อซีโรไทป์ของ *Salmonella* นั้น)

4. การทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม

การจัดจำแนกว่าเชื้อที่นำมาทดสอบเป็น *Salmonella* หรือไม่จะต้องให้ผลการทดสอบตรงตามปฏิกิริยาของเชื้อ *Salmonella* ข้อ 1-11 ในตารางที่ 8.3 ถ้าหากตรวจพบว่าเชื้อจากหลอดอาหาร TSI เป็นเชื้อ *Salmonella* ก็ไม่จำเป็นต้องทดสอบต่อ แต่ถ้าพบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับ *Salmonella* flagella (H) test แต่สมบัติทางชีวเคมีไม่ตรงกับสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella* ควรนำเชื้อนั้นมาแยกให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบใหม่ตั้งแต่การทำ urease test

ทำการทดสอบทางชีวเคมีอื่น ๆ เพิ่มเติมกับเชื้อที่ให้ผลการทดสอบไม่ตรงกับปฏิกิริยาของเชื้อ *Salmonella* ในข้อ 1-11 ตารางที่ 8.3 ดังนี้

ก) Phenol Red Lactose Broth หรือ Purple Lactose Broth

ถ่ายเชื้อปริมาณเล็กน้อยจากหลอด TSI slant (ซึ่งยังจัดจำแนกไม่ได้) ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงในอาหาร Phenol Red Lactose Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ตรวจผลหลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง

ถ้ามีการสร้างกรด (อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) และมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าให้ผลบวก *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลลบคือไม่สร้างแก๊สและอาหารมีสีแดง (ถ้าใช้ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์) หรืออาหารมีสีม่วงทั่วทั้งหลอด (ถ้าใช้ bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์)

เชื้อใดที่ให้ผลบวกกับการทดสอบแลคโตสทิ้งไปได้เลยเพราะไม่ใช่ *Salmonella* ยกเว้นเชื้อที่ทำให้ส่วนผิวหน้าลาดเอียงของอาหาร TSI เป็นกรด (acid slant) และให้ผลบวกในอาหาร LIA หรือให้ผลบวกในอาหาร Malonate Broth ให้ทดสอบต่อไปว่าใช่ *Salmonella arizonae* หรือไม่

ข) <u>Phenol Red Sucrose Broth หรือ Purple Sucrose Broth</u>

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบใน Phenol Red Lactose Broth เชื้อใดที่ให้ผลบวกกับการทดสอบซูโครสทิ้งไปได้เลยเนื่องจากไม่ใช่ *Salmonella* ยกเว้นเชื้อที่ทำให้ส่วนผิวหน้าลาดเอียงของอาหาร TSI เป็นกรด (acid slant) และให้ผลบวกในอาหาร LIA

ค) <u>MR-VP Broth</u>

ถ่ายเชื้อปริมาณเล็กน้อยจากหลอด TSI slant (ซึ่งยังจัดจำแนกไม่ได้) ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงในอาหาร MR-VP Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง แล้วทดสอบต่อไปดังนี้

1. ทำการทดสอบ Voges-Proskauer (VP test) ที่อุณหภูมิห้องดังนี้:

ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร MR-VP Broth ที่บ่มแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อแล้วบ่มหลอดอาหาร MR-VP Broth ที่เหลือต่อไปอีก 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35°C เติมสารละลายแอลฟาแนฟทอล (α-naphthol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ในแอลกอฮอล์) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันดีแล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เติมผลึกครีเอตินลงไปเล็กน้อยเพื่อเร่งปฏิกิริยา ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงแล้วจึงอ่านผล ถ้าเกิดสีชมพู-แดงทั่วทั้งหลอดอาหารแสดงว่าให้ผลบวก *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลลบ (ไม่เกิดสีชมพู-แดงเข้มทั่วทั้งหลอดอาหารเหลว)

2. ทำการทดสอบ methyl red (methyl red test) ดังนี้:

เติม methyl red 5-6 หยด ลงในหลอดอาหาร MR-VP Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ผ่านการบ่ม 96 ชั่วโมง อ่านผลทันที *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลบวก (เกิดสีแดงแพร่กระจายทั่วทั้งหลอดอาหารเหลว) ถ้าเกิดสีเหลืองคือให้ผลลบ เชื้อที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ KCN และ VP และให้ผลลบกับการทดสอบ methyl red ให้ทิ้งไปได้เพราะไม่ใช่ *Salmonella*

3. <u>Simmon Citrate Agar</u> ถ่ายเชื้อจากหลอด TSI slant (ซึ่งยังจัดจำแนกไม่ได้) ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อ ลงในอาหาร Simmon Citrate Agar โดยการ

ลากที่ผิวหน้าลาดเอียง (ส่วนของ slant) แล้วแทงลงไปจนถึงก้นหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 96 ± 2 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก-มีการเจริญ มักมีการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำเงิน เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับการทดสอบซิเตรท

ผลลบ-ไม่มีการเจริญหรือมีการเจริญน้อยมากและอาหารไม่เปลี่ยนสี

ตารางที่ 8.3 ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและซีโรวิทยาของ *Salmonella*

การทดสอบ / สารตั้งต้นที่ใช้ (substrate)	ผลการทดสอบ		*Salmonella* species reaction [a]
	ผลบวก (positive)	ผลลบ (negative)	
1. Glucose (TSI)	ส่วนก้นหลอดมีสีเหลือง (yellow butt)	ส่วนก้นหลอดมีสีแดง (red butt)	+
2. Lysine decarboxylase (LIA)	ส่วนก้นหลอดมีสีม่วง	ส่วนก้นหลอดมีสีเหลือง	+
3. H_2S (TSI and LIA)	มีสีดำเกิดขึ้น	ไม่มีสีดำเกิดขึ้น	+
4. Urease test	เกิดสีม่วง-แดง	สีไม่เปลี่ยนแปลง	-
5. Lysine decarboxylase broth	เกิดสีม่วง	เกิดสีเหลือง	+
6. Phenol red dulcitol broth	เกิดสีเหลืองและ/หรือแก๊ส	ไม่เกิดแก๊ส สีไม่เปลี่ยน	+ [b]
7. KCN broth	มีการเจริญ	ไม่มีการเจริญ	-
8. Malonate broth	เกิดสีน้ำเงิน	สีไม่เปลี่ยน	- [c]
9. Indole test	เกิดสีม่วงที่ผิว	เกิดสีเหลืองที่ผิว	-
10. Polyvalent flagella test	เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination)	ไม่เกิดการเกาะกลุ่ม (no agglutination)	+
11. Polyvalent somatic test	เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination)	ไม่เกิดการเกาะกลุ่ม (no agglutination)	+
12. Phenol red lactose broth	เกิดสีเหลืองและ/หรือแก๊ส	ไม่เกิดแก๊ส สีไม่เปลี่ยน	- [c]
13. Phenol red sucrose broth	เกิดสีเหลืองและ/หรือแก๊ส	ไม่เกิดแก๊ส สีไม่เปลี่ยน	-
14. Voges-Proskauer test	เกิดสีชมพู-แดง	สีไม่เปลี่ยน	-
15. Methyl red test	เกิดสีแดงแพร่กระจาย	เกิดสีเหลืองแพร่กระจาย	+
16. Simmons citrate	มีการเจริญ มีสีน้ำเงิน	ไม่เจริญ สีไม่เปลี่ยน	V

[a] + คือ 90% หรือมากกว่า ให้ผลบวกภายใน 1 หรือ 2 วัน; - คือ 90% หรือมากกว่า ให้ผลลบภายใน 1 หรือ 2 วัน

ที่มา: Andrews และคณะ (2014)

2. การจัดจำแนกเชื้อที่นำมาทดสอบ

เชื้อที่จะถูกจัดจำแนกว่าเป็น *Salmonella* จะต้องมีผลการทดสอบตรงตามตารางที่ 8.3 ส่วนเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* สามารถคัดทิ้งไปได้ซึ่งจะให้ผลการทดสอบตามตารางที่ 8.4

ตารางที่ 8.4 เกณฑ์การพิจารณาสำหรับการคัดทิ้งเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella*

การทดสอบ / สารตั้งต้นที่ใช้ (substrate)	ผลการทดสอบ
1. Urease test	ผลบวก (เกิดสีม่วง-แดง)
2. Indole test และ Polyvalent flagella (H) test หรือ Indole test และ Spicer-Edwards flagella test	ผลบวก (เกิดสีม่วงที่ผิว) ผลลบ (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มหรือ no agglutination) ผลบวก (เกิดสีม่วงที่ผิว) ผลลบ (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มหรือ no agglutination)
3. Lysine decarboxylase และ KCN broth	ผลลบ (เกิดสีเหลือง) ผลบวก (มีการเจริญ)
4. Phenol red lactose broth	ผลบวก (เกิดสีเหลือง และ/หรือเกิดแก๊ส) [(a), (b)]
5. Phenol red sucrose broth	ผลบวก (เกิดสีเหลือง และ/หรือเกิดแก๊ส) [(b)]
6. KCN broth Voges-Proskauer test และ Methyl red test	ผลบวก (มีการเจริญ) ผลบวก (เกิดสีชมพู-แดง) ผลลบ (เกิดสีเหลืองแพร่กระจาย)

[a]ทำการทดสอบใน malonate broth ต่อไปเพื่อหาว่าเชื้อที่ทดสอบนี้เป็น *S.* arizonae หรือไม่

[b]อย่าทิ้ง broth cultures ที่ให้ผลบวกนี้ถ้าผลในอาหาร LIA ให้ผลที่ตรงกับปฏิกิริยาของ *Salmonella* ให้ทำการทดสอบต่อไปว่าใช่ *Salmonella* หรือไม่

ที่มา: Andrews และคณะ (2014)

ตอนที่ 2 การตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธีที่รวดเร็ว (วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ ไข่ไก่สด เนื้อหมูสด เนื้อไก่สด และเนื้อวัวสด
2. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Brain Heart Infusion (BHI) Agar, Lactose Broth (LB), Nutrient broth (NB), Nutrient Agar (NA), Trypticase (Tryptic) Soy Broth (TSB), Tetrathionate (TT) broth, Selenite Cystine (SC) Broth, Rappaport-Vassiliadis (RV) Medium

3. ชุดทดสอบสำหรับตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี ELISA ของ TECRA: Tecra Salmonella Visual Immunoassay เป็นชุดตรวจหา *Salmonella* ที่ผลิตขึ้นโดยบริษัท Tecra Diagnostics, New South Wales ประเทศออสเตรเลีย ส่วนประกอบหลักของชุดทดสอบนี้คือ หลุมของ microtiter plate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่สามารถหักได้เพื่อแยกแต่ละหลุมออกจากกันและสารต่างๆ จำนวน 8 ชนิดได้แก่ wash concentrate, positive control, control diluent, conjugate, conjugate diluent, substrate, substrate diluent, stop solution และแผ่นเทียบสี ทำการทดลองตามคำแนะนำในคู่มือ
4. สารละลาย phosphate saline buffer ซึ่งมีสูตรดังนี้ NaCl 8 กรัม $Na_2HPO_4.7H_2O$ 2.17 กรัม KCl 0.2 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตรและ ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์
5. micropipette ขนาด 1-1000 ไมโครลิตร
6. McFarland Standard (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ง)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับ microtiter plate (เครื่อง Microplate Reader) และตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C

วิธีการ

1. การทดสอบความไวของ ELISA Kit ต่อเชื้อ *Salmonella*

เชื้อ *Salmonella* ที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control) ได้แก่ *S.* Typhimurium เก็บเชื้อในหลอดอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อจะเตรียมเชื้อ *S.* Typhimurium ถ่ายเชื้อ *S.* Typhimurium จาก NA slant ลงในอาหาร BHI slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อโดยลากลงบนผิวหน้าอาหาร BHI โดยลากให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อเขี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหาร BHI ดังกล่าวจำนวน 8 โคโลนีลงในอาหารเหลว NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปรียบเทียบความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์กับความขุ่นของ McFarland standard เบอร์ 5 ถ้ามีความขุ่นมากเกินไป เจือจางด้วยสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland standard เบอร์ 5 จะได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^9 CFU/g (ตรวจหาความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร BHI agar) จากนั้นเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งแต่ 10^8 CFU/g ถึง 10^4 CFU/g (ขณะเดียวกันเขี่ยเชื้อในหลอดเริ่มต้นไปลากลงบนอาหาร BHI เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนด้วย) เมื่อได้เชื้อ *S.*

Typhimurium ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ แล้วนำมาทดลองกับชุดทดสอบ ELISA ของ TECRA ตามวิธีการต่อไปนี้

นำเชื้อ *S.* Typhimurium ในหลอดที่เจือจางแล้ว (ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-5}) ไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทำให้เย็นและเติม *S.* Typhimurium ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ลงในหลุมของชุดทดสอบ TECRA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยเติมระดับความเจือจางละ 2 หลุมรวมทั้งเติมตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งใช้ PBS จำนวน 2 หลุม ปริมาตรเท่ากัน ขั้นตอนต่อไปของการทำ ELISA ทำเหมือนกรณีการตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่จะกล่าวต่อไปทุกประการ

3. วิธีการตรวจหา *Salmonella* ในอาหารด้วยวิธี ELISA โดยใช้ Tecra Salmonella Visual Immunoassay

I. Preenrichment

สำหรับการตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารดิบเช่น ไข่ไก่สด เนื้อหมูสด เนื้อไก่สด และเนื้อวัวสด ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์สูง ขั้นตอน preenrichment ทำเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 คือชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติม preenrichment broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (ใช้ TSB สำหรับไข่ไก่สดและใช้ LB สำหรับเนื้อสด) ตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายตัวอย่างอาหารใส่ขวดปลอดเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วคลายฝาเกลียวออก 1/4 รอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

II. Selective enrichment

ทำการถ่ายเชื้อจากอาหาร preenrichment broth ที่บ่มแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร RV broth และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

III. Postenrichment

ในขั้นตอน postenrichment ถ่ายเชื้อจากอาหาร RV broth ที่บ่มแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร M-broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

IV. ขั้นตอนอื่น ๆ สำหรับวิธี ELISA

ปิเปตตัวอย่างจากหลอดอาหาร M-broth ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดที่ปราศจากเชื้อ แช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100°C

เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น แล้วปิเปตตัวอย่างใส่หลุม microtiter plate ของชุดทดสอบ TECRA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม (1 ตัวอย่าง ทำ 2 หลุม) รวมทั้งเติมตัวอย่างควบคุมคือ ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control) และตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ใส่หลุมด้วย หลุมละ 200 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างหลุมด้วย wash solution จำนวน 4 ครั้ง (ในการล้างแต่ละครั้ง เปิดฝา microtiter plate ออก เติม wash buffer ลงไปในหลุม เท wash buffer ออกโดยการคว่ำ microtiter plate แล้วเคาะอย่างรวดเร็วลงบนพื้นของอ่างน้ำประมาณ 2 ครั้งและขจัดของเหลวที่ยังคงค้างอยู่โดยเคาะอีกครั้งลงบนกระดาษซำระเป็นการเสร็จสิ้นการล้าง 1 ครั้ง ส่วนการล้างอีก 3 ครั้งทำซ้ำเช่นเดิม) จากนั้นปิเปต conjugate (สารละลายของแอนติบอดีที่จับอยู่กับเอนไซม์) มา 200 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างหลุมด้วย wash solution อีกจำนวน 4 ครั้ง จากนั้นปิเปตสารตั้งต้น (substrate) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในแต่ละหลุม (ถ้า pipet tip แตะหลุมให้เปลี่ยน pipet tip) จากนั้นปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยา (stop solution) แล้วกระทบข้าง plate เบาๆ เพื่อช่วยให้ส่วนผสมเข้ากันได้ดี สังเกตสีที่เกิดขึ้น ทุกหลุมเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสี (Color Card No.1) หรืออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader แล้วอ่านค่า absorbance ที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader ภายใน 30 นาที

<u>การแปลผล</u>

การคำนวณ cutoff value ตามที่ผู้ผลิตชุดทดสอบ การอ่านค่า ELISA plate จะถูกต้องถ้า:

1) หลุมที่ใส่ชุดควบคุมเชิงลบควรอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้น้อยกว่า 0.3
2) หลุมที่ใส่ชุดควบคุมเชิงบวกควรอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างน้อย 0.7
3) ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่ชุดควบคุมเชิงบวกและชุดควบคุมเชิงลบอยู่นอกค่าที่ผู้ผลิตหาไว้ล่วงหน้าชี้ให้เห็นถึงข้อผิดพลาดในระหว่างขั้นตอนการวิธีเคราะห์เช่น ในระหว่างการล้างหรือมีปัญหาเกี่ยวกับสารที่ใช้ทดสอบ

การคำนวณหา cutoff value ทำได้โดยบวก 0.25 เข้ากับค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมเชิงลบ การคำนวณเช่นนี้ช่วยให้ได้ผลบวกหลอกน้อยลง (false-positive results) ควรใช้ cutoff value ในการพิจารณาผลดังนี้

1) ตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าหรือเท่ากับ cutoff value จะถือว่าให้ผลบวก
2) ตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า cutoff value จะถือว่าให้ผลลบ

วันที่ 1 (15.00 **น.**) Pre-enrichment

ตัวอย่าง 25 g ต่อ LB หรือ TSB 225 ml (ratio 1:10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-22 ชม.

⇓

วันที่ 2 (13.00 **น.**) Selective-enrichment

ดูดตัวอย่างที่บ่มแล้วมา 0.1 ml ใส่ใน RV-broth 9.9 ml

บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 16-20 ชม.

⇓

วันที่ 3 (8.00 **น.**) Post-enrichment

ดูดตัวอย่างจาก Selective-enrichment มา 1 ml ใส่ใน M-broth 10 ml

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชม.

⇓

วันที่ 3 (14.00 **น.**) ดูดตัวอย่างจาก Post-enrichment มา 1 ml ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว

ปิดฝาหลวม ๆ ต้มในอ่างน้ำร้อน 100°C เป็นเวลา 15 นาที

⇓

ดูดตัวอย่างและ control มาอย่างละ 200 µl ใส่ในหลุมที่เตรียมไว้ ปิดหลุมด้วยแผ่นพลาสติก

นำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

⇓

ล้างหลุมด้วย wash solution จำนวน 4 ครั้ง

⇓

ดูด conjugate มา 200 µl ใส่ในแต่ละหลุม ปิดหลุมด้วยแผ่นพลาสติก

นำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

⇓

ล้างหลุมด้วย wash solution จำนวน 4 ครั้ง

⇓

ดูด substrate มา 200 µl ใส่ในแต่ละหลุม ปิดหลุมด้วยแผ่นพลาสติก

นำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20-25°C เป็นเวลา 10 นาที เติม stop solution

⇓

สังเกตสีที่เกิดขึ้นทุกหลุมเปรียบเทียบกับ Color Card No.1

หรืออ่านค่า absorbance ที่ 414 ± 10 nm

รูปที่ 8.7 การตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบของ TECRA

บันทึกผลการทดลอง

I ผลการตรวจหา *Salmonella* ในอาหารด้วยวิธีพื้นฐาน

ตัวอย่างอาหารที่ตรวจสอบคือ.....

1. ลักษณะการเจริญใน pre-enrichment broth……..

2. ลักษณะการเจริญใน selective enrichment broth

2.1 selective enrichment broth ชนิดที่ 1 คือ อาหาร……

ลักษณะการเจริญ……

……

……..

2.2 selective enrichment broth ชนิดที่ 2 คือ อาหาร.....……

ลักษณะการเจริญ……

……..

3. การเจริญของเชื้อบนอาหาร selective agar

Selective plating media	Selective enrichment broth	ลักษณะโคโลนีที่เลือกเขี่ยเชื้อไปทดสอบต่อ			
		โคโลนีที่ 1		โคโลนีที่ 2	
		รหัส		รหัส	
HE	RV				
	TT				
XLD	RV				
	TT				
BS	RV				
	TT				

4. การทดสอบในอาหาร TSI และอาหาร LIA

ที่มาของเชื้อ (Selective plating media)	ที่มาของเชื้อ (Selective enrichment broth)	รหัสของเชื้อ	ผลการทดสอบในอาหาร TSI			ผลการทดสอบในอาหาร LIA		
			Butt	Slant	การสร้าง H_2S	Butt	slant	การสร้าง H_2S
HE	RV							
	RV							
	TT							
	TT							
XLD	RV							
	RV							
	TT							
	TT							
BS	RV							
	RV							
	TT							
	TT							

5. ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อจากหลอด TSI ที่ให้ผลลบกับการทดสอบยูรีเอส

การทดสอบ	ผลการทดสอบ					
	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
Lysine decarboxylase broth						
Phenol red dulcitol broth						
KCN broth						
Malonate broth						
Indole test						
Polyvalent flagella test						
Phenol red lactose broth						
Phenol red sucrose broth						
Voges-Proskauer test						
Methyl red test						
Simmons citrate						

6. การทดสอบทางซีโรวิทยา (Serological somatic (O) tests)

รหัสของเชื้อที่ทดสอบ	ผลของการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับแอนติซีรัม Polyvalent A-I (+ หรือ -)	แอนติซีรัมกลุ่มที่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเชื้อที่ทดสอบ (Somatic (O) group test)

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

ผลการตรวจหา *Salmonella* (พบหรือไม่พบ) .....

ซีโรกรุ๊ฟของ *Salmonella* ที่พบ.....

II ผลการตรวจหา *Salmonella* ในอาหารด้วยวิธี ELISA

บันทึกรหัสของตัวอย่างที่ทำในแต่ละหลุมของ microtiter plate และค่า OD_{450} ลงในตาราง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
E												
F												
G												
H												

คำถามท้ายบท

1. จงบอกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Salmonella*
2. ขั้นตอนการตรวจหา *Salmonella* มีกี่ขั้นตอนอะไรบ้าง
3. ยกตัวอย่าง selective enrichment broth และ selective plating media ที่ใช้มาอย่างละ 2 ชนิด

4. จงบอกลักษณะของ typical colony ของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหาร HE, XLD และ BS

5. ในการทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหาร TSI และ LIA ถ้าเป็น *Salmonella* จะให้ผลอย่างไร

6. การทดสอบทางซีโรวิทยา (serological test) คืออะไร จงอธิบายหลักการ

เอกสารอ้างอิง

อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2544. Genus *Salmonella*. WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

Andrews, W.H., Jacobson, A., Hammack, T.S. 2014. Bacteriological Analytical Manual Chapter 5: *Salmonella* (February 2014 Version). Available from: www.fda.gov/Food/FoodScience Research/ LaboratoryMethods/ucm 070149.htm 12 May 2014.

Benson, H.J. 1998. Microbiological Application: Laboratory Manual in General Microbiology, 7th ed. WCB/McGraw – Hill, USA.

D'Aoust, J.-Y. 2001. *Salmonella*. In: Labbé, R.G., García, S. (Eds.), Guide to Foodborne Pathogens. A John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 163-191.

Flowers, R.S., D'Aoust, J.-Y., Andrews, W.H., Bailey, J.S. 1992. *Salmonella*. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 371-422.

Gomez, R.F., Sinskey, A.J., Davies, R., Labuza, T.P. 1973. Minimal medium recovery of heated *Salmonella typhimurium* LT2. Journal of General Microbiology. 74: 267.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.

Jones, J. M. 1995. Food Safety. Eagan Press, Minnesota, USA.

Mattingly, J.A., Gehle, W.D. 1984. An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. Journal of Food Protection. 49: 807-809.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L.2001. Microbiology: An Introduction, 7th ed. Benjamin Cummings, USA.

Varnam, A.H., Evans, M.G. 1991. Foodborne Pathogens: An Illustrated Text. Wolfe Publishing Ltd., London.

Wistreich, G.A. 1997. Microbiology Laboratory: Fundamental and Applications. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

บทปฏิบัติการที่ 9
การตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร

Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนโค้งหรือท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่มีแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ขั้วเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (single polar flagellum) ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลสได้ หมักกลูโคสไม่ให้แก๊ส แบคทีเรียในสกุลนี้มีอย่างน้อย 28 สปีชีส์ *Vibrio* 3 สปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งมักพบในแหล่งน้ำและอาหารทะเลได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio vulnificus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียรูปท่อนที่ชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ (halophilic rod) เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ ส่วนใหญ่พบในน้ำทะเลในมหาสมุทรและแถบชายฝั่ง การตรวจพบเชื้อชนิดนี้เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยทั่วไปจะมีจำนวนที่ไม่อาจตรวจพบได้จนกว่าอุณหภูมิของน้ำทะเลจะสูงขึ้นถึงประมาณ 19-20°C ดังนั้นจึงมักจะแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้จากสิ่งแวดล้อมในทะเลแถบอบอุ่นเช่น สัตว์ทะเล แพลงตอน ตะกอนในทะเล และน้ำชายฝั่งทะเล เชื้อชนิดนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 30-35°C และอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญที่ 44°C เจริญได้ในอาหารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 9.5-10°C ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 4 °C และไม่เจริญในสภาพที่ไม่มีเกลือ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1-8 เจริญได้ดีในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 2-4 เจริญได้ที่ช่วง pH 4.8-11.0 และช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7.6-8.6 ค่า pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิและปริมาณเกลือ จากการวิจัยพบว่า *V. parahaemolyticus* ATCC 107941 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 5-9°C ในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) ที่มีค่า pH 7.2-7.3 และมีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3 แต่ที่อุณหภูมิ 30°C ในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 3 มีค่า pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญเป็น 4.8 ขณะที่ในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 7 มีค่า pH ต่ำสุดสูงขึ้นเป็น 5.2 ส่วนค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญที่ทำให้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (generation time) สั้นที่สุดคือระดับ a_w 0.992 ในอาหาร TSB ที่มีเกลือร้อยละ 2.9 แต่ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญจะเป็น 0.937, 0.945, 0.948, 0.957, 0.983 และ 0.986 ที่อุณหภูมิ 29°C ถ้าใช้กลีเซอรอล โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ ซูโครส กลูโคส และโพรไพลีนไกลคอลในการควบคุมระดับ a_w ตามลำดับ เมื่อเจริญในอาหารเหลวมีแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ขั้วเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง แต่เมื่อเจริญบนอาหารแข็งอาจมีแฟลกเจลลารอบเซลล์

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคทางเดินอาหาร (gastroenteritis) เกือบทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic) ขณะที่บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากปลาทะเลและสิ่งแวดล้อมในทะเลไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (nonhemolytic)

ปรากฏการณ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนแตกนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาคานากาวา (Kanagawa reaction) โดยทั่วไปจะทดสอบโดยใช้เม็ดเลือดแดงของคนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma's Agar นอกจากจะทำให้เม็ดเลือดแดงของคนแตกแล้วยังทำให้เม็ดเลือดแดงของสุนัขและหนูแตกด้วย แต่ให้ผลของปฏิกิริยาอ่อนกับเม็ดเลือดแดงของกระต่ายและแกะ มีรายงานว่าร้อยละ 1 ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 650 ไอโซเลตที่แยกได้จากปลาและร้อยละ 96 ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 2,720 ไอโซเลตที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาคานากาวา ส่วนแบคทีเรียชนิดนี้ที่แยกได้จากน้ำทะเลโดยทั่วไปให้ผลลบกับปฏิกิริยาคานากาวา โปรตีนที่เรียกว่าฮีโมไลซิน (hemolysin) ที่ทนความร้อน (thermostable direct hemolysin, TDH) เป็นไซโตทอกซิกโปรตีน (cytotoxic protein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 42,000 ดาลตัน สามารถทำให้หนูตายได้ TDH นี้เกี่ยวข้องกับการให้ผลบวกกับปฏิกิริยาคานากาวา ส่วนสายพันธุ์ที่สร้างฮีโมไลซินที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile hemolysin) จะให้ผลลบกับปฏิกิริยาคานากาวา โปรตีน TDH ถูกทำลายบางส่วนเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 30 นาทีที่ pH 6.0 และจากการทดลองในอาสาสมัครกลุ่มหนึ่งพบว่า สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาคานากาวาทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ขณะที่สายพันธุ์ที่ให้ผลลบไม่ทำให้เกิดโรคดังกล่าว ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า TDH มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคทางเดินอาหาร

การติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารทะเล เช่น อาหารทะเลดิบ อาหารที่ปนเปื้อนอีกครั้งหลังจากผ่านความร้อนและอาหารทะเลที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ซึ่งต่างกับการติดเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่นที่อาจปนเปื้อนมากับอาหารหลายชนิด แต่ถ้าอาหารชนิดอื่นที่ไม่ใช่อาหารทะเลถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้ ก็มักมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนข้ามจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล อาหารที่มีรายงานว่าเป็นต้นเหตุของโรคระบาดจากเชื้อชนิดนี้ได้แก่ หอยนางรม กุ้ง ปู กุ้งมังกร และหอยชนิดต่าง ๆ เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษที่พบบ่อยในประเทศญี่ปุ่นเนื่องจากประชาชนนิยมรับประทานปลาดิบ แบคทีเรียชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อน มีรายงานว่าค่า $D_{47^\circ C}$ ของ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วง 0.8-65.1 นาที และพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์หนึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 500 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในกุ้งบดถูกทำลายหมดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C ภายใน 1 นาที แต่ถ้ามีจำนวนเซลล์มากขึ้นถึง 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การทำลายเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาทีจะทำให้มีบางเซลล์ที่อยู่รอดได้ ดังนั้นถ้าได้รับ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลที่ผ่านการแปรรูปอาจเป็นผลมาจากการให้ความร้อนไม่เพียงพอ หรือเกิดการปนเปื้อนข้ามหรือปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อน รวมทั้งการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะ แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้เร็วมากซึ่งจะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าสั้นมากเพียง 8-9 นาทีที่อุณหภูมิ 37°C ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการป่วยได้ภายใน 4 ชั่วโมง ถึงมากกว่า 30 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไป อาการที่เกิดขึ้นได้แก่ ปวดท้อง

รุนแรง เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย มักมีน้ำออกมามาก บางครั้งมีเลือดปน คลื่นไส้ อาเจียน และเป็นไข้ อัตราการตายต่ำ ผู้ป่วยฟื้นตัวได้ภายในระยะเวลา 2-3 วัน การติดเชื้อ *Vibrio* มักจะไม่เกิดขึ้นในฤดูหนาวแต่มักจะเกิดในฤดูร้อนโดยเฉพาะปนเปื้อนมากับอาหารทะเล

Vibrio เหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นหลายชนิดคือ เจริญได้ในสภาพที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูง เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ เจริญได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง ดังนั้นในการแยกเชื้อ *Vibrio* ในอาหารจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เป็นด่างเช่น Alkaline Peptone Water เป็น enrichment media ชนิดที่นิยมใช้กันมากในขั้นแรกของการแยกเชื้อ *Vibrio* และอาหาร Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar นิยมใช้ในการแยกเชื้อ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* ชนิดอื่นจากอาหารทะเล อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะส่งเสริมการเจริญของ *Vibrio* หลายชนิดแต่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ *Vibrio* เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ ดังนั้นสารละลายที่ใช้ในการทำเจือจางหรือสารละลายที่ใช้ในการทำสารแขวนลอยของเซลล์ต้องมีโซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบเช่น สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate buffered saline) และเช่นเดียวกันในการทดสอบทางชีวเคมีควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 หรือ 3

ในการเก็บรักษาตัวอย่างที่จะวิเคราะห์หา *Vibrio* ควรทำให้ตัวอย่างเย็นลงทันทีถึง 7-10°C หลังจากเก็บตัวอย่างและทำการวิเคราะห์ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรงกับน้ำแข็งเพื่อที่จะให้เชื้ออยู่รอดได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามเซลล์ของ *Vibrio* อาจบาดเจ็บได้ถ้าหากทำให้ตัวอย่างเย็นลงเร็วเกินไป แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้เร็วในอาหารทะเลที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง *Vibrio* อยู่รอดได้ที่อุณหภูมิแช่เย็น แต่จะอยู่รอดได้ไม่ดีในสภาพที่ร้อนและเย็นมากๆ ถ้าต้องการเก็บรักษาอาหารไว้ในสภาพแช่แข็งควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เข้าใจถึงหลักการและวิธีการตรวจหา *V. parahaemolyticus* ในอาหาร
2. เพื่อเรียนรู้วิธีการทดสอบทางชีวเคมีและหาจำนวน *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี MPN

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ได้แก่ *V. parahaemolyticus*
2. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ ปลาหมึกสด ปลาสด หอยแมลงภู่สด หอยแครงสด กุ้งสดและอื่นๆ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Phosphate-Buffered Saline (PBS), Alkaline Peptone Water (APW), Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar, Arginine Glucose Slant (AGS), Motility Test Medium, Trypticase Soy Broth (TSB) และ Trypticase Soy Agar

(TSA) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร), Tryptone broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ ร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 (T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 และ T_1N_{10}) Urea Broth หรือ Christensen's Urea Agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate Buffered Saline, PBS)
5. สีย้อมและสารเคมีสำหรับย้อมแกรม (ภาคผนวก ค) และ oxidase reagent (สารละลาย N, N, N, N′- tetramethyl-p-phenylenediamine.2HCl ความเข้มข้นร้อยละ 1)
6. API 20E diagnostic strips and reagents (BioMerieux)
7. เครื่องตีป่นอาหาร เครื่องผสมตัวอย่าง (vortex mixer) กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างและตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C
8. จานเพาะเชื้อ ปิเปต ลูปเขี่ยเชื้อ และถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่น

วิธีการทดลอง

<u>การตรวจหาปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในอาหารด้วยวิธี MPN</u>

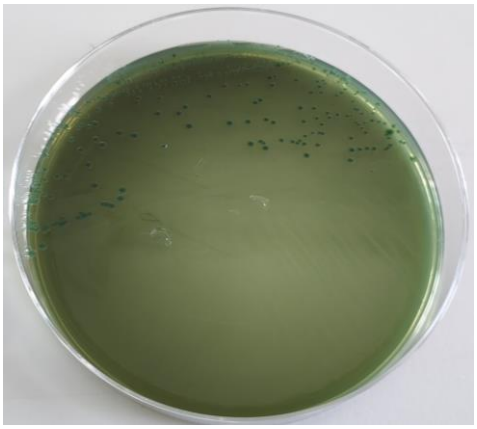
1. ชั่งตัวอย่างอาหารทะเล (ตัวอย่างปลา: ใช้ส่วนของเนื้อเยื่อที่ผิว เหงือกและทางเดินอาหารของปลา สำหรับสัตว์น้ำประเภท crustaceans เช่น กุ้ง ถ้าเป็นไปได้ให้ใช้ทั้งตัว ถ้าใหญ่เกินไป เลือกส่วนกลางของตัวสัตว์ซึ่งรวมเหงือกและทางเดินอาหาร) 50 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหาร เป็นเวลา 90 วินาที โดยใช้ความเร็วสูง
2. เติม PBS ปริมาตร 450 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจาง 10^{-1}) ตีป่นอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางต่อไปใน PBS จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} หรืออาจเจือจางที่ระดับความเจือจางสูงขึ้นถ้าจำเป็น

   (ก) สำหรับตัวอย่างสัตว์น้ำเปลือกแข็ง (molluscan shellfish) ใช้ทั้งหมด 12 ตัว ตีป่นกับสารละลาย PBS ปริมาตรเท่ากันด้วยความเร็วสูง 90 วินาทีจะได้ของผสมที่เจือจาง 1:2 เท่า แล้วชั่งของผสมนี้มา 20 กรัมใส่ลงในสารละลาย PBS 80 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางต่อไป เติมตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 เท่าปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย PBS 90 มิลลิลิตรจะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} แล้วเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-3} และ 10^{-4} ขั้นต่อไปทำเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ ข

   (ข) สำหรับตัวอย่างที่ผ่านการแปรรูปเช่น ให้ความร้อน ทำแห้ง แช่แข็ง ให้ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดอาหาร Alkaline Peptone Water (APW) ความเข้มข้น 2 เท่าของสูตรปกติ จำนวน 3 หลอด ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร แต่ละหลอดจะมีปริมาณตัวอย่างอาหาร 1 กรัม จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}และ 10^{-4} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหาร APW ตามสูตรปกติ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับ

ความเจือจางละ 3 หลอด ซึ่งจะมีปริมาณตัวอย่างอาหาร 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 กรัมต่อหลอดที่แต่ละระดับความเจือจางตามลำดับ

4. นำหลอด APW ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เขี่ยเชื้อจากหลอด APW ที่ 3 ระดับความเจือจางสูงสุดที่มีการเจริญ (มีความขุ่น)โดยเขี่ยเชื้อจากอาหาร APW ที่ผิวด้านบนลึกลงมาประมาณ 1 เซนติเมตร (อย่าเขย่าหลอด) ลากลงบนผิวหน้าอาหาร TCBS ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เขียนระดับความเจือจางของหลอดที่มาบนจานอาหาร TCBS ด้วย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงบันทึกจำนวนหลอดและระดับความเจือจางที่เกิดความขุ่น โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* จะมีลักษณะกลม สีเขียว หรือน้ำเงินเขียว ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร (รูปที่ 9.1) โคโลนีของ *V. vulnificus* และ *V. mimicus* ก็มีลักษณะเช่นนี้ เชื้อที่เจริญแข่งขันเช่น *V. alginolyticus* จะมีโคโลนีขนาดใหญ่ ทึบ และมีสีเหลือง ส่วน *V. cholerae* มีขนาดโคโลนีใหญ่และมีสีเหลือง เนื่องจากหมักซูโครสได้



รูปที่ 9.1 ลักษณะของ typical colony ของ *Virio parahaemolyticus* บนอาหาร TCBS

<u>การคัดเลือกและการทดสอบยืนยัน</u>

1. การเจริญในอาหาร Arginine Glucose Slant (AGS)

   ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 2 โคโลนีหรือมากกว่า 2 โคโลนี นำมาแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ก่อนที่จะใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนผิวหน้าของอาหารส่วนที่ลาดเอียงและแทงลงตรง ๆ ถึงก้นหลอดอาหาร AGS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จะทำให้ส่วนที่ลาดเอียง (slant) มีสีม่วงหรือเป็นด่างและส่วนของก้นหลอด (butt) มีสีเหลืองหรือเป็นกรด (arginine dihydrolase negative) แต่ไม่สร้างแก๊สและไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และเช่นเดียวกันถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยลงในหลอดอาหาร TSB และ TSA slant ที่เติม

โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อในหลอดทั้งสองนี้มาย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างหลายแบบ (pleomorphic) เช่นรูปร่างท่อนโค้งหรือท่อนตรง มีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์

2. การเจริญในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นระดับต่างๆ

   ถ่ายเชื้อจากหลอด TSA slant ลงในอาหาร T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 และ T_1N_{10} (Tryptone broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ เชื้อนี้จะไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 0 และ 10

3. การทดสอบการสร้างออกซิเดส

   คัดเลือกเอาเชื้อที่น่าจะใช่ เช่น เชื้อเจริญในอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 และผ่านการบ่ม 24 ชั่วโมง ทดสอบนี้ทำได้ 2 วิธีคือ ใช้ platinum wire (ไม่ควรใช้ nichrome wire) หรือใช้ไม้ยาวแหลมๆ ที่ปลอดเชื้อช่วยในการถ่ายเชื้อมาแตะที่กระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย oxidase reagent ถ้าเกิดสีม่วงเข้มขึ้นภายใน 10 วินาทีแสดงว่าให้ผลบวกหรืออาจทำวิธีที่ 2 คือ หยด oxidase reagent ลงไปในหลอด TSA slant ที่มีเชื้อเจริญอยู่ถ้าเกิดสีม่วงเข้มขึ้นภายใน 10 วินาทีแสดงว่าให้ผลบวก *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สร้างออกซิเดสได้

3. การเจริญใน Motility Test Medium

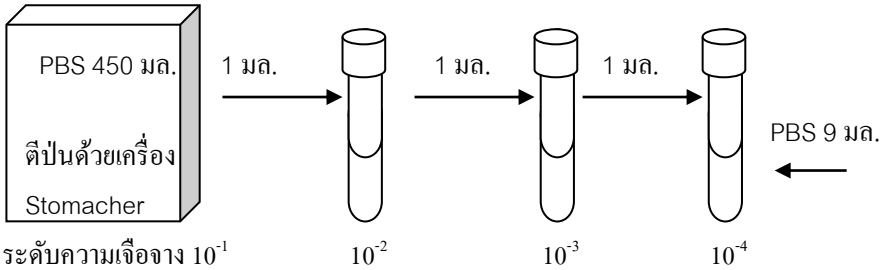
   ถ่ายเชื้อจากหลอด TSA slant ลงในอาหาร Motility Test Medium โดยการแทงลงไปตรงๆ ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ที่มีความลึกของอาหารประมาณ 5 เซ็นติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าหากมีการเจริญออกมารอบรอยแทงแสดงว่าให้ผลบวก สังเกตจากการที่อาหารขุ่น ทั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เคลื่อนที่ได้

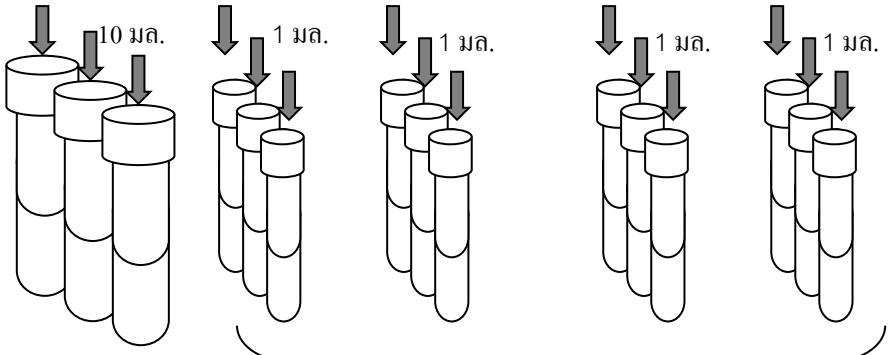
<u>การจำแนกชนิด</u>

V. parahaemolyticus และ *V. vulnificus* มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกันมากแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย คือต่างกันที่ปฏิกิริยาของ ONPG, cellobiose, lactose และการทนเกลือ (ตารางที่ 9.1) นอกจากนี้สามารถแยกความแตกต่างของ เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* กับ *Vibrio* ชนิดอื่นได้โดยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางชนิด อีกวิธีหนึ่ง อาจใช้ชุดทดสอบ API 20E ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เพื่อความสะดวกและรวดเร็ว ควรเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ที่ต้องการทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในการจำแนกชนิดโดยการทดสอบทางชีวเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่เตรียมต้องเติมเกลือ NaCl ร้อยละ 2 หรือร้อยละ 3

วันที่ 1

อาหารทะเล 50 กรัม





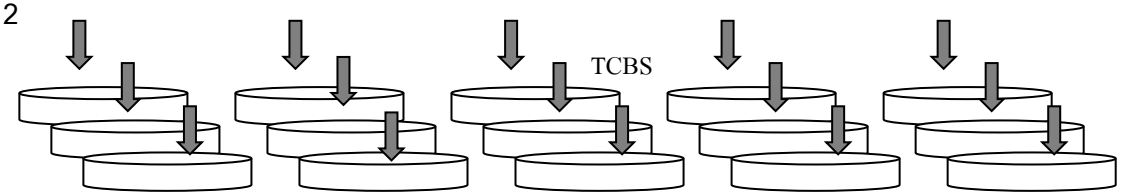
APW เข้มข้น 2 เท่าของสูตรปกติ (10 มล. ต่อหลอด)

APW ตามสูตรปกติ (10 มล. ต่อหลอด)

ปริมาณตัวอย่าง (กรัมต่อหลอด) 1 0.1 0.01 0.001 0.0001

บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วันที่ 2



ลากลงบนอาหาร TCBS (บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C)

วันที่ 3 บันทึกจำนวนจานและระดับความเจือจางที่มีโคโลนีที่มีลักษณะของ *V. parahaemolyticus* (สีเขียว) เขี่ยเชื้อมาลากลงบนผิวหน้าอาหาร TSA + 2% NaCl (บ่มที่ 35 ± 2°C 24 ชั่วโมง)

วันที่ 4 ย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมี

รูปที่ 9.2 การตรวจหาปริมาณ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารด้วยวิธี MPN

หมายเหตุ: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

ตารางที่ 9.1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Vibrio parahaemolyticus*

การทดสอบทางชีวเคมี	*V. cholerae*	*V. mimicus*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*
การเจริญบน TCBS agar	โคโลนีสีเหลือง	โคโลนีสีเขียว	โคโลนีสีเขียว	โคโลนีสีเขียว
การเจริญใน AGS	Ka	KA	KA	KA
การเจริญใน 0% NaCl	+	+	-	-
การเจริญใน 3% NaCl	+	+	+	+
การเจริญใน 6% NaCl	-	-	+	+
การเจริญใน 8% NaCl	-	-	+	-
การเจริญใน 10% NaCl	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+
Urease	-	-	V	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 42°C	+	+	+	+
การเกิดกรดจาก Voges-Proskauer	V	-	-	-
การเกิดกรดจาก ONPG	+	+	-	+
การเกิดกรดจาก Sucrose	+	-	-	-
การเกิดกรดจาก Lactose	-	-	-	+
การเกิดกรดจาก D-cellobiose	-	-	V	+
การเกิดกรดจาก D-mannose	+	+	+	+
การเกิดกรดจาก D-mannitol	+	+	+	V
การเกิดกรดจาก Arabinose	-	-	+	-

KA = Slant alkaline/ Butt acidic = ส่วนของ slant เป็นด่าง (แดง) ส่วนของ butt เป็นกรด (เหลือง); Ka = Slant alkaline/ Butt slightly acidic; V = ผันแปรระหว่างสายพันธุ์

ที่มา: Kaysner และ DePaola (2004)

- การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

เชื้อที่สงสัยว่าเป็น *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดควรนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ซึ่งทำได้โดยถ่ายเชื้อปริมาณมากลงในอาหาร Urea Broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 หรือแตะเชื้อเป็นจุดที่ผิวหน้าอาหาร Christensen's Urea Agar ที่เติมโซเดียมคลอ

ไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ อาหารจะเป็นสีชมพู (เป็นด่าง) เชื้อที่ให้ผลลบควรบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงเพราะอาจเป็นสายพันธุ์ที่สร้างยูรีเอสได้ช้า การสร้างยูรีเอสสัมพันธ์กับการมี *tdh* gene และ/หรือ *trh* gene ปฏิกิริยาของยูรีเอสใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ก่อโรค

เมื่อการทดสอบได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จะทราบว่าหลอดที่ให้ผลบวกที่แต่ละระดับความเจือจางที่แยกเชื้อมานั้นเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือไม่ และบันทึกจำนวนหลอดให้ผลบวกที่แต่ละระดับความเจือจาง นำผลที่ได้ไปหาคำนวณหาค่า MPN ของจำนวน *V. parahaemolyticus* ที่มีในตัวอย่างโดยใช้ตาราง MPN แบบ 3 หลอดในภาคผนวก ฉ

การจำแนกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบ API20E

การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *V. parahaemolyticus* อีกวิธีหนึ่งสามารถทำได้โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E (Biomérieux) ชุดทดสอบนี้ใช้จำแนกแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนชนิดอื่นประเภท non-fastidious

API 20E strip ประกอบด้วยหลอดเล็กๆ ที่บรรจุสารตั้งต้นแห้ง (dehydrated substrates) จำนวน 20 หลอด โดยจะใส่สารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบซึ่งเตรียมโดยผสมในอาหารเหลว ในระหว่างการบ่ม เมแทบอลิซึมของเชื้อจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารที่อยู่ในหลอด โดยอาจจะเปลี่ยนสีได้เองหรือต้องเติมสารเคมีทดสอบลงไป อ่านผลตามตาราง การจำแนกชนิดว่าเป็นเชื้อใดทำได้โดยใช้ identification software

<u>อุปกรณ์</u>

1. API 20E strips ประกอบด้วยหลอดจำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85
3. API Suspension Medium และ mineral oil
4. สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 0.5
5. reagents ที่มากับชุดทดสอบได้แก่ สาร TDA สาร JAMES สาร VP 1 และ VP 2 สาร NIT 1 และ NIT 2
6. กล่องสำหรับใช้บ่ม (incubation box) ประกอบด้วยถาดพลาสติกพร้อมฝาปิด
7. โปรแกรม API 20E Analitical Profile index หรือ apiweb™ Identification software

- ทำการเตรียมกล่องสำหรับบ่ม (ถาดและฝาปิด) เติมน้ำกลั่น (หรือน้ำที่ปราศจากแร่ธาตุหรือน้ำที่ปราศจากสารพิษหรือสารเคมีที่ปล่อยแก๊สออกมา เช่น แก๊สคลอรีน คาร์บอนไดออกไซด์) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในถาดเพื่อให้ในบรรยากาศมีความชื้น พร้อมทั้งบันทึกรหัสของเชื้อที่ทดสอบลงบนถาด

- นำชุดทดสอบออกจากห่อบรรจุ ไปวางบนกล่องสำหรับบ่มที่เตรียมไว้

การเตรียม Strip

หมายเหตุ: ควรใช้ชุดทดสอบ API 20E ในการจำแนกแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนชนิดอื่นที่ไม่จู้จี้ แบคทีเรียที่จู้จี้ (fastidious) มีความต้องการสารอาหารที่มีคุณค่าสูงในการเจริญ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมงลงใน อาหาร API NaCl 0.85% Medium กวนผสมให้เข้ากันเพื่อให้ได้สารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน ต้องนำสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมนี้ไปใช้ทันที

การเติมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียลงใน strip

1. ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อเติมสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้ลงในหลอด CIT , VP และ GEL โดยเติมให้เต็มทั้งในส่วนของหลอด (tube) และปากหลอด (cupule) ที่บรรจุสารทั้งชนิด 3 นี้

2. ส่วนสารอื่น ๆ ให้เติมเฉพาะในส่วนของ tube เท่านั้น

3. ทำให้เกิดสภาพไร้อากาศในการทดสอบกับสาร ADH, LDC, ODC, H2S และ URE โดยเติม mineral oil ปิดทับที่ปากหลอดเพื่อไม่ให้อากาศเข้า

4. ปิดฝากล่องบ่ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล

1. หลังจากบ่มครบตามระยะเวลาแล้ว อ่านผลโดยอ้างอิงจาก “The Reading Table”

2. ถ้าในช่องของสารที่ทดสอบให้ผลบวก 3 ช่องหรือมากกว่า (GLU test + หรือ -) ให้บันทึกผลที่เกิดขึ้นในตารางผลการทดลอง ซึ่งแสดงว่าต้องเติมสารที่ใช้ทดสอบ (reagents) เพิ่มขึ้น ดังนี้

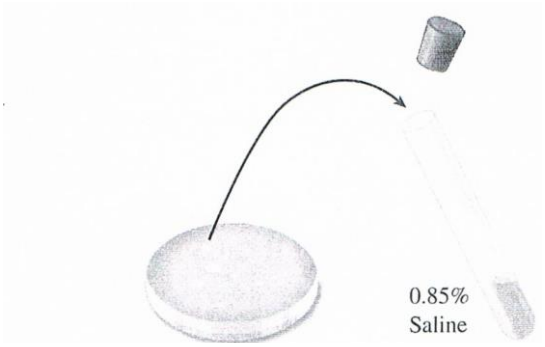
2.1 TDA test: เติม TDA reagent 1 หยดลงไป ถ้าเกิดสีน้ำตาลแดงขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก บันทึกผลลงในตารางบันทึกผลการทดลอง

2.2 IND test: เติม JAMES reagent 1 หยดลงไป ถ้าเกิดสีชมพูทั้งช่องแสดงว่าให้ผลบวก

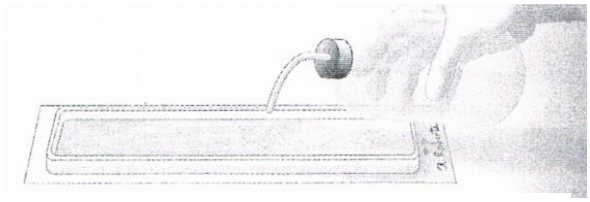
2.3 VP test: เติม VP1 และ VP2 reagent อย่างละ 1 หยดลงไป ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที ถ้าเกิดสีชมพูหรือแดงแสดงว่าให้ผลบวก แต่ถ้าหลังจาก 10 นาที เกิดสีชมพูอ่อนแสดงว่าให้ผลลบ บันทึกผลลงในตารางบันทึกผลการทดลอง

หมายเหตุ: การทดสอบการสร้างอินโดลควรทำหลังสุดเนื่องจากปฏิกิริยานี้ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นแก๊สซึ่งจะไปรบกวนการแปลผลการทดสอบอื่นบน strip

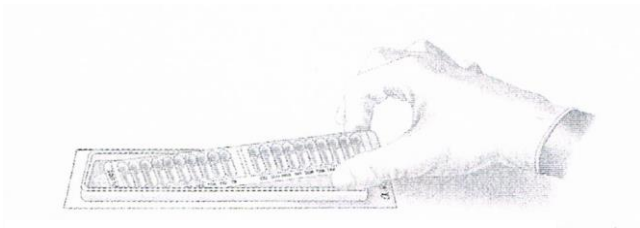
3. ถ้าจำนวนช่องที่ให้ผลบวก (ซึ่งรวมทั้งในช่อง GLU test) ก่อนที่จะเติมสารทดสอบลงไปน้อยกว่า 3 ช่อง ให้นำไปบ่มต่ออีก 24 ± 2 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติมสารทดสอบลงไป



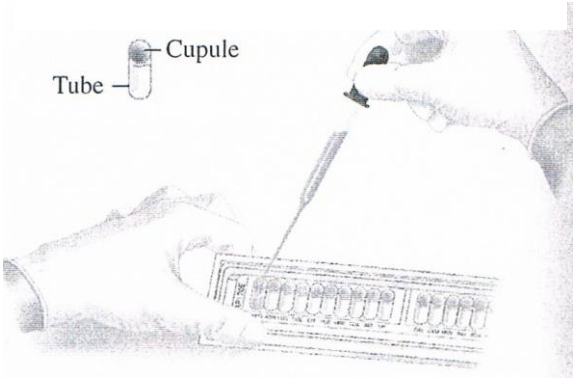
1) เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงในสารละลายเกลือ 0.85% ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex mixer



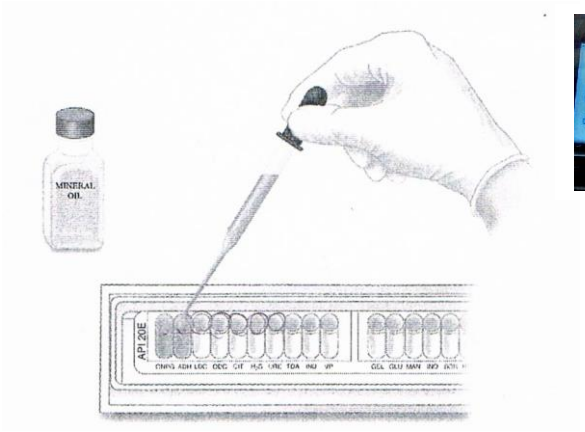
2) เขียนรหัสเชื้อที่ทดสอบและชื่อผู้ทดสอบไว้ที่ถาด เติมน้ำลงในถาด 5 มิลลิลิตร



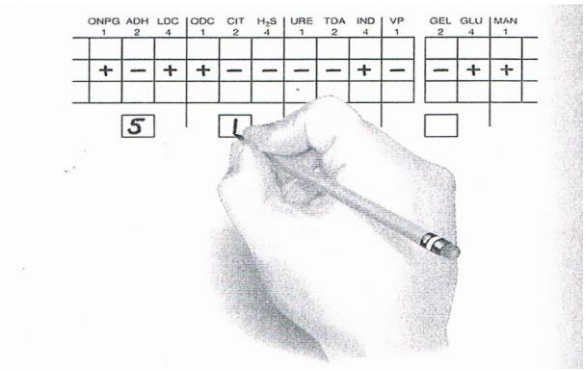
3) วาง API 20E test strip ลงบนถาด



4) เติมสารแขวนลอยเซลล์ลงในหลอด (tube) ผ่านทางปากหลอด (cupule)



5) เพื่อให้มีสภาพไร้อากาศในหลอด ADH, LDC, ODC, H2S และ URE เติม mineral oil ที่ปลอดเชื้อลงในปิดทับให้เต็ม cupule ด้วยพลาสเจอร์ปิเปตที่ปลอดเชื้อ



6) หลังบ่มและหลังจากเติมสารสำหรับทดสอบลงไป บันทึกผล รวมตัวเลขเพื่อให้ได้ 7-digit code

รูปที่ 9.3 วิธีการเตรียมเชื้อและการใช้ชุดทดสอบ API20E ในการจำแนกชนิดของเชื้อ

ที่มา: Brown (2005) หมายเหตุ: ดูวีดีโอได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

ตารางที่ 9.2 สารเคมีชนิดแห้งใน 20 หลอดของ API 20E และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

อักษรย่อ	Active ingredients	ปริมาณ (mg/cup.)	ปฏิกิริยา/เอนไซม์	ผล	
				ลบ	บวก
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl- βD-Galactopyranoside	ไม่มีสี	เหลือง (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine dihydrolase	เหลือง	แดง / ส้ม (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine decarboxylase	เหลือง	แดง / ส้ม (2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine decarboxylase	เหลือง	แดง / ส้ม (2)
CIT	trisodium thiosulfate	0.756	CITrate utilization	เขียวซีด / เหลือง	เขียวแกมน้ำเงิน / น้ำเงิน (3)
H2S	sodium thiosulfate	0.075	H2S production	ไม่มีสี / เทา	ตะกอนดำ / เส้นผอม
URE	Urea	0.76	UREase	เหลือง	แดง / ส้ม (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Trytophane DeAminase	TDA / immediate เหลือง	นาตาลแดง
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate ไม่มีสี /เขียวซีด/เหลือง	ชมพู
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	ไม่มีสี	VP 1+ VP 2 / 10 min ชมพู / แดง (5)
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	ไม่มีการแพร่	มีการแพร่ของรงควัตถุสีดำ
GLU	D-glucose	1.9	Fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง / เหลืองอมเทา
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentation / oxidation (MANitol) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
INO	Inositol	1.9	Fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
RHA	L-rhamnose	1.9	Fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
SAC	D-sucrose	1.9	Fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
MEL	D-melibiose	1.9	Fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
AMY	Amygdalin	0.57	Fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
ARA	L-arabinose	1.9	Fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
OX	ดูวิธีการทดสอบออกซิเดส		Cytochrome-OXidase	ดูวิธีการทดสอบออกซิเดส	

(1) สีเหลืองซีดมาก ถือว่าให้ผลบวกเช่นกัน; (2) เกิดสีส้มหลังการบ่ม 36-48 ชั่วโมง ถือว่าให้ผลลบ; (3) การอ่านผล ทำใน cupule (aerobic)

(4) การหมักเริ่มในส่วนล่างของ tube ออกซิเดชันเริ่มใน cupule; (5) เกิดสีชมพูอ่อนหลังจากทิ้งไว้ 10 นาที ถือว่าให้ผลลบ

ที่มา : คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API 20E

ตารางที่ 9.3 การทดสอบอื่นๆ

อักษรย่อ	Active ingredients	ปริมาณ (mg/cup.)	ปฏิกิริยา/เอนไซม์	ผล	
				ลบ	บวก
Nitrate reduction GLU tube	Potassium nitrate	0.076	NO_2 production Reduction to N_2 gas	NIT 1+ NIT 2 / 2-5 min เหลือง	แดง
				Zn / 5 min ส้ม-แดง	เหลือง
MOB	API M Medium หรือ microscope	-	การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
McC	McConkey medium	-	การเจริญ	ไม่มี	มี
OF-F OF-O	Glucose (API OF Medium)	-	การหมัก: ใต้ mineral oil ออกซิเดชัน : ได้รับอากาศ	เขียว เขียว	เหลือง เหลือง

บันทึกผลการทดลอง

ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....

1. ผลการเจริญในอาหาร APW

ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดความขุ่น)			
	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
1.0				
0.1				
0.01				
0.001				
0.0001				

2. ลักษณะของโคโลนีที่น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* บนอาหาร TCBS .....

.....

บันทึกจำนวนจานอาหาร TCBS ที่มีโคโลนีสีเขียวน้ำเงินซึ่งน่าจะเป็นโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* จากแต่ละระดับความเจือจางที่เขี่ยเชื้อมา.....

.....

.....

3. ผลการศึกษาลักษณะเซลล์และการเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเลขของเชื้อที่แยกได้	ผลการย้อมแกรม	การเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ (+ หรือ -)				
		ร้อยละ 0	ร้อยละ 3	ร้อยละ 6	ร้อยละ 8	ร้อยละ 10
1						
2						
3						
4						
5						
V. parahaemolyticus						

4. ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสมบัติบางประการ

รหัสของโคโลนี	การเจริญบน TCBS	การเจริญใน AGS	การเคลื่อนที่	การสร้าง Oxidase	การสร้าง Urease
1					
2					
3					
4					
5					
V. parahaemolyticus					

5. สรุปจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกเมื่อเชื้อที่ทดสอบได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็น *V. parahaemolyticus*

ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (มี *V. parahaemolyticus*)			
	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
1.0				
0.1				
0.01				
0.001				
0.0001				

การคำนวณหาค่า MPN ต่อกรัม และค่า confidence limit ของ *V. parahaemolyticus*

รูปแบบที่เลือก: .....(จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์..... , ...และ ..... กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = ... (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = ...

Confidence limit (จากตาราง) = ...

Confidence limit ของตัวอย่าง = ...

บันทึกผลการจำแนกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

บันทึกผลบวกหรือลบลงในแต่ละช่องการทดสอบ แล้วรวมตัวเลขแต่ละกลุ่ม ดังตัวอย่างข้างล่าง

API 20E			รหัสของเชื้อ.....						แหล่งที่มา.....						วันที่ทดสอบ.....					
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX

ชื่อผู้ทดสอบ.....					
1	2	4	1	2	4
NO_2	N_2	MOB	McC	OF-O	OF-F

การแปลผล ทำได้โดยใช้โปรแกรม Identification software หรือ Analytical Profile Index โดยใส่เป็นเครื่องหมายบวกหรือลบ หรือใส่เป็นตัวเลข 7 ตัว (Numerical profile) ซึ่งตัวเลขสามารถคำนวณได้ดังนี้คือ ในกระดาษบันทึกผลจะแบ่งการทดสอบเป็นกลุ่ม ๆ โดยใน 1 กลุ่มจะประกอบด้วย 3 การทดสอบ ถ้าให้ผลบวกจะมีค่าเท่ากับ 1, 2 และ 4 เหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นให้นำตัวเลขของผลการทดสอบในช่องที่เป็นบวกมารวมกัน 1 strip จะได้ 7 หมายเลขด้วยกันจาก 20 การทดสอบของ API20E ปฏิกิริยาออกซิเดสเป็นการทดสอบที่ 21 และมีค่าเป็น 4 ถ้าให้ผลบวกในการทดสอบนี้

ตัวอย่างการสร้าง Numerical profile

ในตารางข้างบนแต่ละการทดสอบที่ให้ผลบวกในหนึ่งกลุ่มมีค่า 1, 2 หรือ 4 ถ้าให้ผลลบมีค่า 0 เพื่อที่จะคำนวณ 7-digit profile number ของเชื้อที่ทดสอบ ให้รวมค่าตัวเลขทั้ง 3 ของแต่ละกลุ่ม

ตัวอย่าง:

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTI	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
5 144 572	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
= *E. coli*	1	0	4	1	0	0	0	0	4	0	0	4
			5			1			4			4

	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
	+	-	+	+	+	+	-	+	-
	1	0	4	1	2	4	0	2	0
			5			7			2

คำถามท้ายบท

1. จงบอกลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และสภาพที่เหมาะสมในการเจริญ
2. *V. parahaemolyticus* ก่อให้โรคชนิดใด อาหารชนิดใดที่มักเป็นแหล่งของ *V. parahaemolyticus*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่ใช้ในการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จงบอกลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น
4. ปฏิกิริยาคานากาวา (kanagawa reaction) คืออะไร โปรตีนชนิดใดเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยานี้

เอกสารอ้างอิง

Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed., Springer Science+Business Media, Inc., New York.

Kaysner, C. A., DePaola, Jr, A. 2004. Bacteriological Analytical Manual Chapter 9: *Vibrio*. Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm 12 May 2014.

Kaysner, C. A., Tamplin, M. L., Twedt, R. M. 1992. *Vibrio*. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 451-635.

Oliver, J. D., Kaper, J. B. 2001. *Vibrio* Species. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, D C, pp. 263-300.

Sakazaki, R. 2002. *Vibrio*. In: Cliver, D. O., Rieman, H. P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain, pp. 127-136.

บทปฏิบัติการที่ 10
การตรวจหา *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในวงศ์ Micrococcaceae มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ถ้าตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อาจพบอยู่เป็นคู่ ต่อกันเป็นสายสั้น หรือเกาะกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูลในช่วงที่ยังอ่อนอยู่ แต่เมื่ออยู่ในระยะ stationary phase แคปซูลจะหายไป เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobe) หรือเจริญได้ในทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) มีเมแทบอลิซึมของการหมักและการหายใจ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ได้ บางสายพันธุ์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic) บน Horse Blood Agar หมักแมนนิทอล (mannitol) ได้ในสภาพไร้อากาศ ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการไทอะมีน (thiamine) และกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) เมื่อเจริญในสภาพไร้อากาศต้องการยูราซิล (uracil) เชื้อชนิดนี้ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 6.7°C โดยทั่วไป *S. aureus* เจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 7.0-47.8 °C และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 35°C ระดับ pH ที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.5 ถึง 9.3 ช่วง pH ที่เหมาะสมเป็น 7.0-7.5 ลักษณะเด่นของแบคทีเรีย staphylococci คือ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มี a_w ระดับต่ำกว่าระดับ a_w ที่แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ชอบความเค็ม (nonhalophilic bacteria) จะเจริญได้ เชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ทนเกลือและน้ำตาลได้สูง โดยเจริญได้ในสภาพที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.83 ถึงมากกว่า 0.99 เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนสูง ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรง

แบคทีเรีย *S. aureus* มีลักษณะที่แตกต่างกับเชื้อ *Staphylococcus* อีก 2 สปีชีส์คือ *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* โดย *S. aureus* มีความสามารถสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลส (coagulase) และเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสที่ทนความร้อน (heat-stable endonuclease หรือ thermonuclease, TNase) และสามารถหมักแมนนิทอลได้ในสภาพไร้อากาศ เอนไซม์โคแอกลูเลสและเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสเป็นเอนไซม์ที่ใช้สำหรับวินิจฉัยว่าเชื้อที่สงสัยเป็นเชื้อ *S. aureus* หรือไม่ โคแอกลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอก จะทำปฏิกิริยากับโพรทรอมบริน (prothrombrin) ซึ่งปกติมีอยู่ในพลาสมาทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโคแอกลูเลสกับทรอมบริน (coagulase-thrombin complex) และในทางกลับกันก็จะเปลี่ยนไฟบริโนเจน (fibrinogen) ในพลาสมาให้เป็นไฟบริน (fibrin) ที่ละลายได้อยู่ในลิ่มที่แข็งตัว จากผลการวิจัยได้รายงานว่า การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลสที่ให้ผลการเกิดลิ่มเป็น 1+, 2+ และ 3+ แทบจะไม่ให้ผลการทดสอบชนิดอื่น ๆ ที่บ่งชี้ว่าเป็นลักษณะของ *S. aureus* ส่วนใหญ่จะต้องให้ผลถึงระดับ 4+ จึงจะใช่ *S. aureus* ดังนั้นถ้า

ให้ผลการทดสอบต่ำกว่า 4+ ควรจะทำการทดสอบชนิดอื่นด้วยเพื่อยืนยัน ส่วนเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสสามารถย่อยสลายได้ทั้ง DNA และ RNA เอนไซม์ชนิดนี้ทนความร้อนได้ดีโดยไม่สูญเสียกิจกรรมหลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที เชื้อ staphylococci ส่วนใหญ่ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ได้จะให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลสและเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส

เชื้อ *S. aureus* ถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อนและสารทำความสะอาดเกือบทุกชนิด ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ หรือสารพิษของแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารแปรรูปหรือบนอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารชี้ให้เห็นถึงสุขลักษณะการผลิตที่ไม่ดี เคยมีรายงานมาแล้วว่าเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งจริงๆแล้วเชื้อชนิดนี้อาจก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษกับคนจำนวนมากกว่าจำนวนที่ได้เคยมีการรายงานไว้ การปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารโดยทั่วไปมักมีสาเหตุมาจากการสัมผัสของคน เนื่องจากคนเป็นแหล่งที่สำคัญของเชื้อชนิดนี้โดยเฉพาะตามผิวหนังและรูจมูกของคนเป็นแหล่งสะสม *S. aureus* ดังนั้นโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* จึงมักมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนจากคนสู่อาหารโดยอาจปนเปื้อนโดยตรงจากมือคน หรืออาจปนเปื้อนผ่านอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ประกอบการแปรรูปอาหารเช่น มีด เขียง เครื่องบดเนื้อ ภาชนะใส่อาหารและอื่น ๆ นอกจากนี้แล้วการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อชนิดนี้อาจมีสาเหตุร่วมกับสภาพที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น การทำให้อาหารเย็นไม่เพียงพอ การเตรียมอาหารไว้ล่วงหน้านานเกินไป สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี และการให้ความร้อนอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการมีเชื้อ *S. aureus* จำนวนมากในอาหารแม้ว่าจะชี้ให้เห็นถึงสุขลักษณะการผลิตอาหารที่ไม่ดี แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะเป็นหลักฐานของการเป็นสาเหตุการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ จะต้องพิสูจน์ให้เห็นว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้นั้นสามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินได้หรือไม่

ลักษณะสำคัญบางประการที่สามารถใช้ตรวจหา *S. aureus* ได้แก่ การเจริญในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 สภาพที่มีลิเทียมคลอไรด์ (lithium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 หรือสภาพที่มีโพแทสเซียมเทลลูไรส์ (potassium tellurite, K_2TeO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 การหมักแมนนิทอลในสภาพไร้อากาศ การรีดิวซ์เทลลูไรส์ให้โคโลนีสีดำ การไฮโดรไลส์ไข่แดงเพราะเชื้อสร้างเอนไซม์เลซิทิเนส (lecithinase) รวมทั้งสร้างโคแอกลูเลสและเอนโดนิวคลีเอสด้วย ลักษณะบางอย่างดังกล่าวได้นำมาใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* เช่น Baird-Parker Medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท selective-differential medium ที่ใช้ในการแยกเชื้อ *S. aureus* การทดสอบการสร้างโคแอกลูเลสและเอนโดนิวคลีเอสเป็นการทดสอบที่ใช้เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่แยกจาก Baird-Parker Medium เป็น *S. aureus* หรือไม่

วัตถุประสงค์

เพื่อเรียนรู้วิธีการตรวจหา *S. aureus* ในอาหาร

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*
2. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ อาหารประเภทยำ ส้มตำ สลัดผัก แซนวิชสำเร็จรูป เปาะเปี๊ยสด เอแคร์ น้ำพริกที่ตำขายสดๆ ตามตลาด ข้าวปั้น และอาหารชนิดอื่น ๆ ที่ใช้มือสัมผัสแล้วรับประทานโดยไม่ผ่านความร้อน
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Baird-Parker Agar (BPA) ที่มีสารโพแทสเซียมเทลลูไรส์และไข่แดง Trypticase Soy Agar (TSA) และ Brain Heart Infusion (BHI) Broth, Tryptone Yeast Extract Agar (TYEA) ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.5, Tryptone Yeast Extract Agar ที่มีแมนนิทอลร้อยละ 0.5 Toluidine Blue-Deoxyribonucleic Acid Agar และ Trypticase Soy Broth (TSB) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 และโซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate) ความเข้มข้นร้อยละ 1
4. สารเคมีสำหรับทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โคแอกลูเลสพลาสมา (Coagulase plasma (rabbit) ที่มี EDTA) ไลโซสตาฟริน (lysostaphin) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3
5. สารละลายเปปโตนซาไลน์ สารละลายฟอสเฟตซาไลน์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (0.02 M phosphate-saline buffer ที่เติมเกลือร้อยละ 1) น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) และสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
6. จานเพาะเชื้อ ปิเปต เข็มและลูปเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วงอ และถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่น
7. เครื่องตีป่นอาหาร เครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35/37°C และอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100°C

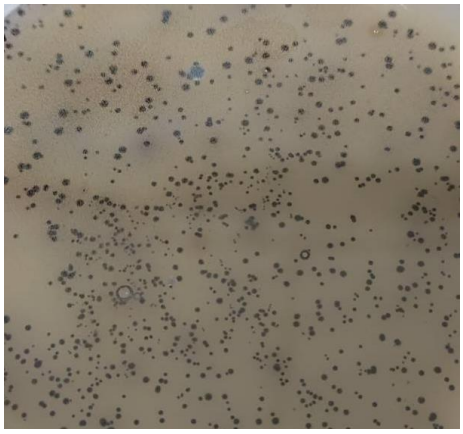
วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> การตรวจหาปริมาณ *S. aureus* โดยวิธีการตรวจนับจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct plate count method): เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มี *S. aureus* มากกว่า 100 เซลล์ต่อกรัม

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เทใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อแล้วเติมสารละลายเปปโตนซาไลน์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นเป็นเวลา 2 นาที
2. ทำการเจือจางตัวอย่างต่อไปถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ด้วยสารละลายเปปโตนซาไลน์
3. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตรแบ่งใส่บนผิวหน้าอาหาร BPA จำนวน 3 จาน คือจานที่ 1 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จานที่ 2 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และจาน

ที่ 3 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ถ้าตัวอย่างอาหารยังซึมเข้าในผิวอาหารเลี้ยงเชื้อไม่หมด ให้ตั้งจานอาหาร BPA ไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35°C โดยไม่ต้องคว่ำจานเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงคว่ำจานและบ่มต่อไปอีก 45-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35°C

4. ตรวจดูโคโลนีบนจานอาหาร BPA เลือกจานที่มีโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *S. aureus* จำนวน 20-200 โคโลนี โคโลนีของ *S. aureus* จะมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ชื้น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สีเทาถึงดำ มักมีสีอ่อนลงที่ขอบโคโลนี บริเวณรอบโคโลนีจะมีโซนขาวขุ่น (opaque zone) และบ่อยครั้งจะมีโซนใสล้อมรอบที่ขอบนอกด้วย บางครั้งอาจพบ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายไขมันที่มีลักษณะคล้ายกันที่ไม่มีโซนขาวขุ่นหรือโซนใสจากอาหารหลายชนิดรวมทั้งผลิตภัณฑ์นม สำหรับ *S. aureus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารแช่แข็งหรืออาหารแห้งที่เก็บไว้นาน โคโลนีที่ขึ้นมักจะมีสีดำจางและอาจมีลักษณะเนื้อของโคโลนีที่แห้งหยาบ



รูปที่ 10.1 ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหาร BPAที่เติมโพแทสเซียมเทลลูไรส์และไข่แดง

5. ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวแล้วจดบันทึกไว้ ในกรณีที่โคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารที่ระดับความเจือจางต่ำสุดโดยมีจำนวนน้อยกว่า 20 โคโลนี อาจใช้จานอาหารเหล่านี้ในการนับจำนวนโคโลนี โดยให้นับโคโลนีที่มีลักษณะต่าง ๆ รวมทั้งโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *S. aureus* และโคโลนีที่มีลักษณะอื่น โดยนับจำนวนโคโลนีแต่ละลักษณะและบันทึกจำนวนโคโลนีแต่ละลักษณะแยกกัน แต่ถ้าโคโลนีที่ขึ้นมีจำนวนมากกว่า 200 โคโลนีโดยมีลักษณะที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *S. aureus* และไม่พบลักษณะนี้ที่ระดับความเจือจางสูงกว่า ให้นับจำนวนโคโลนีจากจานอาหารเหล่านี้โดยเลือกนับเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* เท่านั้น
6. คัดเลือกโคโลนีแต่ละลักษณะที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *S. aureus* มากกว่า 1 โคโลนีต่อหนึ่งลักษณะ นำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test) และทดสอบยืนยันชนิดอื่น

คำนวณหาจำนวนของ *S. aureus* ในอาหารที่นำมาวิเคราะห์ (CFU ต่อกรัมของอาหาร) จากจำนวนโคโลนีที่ให้ผลบวกกับการทดสอบยืนยัน

หมายเหตุ: ดูวีดีโอได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

เชื้อควบคุม

1. เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 2 ชนิดจากหลอด TSA slant ได้แก่ *S. aureus* (เป็น positive control) และ *S. epidermidis* (เป็น negative control) ลากลงบนผิวหน้าอาหาร BPA ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ สังเกตลักษณะโคโลนีเปรียบเทียบกับเชื้อจากตัวอย่าง
2. คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* มาทดสอบยืนยันในขั้นต่อไป

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส

1. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นโคโลนีของ *S. aureus* ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว BHI ปริมาตร 0.2-0.3 มล. กวนเพื่อผสมเชื้อให้เข้ากันดีกับอาหารเหลว และถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร BHI นี้มา 1 ลูปเต็ม ลากบนผิวในหลอดอาหาร TSA slant
2. นำหลอดอาหาร BHI และ TSA slant ที่ถ่ายเชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เก็บเชื้อในหลอด TSA slant ไว้เพื่อทดสอบซ้ำหรือทดสอบอย่างอื่นเพิ่มเติมในกรณีที่ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสยังไม่ชัดเจน
3. เติมโคแอกกูเลสพลาสมาที่มี EDTA ซึ่งผ่านการคืนรูปแล้ว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดอาหาร BHI ที่ผ่านบ่มแล้ว นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงสำหรับตรวจดูการสร้างลิ่ม (clot formation)
4. อ่านผลโดยดูการจับตัวเป็นลิ่มของพลาสมาเนื่องจากเอนไซม์โคแอกกูเลสที่เชื้อ *S. aureus* สร้าง การเกิดลิ่มเพียงบางส่วน (ปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในระดับ 2+ และ 3+) ต้องทดสอบต่อไป ควรทดสอบเชื้อที่ทราบแล้วว่าเป็นเชื้อชนิดใดและจะให้ผลบวกหรือให้ผลลบกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสควบคู่กันไปกับเชื้อที่ยังไม่ทราบว่าสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสได้หรือไม่ นำทุกเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *S. aureus* มาย้อมแกรม แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดสอบยืนยันชนิดอื่น

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

ใช้เชื้อที่เจริญในหลอด TSA slant สำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส วิธีการทดสอบทำได้โดยปิเปตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเชื้อที่ขึ้นในหลอด TSA slant สังเกตการเกิดแก๊ส ถ้าเกิดแก๊สแสดงว่าให้ผลบวก หรืออีกวิธีหนึ่ง หยด

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 จำนวน 1 หยดลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อมา 1 ลูป กวนให้เข้ากัน ถ้าเกิดแก๊สทันทีแสดงว่าให้ผลบวก

2. การใช้กลูโคสในสภาพไร้อากาศ

เขี่ยเชื้อปริมาณมากด้วยห่วงเขี่ยเชื้อลงในอาหารคาร์โบไฮเดรตสำหรับการหมัก (TYEA ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.5) โดยให้เชื้อบางส่วนตกลงที่ก้นหลอด ปิดผิวหน้าของอาหารด้วยน้ำมันพาราฟินที่หนาอย่างน้อย 25 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน ถ้าอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั่วทั้งหลอดแสดงว่ามีการสร้างกรดในสภาพไร้อากาศชี้ให้เห็นถึงการมีเชื้อ *S. aureus* ควรทดสอบเชื้อควบคุมควบคู่กันไปได้แก่ เชื้อที่จะให้ผลบวกและเชื้อที่จะให้ให้ผลลบ รวมทั้งควรทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ใส่เชื้อด้วยเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ

3. การใช้แมนนิทอลในสภาพไร้อากาศ

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบการใช้กลูโคสในสภาพไร้อากาศโดยใช้แมนนิทอลเป็นสารคาร์โบไฮเดรตในหลอดอาหารสำหรับทดสอบ (TYEA ที่มีแมนนิทอลร้อยละ 0.5) ถ้าเป็นเชื้อ *S. aureus* มักจะให้ผลบวก ยกเว้นบางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะให้ผลลบ ควรทดสอบเชื้อควบคุมควบคู่กันไปเช่นเดียวกัน

4. การทดสอบความไวต่อไลโซสตาฟริน (lysostaphin sensitivity)

การทดสอบความไวต่อไลโซสตาฟรินทำได้โดย ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งใส่ลงในสารละลายฟอสเฟตซาไลน์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (ที่เติมเกลือร้อยละ 1) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กวนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายครึ่งหนึ่งของสารแขวนลอยเซลล์นี้ลงในหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่ง ผสมกับสารละลายฟอสเฟตซาไลน์บัฟเฟอร์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม ส่วนสารแขวนลอยของเซลล์ที่เหลือในหลอดเดิม นำมาเติมสารละลายไลโซสตาฟริน (ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตซาไลน์บัฟเฟอร์ที่มีเกลือร้อยละ 1) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำหลอดทั้งสองไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง ถ้าความขุ่นในของผสมหายไปแสดงว่าให้ผลบวก แต่ถ้าของผสมยังขุ่นอยู่ถือว่าให้ผลลบ โดยทั่วไปเชื้อ *S. aureus* จะให้ผลบวก

5. การสร้างเอนไซม์นิวคลีเอสที่ทนความร้อน (thermostable nuclease production)

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบที่มีความสำคัญในการยืนยันว่าเป็น *S. aureus* เช่นเดียวกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส ใช้แทนการทดสอบสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสไม่ได้ แต่จะใช้เพื่อสนับสนุนเพิ่มเติมในการยืนยันว่าใช่ *S. aureus* ในกรณีที่ได้ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสในระดับ 2+ ในการทดสอบนี้ ให้เทอาหาร Toluidine Blue-Deoxyribonucleic Acid Agar ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้แผ่บนกระจกสไลด์ เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะวุ้นให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เติมตัวอย่างเชื้อในอาหารเหลว (ที่เหลือจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสซึ่ง

ได้ ผ่านการให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะนั้น นำสไลด์ไปบ่มในสภาพที่ชื้นเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35°C ถ้าเกิดวงสีชมพูสดใสขึ้นอย่างน้อย 1 มิลลิลิตรจากขอบหลุมแผ่เข้าไปในวุ้นแสดงว่าให้ผลบวก

ตารางที่ 10.1 ลักษณะเฉพาะของ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*

คุณลักษณะเฉพาะของเชื้อ	*S. aureus*	*S. epidermidis*	Micrococci
การสร้างคะตะเลส	+	+	+
การสร้างโคแอกลูเลส	+	-	-
การสร้างเทอร์โมนิวคลีเอส	+	-	-
ความไวต่อไลโซสตาฟริน	+	+	-
การใช้กลูโคสในสภาพไร้อากาศ	+	+	-
การใช้แมนนิทอลในสภาพไร้อากาศ	+	-	-

+ หมายถึง สายพันธุ์ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90 หรือมากกว่า) ให้ผลบวก

- หมายถึง สายพันธุ์ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90 หรือมากกว่า) ให้ผลลบ

<u>การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API staph (BioMérieux)</u>

การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* อีกวิธีหนึ่งสามารถทำได้โดยใช้ชุดทดสอบ API staph (Biomérieux) ชุดทดสอบนี้ใช้จำแนกแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus, Micrococcus* และ *Kocuria* โดยอาศัยหลักชีวเคมีทั้งหมด 20 การทดสอบ

<u>หลักการ</u>

API staph strip ประกอบด้วยหลอดเล็กๆ ที่บรรจุสารตั้งต้นแห้ง (dehydrated substrates) จำนวน 20 หลอด โดยจะใส่สารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบซึ่งเตรียมโดยผสมในอาหารเหลว API Staph medium ในระหว่างการบ่ม เมแทบอลิซึมของเชื้อจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารที่อยู่ในหลอด อ่านผลตามตาราง การจำแนกชนิดว่าเป็นเชื้อใดทำได้โดยใช้ identification software

<u>อุปกรณ์</u>

1.1 API staph medium ปริมาตร 6 มิลลิลิตร (มีสูตรดังนี้ ยีสต์สกัด 0.5 กรัม bactopeptone 10 กรัม NaCl 5 กรัม Trace elements 10 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0-7.4)

1.2 API staph strips ประกอบด้วยหลอดจำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ได้แก่ ไม่มีซับสเตรท (0), D-glucose (GLU), D-fructose (FRU), D-

mannose (MNE), D-maltose (MAL), D-lactose (LAC), D-trehalose (TRE), D-mannitol (MAN), xylitol (XLT), D-melibiose (MEL), potassium nitrate (NIT), ß-naphthyl phosphate (PAL), sodium pyruvate (VP), D-raffinose (RAF), D-xylose (XYL), D-saccharose หรือ sucrose (SAC), methyl-**α** D-glucopyranoside (MDG), N-acetyl-glucosamine (NAG), L-arginine (ADH) และ urea (URE) (ตารางที่ 10.2)

1.3. mineral oil

1.4. สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 0.5

1.5. reagents ที่มากับชุดทดสอบได้แก่

ก) สาร VP1 และ VP2

ข) สาร NIT1 และ NIT2

ค) สาร ZYM A และ ZYM B

1.6 กล่องสำหรับใช้บ่ม (incubation box) ประกอบด้วยถาดพลาสติกพร้อมฝาปิด

1.7 โปรแกรม apiweb™ Identification software

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ก) การเตรียม Strip

เตรียมกล่องสำหรับใช้บ่ม โดยเติมน้ำกลั่นหรือน้ำ demineralized (หรือน้ำใดๆ ที่ไม่มีสารเจือปนหรือสารเคมีที่อาจจะปล่อยแก๊สเช่น แก๊สคลอรีน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เกิดสภาพบรรยากาศที่ชื้น วาง strip ลงบนถาด

ข) การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเชื้ออยู่ในวงศ์ Micrococcaceae หรือไม่ (เช่นตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีแกรมและการสร้างเอนไซม์คะตะเลส) พร้อมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ จากนั้นเปิดฝา ampoule ของอาหาร API staph medium เขี่ยเชื้อลงในอาหารเพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 0.5

ค) การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงใน API staph strip

วาง strip บนถาดซึ่งเอียงตั้งขึ้น แล้วใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้เติมลงในหลอดเล็กๆ ใน strip นั้น โดยสอดปลาย pipet tip ลงที่ด้านข้างของปากหลอด (cupule) แล้วจึงปล่อยของเหลวลงไปในหลอดเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดฟองอากาศ ไม่ต้องเติมจนเต็ม ให้เหลือที่ว่างบริเวณ cupule ไว้ แล้วหยอด mineral oil ลงใน 2 หลอดสารได้แก่ หลอด <u>ADH</u> และ <u>URE</u> เพื่อให้เกิดสภาพไร้อากาศ นำ strip ที่วางในกล่องบ่มไปไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง <u>หมายเหตุ</u>: ดูวีดีโอได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

รูปที่ 10.2 ชุดทดสอบ API staph ก่อนบ่ม

ตารางที่ 10.2 สารเคมีชนิดแห้งใน 20 หลอดของ API staph strips

หลอดที่	อักษรย่อ	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	ปริมาณ (mg/cup.)
0	หลอดควบคุม	ไม่มี substrate	0
1	GLU	D-glucose	1.56
2	FRU	D-fructose	1.4
3	MNE	D-mannose	1.4
4	MAL	D-maltose	1.4
5	LAC	D-lactose	1.4
6	TRE	D-trehalose	1.32
7	MAN	D-mannitol	1.36
8	XLT	Xylitol	1.4
9	MEL	D-melibiose	1.32
10	NIT	potassium nitrate	0.08
11	PAL	ß-naphthyl phosphate	0.0244
12	VP	sodium pyruvate	1.904
13	RAF	D-raffinose	1.56
14	XYL	D-xylose	1.4
15	SAC	D-saccharose (sucrose)	1.32
16	MDG	methyl- α D-glucopyranoside	1.28
17	NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28
18	ADH	L-arginine	1.904
19	URE	Urea	0.76

ที่มา : คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API staph

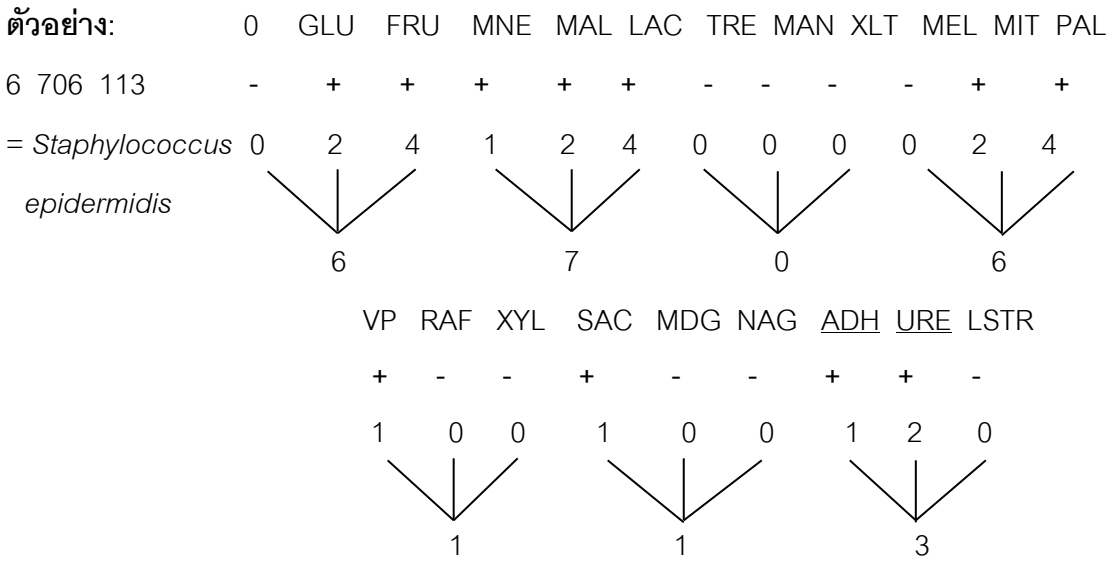
ง) การอ่านและแปรผล

หลังจากบ่ม ให้หยดสารเคมีเพื่อการเกิดปฏิกิริยา ตามลำดับดังนี้

- VP test: หยดสาร VP 1 และ VP 2 ลงในหลอด VP อย่างละ 1 หยด ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพู-ม่วง แสดงว่าให้ผลบวก แต่ถ้าให้สีชมพูซีดหรือชมพูอ่อนคือให้ผลลบ (VP 1 ประกอบด้วยโพแทสเทียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม น้ำ 100 มิลลิลิตร และ VP 2 ประกอบด้วย α-naphthol 6 กรัม เอทานอล 100 มิลลิลิตร)
- NIT test: หยดสาร NIT 1 และ NIT 2 ลงในหลอด NIT อย่างละ 1 หยด ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (NIT 1 ประกอบด้วย sulphanilic acid 0.4 กรัม กรดแอซีติก 30 กรัม น้ำ 70 มิลลิลิตร และ NIT 2 ประกอบด้วย N, N-dimethy-1-naphthylamine 0.6 กรัม กรดแอซีติก 30 กรัม น้ำ 70 มิลลิลิตร)
- PAL test: หยด ZYM A และZYM B ลงในหลอด PAL อย่างละ 1 หยด ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นผลบวก (ZYM A ประกอบด้วย tris-hydroxymethyl-aminomethane 25 กรัม กรดไฮโดรคลอริก (37%) 11 มิลลิลิตร sodium lauryl sulfate 10 กรัมและน้ำ 100 มิลลิลิตร และ ZYM B ประกอบด้วย fast blue BB (active ingredient) 0.12 กรัม เมทานอล 40 มิลลิลิตรและ dimethylsulfoxide (DMSO) 60 มิลลิลิตร)

ส่วนในหลอดอื่นที่มีสีของสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีแดง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรทเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลืองให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ ส่วนในหลอด ADH และ URE ซึ่งมีสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีเหลือง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรทเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง-ส้มหรือสีแดง-ม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ อ่านค่าแล้วแปรผลต่อไป

การแปรผลโดยใช้โปรแกรม Identification software หรือ API Staph Analytical Profile Index โดยใส่เป็นเครื่องหมายบวกหรือลบ หรือใส่เป็นตัวเลข 7 ตัว (Numerical profile) ซึ่งตัวเลขสามารถคำนวณได้ดังนี้คือ ในกระดาษบันทึกผลจะแบ่งการทดสอบเป็นกลุ่ม ๆ โดยใน 1 กลุ่มจะประกอบด้วย 3 การทดสอบ ถ้าให้ผลบวกจะมีค่าเป็น 1, 2 และ 4 เหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นให้นำเลขของผลการทดสอบในช่องที่เป็นบวกมารวมกัน 1 strip จะได้ 7 หมายเลขด้วยกัน ตัวอย่างดังในภาพ



<u>ตอนที่ 2</u> การตรวจหาจำนวน *S. aureus* โดยวิธี Most Probable Number

วิธี Most Probable Number (MPN) เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับงานประจำในการตรวจหา *S. aureus* ที่มีปริมาณน้อยในผลิตภัณฑ์ซึ่งมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปะปนด้วยปริมาณมาก

1. เตรียมตัวอย่างเหมือนกับวิธีการตรวจนับจำนวน *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง โดยเจือจางตัวอย่างอาหารจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-3} (อาจทำการเจือจางที่ระดับความเจือจางสูงขึ้นถ้าคาดว่ามีจำนวน *S. aureus* เกิน 10^{3} ต่อกรัม)
2. ถ่ายเชื้อที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TSB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 และโซเดียมไพรูเวตความเข้มข้นร้อยละ 1 ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง
3. ถ่ายเชื้อ 1 ลูปจากหลอดที่มีการเจริญซึ่งเกิดความขุ่น ถ้าสังเกตเห็นการเจริญเฉพาะที่ก้นหลอดหรือด้านข้างหลอดให้ผสมให้เข้ากันก่อนลากลงบนอาหาร BPA ที่มีผิวหน้าแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
4. ถ่ายเชื้อจากจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *S. aureus* อย่างน้อย 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว BHI ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสและทดสอบยืนยันเช่นเดียวกับวิธีการตรวจนับจำนวน *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง
5. จากการทดสอบยืนยันจะทำให้ทราบจำนวนหลอดอาหารที่มีเชื้อ *S. aureus* ที่แต่ละระดับความเจือจาง (จากจำนวนทั้งหมด 3 หลอดต่อ 1 ระดับความเจือจาง) นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาจำนวน *S. aureus* ในรูปของค่า MPN ต่อกรัมโดยใช้ตาราง MPN สำหรับ 3 หลอดในภาคผนวก จ

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการตรวจนับจำนวน *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....

ลักษณะของโคโลนีที่น่าจะเป็น *S. aureus*.....

ลักษณะของโคโลนีอื่นที่สงสัยว่าอาจเป็น *S. aureus*.....

1.1 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนี

ความเจือจาง	จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะของ *S. aureus*				จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะอื่น			
	จานที่ 1	จานที่ 2	จานที่ 3	ทั้งหมด	จานที่ 1	จานที่ 2	จานที่ 3	ทั้งหมด
10^{-1}								
10^{-2}								
10^{-3}								

1.2 ผลการทดสอบยืนยัน

หมายเลขของเชื้อที่แยกมาทดสอบ	การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลส	การทดสอบยืนยันชนิดอื่น				
		.....	.....	.....	.....	.....
<u>โคโลนีที่มีลักษณะของ *S. aureus*</u>						
1						
2						
3						
4						
<u>โคโลนีที่มีลักษณะอื่น</u>						
1						
2						
3						
4						
S. aureus						
S. epidermidis						

จำนวน *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์เท่ากับ .....CFU ต่อกรัม

2. ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API staph

บันทึกผลบวกหรือลบลงในแต่ละช่องการทดสอบ แล้วรวมตัวเลขแต่ละกลุ่ม ดังตัวอย่างข้างล่าง

API 20E			รหัสของเชื้อ.....						แหล่งที่มา.....						วันที่ทดสอบ.....					
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR

<u>สรุปผลการทดสอบ</u>

.....

.....

.....

.....

3. ผลการตรวจหาจำนวน *S. aureus* โดยวิธี MPN

ระดับความเจือจาง	ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (มี *S. aureus*)			
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
10^{-1}	0.1				
10^{-2}	0.01				
10^{-3}	0.001				

<u>การคำนวณหาค่า MPN ต่อกรัม และค่า confidence limit ของ *S. aureus*</u>

รูปแบบที่เลือก: .....(จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์..... , ...และ ..... กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = ... (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1 , 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = ...

Confidence limit (จากตาราง) = ...

Confidence limit ของตัวอย่าง = ...

คำถามท้ายบท

1. *S. aureus* มีลักษณะอย่างไร จงบอกสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อชนิดนี้
2. ทำไมจึงใช้ BPA ในการตรวจหา *S. aureus* อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ประกอบด้วยอะไร ทำไมจึงต้องเติมโพแทสเซียมเทลลูไรส์และไข่แดง โคโลนีของ *S. aureus* บน BPA จะมีลักษณะอย่างไร
3. ในการทดสอบยืนยันว่าเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* จะต้องทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดใด

เอกสารอ้างอิง

Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus aureus*. In: R.G. Labbé, García, S. (Eds.), Guide to Foodborne Pathogens, A John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 201-220.

Bennett, R. W., Lancette, G. A. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ Laboratory Methods/ucm071429.htm 15 July 2014.

Montville, T.J., Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington, DC.

Wong, A.C.L., Bergdoll, M.S. 2002. Staphylococcal food poisoning. In: Cliver, D.O., Rieman, H.P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2rd ed. Academic Press, Barcelona, Spain, pp. 231-248.

Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

บทปฏิบัติการที่ 11
การตรวจหา *Bacillus cereus* ในอาหาร

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนขนาดใหญ่ มักจะอยู่ต่อกันเป็นสาย เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) เซลล์มีขนาดใหญ่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-1.2 ไมโครเมตร ยาว 3.0-5.0 ไมโครเมตร เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ แต่ในสภาพไม่มีอากาศก็สามารถเจริญได้ดี สร้างเอนโดสปอร์ที่มีรูปร่างรี อยู่ระหว่างกึ่งกลางเซลล์ถึงเกือบปลายเซลล์ สปอร์ของ *B. cereus* ทนความร้อนได้ดี สามารถอยู่รอดได้หลังการพาสเจอร์ไรส์ อุณหภูมิต่ำสุดในการเจริญ 10-12°C และอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญ 48-50°C เจริญได้เร็วที่อุณหภูมิ 30-40°C เจริญได้ในช่วง pH 4.9-9.3 แบคทีเรียชนิดนี้ปกติแพร่กระจายตามธรรมชาติ พบในดินและบนพืชผัก ในสิ่งแวดล้อมเช่นนี้ทำให้เชื้อชนิดนี้ปนเปื้อนสู่อาหารได้ง่ายทั้งในอาหารดิบและอาหารแปรรูปหลายชนิดที่ทำจากพืช และอาจปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์เนื้อและผลิตภัณฑ์นม ตัวอย่างเช่น ปนเปื้อนจากหญ้าสู่เต้านมวัวและในที่สุดปนเปื้อนลงในน้ำนมดิบ สปอร์ของ *B. cereus* สามารถอยู่รอดได้หลังการพาสเจอร์ไรส์น้ำนม จากนั้นสปอร์จะงอก เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนทำให้เกิดปัญหาในผลิตภัณฑ์นม ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ของ *B. cereus* ส่วนใหญ่จะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C หรือในผลิตภัณฑ์นมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8°C แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิต่ำได้ดี (psychrotolerant strains) โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 4-6°C

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิดที่มีลักษณะค่อนข้างแตกต่างกันมาก จากการที่มีผู้วิเคราะห์ 16S rRNA sequence ของเชื้อ *Bacillus* หลายชนิด ทำให้สามารถแยก *Bacillus* ออกได้เป็นหลายกลุ่ม สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *B. cereus (B. cereus* group) ได้แก่ *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides, B. megaterium* และ *B. weihenstephanensis* คุณสมบัติของ *B. cereus* ที่แตกต่างจากสปีชีส์ใกล้เคียงได้แก่ การที่เชื้อชนิดนี้สร้างเอนไซม์เลซิทิเนส ย่อยสลายเลซิทินในไข่แดง ไม่สามารถสร้างกรดจากแมนนิทอล สามารถเจริญได้ในสภาพไม่มีอากาศ ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Voges-Proskauer และมีความต้านทานต่อไลโซไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.001

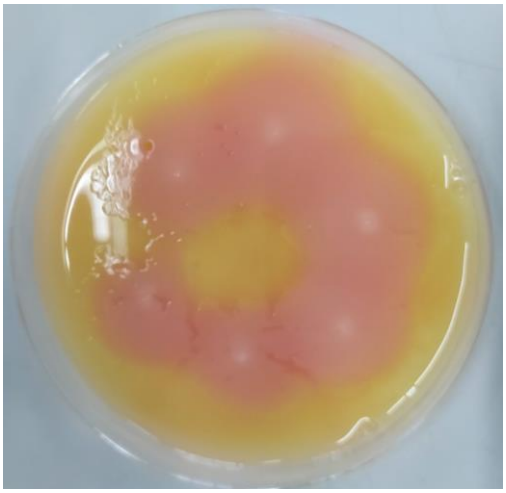
โรคอาหารเป็นพิษโดย *B. cereus*

โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *B. cereus* เกิดขึ้นจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้จำนวนมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งได้เตรียมทิ้งไว้นานหลายชั่วโมงโดยไม่แช่เย็น โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ที่ได้มีรายงานไว้นั้นมีสาเหตุมาจากการรับประทานเนื้อ ผักปรุงสุก ข้าวผัด

ข้าวต้ม สตูเนื้อ ซอสวานิลา คัสตาสด์ มักโรนีกับเนยแข็ง ซุป และถั่วงอกดิบ เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ มักมีสารประกอบที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมหลายชนิดได้แก่ เอนไซม์เลซิทิเนส โพรติเอส (proteases) ฮีโมไลซิน (hemolysin) เบต้าแลคทาเมส (β-lactamase) สารพิษที่เป็นอันตรายต่อหนูและสารพิษที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food-poisoning toxins) เชื้อ *B. cereus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ 2 ชนิดได้แก่ 1) diarrheal syndrome เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้จำนวนมาก เชื้อชนิดนี้สร้างเอนเทอโรทอกซินในลำไส้เล็กของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย มีน้ำออกมามาก และอาจคลื่นไส้ ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับเชื้อจนกระทั่งแสดงอาการ (incubation period) ประมาณ 8-16 ชั่วโมง บางครั้งอาจนานกว่า 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง อาหารที่มักจะเป็นสาเหตุได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้อ นม และผลิตภัณฑ์นม ซุป ผัก พุดดิ้ง และซอสต่าง ๆ 2) emetic syndrome มีสาเหตุมาจากการที่ผู้ป่วยได้รับสารพิษอิมีติก (emetic toxin) ซึ่งเป็นไซคลิกเปปไทด์ (cyclic peptide) ที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้และอาเจียนอย่างรุนแรงหลังจากได้รับเชื้อและสารพิษภายใน 0.5-5 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง อาหารที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของโรคนี้ได้แก่ ข้าวผัด ข้าวสุก พาสต้า (pasta) เพสตรี (pastry) และอาหารเส้นประเภทก๋วยเตี๋ยว บะหมี่

การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *B. cereus*

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือก (selective media) เพื่อแยกเชื้อ *B. cereus* นั้นอาศัยหลักการที่ *B. cereus* สามารถสร้างเอนไซม์เลซิทิเนสหรือเอนไซม์ฟอสฟอลิเพส ซี (phospholipase C) ได้ ซึ่งทดสอบโดยการเติมไข่แดงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจดูการสร้างเอนไซม์เลซิทิเนสและการที่ *B. cereus* ไม่สามารถหมักแมนนิทอล ซึ่งทดสอบได้ง่ายโดยการเติมแมนนิทอลและสีย้อมที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการเติมสารพอลิไมซิน (polymyxin) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก *B. cereus* ก็เพื่อที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพในการคัดเลือก *B. cereus* เนื่องจากสารชนิดนี้จะไปยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ hemolysin activity สามารถตรวจสอบได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเช่น จากเลือดของม้า กระต่าย แกะ หรือคน มีผู้ทดลองเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดได้แก่ Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar, Polymyxin-Pyruvate-Egg Yolk-Mannitol-Bromothymol Blue Agar (PEMBA) และ Trypticase Soy-Polymyxin-Sheep Blood Agar เพื่อใช้ในการตรวจหาจำนวน *B. cereus* ปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด แต่นักวิจัยบางท่านได้แนะนำว่า *B. cereus* ถูกแยกความแตกต่างกับแบคทีเรียชนิดอื่นได้ดีบนอาหาร MYP



รูปที่ 11.1 *Bacillus cereus* บนอาหาร MYP ที่เติมไข่แดง

การสุ่มตัวอย่างและการขนส่งตัวอย่าง

ถ้าอาหารมีปริมาณมาก เก็บตัวอย่าง 50 กรัมจากแต่ละส่วนที่แตกต่างกันของอาหารที่สงสัย เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนโดยอาจกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ถ้าหากอาหารเป็นผงหรือประกอบด้วยส่วนผสมที่มีอนุภาคต่างกัน ควรผสมให้เข้ากันดีก่อนเก็บตัวอย่าง และควรขนส่งตัวอย่างทันทีที่เก็บตัวอย่าง โดยวางในกล่องที่ป้องกันอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงซึ่งมีสารทำความเย็นอยู่เพียงพอเพื่อรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างให้อยู่ที่ 6°C หรือต่ำกว่า เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ควรทำการวิเคราะห์ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ ถ้าไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ภายใน 4 วัน ควรแช่แข็งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะวิเคราะห์ เมื่อจะวิเคราะห์นำตัวอย่างมาละลายจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วทำการวิเคราะห์ตามปกติ ถ้าหากตัวอย่างเป็นอาหารแช่แข็ง รักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ -20°C จนกระทั่งวิเคราะห์ ขนส่งตัวอย่างในสภาพที่มีน้ำแข็งแห้งเพื่อหลีกเลี่ยงการละลาย ถ้าเป็นอาหารแห้งควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและขนส่งโดยไม่ต้องแช่เย็น

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เข้าใจถึงหลักการและวิธีการตรวจหา *B. cereus* ในอาหาร

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus cereus*
2. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ เต้าเจี้ยว แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว ข้าวผัด ข้าวต้ม ซูชิ หมี่ผัด และเครื่องเทศผงเช่น อบเชย พริก ไทยขาว พริกไทยดำ ผงพะโล้ กระเทียม และอื่นๆ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) agar, Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), Phenol Red Glucose Broth, Nitrate Broth, Modified Voges-

Proskauer (VP) Medium, Tyrosine Agar, Lysozyme Broth (Nutrient Broth ที่มีไลโซไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.001), *Bacillus cereus* (BC) Motility Medium, Trypticase Soy-Sheep Blood Agar (TSSBA) และ Trypticase Soy-Polymyxin Broth

4. สารสำหรับทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ สารทดสอบไนไตรต์ เอ (Nitrite test reagent A) สารทดสอบไนไตรต์ ซี (Nitrite test reagent C) สารละลายแอลฟา-แนฟทอล (alpha-naphthol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ในเอทานอล สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 และผลึกครีเอติน
5. Basic fuchsin, crystal violet, safranin และสารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม
6. สารละลาย Butterfield's phosphate-buffered dilution water และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
7. เมทานอล และสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
8. จานเพาะเชื้อ ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร และ แท่งแก้วงอ
9. ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่น
10. โถไร้อากาศ (GasPak anaerobic jar)
11. เครื่องตีป่นอาหารและเครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง
12. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C และกล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> วิธีการตรวจนับจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct Plate Count Method)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัมด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ เทใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลาย Butterfield's phosphate-buffered dilution water ปริมาณ 450 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยความเร็วสูงโดยใช้เครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที
2. ทำการเจือจางตัวอย่างต่อไปจนได้ 10^{-2} และ 10^{-3}
3. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin Agar (MYP) ระดับความเจือจางละ 2 จาน ใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่ขึ้น โคโลนีของ *B. cereus* จะมีสีชมพูเหมือนสีของอาหารและสีชมพูจะเข้มขึ้นถ้าบ่มต่อไปและรอบโคโลนีจะมีโซนขาวขุ่น (opaque zone) เนื่องจากเชื้อสร้างเลซิทิเนสซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับเลซิทินในไข่แดงทำให้เกิดตะกอนขุ่น ถ้าผลที่ได้ไม่ชัดเจน ให้บ่มต่อไปอีก 24 ชั่วโมงก่อนนับจำนวนโคโลนี

5. เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีชมพูและมีโซนขาวขุ่นรอบโคโลนีประมาณ 15-150 โคโลนี เขี่ยเชื้อจาก 5 โคโลนีหรือมากกว่า ลากลงบนผิวหน้าอาหารในหลอด NA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อการตรวจยืนยัน นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่มีลักษณะดังกล่าว
6. คำนวณหาจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ต่อกรัมของอาหารโดยคำนึงถึงร้อยละของโคโลนีที่ใช่ *B. cereus* หลังการตรวจยืนยัน ตัวอย่างเช่น ถ้าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} เป็น 65 โคโลนี และโคโลนีที่ตรวจสอบยืนยัน 4 โคโลนี (จาก 5 โคโลนีที่ตรวจสอบ) เป็นเชื้อ *B. cereus* ดังนั้น:

   จำนวน *B. cereus* (CFU ต่อกรัมของอาหาร) = 65 × 4/5 × 1000 × 10 = 520,000

   (หมายเหตุ: dilution factor สูงขึ้นอีก 10 เท่าเนื่องจากเติมตัวอย่างเพียง 0.1 มิลลิลิตรในการทำด้วยเทคนิค spread plate)

<u>เชื้อควบคุม</u>

1. เขี่ยเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์จากหลอด NA slant ลากลงบนผิวหน้าอาหาร MYP ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์
2. คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีเปรียบเทียบกับโคโลนีจากตัวอย่าง
3. นำ *B. cereus* บริสุทธิ์มาทดสอบยืนยันในขั้นต่อไป ทำเช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง

<u>การทดสอบยืนยัน</u>

นำเชื้อใน NA slant มาย้อมแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ *B. cereus* จะติดสีแกรมบวก มีรูปท่อนขนาดใหญ่ ต่อกันเป็นสายสั้นถึงสายยาว สปอร์เป็นรูปรี อยู่ตรงหรือค่อนไปทางปลายเซลล์ เขี่ยเชื้อจากหลอด NA slant มา 1 ลูปเต็มใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบยืนยันดังนี้

1. Phenol Red Glucose Broth

เขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดอาหาร Phenol Red Glucose Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในโถไร้อากาศ (GasPak anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าหลอดอย่างแรง สังเกตการเจริญจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นและสีที่เปลี่ยนไปจากสีแดงเป็นสีเหลือง ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการสร้างกรดจากกลูโคสในสภาพไร้อากาศ อาจมีบางหลอดที่สีเปลี่ยนเพียงบางส่วนจากสีแดงเป็นสีส้มหรือเหลืองแม้แต่ในหลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อเนื่องจากค่า pH ที่ลดลงจากการที่อาหารสัมผัสกับแก๊สคาร์บอนคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในโถไร้อากาศ ควรทดสอบควบคู่ไปกับเชื้อควบคุม

2. Nitrate Broth

เขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดอาหาร Nitrate Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบไนไตรต์โดยการเติมสารทดสอบไนไตรต์ เอ และสารทดสอบไนไตรต์ ซี ลงในหลอดเชื้อที่บ่มแล้ว ถ้าเกิดสีส้มภายใน 10 นาทีแสดงว่า ไนเตรตได้ถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์

3. Modified VP Medium

เขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดอาหาร Modified VP Medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินอล (acetylmethyl carbinol) โดยปิเปตเชื้อในหลอดอาหารดังกล่าวมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปราศจากเชื้อแล้วเติมสารละลายแอลฟา-แนฟทอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรและสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าและเติมผลึกครีเอตินลงไป 2-3 ผลึก ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตผล ถ้าเกิดสีชมพูหรือสีม่วงแสดงว่าให้ผลบวก

4. Tyrosine Agar

เขี่ยเชื้อมาลากลงบนผิวอาหารใน Tyrosine Agar slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการใสขึ้นของอาหารที่มีเชื้อเจริญ ชี้ให้เห็นว่าไทโรซีน (tyrosine) ได้ถูกย่อยสลายไป สำหรับเชื้อที่ไม่ใช่ *B. cereus* ให้สังเกตการเจริญและบ่มต่อไปจนครบ 7 วันก่อนจะตัดสินว่าให้ผลลบ

5. Lysozyme Broth

เขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดอาหาร NB (ที่มีไลโซไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.001) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และหลอดอาหาร NB ที่ไม่เติมไลโซไซม์เป็นหลอด positive control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญในหลอดทั้งสอง บ่มหลอดที่เชื้อไม่เจริญต่อไปอีก 24 ชั่วโมง

6. MYP agar

ใช้ปากกาขีดใต้จานอาหาร MYP Agar เพื่อแบ่งให้เป็น 6-8 ช่องเท่าๆ กัน แล้วเขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็ม แตะลงบนผิวหน้าของอาหาร MYP (สามารถทดสอบได้ 6-8 เชื้อต่อหนึ่งจาน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการสร้างเอนไซม์เลซิทิเนสโดยสังเกตรอยขาวขุ่นรอบโคโลนีที่ขึ้น ถ้าเชื้อที่เจริญมีสีของโคโลนีและสีของอาหารโดยรอบเป็นสีชมพู แสดงว่าไม่เกิดการหมักแมนนิทอล แต่ถ้ามีสีเหลืองแสดงว่าเกิดกรดจากการหมักแมนนิทอล โดยปกติ *B. cereus* มักจะสร้างเอนไซม์เลซิทิเนสได้ (lecithinase-positive) และไม่หมักแมนนิทอล (mannitol-negative) บนอาหาร MYP

<u>การสรุปผลการทดสอบ</u>

การที่จะสรุปว่าเชื้อที่แยกจากตัวอย่างเป็น *B. cereus* ได้นั้น 1) เซลล์จะต้องมีรูปร่างท่อนขนาดใหญ่ สร้างสปอร์โดยอับสปอร์ไม่บวม 2) สร้างเอนไซม์เลซิทิเนสและไม่หมักแมนนิทอลบนอาหาร MYP 3) เจริญและสร้างกรดจากกลูโคสในสภาพไร้อากาศ 4) รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์

(ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่อาจให้ผลลบ) 5) สร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินอล (ผลการทดสอบ VP เป็นบวก) 6) ย่อยสลายแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และ 7) เจริญในสภาพที่มีไลโซไซม์ร้อยละ 0.001

ลักษณะพื้นฐานเหล่านี้เป็นลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *B. cereus* ซึ่งรวมถึงสายพันธุ์ที่มีไรซอยด์ (rhizoid strains) ได้แก่ *B. mycoides*, *B. thuringiensis* (ก่อให้เกิดโรคกับแมลง) และ *B. anthracis* (ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) อย่างไรก็ตาม สามารถแยกแบคทีเรียเหล่านี้ออกจาก *B. cereus* ได้ตามลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิด แบคทีเรียที่มีผลการทดสอบยืนยันแตกต่างไปจากที่กล่าวมานี้ จำเป็นต้องนำมาทดสอบเพิ่มเติม

<u>หมายเหตุ</u>: ดูวีดีโอวิธีการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

ตารางที่ 11.1 คุณลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus cereus* ชนิดต่างๆ

คุณลักษณะ	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. anthrasis*	*B. megaterium*
การย้อมแกรม	+[(a)]	+	+	+	+
การสร้างคะตะเลส	+	+	+	+	+
การเคลื่อนที่	+/-[(b)]	+/-	-[(c)]	-	+/-
การรีดิวซ์ไนเตรต	+	+	+	+	-[(d)]
การสลายไทโรซีน	+	+	+/-	-[(d)]	+/-
การทนไลโซไซม์	+	+	+	+	-
ปฏิกิริยากับไข่แดง	+	+	+	+	-
การใช้กลูโคสในสภาพไร้อากาศ	+	+	+	+	-
ปฏิกิริยา VP	+	+	+	+	-
การสร้างกรดจากแมนนิทอล	-	-	-	-	+
ฮีโมไลซีส	+	+	+	-[(d)]	-
การก่อให้เกิดโรค	สร้างเอนเทอโรทอกซิน	สร้างผลึกเอนโดทอกซิน ก่อโรคกับแมลง	มีการเจริญให้ไรซอยด์	ก่อโรคกับคนและสัตว์	

[(a)] + หมายถึง ร้อยละ 90-100 ของสายพันธุ์ให้ผลบวก [(c)] – หมายถึง ร้อยละ 90-100 ของสายพันธุ์ให้ผลลบ

[(b)] +/- หมายถึง ร้อยละ 50-50 ของสายพันธุ์ให้ผลบวก [(d)] -หมายถึง สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลลบ

ที่มา: Rhodehamel และ Harmon (2001)

<u>การทดสอบเพื่อแยกความแตกต่างของแบคทีเรียชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *B. cereus*</u>

การทดสอบต่อไปนี้เป็นการทดสอบที่มีประโยชน์สำหรับแยกความแตกต่างของแบคทีเรีย

ชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *B. cereus* ได้แก่ *B. mycoides*, *B. thuringiensis* และ *B. anthracis*

1. การทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test)

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบที่มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยการแทงลงไปตรงกลางหลอดอาหาร BC Motility Medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญตามรอยแทง ถ้าเชื้อเคลื่อนที่ได้จะเกิดการเจริญกระจายออกโดยรอบรอยนั้น แต่ถ้าเชื้อเคลื่อนที่ไม่ได้จะมีการเจริญเฉพาะในรอยและตามรอยแทงนั้น

อีกวิธีหนึ่งเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงบนผิวของอาหารในหลอด NA slant เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบมา 1 ลูปเต็มใส่ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 หยดลงบนแผ่นสไลด์ แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่อยู่ในของเหลวที่ฐานของหลอดลงในหยดน้ำ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการเคลื่อนที่ บันทึกผล *B. cereus* และ *B. thuringiensis* ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ส่วน *B. anthracis* และ *B. mycoides* เกือบทั้งหมดเคลื่อนที่ไม่ได้ และมี *B. cereus* บางสายพันธุ์เท่านั้นก็เคลื่อนที่ไม่ได้เช่นกัน

2. การเกิดไรซอยด์ (Rhizoid growth)

เทอาหาร NA ปริมาตร 18-20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อขนาด 15×100 มิลลิ เมตร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งประมาณ 1-2 วัน เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง 1 ลูปเต็มแตะที่ผิวตรงกลางจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิดไรซอยด์ ถ้าเกิดไรซอยด์จะให้โคโลนีที่มีโครงสร้างคล้ายรากยาวยื่นออกมาหลายเซนติเมตรจากด้านข้างของโคโลนี เชื้อ *B. cereus* มักให้โคโลนีผิวหยาบที่มีรูปร่างกาแลคซี (galaxy shaped) ไม่ควรสับสนกับลักษณะของไรซอยด์ปกติซึ่งเป็นลักษณะของ *B. mycoides*

3. การทดสอบปฏิกิริยา hemolytic activity

ใช้ปากกาขีดที่ใต้จานอาหาร (Trypticase Soy-Sheep Blood Agar, TSSBA) เพื่อแบ่งเป็น 6-8 ส่วนเท่า ๆ กัน เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งมีอายุ 24 ชั่วโมง 1 ลูปเต็ม แตะบนผิวหน้าอาหาร TSSBA ในช่องใดช่องหนึ่ง (ทดสอบได้ 6-8 เชื้อต่ออาหารหนึ่งจาน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง สำหรับ *B. cereus* มีกิจกรรมย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ดี (strong hemolytic) โดยจะเกิดโซนใสของการเกิดฮีโมไลซีสอย่างสมบูรณ์รอบโคโลนี โซนใสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร *B. thuringiensis* และ *B. mycoides* ก็ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. anthracis* มักไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (nonhemolytic) หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง

4. การทดสอบผลึกสารพิษ (Protein toxin crystal)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งมีอายุ 24 ชั่วโมง 1 ลูปเต็มลงบนผิวหน้าอาหารในหลอด NA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 2-3 วัน จากนั้นเตรียมสไลด์ที่สะอาด หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาสเมียร์เป็นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์ ทิ้งไว้ให้รอยสเมียร์แห้ง ตรึงเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดเมทานอลให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วเทเมทานอลออก ทิ้งให้แห้งในอากาศ หยดสี basic fuchsin หรือ TB carbolfuchsin ZN stain (Difco) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ให้ความร้อนสไลด์โดยลนไฟข้างใต้สไลด์จนเดือด ยกออกมาทิ้งไว้นาน 1-2 นาที แล้วทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง ทิ้งไว้ 30 วินาที เทสีทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ทำการตรวจดูสปอร์อิสระและผลึกสารพิษ (tetragonal (diamond-shaped) toxin crystal) ที่มีสีเข้มจากการย้อมสี ปกติผลึกสารพิษมักมีขนาดเล็กกว่าสปอร์และมักพบมากในเชื้อ *B. thuringiensis* ที่มีอายุ 3-4 วันแต่จะไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคการย้อมสีจนกว่าอับสปอร์ (sporangium) จะแตก ดังนั้นถ้าไม่เห็นสปอร์อิสระ ควรทิ้งไว้ให้เชื้ออยู่ที่อุณหภูมิห้องอีก 2-3 วัน จึงตรวจสอบใหม่อีกครั้ง สำหรับ *B. cereus* และเชื้อชนิดอื่นในกลุ่มนี้ไม่สร้างผลึกสารพิษ

<u>การแปลผลการทดสอบ</u>

การที่จะสรุปว่าเชื้อที่ทดสอบเป็น *B. cereus* ได้ เชื้อนั้นควรจะเคลื่อนที่ได้ ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ดี (strongly hemolytic) ไม่สร้างโคโลนีที่มีไรซอยด์ ไม่สร้างผลึกสารพิษ แต่ *B. cereus* บางสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ก็พบได้บ่อยเช่นกัน และมีบางสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอ่อน (weakly hemolytic) *B. cereus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคแตกต่างจาก *B. anthracis* ตรงที่ *B. cereus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคนี้ต้านทานต่อเพนนิซิลินและแกมมาแบคเทอริโอฟาสก์ (gamma bacteriophage)

<u>ข้อควรระวัง</u>: ไอโซเลตของเชื้อที่ไม่สามารถเคลื่อนที่และไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่สงสัยว่าเป็น *B. anthrasis* ควรส่งไปตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองหรือไม่ก็ควรทำลายโดยการเอาไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

<u>ตอนที่ 2</u> การตรวจหาจำนวน *B . cereus* โดยวิธี Most Probable Number

วิธี Most Probable Number (MPN) เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับตัวอย่างที่คาดว่าจะมี *B. cereus* น้อยกว่า 10 เซลล์ต่อกรัม

1. ทำการเตรียมตัวอย่างเหมือนกับวิธีการตรวจนับจำนวน *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง โดยเจือจางตัวอย่างอาหารจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-3} (อาจเจือจางที่ระดับความเจือจางสูงขึ้นถ้าคาดว่ามีจำนวน *B. cereus* เกิน 10^{3} เซลล์ต่อกรัม)

2. ถ่ายเชื้อที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร Trypticase Soy-Polymyxin Broth ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง
3. ถ่ายเชื้อ 1 ลูปจากหลอดที่มีการเจริญหนาแน่น ลากลงบนอาหาร MYP ที่มีผิวหน้าแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
4. ถ่ายเชื้อจากจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีชมพูและมีโซนขาวขุ่นรอบ ๆ โคโลนีจำนวน 1 โคโลนีหรือมากกว่า 1 โคโลนี ลงบนผิวของอาหารในหลอด NA slant สำหรับการทดสอบยืนยันเช่นเดียวกับวิธีการตรวจนับจำนวน *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง
5. จากการทดสอบยืนยัน จะทำให้ทราบจำนวนหลอดอาหาร Trypticase Soy-Polymyxin Broth ที่มีเชื้อ *B. cereus* ที่แต่ละระดับความเจือจาง (จากจำนวนทั้งหมด 3 หลอดที่แต่ละระดับความเจือจาง) นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาจำนวน *B. cereus* ในรูปของค่า MPN ต่อกรัม โดยใช้ตาราง MPN สำหรับ 3 หลอดในภาคผนวก ฉ

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการตรวจนับจำนวน *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

   1.1 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* บนอาหาร MYP

   ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....

   ลักษณะของโคโลนีที่น่าจะเป็น *B. cereus* บนอาหาร MYP.....

จานที่	จำนวนโคโลนี		
	ระดับความเจือจางที่	ระดับความเจือจางที่	ระดับความเจือจางที่ .....
1			
2			

1.2 ผลการทดสอบยืนยัน

หมายเลขของเชื้อที่แยกได้	การย้อมแกรม	การทดสอบยืนยัน					
		Phenol Red Glucose Broth	Nitrate Broth	Modified VP Medium	Tyrosine Agar	Lysozyme Broth	MYP Agar
1							
2							
3							
4							
5							
B. cereus							

จำนวนโคโลนีที่ใช่ *B. cereus* เท่ากับ.....โคโลนีจากจำนวนทั้งหมด 5 โคโลนีที่ตรวจสอบ

จำนวน *B. cereus* ที่มีในตัวอย่าง เท่ากับ ..... CFU ต่อกรัม

2. ผลการตรวจหาจำนวน *B. cereus* โดยวิธี MPN

ระดับความเจือจาง	ปริมาณตัวอย่างต่อหลอด (กรัม)	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (มี *B. cereus*)			
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	รวม
10^{-1}	0.1				
10^{-2}	0.01				
10^{-3}	0.001				

<u>การคำนวณหาค่า MPN ต่อกรัม และค่า confidence limit ของ *B. cereus*</u>

รูปแบบที่เลือก: .....(จากปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์..... , ...และ ..... กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัม (จากตาราง) = ... (จากปริมาณตัวอย่างในตาราง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม)

ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง = ...

Confidence limit (จากตาราง) = ...

Confidence limit ของตัวอย่าง = ...

คำถามท้ายบท

1. จงบอกลักษณะของเชื้อ *B. cereus* และสภาพที่เหมาะสมในการเจริญ
2. *B. cereus* ก่อให้โรคอาหารเป็นพิษชนิดใด ส่วนใหญ่พบ *B. cereus* ในอาหารชนิดใด
3. จงอธิบายวิธีการตรวจหา *B. cereus* ในอาหาร
4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดใช้คัดแยกเชื้อ *B. cereus* จงบอกลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น ทำไมจึงต้องเติมไข่แดงลงไป
5. การที่จะสรุปว่าเชื้อที่ทดสอบเป็น *B. cereus* ได้ เชื้อนั้นควรจะได้ผลการทดสอบอย่างไร

เอกสารอ้างอิง

Bennett, R.W. 2001. *Bacillus cereus*. In: Labbé, R.G., García, S. (Eds.), Guide to Foodborne Pathogens. A John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 51-60.

Rhodehamel, E.J., Harmon, S.M. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 14: *Bacillus cereus*. Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm 12 May 2014.

Granum, P.E. 2001. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamental and Frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, D C, pp. 373-381.

Griffiths, M.W., Schraft, H. 2002. *Bacillus cereus* Food Poisoning. In: Cliver, D.O., Rieman, H.P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain, pp. 261-270.

Montville, T.J., Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington,DC.

Schultz, F.J., Smith, J.L. 1994. *Bacillus*: recent advances in *Bacillus cereus* food poisoning research. In: Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O. (Eds.), Foodborne Disease Handbook, Vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 29-62.

บทปฏิบัติการที่ 12
การตรวจหา *Clostridium perfringens* ในอาหาร

Clostridium perfringens ได้ถูกจัดจำแนกครั้งแรกเป็น *Bacillus aerogenes* ในปี ค. ศ. 1982 และต่อมาจัดเป็น *Clostridium welchii* แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนขนาดใหญ่ สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ไม่ได้ เจริญในสภาพไร้อากาศ ค่อนข้างทนต่อออกซิเจน (aerotolerant) สร้างสารพิษได้หลายชนิด ถ้าแบ่งชนิดของ *C. perfringens* ตามความสามารถในการสร้างสารพิษ สามารถแบ่งได้เป็น 5 ชนิด (type) คือ ชนิด A, B, C, D และ E สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษส่วนใหญ่เป็นชนิด A ซึ่งทนความร้อนได้ดี การที่เชื้อชนิดนี้สามารถก่อโรคได้เป็นผลจากคุณลักษณะของเชื้อในการสร้างสารพิษ รวมทั้งคุณลักษณะอื่น ๆ ที่เอื้ออำนวยได้แก่ 1) ความสามารถของเชื้อในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เชื้อชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในอาหาร โดยใช้เวลาน้อยกว่า 10 นาทีในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าและ 2) ความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาพเครียดต่างๆในสิ่งแวดล้อมได้ดีเช่น รังสี สภาพแห้ง และความร้อน การที่ *C. perfringens* สามารถสร้างสปอร์ที่มีความต้านทานสูงจึงทำให้อยู่รอดได้ในอาหารที่ผ่านความร้อนมาอย่างไม่สมบูรณ์หรืออาหารที่อุ่นด้วยความร้อนที่ไม่สูงพอ

C. perfringens ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 37-45°C อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญประมาณ 20°C และอุณหภูมิสูงสุดประมาณ 50°C การเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 45°C ภายใต้สภาพที่เหมาะสมอื่น ๆ สามารถทำให้เชื้อชนิดนี้มีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (generation time) สั้นได้ถึง 7 นาที หลายสายพันธุ์เจริญได้ที่ pH 5.5-8.0 โดยทั่วไปไม่เจริญที่ระดับ pH ต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 8.5 จากการศึกษาพบว่าค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญและการงอกของสปอร์ในสภาพที่มีซูโครสหรือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว thioglycollate อยู่ระหว่าง 0.97-0.95 และในสภาพที่มีกลีเซอรอลในอาหารเดียวกันมีค่าเป็น 0.93 ส่วนการสร้างสปอร์ต้องการ a_w สูงกว่าระดับดังกล่าวข้างต้น เชื้อ *C. perfringens* พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเช่น ในดิน ฝุ่น อาหาร และทางเดินอาหารของคนและสัตว์ พบบ่อยในเนื้อสัตว์และสัตว์ปีก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อต้องการสารอาหารโดยเฉพาะกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด เชื้อชนิดนี้ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้แก่ เนื้อสกัดและเคซีนสกัดซึ่งเป็นแหล่งของกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังเจริญได้ดีในอาหารคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งอาหารที่เป็นแหล่งของวิตามินและและนิวคลีโอไทด์เช่น ยีสต์สกัด สามารถหมักแลคโตสให้แก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี ตะกอนเคซีนที่เกิดขึ้นจากการสร้างกรดจะถูกทำให้แตกออกโดยแก๊สที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงมีการนำ Milk Medium มาใช้ในการทดสอบยืนยันเชื้อชนิดนี้

ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ซุปผง ซอสผง เครื่องเทศ และผักสดอาจมี *C. perfringens* ปนเปื้อนจำนวนไม่มากซึ่งพบได้ไม่บ่อยนักแต่ในบางครั้งอาจพบสปอร์ของเชื้อชนิดนี้ในอาหาร สปอร์ ของ *C. perfringens* บางสายพันธุ์สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 100°C เป็นเวลานานกว่า 1 ชั่วโมง และเมื่อนำอาหารไปให้ความร้อน ปริมาณออกซิเจนอาจลดลงมากเพียงพอที่จะทำให้ *C. perfringens* เจริญได้ สปอร์ที่อยู่รอดหลังจากให้ความร้อนอาหารอาจจะงอกและเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่ตั้งทิ้งไว้ จากหลักฐานด้านการระบาดของโรคได้ชี้ให้เห็นว่า เมื่อมีการค้นพบว่าเชื้อ *C. perfringens* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ก็มักจะพบเสมอว่าในอาหารมีเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ปนเปื้อนเป็นจำนวนมากนับแสนเซลล์ต่อกรัม

โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *C. perfringens* อาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทานอาหารเนื้อหรือเนื้อสัตว์ปีกสุกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่แช่ตู้เย็น หรือมีการอุ่นอยู่ตลอดเวลาแต่อุณหภูมิไม่สูงพอที่จะทำลายเชื้อ โดยเกิดขึ้นจากการรับประทานอาหารที่มีเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. perfringens* จำนวนมากลงไปประมาณมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อกรัม และเชื้อจะสามารถอยู่รอดได้ผ่านกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เล็กและสร้างสปอร์ขึ้น เชื้อจะสร้างเอนเทอโรทอกซินในระหว่างการสร้างสปอร์และถูกปล่อยออกมากับสปอร์ที่โตเต็มที่ในระหว่างที่อับสปอร์แตกออก อาการของโรคอาหารเป็นพิษมีสาเหตุมาจากสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น ปกติจะเกิดอาการป่วยขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้เข้าไปนานประมาณ 8-15 ชั่วโมง โดยผู้ป่วยจะเป็นตะคริวที่ท้องอย่างรุนแรง มีแก๊สในทางเดินอาหารและท้องเสีย ไม่ค่อยมีอาการคลื่นไส้อาเจียน มีรายงานว่าความสามารถของเชื้อ *C. perfringens* ในการสร้างสารพิษมีความสัมพันธ์อย่างมากกับความสามารถในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ การสร้างสารพิษของแบคทีเรียชนิดนี้สามารถตรวจสอบได้ในระหว่างการสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่บางสายพันธุ์ทำให้เกิดสปอร์ได้ยากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ *C. perfringens* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่อนำอาหารไปแช่แข็งหรือแช่เย็นเป็นเวลานาน การที่เซลล์ไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ทำให้ยากที่จะตัดสินได้ว่าเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้นในการตรวจหาเชื้อ *C. perfringens* ถ้าหากไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันที ควรป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์กลีเซอรีนซอลท์ลงในตัวอย่างอาหารก่อนที่จะเก็บหรือแช่แข็งตัวอย่างไว้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เข้าใจถึงหลักการและวิธีการตรวจหา *C. perfringens* ในอาหาร
2. เพื่อเรียนรู้วิธีการทดสอบยืนยันและคำนวณหาปริมาณ *C. perfringens* ในอาหาร

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ได้แก่ *C. perfringens*
2. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ อาหารปรุงสำเร็จประเภทเนื้อ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar ที่ผสม egg yolk emulsion, Cooked Meat Medium (CMM), Thioglycollate Broth, Modified Iron Milk Medium, Motility-Nitrate (Buffered) Medium, Lactose-Gelatin Medium, Sporulation Broth, Spray's Fermentation Medium ที่มีซาลิซิน (salicin) ร้อยละ 1, Spray's Fermentation Medium ที่มีราฟฟิโนส (raffinose) ร้อยละ 1 และ Spray's Fermentation Medium ที่ไม่มีสารคาร์โบไฮเดรต
4. สารสำหรับทดสอบได้แก่ สารทดสอบไนไตรต์ เอ (Nitrite test reagent A) สารทดสอบไนไตรต์ บี (Nitrite test reagent B)
5. สารละลายบรอมไทมอลบลู (Bromthymol blue) ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 สีย้อมและสารเคมีชนิดต่าง ๆ สำหรับย้อมแกรม (ภาคผนวก ค)
6. สารละลายบัฟเฟอร์กลีเซอรีนซอลท์ (Buffered glycerin-salt solution) สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
7. จานเพาะเชื้อ ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร แท่งแก้วงอ และถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่น
8. เครื่องตีป่นอาหาร และเครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง
9. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C และโถไร้อากาศ (GasPak anaerobic jar)
10. กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง

วิธีการทดลอง

I. การสุ่มตัวอย่างอาหาร

สุ่มตัวอย่างอาหารทุกส่วนเช่น ไก่ทอด น้ำซอส และอื่นๆ หรือเก็บตัวอย่างบางส่วนที่จะเป็นตัวแทนที่ดีเช่น เก็บตัวอย่างอาหารที่สงสัยในจุดเก็บตัวอย่างบริเวณต่างกันจุดละ 25 กรัมเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้ออาจไม่สม่ำเสมอ

II. การขนส่งและเก็บรักษาตัวอย่าง

นำตัวอย่างอาหารมายังห้องปฏิบัติการและตรวจวิเคราะห์โดยทันทีถ้าเป็นไปได้เก็บตัวอย่างอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 10°C จนกระทั่งวิเคราะห์หรือถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ภายใน 8 ชั่วโมงนับตั้งแต่

เก็บตัวอย่าง ให้เติมสารละลายบัฟเฟอร์กลีเซอรีนซอลท์ลงไปแล้วนำไปแช่แข็งทันทีที่อุณหภูมิ -70°C ถึง -90°C จากนั้นจึงส่งตัวอย่างแช่น้ำแข็งแห้งไปยังห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อเก็บรักษาหรือเพื่อขนส่ง ทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใส่ตัวอย่างอาหารที่จะวิเคราะห์ 25 กรัมลงในภาชนะบรรจุปราศจากเชื้อขนาด 150 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์กลีเซอรีนซอลท์ 25 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันกับตัวอย่างอาหาร สำหรับตัวอย่างเหลวเช่น น้ำซุปเนื้อ ควรเติมสารละลายบัฟเฟอร์กลีเซอรีนซอลท์ที่มีความเข้มข้น 2 เท่าลงไปผสมกับตัวอย่างด้วยปริมาตรเท่ากัน นำไปแช่แข็งทันทีที่อุณหภูมิ -70°C ถึง -90°C เก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่แข็งนี้จนกระทั่งวิเคราะห์ (ไม่ควรเก็บไว้นานเกินไป ควรทำภายใน 2-3 วัน) ถ้าหากต้องขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ ให้บรรจุตัวอย่างลงให้ภาชนะเช่น กระป๋องโลหะเล็กๆ มีฝาปิด เติมน้ำแข็งแห้งเพื่อรักษาอุณหภูมิให้ต่ำที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ เมื่อจะวิเคราะห์ให้นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาละลายน้ำแข็งก่อนที่จะถ่ายตัวอย่างไปยังภาชนะปลอดเชื้อและเติมสารละลายทำเจือจางเพื่อตีป่นให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่อไป

III. การตรวจหาเชื้อ *C. perfringens*

1. ทำการชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัมด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อแล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจาง 10^{-1}) นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1-2 นาทีด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้อาหารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยมีอากาศผสมลงไปน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้
2. ทำการเจือจางตัวอย่างต่อไปให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} โดยใช้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1
3. ปิเปตตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหาร Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar ที่เติมไข่แดง ใช้แท่งแก้วงอปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีเพื่อให้ตัวอย่างซึมเข้าในอาหาร จากนั้นจึงเทอาหาร TSC ที่ไม่ได้เติมไข่แดงปริมาตร 10 มิลลิลิตรซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45°C ทับลงไปในจานเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แข็ง นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปวางในโถไร้อากาศโดยไม่ต้องคว่ำจานจากนั้นทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีของ *C. perfringens* บนอาหาร TSC จะมีสีดำและมีรอยขาวขุ่น (opaque white zone) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตรโดยรอบโคโลนีเนื่องจากเชื้อชนิดนี้สร้างเอนไซม์เลซิทิเนสย่อยสลายเลซิทินในไข่แดง ตรวจนับโคโลนีในจานที่มีโคโลนีสีดำ 20-200 โคโลนี ควรใช้เครื่องนับโคโลนี (Quebec colony counter) โดยวาง

กระดาษทิชชูปกคลุมบริเวณที่จะนับ นับโคโลนีสีดำ คำนวณหาจำนวน clostridria ต่อกรัมของอาหาร เก็บจานอาหาร TSC ที่นับเชื้อแล้วไว้เพื่อการจำแนกชนิด

5. ขณะเดียวกัน ปิเปตตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Chopped Liver Broth หรือ อาจใช้ Cooked Meat Medium (CMM) ที่ผ่านการต้มไล่อากาศในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องเขย่าหลอด ประมาณ 3-4 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

   หมายเหตุ: ขั้นนี้จะทำต่อไปก็ต่อเมื่อตรวจไม่พบการเจริญของ *C. perfringens* บน TSC ฉะนั้นถ้าผลการตรวจสอบบน TSC เป็นบวกคือพบโคโลนีสีดำ ก็ไม่จำเป็นต้องสนใจผลในอาหาร CMM

6. ตรวจการเจริญในอาหาร CMM แล้วเขี่ยเชื้อจากก้นหลอด CMM ลากลงบนอาหาร TSC ที่เติมไข่แดง บ่มในโถไร้อากาศที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีที่น่าจะเป็น *C. perfringens*

การทดสอบเพื่อยืนยัน (Presumptive confirmation test)

ทำการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีซึ่งมีลักษณะที่น่าจะเป็น *C. perfringens* จากจานอาหาร TSC จำนวน 10 โคโลนี ลงใน Thioglycollate Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะเซลล์ของเชื้อในแต่ละหลอดโดยการย้อมแกรม *C. perfringens* มีรูปร่างท่อนหนาสั้น ติดสีแกรมบวก และควรตรวจสอบความบริสุทธิ์ ถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นให้เขี่ยเชื้อจากหลอดที่ปนเปื้อนไปลากบนอาหาร TSC ที่เติมไข่แดง นำไปบ่มในโถไร้อากาศที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

-Iron-milk presumptive test

ปิเปตเชื้อที่เจริญในอาหาร Thioglycollate Broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Modified Iron Milk Medium บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 46°C เมื่อครบ 2 ชั่วโมงสังเกตการเกิด “stormy fermentation” โดยจะมีการตกตะกอนของนมอย่างรวดเร็วตามด้วยการแตกของเคิร์ดเป็นมวลคล้ายฟองน้ำลอยขึ้นที่ผิวของอาหาร นำหลอดที่ให้ผลบวกออกจากอ่างน้ำมิฉะนั้นเคิร์ดอาจหกลงในอ่างน้ำ เชื้อที่ไม่เกิด stormy fermentation ภายใน 5 ชั่วโมง ไม่น่าจะเป็น *C. perfringens* ในบางกรณีอาจนานถึง 6 ชั่วโมง แต่ก็เป็นเชื้อที่ต้องสงสัย ควรทำการทดสอบยืนยันต่อไป *C. baratii* บางสายพันธุ์มีลักษณะเช่นนี้ โดยสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อชนิดนี้ได้จากการที่เชื้อไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ใน Lactose-Gelatin Medium ความรวดเร็วของการเกิด stormy fermentation ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและจำนวนเชื้อเริ่มต้น ดังนั้นเฉพาะเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวเท่านั้นที่จะเหมาะสมกับการทดสอบนี้ การทดสอบถึงขั้นนี้อาจเพียงพอสำหรับวัตถุประสงค์บางอย่าง แต่สำหรับเชื้อที่แยกจากตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคระบาดจะต้องตรวจสอบยืนยันถึงขั้นสมบูรณ์

การตรวจสอบยืนยันขั้นสมบูรณ์ (Completed confirmation test)

1. การเจริญใน Lactose-Gelatin Medium และ Buffered Motility-Nitrate Medium

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อเขี่ยเชื้อที่เจริญในอาหาร Thioglycollate Broth หรือจากโคโลนีบนอาหาร TSC โดยแทงลงไปใน Buffered Motility-Nitrate Medium และ Lactose-Gelatin Medium ใส่เชื้อลงไปหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้มีปริมาณเชื้อเพียงพอ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลดังนี้

-ใน Buffered Motility-Nitrate Medium

ตรวจดูการเคลื่อนที่ตามรอยแทง เชื้อที่ไม่เคลื่อนที่จะมีการเจริญเฉพาะในรอยและตามรอยแทงเท่านั้น ส่วนเชื้อที่เคลื่อนที่ได้จะมีการเจริญออกมารอบรอยแทงนั้น *C. perfringens* เคลื่อนที่ไม่ได้ และตรวจสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate) ไปเป็นไนไตรต์ (nitrite) ทำได้โดยหยดสารทดสอบไนไตรต์ เอ 0.5 มิลลิลิตรและสารทดสอบไนไตรต์ บี 0.2 มิลลิลิตรลงในหลอดเชื้อที่เจริญใน Buffered Motility Nitrate Medium ถ้ามีไนไตรต์จะเกิดสีม่วงภายใน 5 นาที แต่ถ้าไม่เกิดสี ให้เติมผงซิงค์ (zinc) ลงไปเล็กน้อย ถ้าให้ผลลบ (ไม่เกิดสีม่วง) หลังจากเติมผงซิงค์ลงไปชี้ให้เห็นว่าไนเตรตได้ถูกรีดิวซ์อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าให้ผลบวก (เกิดสีม่วง) หลังจากเติมผงซิงค์ชี้ให้เห็นว่าเชื้อไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้

-ใน Lactose-Gelatin Medium

ตรวจดูการสร้างแก๊สและการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงถึงการสร้างกรด จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูการเหลวของเจลาติน แต่ถ้าเจลาตินแข็งเป็นเจล ให้บ่มต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C แล้วตรวจดูการเหลวของเจลาตินอีกครั้ง

2. การเจริญใน Sporulation Broth

ปิเปตเชื้อจากหลอดอาหาร Thioglycollate Broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงใน Sporulation Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจาก Sporulation Broth มาย้อมแกรมส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เก็บเชื้อใน Sporulation Broth ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการทดสอบขั้นต่อไป

ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็น *C. perfringens* ควรจะให้ผลดังนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile)ให้โคโลนีสีดำบนอาหาร TSC รีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ สร้างกรดและแก๊สจากแลคโตส ทำให้เจลาตินเหลวภายใน 48 ชั่วโมง แต่เชื้อ *C. perfringens* บางสายพันธุ์สร้างสปอร์ได้ไม่ดีใน Sporulation Medium และมีปฏิกิริยาของเลซิทิเนสอ่อนบนอาหาร TSC ที่มีไข่แดง เชื้อที่สงสัยว่าอาจเป็น *C. perfringens* แต่ได้ผลการทดสอบไม่ตรงตามที่กล่าวข้างต้นจำเป็นต้องทำการทดสอบยืนยันเพิ่มเติม

หมายเหตุ: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อนี้ได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

การทดสอบยืนยันเพิ่มเติมสำหรับเชื้อที่สงสัยว่าอาจเป็น *C. perfringens*

เขี่ยเชื้อที่ได้ผลการทดสอบไม่ตรงกับที่กล่าวข้างต้นทั้งหมดลงในอาหาร Thioglycollate Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาย้อมแกรม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ และลักษณะรูปร่างของเซลล์ จากนั้นปิเปตเชื้อในอาหาร Thioglycollate Broth ลงในหลอดอาหารเหลว 3 ชนิดที่ผ่านการต้มไล่อากาศหรือเพิ่งเตรียมใหม่ๆ ได้แก่ Spray's Fermentation Medium ที่มีซาลิซินร้อยละ1 Spray's Fermentation Medium ที่มีราฟฟิโนสร้อยละ 1 และ Spray's Fermentation Medium ที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างกรดและแก๊สในอาหารเหลวที่มีซาลิซิน การทดสอบการสร้างกรดทำได้โดยปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในจานหลุมแล้วหยดสารละลายบรอมไทมอลบลูความเข้มข้นร้อยละ 0.04 ปริมาณ 1-2 หยดลงไป ถ้าเกิดสีเขียวอ่อนหรือสีเหลืองแสดงว่ามีการสร้างกรด ปกติเชื้อ *C. perfringens* ไม่หมักซาลิซิน แต่มักจะสร้างกรดจากราฟฟิโนสภายใน 3 วัน ส่วนเชื้อสปีชีส์ใกล้เคียงหมักซาลิซินให้กรดและแก๊ส แต่ไม่สร้างกรดจากราฟฟิโนส ส่วนในอาหารที่ไม่คาร์โบไฮเดรตอาจมีการเปลี่ยนแปลง pH เพียงเล็กน้อย

Clostridium ชนิดที่แยกได้จากอาหารและมีลักษณะที่แตกต่างกับ *C. perfringens* ได้แก่

- *C. paraperfringens* และ *C. baratii* มีเซลล์รูปร่างผอม ต่อกันเป็นสาย แต่เซลล์รูปทรงกลมใหญ่ในอาหาร CMM หรือในอาหารอื่นที่มีคาร์โบไฮเดรต การรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์อ่อนหรือไม่มีการรีดิวซ์ สร้างเอนไซม์เลซิทิเนสได้น้อยมากและไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้
- *C. absonum* หรือ *C. sardiniensis* เมื่อยังอ่อนเคลื่อนที่ได้น้อย ย่อยเจลาตินได้ช้า สร้างเอนไซม์เลซิทิเนส การรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์อ่อนหรือไม่มีหลังบ่ม 18 ชั่วโมง
- *C. celatum* คล้ายกับ *C. paraperfringens* ยกเว้นมีการสร้างมวลเซลล์มากที่ก้นหลอดเจริญช้ามาก *C. celatum* ที่มีผู้รายงานไว้ทั้งหมดแยกได้จากอุจจาระ *C. celatum* ต่างกับ *C. paraperfringens* ตรงที่ไม่สร้างเอนไซม์เลซิทิเนสและมีการสร้างกรดจากสตาร์ช (starch)

การคำนวณหาจำนวนเซลล์ของ *C. perfringens*

ปริมาณเซลล์ของ *C. perfringens* ในตัวอย่างขึ้นอยู่กับจำนวนของโคโลนีที่ทดสอบและได้รับการยืนยันว่าใช่ *C. perfringens* เช่น ถ้าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} เป็น 85 โคโลนีและโคโลนีที่ได้รับการยืนยันว่าเป็น *C. perfringens* มีจำนวน 8 โคโลนีใน 10 โคโลนีที่ทดสอบ ดังนั้น:

จำนวน *C. perfringens* = 85 ×(8/10) ×100,000= 680,000 CFU ต่อกรัม

(หมายเหตุ: dilution factor สูงขึ้นอีก 10 เท่าเพราะใช้ 0.1 มิลลิลิตรในการทำ spread plate)

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสปอร์และเอนเทอโรทอกซิน

ถ้าต้องทดสอบตัวอย่างทันทีเกี่ยวกับการสร้างสปอร์และเอนเทอโรทอกซิน เชื้อที่จะเก็บไว้หรือส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการอื่นให้เตรียมดังนี้ ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร Thioglycollate Broth ไปเลี้ยงในหลอดอาหาร CMM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการบ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 24 ชั่วโมงเก็บหลอดอาหาร CMM ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในถ่ายเชื้อเพื่อการสร้างสปอร์และการสร้างเอนเทอโรทอกซิน ผสมอาหาร CMM ด้วย vortex mixer ถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร Thioglycollate Broth ที่เตรียมใหม่ๆ (10 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยนำหลอดหนึ่งไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนหลอดที่ 2 ไม่ต้องนำไปให้ความร้อน ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วใช้เชื้อในหลอดนี้สำหรับถ่ายลงในอาหาร modified AE Sporulation Medium เพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุด ถ่ายเชื้อจากหลอด Thioglycollate Broth ที่บ่ม 4 ชั่วโมงนี้ 0.75 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว modified AE Sporulation Medium หรืออาหาร modified Duncan-Strong Sporulation Medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใน anaerobic jar ตรวจดูการสร้างสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสซ์ (phase-contrast microscope) หรือตรวจดูโดยการย้อมสปอร์บนรอยสเมียร์บนกระจกสไลด์ ถ้าพบสปอร์น้อยกว่า 5 สปอร์ต่อ microscopic field แสดงว่าเชื้อสร้างสปอร์ได้ไม่ดี จากนั้นนำหลอดอาหารเหลวที่เชื้อสร้างสปอร์ไปเซนตริฟิวส์ที่ 10,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบการมีเอนเทอโรทอกซินในส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (cell-free culture supernatant) โดยใช้ reversed passive latex agglutination test kit

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *C. perfringens* บนอาหาร TSC
   ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....
   ลักษณะของโคโลนีที่ตรวจนับซึ่งน่าจะเป็นโคโลนีของ *C. perfringens*.....

จานที่	จำนวนโคโลนี		
	ระดับความเจือจางที่	ระดับความเจือจางที่	ระดับความเจือจางที่ .....
1			
2			

2. ผลการทดสอบยืนยัน

หมายเลขโคโลนีที่แยกมาทดสอบ	Presumptive confirmation test		Completed confirmation test					
	การย้อมแกรม	การเกิดการหมัก (stormy ferment)	Motity–Nitrate Medium		Lactose-Gelatin Medium			Sporulation Broth
			การเคลื่อนที่	การเกิดไนไตรต์	การเกิดกรด	การเกิดแก๊ส	การย่อยสลายเจลาติน	การสร้างสปอร์
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

จำนวนโคโลนีที่ยืนยันว่าเป็น *C. perfringens* = ...โคโลนี จากจำนวน.....โคโลนีที่ทดสอบ

ตัวอย่างที่ตรวจสอบมีจำนวน *C. perfringens* =.....CFU ต่อกรัม

คำถามท้ายบท

1. จงบอกลักษณะของเชื้อ *C. perfringens* และสภาพที่เหมาะสมในการเจริญ เชื้อ *C. perfringens* ชนิดใดที่มักเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ
2. ทำไม *C. perfringens* จึงสามารถก่อให้เกิดโรคได้ แบคทีเรียชนิดนี้มีคุณลักษณะอะไรที่เอื้ออำนวยต่อการก่อโรค และโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากอะไร
3. อาหารประเภทใดที่มักพบ *C. perfringens*
4. จงบอกลักษณะโคโลนีของ *C. perfringens* บนอาหาร TSC ทำไมจึงต้องเติมไข่แดงลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

Rhodehamel, E. J., Harmon, S. M. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 16: *Clostridium perfringens*. Available from: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ LaboratoryMethods/ ucm070878.htm 15 July 2014.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.

Labbe, R.G., Juneja, V.K. 2002. *Clostridium perfringens*. In: Cliver, D.O., Rieman, H.P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain, pp. 119-126.

McClane, B.A. 2001. *Clostridium perfringens*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, D C, pp. 351-372.

บทปฏิบัติการที่ 13
การตรวจหา *Listeria monocytogenes* ในอาหาร

แบคทีเรียสกุล *Listeria* มี 6 ชนิดได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* และ *L. grayi* โดยเชื้อ *L. grayi* และ *L. ivanovii* มี 2 ชนิดย่อย (subspecies) เชื้อ *Listeria* ที่ก่อให้เกิดโรคในหนูและสัตว์ชนิดอื่นคือ *L. ivanovii* และ *L. monocytogenes* อย่างไรก็ตามมีเพียง *L. monocytogenes* เท่านั้นที่มักพบบ่อยว่าเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซีส (listeriosis) ในคน โรคลิสเทอริโอซีสที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. seeligeri* พบน้อยมากๆในคน

เชื้อ *Listeria* spp. ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ สร้างคะตะเลส ไม่สร้างออกซิเดส และไฮโดรไลซ์เอสคิวลิน (esculin) เชื้อ *Listeria* แต่ละชนิดมีสมบัติแตกต่างกันในด้านการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรตและการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (ตารางที่ 13.1)

ตารางที่ 13.1 การแยกความแตกต่างของ *Listeria* ชนิดต่างๆ

Species	การสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต[a]			β-hemolysis[b]	ความรุนแรง
	Xylose	rhamnose	Mannitol		(virulence)
L. monocytogenes	-	+	-	+	+
L. innocua	-	V	-	-	-
L. seeligeri	+	-	-	+	-
L. welshimeri	+	V	-	-	-
L. ivanovii	+	-	-	+	+
L. grayi	-	-	+	-	-

[a] v = ผันแปร

[b] เมื่อทดสอบในอาหารแข็งที่เติม sheep blood

ที่มา: Yousef และ Carlstrom (2003)

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาจำนวนเล็กน้อยที่อยู่รอบเซลล์ เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 20-25°C เคลื่อนที่ได้ไม่ดีหรือไม่เคลื่อนที่เลยถ้าบ่มที่อุณหภูมิ 37°C การเคลื่อนที่ในลักษณะกระดกไปมา สังเกตได้โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่เตรียมสไลด์ด้วยเทคนิคหยดแขวน (hanging-drop technique) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหาร

ที่มีคุณค่าสูงและบ่มไว้ข้ามคืนจะสร้างโคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.8 มิลลิเมตร เชื้อ *L. monocytogenes* เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีอากาศและในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เมื่อเจริญบน blood agar สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (β-hemolysis) แม้ว่าจะให้โซนการย่อยสลายที่แคบ แบคทีเรียชนิดนี้เป็น homofermentative bacteria ซึ่งกลูโคสจะถูกเมแทบอไลซ์ไปเป็นแลคเตต (lactate) แอซีเตต (acetate) และแอซีโทอิน (acetoin) เชื้อ *L. monocytogenes* เจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 1-45°C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 35-37°C เจริญได้ช้าที่อุณหภูมิแช่เย็น generation time ในหางนม (skim milk) ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C เท่ากับ 30-40 ชั่วโมง ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่ำนี้ใช้เป็นปัจจัยสำหรับแยกความแตกต่างในขั้นตอน cold enrichment ก่อนการแยกเชื้อนี้ออกจากตัวอย่างอาหาร

เชื้อ *L. monocytogenes* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีอยู่อาศัยได้ในซากพืชที่ตายแล้ว สามารถเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิต่ำ เจริญได้ในช่วงพีเอชกว้าง (pH 4-9) และอยู่ได้ในสภาพที่มีปริมาณน้ำอิสระน้อย เช่น ทนเกลือได้สูงถึงร้อยละ 10 ความสามารถเหล่านี้ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *L. monocytogenes* ในสิ่งแวดล้อม

อาหารที่ปนเปื้อน

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการแพร่กระจายของเชื้อลิสทีเรียส่วนมากเกิดขึ้นผ่านทางอาหาร เชื้อ *L. monocytogenes* อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายเนื่องจากเคยแยกได้จากอาหารดิบได้แก่ นม ผักสลัด เนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์ปีกและอาหารทะเล ส่วนอาหารพร้อมรับประทานที่บางครั้งถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้เช่น ไส้กรอกแฟรงเฟอเทอร์ เนื้อสุกหั่นชิ้นและเนยแข็ง แบคทีเรียชนิดนี้เคยถูกแยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกรวมทั้งไก่และไก่งวงที่เลี้ยงตามบ้าน การปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อและสัตว์ปีกอาจเริ่มจากสิ่งแวดล้อมในการเกษตร โรงงานแปรรูป และร้านขายปลีก ส่วนการพบ *L. monocytogenes* ในน้ำนมดิบเกี่ยวข้องกับสุขลักษณะที่ไม่ดีพอในบริเวณคอกสัตว์และในบริเวณที่รีดนม แบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำให้วัวเป็นโรคเต้านมอักเสบได้และอาจปนเปื้อนสู่น้ำนม เคยมีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในน้ำนมดิบ และเนยแข็งชนิดอ่อน ผักหลายชนิดเคยปนเปื้อนด้วยเชื้อลิสทีเรีย โดยเฉพาะมันฝรั่งและแรสดิส (radishes) ปกติมักจะปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีอยู่ในระบบนิเวศน์ส่วนใหญ่ ดังนั้นน้ำอาจเป็นแหล่งเริ่มต้นของการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* สู่ปลาและอาหารทะเล การปนเปื้อนของอาหารทะเลอาจเกิดขึ้นในโรงงานแปรรูป ห้องรมควัน หรือแม้แต่โรงฆ่าสัตว์ การปฏิบัติอย่างถูกสุขลักษณะและวิธีการฆ่าเชื้อที่ดีสามารถช่วยหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อนี้ได้ นอกจากนี้สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมของการแปรรูปอาหาร

โรคที่มีสาเหตุมาจาก *Listeria monocytogenes*

การรับประทานอาหารแช่เย็นโดยไม่นำไปให้ความร้อนก่อนรับประทานเป็นการเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เนื่องจาก *L. monocytogenes* เจริญได้ที่อุณหภูมิระดับที่ใช้แช่เย็นอาหาร การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วย *L. monocytogenes* อาจทำให้เกิดการติดเชื้อและก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซีส เชื่อว่าการได้รับเชื้อมากกว่า 100 เซลล์ต่อกรัมทำให้เกิดการติดเชื้อนี้ในร่างกาย แต่การได้รับเชื้อปริมาณน้อยกว่านี้ก็อาจก่อให้เกิดโรคได้เช่นกัน ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการของโรคลิสเทอริโอซิสคือ ตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงหลายสัปดาห์ ผู้ที่ได้รับอันตรายจากเชื้อนี้ได้ง่ายคือ เด็กอายุต่ำกว่า 4 ปี หญิงมีครรภ์ คนชราและบุคคลที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในหญิงมีครรภ์โรคนี้ทำให้เกิดการตายของทารกเมื่อคลอดออกมา คลอดก่อนกำหนด หรือคลอดเมื่อทารกยังไม่โตเต็มที่ (premature birth) โรคลิสเทอริโอซิสในผู้ใหญ่ที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ก่อให้เกิดภาวะโลหิตมีเชื้อแบคทีเรีย (bacteremia) ซึ่งมีอาการที่เป็นผลมาจากการมีแบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้อยู่ในกระแสเลือดเช่น มีไข้ เกิดความไม่สบายและเมื่อยล้า เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง (meningitis) และเกิดการอักเสบของทั้งสมองและเยื่อหุ้มสมอง (meningoencephalitis) อาการที่เกิดขึ้นร่วมกับ meningitis และ meningoencephalitis คือ อาการไข้ ความไม่สบาย และจิตใจไม่ปกติ มีอัตราการตายร้อยละ 20-30

หลักการตรวจหาเชื้อ *Listeria monocytogenes*

ความสามารถของ *L. monocytogenes* ในการเจริญที่อุณหภูมิต่ำได้เคยถูกนำมาใช้ในขั้นตอนการ cold enrichment ซึ่งอาจเป็นวิธีการแรกที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ สำหรับวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ *L. monocytogenes* โดยทั่วไปจะชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมอาหารเหลว buffered *Listeria* enrichment broth (BLEB) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับการ pre-enrichment ซึ่งเทียบเท่ากับวิธีการของ AOAC/IDF ที่ใช้ enrichment broth base ที่มี sodium pyruvate เมื่อบ่มจนถึงชั่วโมงที่ 4 จะเติม selective agent เช่น acriflavin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร sodium nalidixate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารต้านเชื้อรา (อาจไม่เติมก็ได้) คือ cycloheximide ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C จนครบ 48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจาก enrichment culture ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของการบ่ม นำมาลากลงบนอาหาร differential selective agar ชนิดใดชนิดหนึ่งที่เลือกมาใช้เพื่อที่จะแยก *Listeria* species อาหารมาตรฐานที่นิยมใช้กันมากในการคัดเลือกและแยกเชื้อ *Listeria* คือ อาหาร Oxford agar นอกจากนี้สามารถเลือกใช้อาหารชนิดอื่นได้อีกเช่น PALCAM agar, MOX agar อาหาร LPX ที่เติมเอสคิวริน (esculin) และเฟอริกอิออน (ferric ion)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้ถึงวิธีการตรวจหาและแยกเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหาร
2. เพื่อเรียนรู้ถึงวิธีการทดสอบยืนยันเชื้อ *L. monocytogenes* ทางชีวเคมี

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารที่ใช้ได้แก่ เนื้อหมูสด เนื้อไก่สด เนื้อวัวสด แหนม ผักสด และอื่นๆ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB) อาหาร Oxford agar หรืออาหาร PALCAM agar (Polymyxin, Acriflavin, Lithium chloride, Ceftazidine, Esculin and Mannitol (PALCAM) Agar Medium) ใช้ชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยจะใช้อาหารสำเร็จรูป PALCAM medium base นำมาเติม PALCAM Antimicrobic supplement อาหาร 5% sheep blood agar (trypticase-soy sheep blood agar) อาหาร Trypicase Soy Agar ที่เติม yeast extract ร้อยละ 0.6 (TSAye) อาหารเหลว TSBye อาหาร Motility Test Medium และอาหารเหลว Purple Carbohydrate Broth ที่เติมคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 5 สารคาร์โบไฮเดรตได้แก่ เด็กซ์โทรส (dextrose) เอสคิวลิน (esculin) มอลโทส (maltose) แรมโนส (rhamnose) แมนนิทอล (mannitol) และไซโลส (xylose)
3. น้ำยาที่จำเป็นสำหรับทดสอบได้แก่ nitrite detection reagents (reagent A, B และ C) สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 น้ำยาแกรมไอโอดีน เอทานอล สีย้อม เช่น crystal violet และ safranin
4. ยาปฏิชีวนะได้แก่ pimaricin หรือ natamycin
5. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
6. จานเพาะเชื้อ ปิเปต แผ่นสไลด์ ลูป และเข็มเขี่ยเชื้อ ปากคีบ กรรไกร และถุงพลาสติกปลอดเชื้อ
7. เครื่องตีป่นอาหาร และเครื่องผสมตัวอย่าง (vortex mixer)
8. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 2\ ^{\circ}C$

วิธีการทดลอง

วิธีการตรวจหา *L. monocytogenes* ในอาหาร (Hitchins และ Jinneman, 2011)

1. **การสุ่มตัวอย่างและการ enrichment**: ตัวอย่างที่สุ่มมาเพื่อการตรวจหาเชื้อ *L. monocytogenes* ควรนำมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ $4\ ^{\circ}C$ ตลอดการจัดการ การเก็บรักษา และการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ในอุณหภูมินี้ได้ แต่ถ้าตัวอย่างอยู่ในสภาพแช่แข็งแล้วไม่ควรจะทำให้ละลายจนกว่าจะวิเคราะห์
2. **กรณีที่เป็นตัวอย่างรวมกัน (composite sample)**: โดยทั่วไปตัวอย่างประเภทนี้เตรียมได้

โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างย่อย 10 ตัวอย่างเช่นอาหารเหลว ครีม หรืออาหารแข็ง ปริมาณตัวอย่างที่เก็บคือ 50 กรัมหรือ 50 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างย่อย 1 ตัวอย่าง เพื่อทำให้ได้ตัวอย่างประเภทรวมกันจำนวน 2 ตัวอย่าง (คือ 500 กรัมแบ่งได้ 2 ตัวอย่างตัวอย่างละ 250 กรัม) ควรเก็บตัวอย่างอย่างระมัดระวังเพื่อให้ตัวอย่างนั้นเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่างอาหารที่ผิวด้านนอกและด้านใน ตัวอย่างประเภทรวมกันตัวอย่างแรกได้จากการเก็บตัวอย่างย่อยจำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 กรัม นำมาผสมกันแล้วเติมอาหารเหลว BLEB ที่มีโซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate) และไม่มี selective agent ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงผสมให้เข้ากัน ส่วนตัวอย่างประเภทรวมกันตัวอย่างที่ 2 เตรียมได้จากการนำตัวอย่างที่เหลืออีก 5 ตัวอย่างมาผสมกัน ตัวอย่างประเภทรวมกันทั้งสองตัวอย่างที่ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้วประกอบด้วยตัวอย่าง 250 กรัม และ basal BLEB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ดังนั้นตัวอย่างประเภทรวมกันที่ผสมเข้ากันดีแล้ว 50 กรัม (ประกอบด้วยตัวอย่างอาหาร 25 กรัมและbasal BLEB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) ถูกผสมเข้ากับ basal BLEB อีก 200 มิลลิลิตร ดังนั้นตัวอย่างอาหาร 25 กรัม มี basal BLEB ผสมอยู่ 225 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างเดี่ยวๆ (non-composited sample) ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัมผสมกับอาหาร BLEB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที

การ pre-enrichment และ การ enrichment: ทำการ pre-enrichment โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อน เมื่อบ่มจนครบ 4 ชั่วโมงแล้วจึงเติม selective agent ลงไป สาร selective agent ที่ใช้คือ cycloheximide แต่ถ้าไม่มี อาจเติม pimaricin หรือ natamycin แทนก็ได้ (การใช้ natamycin ปลอยภัยกว่าการใช้ cycloheximide มาก) โดยเติมในความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (หรือในกรณีที่ตัวอย่างมีเชื้อราและยีสต์จำนวนน้อยอาจไม่ต้องเติม antifungal agents ก็ได้ แต่ไม่แนะนำถ้าตัวอย่างเป็นเนยแข็งที่บ่มด้วยเชื้อรา (mold-ripened cheese) อาหารทะเลแห้ง หรือรมควัน อาหารสด) หลังจากเติม selective agent บ่มต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง

3. **การแยกเชื้อ**: หลังจากบ่มตัวอย่างในอาหาร BLEB จนครบเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่เจริญในอาหาร BLEB (BLEB culture) หลังบ่มจนครบเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยนำมาลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OXA agar (Oxford medium) นอกจากนี้อาจใช้อาหาร selective isolation agar ชนิดอื่นที่มีเอสคิวลินผสมอยู่ด้วยแทนอาหารได้ (เขียนเรียงตามลำดับความนิยมใช้) อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้แก่ PALCAM Listeria Selective Agar (PALCAM) (ซึ่งเตรียมโดยใช้ PALCAM Medium Base ที่เติม antimicrobic supplement) MOX agar หรือ LPM agar ที่เติมเอสคิวลินและ Fe^{3+} ถ้าใช้อาหาร PALCAM, OXA และ MOX บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้อาหาร LPM agar ที่เติมเอสคิวลินและ Fe^{3+} บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

นอกจากจะเขี่ยเชื้อจากอาหาร BLEB มาลากลงบน selective isolation agar ที่มีเอสคิวลินแล้ว แนะนำอย่างยิ่งว่าควรจะถ่ายเชื้อที่เจริญในอาหาร BLEB หลังบ่ม 48 ชั่วโมงมาลากลงบนอาหาร differential selective agar ชนิดใดชนิดหนึ่งได้แก่ อาหาร BCM agar หรือ ALOA agar หรือ Rapid' L. mono หรือ CHROMagar Listeria (หรืออาจเขี่ยเชื้อจากอาหาร BLEB หลังบ่ม 24 ชั่วโมงด้วยก็ได้) การทำเช่นนี้จะช่วยลดปัญหาการบดบังเชื้อ *L. monocytogenes* โดยเชื้อ *L. innocua* (อาหาร BCM ได้ถูก validate โดย FDA แล้ว) อาหาร differential selective medium อีกชนิดหนึ่งคือ Chromogenic *Listeria* agar (สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีในภาคผนวกสามารถดูได้ใน BAM online)

โคโลนีของ *Listeria* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอสคิวลินจะมีสีดำและมีสีดำล้อมรอบโคโลนี แบคทีเรียชนิดอื่นบางชนิดสามารถสร้างโคโลนีสีดำออกน้ำตาล แต่การเกิดสีต่าง ๆ ของโคโลนีใช้เวลามากกว่า 2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *Listeria* จำนวน 5 โคโลนีหรือมากกว่า 5 โคโลนีลงบนอาหาร OXA หรือ PALCAM (หรืออาหารชนิดอื่น) ลากลงบนอาหาร Trypticase Soy Agar ที่เติม yeast extract ร้อยละ 0.6 (TSAye) โดยลากในลักษณะที่จะทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์หรือได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำจานอาหาร TSAye ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (แต่อาจบ่มที่อุณหภูมิ 35°C ก็ได้ถ้าจะไม่ใช้โคโลนีที่ขึ้นในการทำ wet mount เพื่อตรวจดูการเคลื่อนที่) ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร TSAye เป็นขั้นตอนที่จำเป็นต้องทำ เพราะโคโลนีที่แยกได้จากอาหาร selective agar media ยังคงอยู่ใกล้ชิดกับเชื้อที่เจริญแข่งขันซึ่งถูกยับยั้งเพียงบางส่วน

<u>หมายเหตุ</u>: ถ้าใช้อาหาร BCM ตามคำแนะนำดังกล่าวข้างต้น โคโลนีที่น่าจะเป็นเชื้อ *Listeria monocytogenes* (presumptive *L. monocytogenes* colonies) จะมีสีน้ำเงิน เนื่องจากไม่ค่อยพบ *L. ivanovii* ในตัวอย่างอาหาร ส่วนโคโลนีของ *L. monocytogenes* และ *L. ivanovii* บนอาหาร ALOA จะมีสีน้ำเงินและมีโซนของการย่อยสลายไขมันรอบโคโลนี การใช้อาหาร BCM และ ALOA จะช่วยในการลดจำนวนโคโลนีที่จำเป็นต้องเขี่ยมาทดสอบ

ในการแยกเชื้อจำเป็นต้องให้ได้อย่างน้อยมากกว่า 5 ไอโซเลต เพราะอาจมี *Listeria* มากกว่า 1 สปีชีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเดียวกัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว เขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตมาลากลงในหลอดอาหาร TSAye slant แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้เพื่อการทดสอบในขั้นต่อไป <u>หมายเหตุ</u>: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

การจำแนกชนิด

1. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบจากจานเพาะเชื้อหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30°C มาทำ wet mount โดยใช้สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นสารที่ใช้แขวนลอยเซลล์ในการทำ wet mount

และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase – contrast โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่ต้องหยดน้ำมันบนสไลด์ โดยเลือกเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีการเจริญมากพอใส่ลงบนสไลด์แล้วกวนผสมกับสารละลายเกลืออย่างทั่วถึง แต่ถ้าเลือกเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีการเจริญน้อยเกินไปจะมีเซลล์เพียงจำนวนน้อยซึ่งเซลล์จะไปติดที่กระจกสไลด์และปรากฏเป็นเซลล์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-motile) เชื้อ *Listeria* spp. มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนผอม สั้น ๆ เคลื่อนที่ได้โดยหมุนเพียงเล็กน้อย หรือกระดกไปมา ควรเปรียบเทียบกับเชื้อ *Listeria monocytogenes* บริสุทธิ์เสมอ เชื้อที่มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อนขนาดใหญ่หรือรูปท่อนที่เคลื่อนที่ได้โดยการว่ายอย่างรวดเร็วจะไม่ใช่เชื้อ *Listeria* spp. หรืออีกวิธีหนึ่งอาจทดสอบการเคลื่อนที่โดยการใช้ 7-day motility test medium (ดูวิธีการทดสอบในข้อ 6)

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส: ทำได้โดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 หนึ่งหยดลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อมา 1 ลูป กวนให้เข้ากัน ถ้าเกิดแก๊สทันทีแสดงว่าให้ผลบวก เชื้อ *Listeria* spp.จะสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive)
3. การย้อมแกรม: เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 16-24 ชั่วโมงมาย้อมแกรม เชื้อ *Listeria* spp. ทั้งหมดจะมีลักษณะเป็นรูปท่อนสั้น ติดสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ถ้าเชื้อแก่คือโคโลนีที่มีอายุเกิน 24 ชั่วโมง การติดสีแกรมอาจผันแปร (gram variable) และเซลล์อาจมีรูปร่างกลม
4. การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง: ทำได้โดยถ่ายเชื้อจากโคโลนีบนอาหารแข็ง TSAye ลงบนอาหาร blood agar ที่เติมเลือดแกะร้อยละ 5 (5% sheep blood agar ซึ่งได้เตรียมไว้ล่วงหน้ามีความหนาและมีผิวหน้าแห้ง) ก่อนทดสอบให้ใช้ปากกาขีดใต้จานเพาะเชื้อเป็นช่องสี่เหลี่ยมจำนวน 20 – 25 ช่องจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อมาแทงลงในช่องสี่เหลี่ยม 1 เชื้อต่อ 1 ช่อง ควรทำควบคู่ไปกับเชื้อบริสุทธิ์ที่ทราบชื่อที่เป็นชุดควบคุมเชิงบวกด้วยเสมอเช่น *L. ivanovii* และ *L. monocytogenes* ซึ่งจะให้ผลการทดสอบเป็นบวก และทำกับเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบด้วย ได้แก่ *L. innocua* ซึ่งจะให้ผลการทดสอบเป็นลบ พยายามแทงเชื้อลงไปใกล้ก้นของชั้นวุ้นให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้โดยไม่แตะก้นของชั้นวุ้นจริง ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง

หลังจากบ่มแล้วตรวจสอบจานอาหารแข็ง blood agar ที่มีเชื้อจากการถ่ายเชื้อโดยการแทงซึ่งต้องส่องดูในที่ที่มีแสงสว่าง ถ้าเป็นเชื้อ *L. monocytogenes* และ *L. seeligeri* จะเห็นลักษณะโซนใสของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเกิดขึ้นรอบ ๆ รอยแทงบริเวณดังกล่าว (ให้ผลบวก) สำหรับเชื้อ *L. innocua* จะไม่พบโซนใส (ให้ผลลบ) จากการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ขณะที่ *L. ivanovii* จะพบโซนใสรอบ ๆ บริเวณที่แทง ในขั้นตอนนี้อย่าพยายามที่จะแยกความแตกต่างของเชื้อแต่ละสปีชีส์แต่ให้บันทึกลักษณะของปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้น แต่ถ้าต้องการทราบสปีชีส์ของเชื้อสามารถทำได้โดยการทำ CAMP test (หมายเหตุ hemolysis จะถูก

ตรวจสอบได้ง่ายเมื่อความหนาของอาหาร blood agar น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร อีกวิธีหนึ่งอาจทำได้โดยใช้เทคนิคการเททับด้วยอาหาร blood agar หนา 1 – 2 มิลลิเมตร)

5. การทดสอบการรีดักชันของไนเตรต (Nitrate reduction test): เชื้อ *L. grayi* ssp. *murrayi* เท่านั้นที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ การทดสอบนี้ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *L. grayi* ssp. *murrayi* ออกจากเชื้อ *L. grayi* ssp. *grayi* ได้ การทดสอบนี้ทำได้โดยถ่ายเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSBye ลงในอาหาร nitrate broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยเติมสารทดสอบไนไตรต์ เอ (sulfanilic acid reagent) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และสารทดสอบไนไตรต์ บี (N-(I-naphthyl) ethylenediamine reagent) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏสีม่วงแดงขึ้นชี้ให้เห็นถึงการมีไนไตรต์ (nitrite) เนื่องจากไนเตรตได้ถูกรีดิวซ์ หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้เติมผงซิงค์ (zinc) ลงไปเล็กน้อยแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าเกิดสีม่วงแดงขึ้นชี้ให้เห็นว่ายังคงมีไนเตรตเพราะไนเตรตยังไม่ถูกรีดิวซ์

   อีกวิธีหนึ่งคือเติมสารทดสอบไนไตรต์ เอ (sulfanilic acid reagent) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และสารทดสอบไนไตรต์ ซี (**α**- naphthol reagent) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏสีส้มขึ้นแสดงว่าได้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรต หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีเกิดขึ้นให้เติมผงซิงค์เช่นเดียวกับข้างต้น ถ้าเกิดสีส้มชี้ให้เห็นถึงการมีไนเตรตที่ยังไม่ถูกรีดิวซ์

6. การทดสอบการเคลื่อนที่: ทำได้โดยถ่ายเชื้อที่ขึ้นในอาหารเหลว TSBye ลงในอาหาร Motility Test Medium (MTM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตทุกวัน โดยเชื้อ *Listeria* spp. จะเคลื่อนที่ได้ รูปแบบการเจริญโดยทั่วไปจะมีลักษณะคล้ายร่ม โดยอาหาร MTM จะทำให้มีการเจริญลักษณะคล้ายร่มได้ดีที่สุด หรืออีกวิธีหนึ่งอาจตรวจดูการเคลื่อนที่แบบ tumbling ของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว TSBye หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30°C โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราส (phase contrast microscope) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

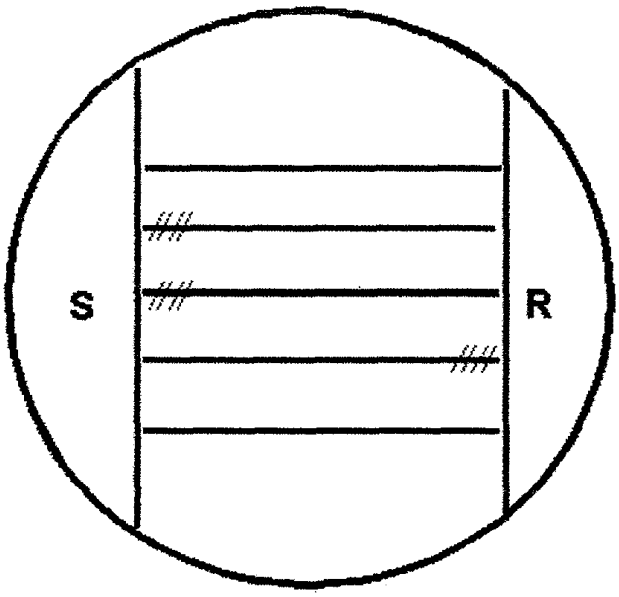
7. การทดสอบการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต: ทำได้โดยเขี่ยเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว TSBye ลงในอาหารเหลว Purple Carbohydrate Fermentation Broth ที่มีคาร์โบไฮเดรตชนิดใดชนิดหนึ่งความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (อาจใช้หลอดดักก๊าซ (Durham tubes) ก็ได้) คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการทดสอบได้แก่น้ำตาลเด็กซ์โทรส เอสคิวลิน มอสโทส แรมโนส แมนนิทอล และไซโลส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยเชื้อ *Listeria* spp. ให้ผลทดลองเป็นบวกคือจะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส ดูปฏิกิริยาการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Listeria* spp. ในตารางที่ 13.1 เชื้อ *Listeria* ทุกสปีชีส์จะให้ผลการทดสอบการหมักน้ำตาลเด็กซ์โทรส เอสคิวลิน และมอลโทสเป็นบวกคือ สามารถหมักได้และเชื้อ *Listeria* spp. ทุกสปีชีส์ (ยกเว้น *L. grayi*) จะให้ผลการทดสอบการหมักแมนนิทอลเป็นลบคือ ไม่เกิดการหมักแมนนิทอล

8. อาจจำแนกชนิดของเชื้อผ่านการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วโดยใช้ชุดทดสอบที่มีจำหน่ายเช่น ชุดทดสอบ Vitek Automicrobic Gram Positive และ Gram Negative Identification cards (ของบริษัท bioMerieux, Hazelwood, MO) หรือชุดทดสอบ API Listeria (ของบริษัท bioMerieux, Marcy – l'Etoile ประเทศฝรั่งเศส) ซึ่งไม่จำเป็นต้องทำ CAMP test หรืออาจใช้ชุดทดสอบ Micro – ID™kit (ของบริษัท bioMerieux, Hazelwood, MO) หรือชุดทดสอบ Phenotype MicroArray for *Listeria* (ของบริษัท BiOLOG, Hayward, CA)

   หมายเหตุ: การยืนยันว่าไอโซเลตของ *Listeria* เป็น *Listeria monocytogenes* หรือไม่ สามารถทำได้โดยใช้ชุดทดสอบเช่น AccuProbe™ *Listeria monocytogenes* culture confirmation test (Gen-Probe, Inc, San Diego, CA), GeneTrak *Listeria monocytogenes* test kit (Neogen, Lansing, MI) Probelia *Listeria monocytogenes* test kit (BioControl, Seattle, WA), VIDAS *Listeria monocytogenes* test kit (bioMerieux), Transia Plate *Listeria monocytogenes* (Diffchamb SA, Lyon, France) และ BAX *Listeria monocytogenes* test (Qualicon, Inc., Wilmington, DE)

CAMP Test

Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) test (ตารางที่ 13.2 และรูปที่ 13.1) เป็นการทดสอบที่มีประโยชน์ในการยืนยันสปีชีส์เมื่อผลการทดสอบโดยการแทงลงใน blood agar คลุมเครือ ในการทดสอบนี้ ทำได้โดยเขี่ยเชื้อ β-hemolytic *Staphylococcus aureus* และ *Rhodococcus equi* (อายุ 48 ชั่วโมง) มาลากเป็นเส้นขนานในแนวตั้ง (ดังรูปที่ 13.1) บนจานอาหาร Sheep Blood Agar จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาลากในแนวนอนระหว่างรอยลากของ *S. aureus* และ *R. equi* (ดังรูปที่ 13.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ *L. monocytogenes* และ *L. seeligeri* ถูกส่งเสริมให้เกิดได้ดีในบริเวณที่ได้รับอิทธิพลของรอยลาก *S. aureus* ส่วน *Listeria* ชนิดอื่นไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ ปฏิกิริยาของ *L. monocytogenes* เหมาะสมที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง มากกว่าที่ 48 ชั่วโมง ควรทดสอบเชื้อ *Listeria* spp. บริสุทธิ์ที่ทราบสปีชีส์บนจานอาหาร sheep blood agar อีกจานหนึ่งด้วยเพื่อใช้เปรียบเทียบ และอาหาร Sheep Blood Agar ที่ใช้ก็ควรเตรียมใหม่ๆ



รูปที่ 13.1 CAMP test สำหรับ *Listeria monocytogenes*
รูปแบบการถ่ายเชื้อบนผิวหน้าอาหาร sheep blood agar เส้นแนวนอนคือ
รอยลากของเชื้อ 5 สายพันธุ์ เส้นแนวตั้ง คือรอยลากของ *Staphylococcus aureus* (S) และ *Rhodococcus equi* (R) เส้นประคือบริเวณที่มีการส่งเสริม
การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
ที่มา: Hitchins และ Jinneman (2011)

ตารางที่ 13.2 ผลการทดสอบ CAMP test ของ *Listeria* species

แบคทีเรียที่ทดสอบ	การส่งเสริมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดย	
	Staphylococcus aureus (S)	*Rhodococcus equi* (R)
L. monocytogenes	+	-*
L. ivanovii	-	+
L. innocua	-	-
L. welshimeri	-	-
L. seeligeri	+	-

*Rare strains are S+ and R+.

การแปลผลการทดสอบ

การทดสอบคุณลักษณะอย่างสมบูรณ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่แยกได้นั้นสำคัญ การทดสอบเพียงบางอย่างเท่านั้นอาจทำให้เกิดความเข้าใจที่ผิดพลาดได้เนื่องจาก *Listeria* ทุกชนิดให้ผลลบเมื่อทดสอบการสร้างอินโดล ออกซิเดส ยูรีเอสและไฮโดรเจนซัลไฟด์จากสารประกอบซัลเฟอร์อินทรีย์ (H_2S ถูกสร้างขึ้นจาก thiosulfate ใน MICRO-ID test kit) และให้ผลบวกกับการทดสอบ methyl red และ Voges-Proskauer ส่วนแบคทีเรีย *Brochothrix* ซึ่งมีความเกี่ยวพันอย่างใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อ *Listeria* สามารถแยกความแตกต่างได้โดย *Brochothrix* จะไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C และเชื้อนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

Listeria spp. ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ขนาดเล็ก สร้างคะตะเลสได้และเคลื่อนที่ใน wet mounts และในอาหาร MIM ที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ เชื้อนี้สามารถใช้เด็กซ์โทรส เอสคิวลิน และมอสโทสได้ บางสปีชีส์สามารถใช้แมนนิทอล แรมโนสและไซโลสในการสร้างกรดได้ เชื้อ *Listeria* ที่ใช้แมนนิทอลในการสร้างกรดได้คือ *L. grayi* ส่วนเชื้อ *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* และ *L. seeligeri* ทำให้เกิด hemolysis ในรอยแทงในอาหาร Sheep Blood Agar และให้ผลการทดสอบ CAMP test เป็นบวกซึ่งเชื้อ *Listeria* ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว มีเพียง *L. monocytogenes* เท่านั้นที่ไม่หมักไซโลส แต่สามารถใช้แรมโนสได้ การแยกความแตกต่างของ *L. ivanovii* และ *L. seeligeri* ทำได้โดยการทำ CAMP test เชื้อ *L. seeligeri* ส่งเสริมการย่อยสลายเม็ดแดงที่รอยลากของ *S. aureus* ส่วนเชื้อ *L. ivanovii* ส่งเสริมการย่อยสลายเม็ดแดงที่รอยลากของ *R. equi* ในบรรดา *Listeria* ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดแดง *L. innocua* อาจให้ผลของปฏิกิริยาการหมักแรมโนส-ไซโลสเหมือนกับผลที่ได้เมื่อทดสอบกับ *L. monocytogenes* แต่จะให้ผลลบเมื่อทำ CAMP test เชื้อ *L. innocua* บางครั้งอาจให้ผลลบเมื่อทดสอบการใช้แรมโนส ไอโซเลสของเชื้อ *L. welshimeri* ให้ผลการหมักแรมโนสเป็นลบ ซึ่งอาจสับสนกับ *L. seeligeri* ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างอ่อนถ้าไม่ทำการทดสอบ CAMP test

Subtyping of *L. monocytogenes*

1. Serological typing

ในการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้ ควรใช้ commercial sera เชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากคนไข้และสิ่งแวดล้อมเป็น type 1 หรือ type 4 ในการศึกษาด้านซีโรวิทยา ทำได้โดย ถ่ายเชื้อจาก TSBye culture ลงใน Tryptose Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร Tryptose Agar Slant บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชะล้าง slant ด้วย Difco fluorescent antibody buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ถ่ายไปยังหลอดทดลองฝาเกลียวปลอดเชื้อ นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1

ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1600 ×g เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตส่วนใส (supernatant fluid) ออกมาปริมาตร 2.2-2.3 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ที่เหลือลงไปในตะกอน (pellet) จากนั้นทำการเจือจาง sera ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ แล้วทำการทดสอบตามวิธีการทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination test)

2. Genetic subtyping

ข้อมูลจาก pulse-field gel electrophoresis ของ DNA restriction fragments ควรส่งไปยัง PulseNet (CDC, Atlanta, GA) เชื้อที่ได้ควรส่งไปทำ ribotyping ที่ห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาจำนวน *L. monocytogenes*

ถ้าตรวจพบว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีเชื้อ *L. monocytogenes* ควรนำตัวอย่างที่เหลืออยู่มาทำการตรวจหาจำนวน การตรวจหาจำนวน *L. monocytogenes* สามารถทำได้โดยวิธีการตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธี Most Probable Number (MPN) วิธีการที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นเพียงการหาจำนวน presumptive *L. monocytogenes* เท่านั้น จำเป็นต้องทำการทดสอบเชื้อ *Listeria* ที่แยกได้ต่อไป

ในการที่จะประมาณการปนเปื้อนของตัวอย่างโดยการหาจำนวนแบคทีเรีย presumptive *L. monocytogenes* ก่อนที่จะเริ่มบ่มตัวอย่างใน enrichment broth ให้ปิเปตตัวอย่างที่ผสมใน enrichment broth ในขั้นแรกมาทำ spread plate บนอาหาร ALOA, BCM หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งที่ใช้ได้ดี ถ้าหากพบโคโลนีที่น่าจะเป็นโคโลนีของ *L. monocytogenes* ให้แยกเชื้อมาทดสอบแล้วรายงานผลจำนวนโคโลนีทั้งหมดของ *L. monocytogenes* ที่นับได้ โดยคำนวณจากอัตราส่วนของจำนวนไอโซเลตที่ใช่ *L. monocytogenes* ต่อจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่แยกมาทดสอบ หรืออาจทำด้วยวิธี MPN (ใช้วิธี 3-tube MPN หรือมากกว่า 3 หลอด) โดยบ่มตัวอย่างปริมาณ 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัมในอาหาร BLEB ที่เติมหรือไม่เติมไพรูเวตก็ได้ จากนั้นถ่ายเชื้อมาลากบน selective agar ชนิดที่เลือกใช้ ถ้าทุกหลอดที่ทำ MPN ให้ผลบวกคือมีเชื้อ *Listeria* ควรใช้ตัวอย่างเดิมที่เก็บไว้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN ซ้ำอีกครั้ง ควรทำการเจือจางในระดับความเจือจางที่เหมาะสมเช่น ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8}

บันทึกผลการทดลอง

1. ผลการตรวจหา *L. monocytogenes*

1.1 ผลการตรวจหาโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *L. monocytogenes*

ตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์คือ.....

ลักษณะของโคโลนีที่น่าจะเป็น *L. monocytogenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....

1.2 ผลการทดสอบยืนยัน

การทดสอบ	แบคทีเรียที่ทดสอบ					
	ไอโซเลต 1	ไอโซเลต 2	ไอโซเลต 3	ไอโซเลต 4	ไอโซเลต 5	*L. monocytogenes*
Gram staining						
Catalase test						
Hemolysis						
Nitrate reduction test						
Motility						
การหมัก esculin						
การหมัก dextrin						
การหมัก maltose						
การหมัก mannitol						
การหมัก rhamnose						
การหมัก rhamnose						
การหมัก xylose						

2. ผลการตรวจหาจำนวน *L. monocytogenes* โดยตรวจนับจำนวนโคโลนีบน selective agar ลักษณะของโคโลนีที่ตรวจนับซึ่งน่าจะเป็นโคโลนีของ *L. monocytogenes*..... บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชื่อว่า.....

จานที่	จำนวนโคโลนี		
	ระดับความเจือจางที่	ระดับความเจือจางที่	ระดับความเจือจางที่ .....
1			
2			

จำนวนโคโลนีที่ใช่ *L. monocytogenes* เท่ากับ.....โคโลนีจากจำนวนทั้งหมด 5 โคโลนีที่ตรวจสอบ จำนวน *L. monocytogenes* ที่มีในตัวอย่างเท่ากับ ..... CFU ต่อกรัม

คำถามท้ายบท

1. จงบอกลักษณะของเชื้อ *L. monocytogenes* และสภาพที่เหมาะสมในการเจริญ
2. *L. monocytogenes* ก่อให้โรคใด จงอธิบายอาการของโรคที่เกิดขึ้น
3. ใครคือกลุ่มคนที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคที่เป็นคำตอบในข้อ 2 ถ้าหากติดเชื้อ *L. monocytogenes* และมีวิธีใดที่จะป้องกันไม่ให้ติดเชื้อชนิดนี้
4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่เป็น selective media สำหรับแยกเชื้อ *L. monocytogenes* โคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะอย่างไร (ตอบอย่างน้อย 2 ชนิด)

เอกสารอ้างอิง

Hitchins, A. D. and Jinneman, K. 2011. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Available from: http://www.fda.gov/FoodScienceResearch/laboratorymethods/ucm 071400.htm 12 May 2014.

Pagotto, F., Corneau, N., Farber, J. 2006. *Listeria monocytogenes* infections, pp. 313-340. In: Riemann, H.P., Cliver, D.O. (Eds.), Foodborne Infections and Intoxication. Elsevier, Inc., San Diego, California, USA.

Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

บทปฏิบัติการที่ 14
การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมของการแปรรูปอาหาร

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมของการแปรรูปอาหาร มีผลทำให้อาหารที่ผลิตได้มีคุณภาพต่ำซึ่งจะทำให้อาหารนั้นมีอายุการเก็บสั้น และยังทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคอีกด้วย แหล่งของการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมได้แก่ วัตถุดิบ อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูป ผู้ผลิตอาหาร ขยะสิ่งปฏิกูล สัตว์ แมลง และอื่นๆ ดังนั้นถ้าหากมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมากเท่าใด ก็มีโอกาสมากยิ่งขึ้นที่อาหารที่ผ่านการแปรรูปมาแล้วจะปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์อีกครั้ง จึงควรตรวจหาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมบริเวณที่ทำการแปรรูปอาหารบ่อยครั้งกว่าการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหาร ส่วนใหญ่จะตรวจบริเวณพื้นท่อและผิวของอุปกรณ์โดยเฉพาะบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร บริเวณตู้เย็นและถังเก็บส่วนผสมก็ควรตรวจบ่อยครั้ง ส่วนบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนก็ควรตรวจบ่อยกว่าบริเวณอื่น นอกจากนี้แหล่งสำคัญของการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์อาจมาจากพื้นผิวที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหารโดยตรงแต่พื้นผิวนั้นสามารถทำให้เกิดฝุ่นละอองที่มีจุลินทรีย์ปะปนกระจายไปในอากาศ ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนในบริเวณต่าง ๆ ของโรงงานแปรรูปอาหารหรือสถานที่อื่น ๆ ทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาด ก่อนและหลังการผลิตหรือระหว่างการผลิต จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อที่จะได้ทราบว่าสิ่งแวดล้อมในโรงงานนั้นสะอาดมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้ผู้ทำการวิเคราะห์ยังสามารถประเมินได้ถึงแหล่งของการปนเปื้อนอีกครั้งหลังแปรรูป ยังช่วยให้ผู้ผลิตสามารถหาวิธีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในบริเวณต่าง ๆ บนผิวของภาชนะและอุปกรณ์ที่ใช้ในโรงงานได้อย่างเหมาะสม ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของวิธีการทำความสะอาดและวิธีการฆ่าเชื้อที่ใช้ ทำให้ทราบถึงความถี่ที่ต้องทำความสะอาดและความถี่ในการบำรุงรักษา หรือเปลี่ยนอุปกรณ์เช่น แผ่นกรองอากาศเพื่อที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ และช่วยให้ทราบถึงการมีจุลินทรีย์ก่อโรคอยู่ในสิ่งแวดล้อม อาจทำให้ตรวจสอบได้ถึงความผิดพลาดของการออกแบบอุปกรณ์ นอกจากนี้การวางแผนที่ดีในการสุ่มตัวอย่าง การตรวจวิเคราะห์และการประเมินผลที่ดีอาจช่วยบ่งชี้ถึงจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Critical Control Point, CCP) ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ซึ่งอาจจะช่วยให้แผนการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP) ที่จะจัดทำนั้นประสบความสำเร็จได้

ในการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบความสะอาด จำเป็นต้องเลือกทุกจุดที่คาดว่าจะมีการสะสมของจุลินทรีย์ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนทางตรงหรือทางอ้อมสู่ผลิตภัณฑ์ การสุ่มตัวอย่างไม่ควรที่จะจำกัดเฉพาะบริเวณที่จะมีการสัมผัสอาหารโดยตรงเท่านั้น เพราะเป็นไปได้ที่การปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นทางอ้อมโดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเช่น ในน้ำที่กลั่นตัว ละอองน้ำเล็ก ๆ สารหล่อลื่น

วัสดุภาชนะบรรจุ เสื้อผ้าของคนงาน และอื่นๆ จุลินทรีย์สามารถที่จะแพร่กระจายจากบริเวณผิวที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหารไปยังพื้นผิวที่มีการสัมผัสอาหารโดยตรง ถ้าหากการทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของอุปกรณ์ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ก็จะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมและบนผิวของอุปกรณ์เพื่อเป็นการตรวจสอบความสะอาด สำหรับวิธีการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมและบนพื้นผิวของอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันมี 4 วิธีได้แก่ 1) การสัมผัสด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงกับพื้นผิว (agar contact plate) 2) การป้ายหรือถูพื้นผิวด้วยไม้พันสำลี (surface swabbing) 3) การชะล้างผิวของอุปกรณ์หรือภาชนะ (rinsing) และ 4) การเก็บตัวอย่างอากาศ (air sampling)

การที่จะเลือกใช้วิธีการใดในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ขึ้นอยู่กับความมากน้อยของความสกปรก ถ้าพื้นผิวสกปรกเล็กน้อยมักใช้วิธีการสัมผัสด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง แต่ถ้าพื้นผิวนั้นสกปรกมากจะใช้วิธีการถูด้วยไม้พันลำสี เนื่องจากสามารถทำการเจือจางจุลินทรีย์ในของเหลวที่ใช้ชะล้างไม้พันสำลีนั้นได้ วิธีนี้จะทำให้ทราบถึงปริมาณจุลินทรีย์บนพื้นผิวในบริเวณพื้นที่ที่กำหนดและสามารถประเมินได้ถึงการปริมาณการปนเปื้อนถ้าอาหารสัมผัสกับพื้นผิวนี้ จุลินทรีย์ที่มีอยู่บนพื้นผิวอาจมาจากฝุ่นละอองจากแหล่งอื่นหรือมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในโรงงานแปรรูปอาหาร การถูด้วยไม้พันลำสียังใช้ในการตรวจสอบการสะสมและการเจริญของจุลินทรีย์บนพื้นผิวที่ทำความสะอาดได้ยากหรือบริเวณอื่นที่อาจคาดไม่ถึงว่าจะมีการปนเปื้อนมากเช่น บริเวณขอบล่างของหน้าต่าง พื้นด้านหลังของเครื่องมือหนัก บริเวณท่อ และถังเก็บส่วนผสม นอกจากนี้วิธีการถูด้วยไม้พันสำลียังใช้ได้ดีกับพื้นผิวที่มีรูปร่างไม่ปกติ เมื่อจะเก็บตัวอย่างจะต้องทำให้ไม้พันสำลีชื้นเล็กน้อยก่อน จากนั้นจึงถูบริเวณที่ต้องการตรวจสอบ แล้วใส่ไม้พันสำลีกลับเข้าภาชนะดังเดิม ส่งไปยังห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์น้อยที่สุดเช่น การเพิ่มจำนวนถ้ามีการเจริญ หรือการลดจำนวนถ้าไม้พันสำลีแห้งลง กรณีที่ห้องปฏิบัติการอยู่ห่างไกลจากจุดเก็บตัวอย่าง อาจแช่ไม้พันลำสีที่ใช้งานแล้วลงใน transport medium เพื่อให้จุลินทรีย์ยังคงมีชีวิตในระหว่างขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำขณะขนส่ง ในการทำให้ไม้พันสำลีชื้นและในการทำเจือจางเชื้อที่ไม้พันสำลีอาจใช้อาหาร neutralizing broth ซึ่งมีสาร neutralizing agent ที่จะช่วยทำให้สารฆ่าเชื้อที่ตกค้างบนพื้นผิวเป็นกลางเช่น โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ช่วยทำให้สารประกอบคลอรีน ไอโอโดฟอร์ (iodophor) และทวีน 80 (tween 80) เป็นกลาง ช่วยให้กรดอินทรีย์และเอสเทอร์ ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคอมพาวด์(quaternary ammonium compound) ไบกวอไนด์ (biquanide) และสารประกอบแอมโฟเทอริก (amphoteric compound) เป็นกลาง นอกจากนี้อาจนำไม้พันสำลีที่ผ่านการถูพื้นผิวแล้วมาแช่ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมเช่น pre-enrichment media เพื่อการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคหรืออาจแช่ในอาหารเหลวที่เหมาะสม (neutralizing broth) หรืออาหารชนิดอื่นเพื่อการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยทั่วไปจำนวน

จุลินทรีย์ที่นับได้จากการใช้เทคนิคการถูด้วยไม้พันสำลี จะสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากการสัมผัสด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงประมาณ 10 เท่าเมื่อทดสอบกับพื้นผิวที่เรียบ

ในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์โดยการชะล้างผิวของอุปกรณ์หรือภาชนะ จะทำให้ทราบว่าภาชนะนั้นมีความสะอาดมากน้อยเพียงใด ซึ่งควรพิจารณาทั้งจำนวนและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของจุลินทรีย์อาจสำคัญในแง่ของการเป็นสาเหตุการเสียของอาหาร ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์จากภาชนะบรรจุที่ปนเปื้อนลงในอาหารจะมีจำนวนน้อยกว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในอาหารก็ตาม แต่จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในภาชนะบรรจุก็มีความสำคัญเช่นกัน ภาชนะที่ใช้บรรจุอาหารควรมีจุลินทรีย์ในปริมาณที่ต่ำมากโดย เฉพาะการบรรจุในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic packaging) ในแง่ของการควบคุมคุณภาพทางจุลินทรีย์ความสะอาดของภาชนะบรรจุมีความสำคัญมาก จึงเป็นจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม สำหรับมาตรฐานของจำนวนแบคทีเรียในภาชนะบรรจุได้มีผู้กำหนดไว้เช่น ภาชนะบรรจุน้ำนมพาสเจอร์ไรส์และผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ รวมทั้งขวดน้ำดื่มจะมีจำนวนจุลินทรีย์ได้เพียง 1 โคโลนีหรือน้อยกว่า 1 โคโลนีต่อมิลลิลิตรของของเหลวที่บรรจุ หรือไม่เกิน 1 โคโลนีต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรที่อาหารสัมผัสและต้องไม่มีแบคทีเรียโคลิฟอร์มปนเปื้อน นอกจากนี้ในการเก็บตัวอย่างภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์มาตรวจสอบ จะต้องเก็บตัวอย่างภาชนะจำนวน 4 ภาชนะต่อวันและจำนวนภาชนะ 3 ใน 4 จะต้องตรงตามมาตรฐานที่กำหนด

สำหรับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอากาศก็มีความสำคัญเช่นกัน จึงควรเก็บตัวอย่างอากาศ (air sampling) มาตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์อาจอยู่ในอากาศได้จากการกระทำต่างๆ เช่น การฉีดน้ำ การขนส่งส่วนผสมแห้งและการทำให้อากาศเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ฝุ่นผงที่ลอยอยู่ในอากาศมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่ด้วย ส่วนใหญ่มักพบสปอร์ของเชื้อราและแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ในอากาศเนื่องจากสปอร์สามารถอยู่รอดได้ดีในสภาพแห้งและสภาพที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ คุณภาพทางจุลินทรีย์ของอากาศในสิ่งแวดล้อมบริเวณที่แปรรูปอาหารเกี่ยวข้องคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารชนิดที่เน่าเสียง่าย (perishable food) ที่ผลิตในบริเวณนั้น การกรองอากาศที่เข้าสู่บริเวณที่ทำการแปรรูปอาหารอย่างไม่เหมาะสม หรือการหมุนเวียนอากาศจากบริเวณเตรียมวัตถุดิบเข้าสู่ปริเวณที่ทำการแปรรูปสามารถทำให้อาหารเกิดการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ได้ คุณภาพของอากาศในบริเวณบรรจุจึงมีความสำคัญในแง่ของการควบคุมการปนเปื้อนหลังการผลิต

ปฏิบัติการในครั้งนี้จะได้ทดลองวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์บนพื้นผิวของอุปกรณ์ โดยใช้ 3 วิธีการแรกคือ การสัมผัสพื้นผิวโดยตรงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ การถูด้วยไม้พันสำลี และการชะล้างผิวของภาชนะ โดยจะได้ทดลองเปรียบเทียบการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Standard Plate Count กับวิธีการใช้แผ่นฟิล์มเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว แผ่นฟิล์มเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวคือแผ่นเพตตริฟิล์มของบริษัท 3M จำกัด (3M Petrifilm Plates) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อผงแห้งเคลือบอยู่บนแผ่นฟิล์มพลาสติก แผ่นเพตตริฟิล์มมีหลายชนิด แต่ชนิดที่จะใช้ในบทปฏิบัติการนี้เป็น

ชนิดที่เรียกว่า 3M Petrifilm Aerobic Count Plate ใช้สำหรับวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (Plate Count Agar) เจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น และสีย้อมเพื่อช่วยในการนับจำนวนโคโลนี ข้อดีของการใช้แผ่นเพตตริฟิล์มก็คือ สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องเสียเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แผ่นฟิล์มมีขนาดเล็ก ประหยัดเนื้อที่ในตู้บ่มเชื้อ ส่วนข้อเสียได้แก่ โคโลนีมีขนาดเล็กทำให้นับได้ยาก และบางครั้งอนุภาคของอาหารอาจมีลักษณะคล้ายโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนแผ่นเพตตริฟิล์ม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้วิธีการเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมและบนพื้นผิวของอุปกรณ์ด้วยวิธีต่างๆ
2. เพื่อเรียนรู้วิธีการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีที่รวดเร็วโดยใช้ 3M Petrifilm Aerobic Count Plate เปรียบเทียบกับวิธี Standard Plate Count

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์ ได้แก่ พื้น ผนัง ประตู หน้าต่าง โต๊ะ ลูกบิดประตู ก๊อกน้ำ ขวดพลาสติก ขวดแก้ว มีด เขียง ภาชนะใส่อาหารและพื้นผิวอุปกรณ์อื่นๆ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Plate Count Agar (PCA)
3. 3M Petrifilm Aerobic Count Plate และแผ่นพลาสติกแข็งสำหรับกด (Spreader)
4. น้ำกลั่น สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ
5. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 และแท่งแก้วงอ
6. กระดาษแข็งเจาะตรงกลางเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5×5 เซนติเมตร
7. จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร กรรไกร และตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C
8. เครื่องเก็บตัวอย่างอากาศ (MICROBIO MB1 Air Sampler) และ MicroBio Reported Software

วิธีการทดลอง

<u>ตอนที่ 1</u> วิธีการสัมผัสพื้นผิวโดยตรงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

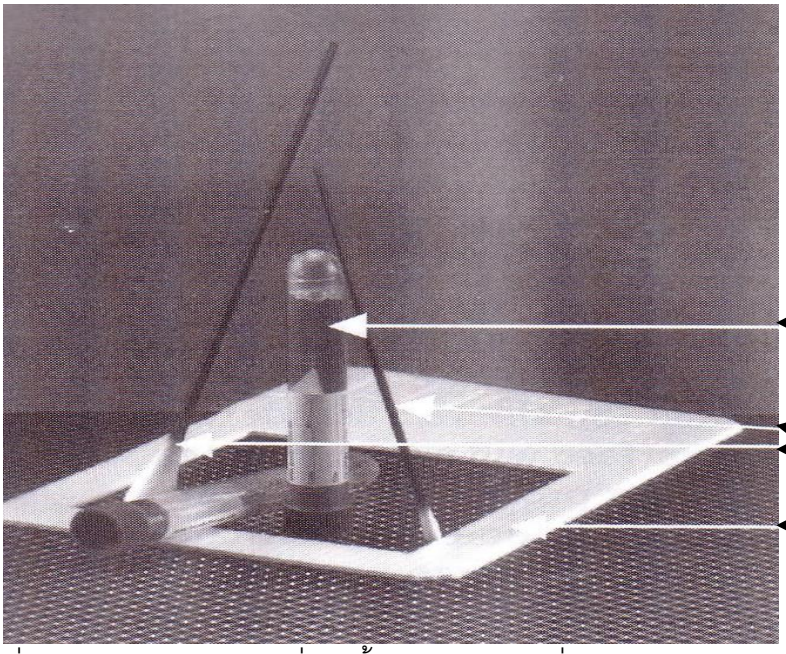
1. เลือกบริเวณพื้นผิวที่แบนราบที่จะตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์เช่น บริเวณพื้น ผนัง ประตู หน้าต่าง โต๊ะหรือบริเวณต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการหรือบริเวณอื่น ๆ
2. วางแผ่นเพตตริฟิล์ม (3M Petrifilm Aerobic Count Plate) บนพื้นราบ เปิดแผ่นพลาสติกด้านบนขึ้น หยดสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงบนแผ่นฟิล์มนี้ ปิดแผ่นพลาสติกแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปิดแผ่นพลาสติกที่ปิดแผ่น

ฟิล์มขึ้น นำแผ่นฟิล์มด้านในไปแปะให้แนบสนิทกับพื้นผิวที่จะทดสอบโดยใช้นิ้วลูบด้านหลังแผ่นฟิล์มเบา ๆ เพื่อให้เนื้อเจลสัมผัสกับพื้นผิวอย่างทั่วถึง ยกแผ่นฟิล์มขึ้นจากพื้นผิวแล้วปิดแผ่นพลาสติกดังเดิม

3. นำแผ่นเพตตริฟิล์มไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
4. นับโคโลนีสีแดงที่ขึ้นบนแผ่นเพตตริฟิล์มทั้งหมด จำนวนโคโลนีที่เหมาะสมต่อการนับอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี กรณีที่มีโคโลนีขึ้นมากเกินไป ให้นับจำนวนโคโลนีใน 1 ช่องสี่เหลี่ยม (1 ตารางเซนติเมตร) แล้วคูณด้วย 20 (พื้นที่ในวงกลมทั้งหมด) จะได้จำนวนโคโลนีทั้งหมดโดยประมาณที่เจริญบนแผ่นเพตตริฟิล์ม

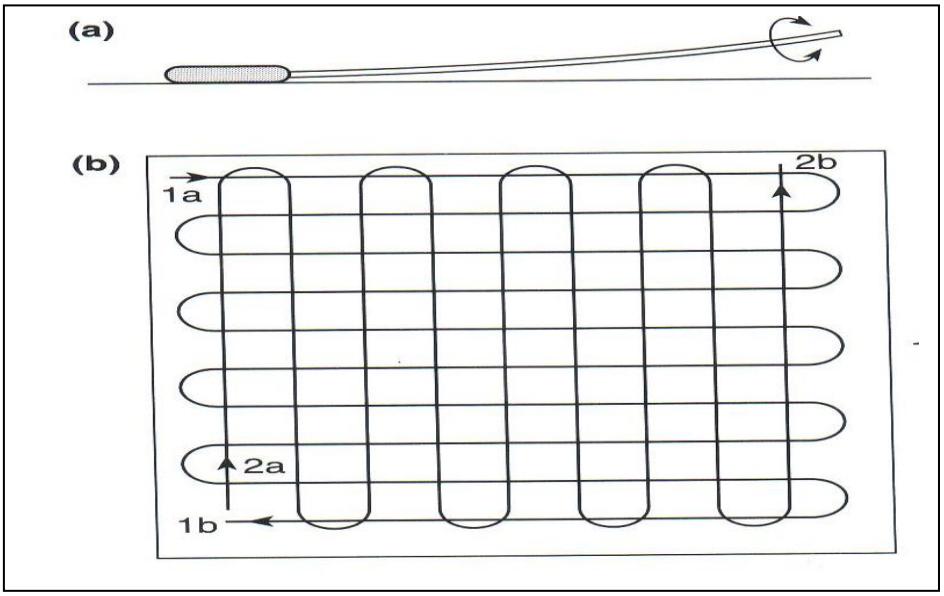
<u>ตอนที่ 2</u> วิธีการถูพื้นผิวด้วยไม้พันสำลี

1. ตัดแผ่นกระดาษแข็งเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 10×10 เซนติเมตรและเจาะตรงกลางแผ่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5×5 เซนติเมตร นำไปใส่ในถุงพลาสติกมัดให้แน่นและนำไปฆ่าเชื้อ
2. เลือกบริเวณพื้นผิวของอุปกรณ์ที่จะตรวจสอบเช่น มีด เขียง ภาชนะบรรจุอาหารและอุปกรณ์ชนิดต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร
3. วางแผ่นกระดาษแข็งจากข้อ 1 ทาบลงบนพื้นผิวของอุปกรณ์ที่ต้องการทดสอบโดยวางให้แบนราบที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อออกจากภาชนะบรรจุ จับที่ปลายไม้ระวังอย่าสัมผัสส่วนอื่นของไม้พันสำลี จุ่มไม้พันสำลีลงไปในหลอดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อให้ส่วนของสำลีเปียกพอหมาด ๆ จากนั้นกดส่วนของสำลีเข้ากับข้างหลอดพร้อมกับหมุนไปด้วยเพื่อขจัดน้ำส่วนเกิน แล้วถูบริเวณช่องสี่เหลี่ยมตรงกลางแผ่นกระดาษให้ทั่วบริเวณพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ในการถูให้ออกแรงเล็กน้อยเพียงพอที่จะทำให้ไม้พันสำลีโค้งเล็กน้อยทำมุมประมาณ 30 องศา ถูให้ทั่วบริเวณพื้นผิวทั้งสองแนว (รูปที่ 14.1 และ 14.2)
4. นำไม้พันสำลีที่ถูแล้วใส่ไว้ในหลอดทดลองเปล่าที่ปราศจากเชื้อ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดด้ามของไม้พันสำลีที่ไม่มีสำลีติดอยู่ทิ้งไปให้เหลือเฉพาะส่วนที่มีสำลีพันอยู่ จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าหลอดอย่างแรง 25 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที (ถ้าพื้นผิวที่ตรวจสอบสกปรกมาก ทำเจือจางที่ระดับความเจือจางสูงขึ้น)
5. ปิเปตสารละลายที่ชะล้างไม้พันสำลีมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่มีผิวหน้าแห้ง เกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นปิเปตสารละลายนี้อีก 1 มิลลิลิตร ใส่ลงกลางแผ่นเพตตริฟิล์มแผ่นล่าง โดยให้ปิเปตตั้งฉากกับแผ่นฟิล์มแล้วปล่อยแผ่นพลาสติกแผ่นบนลง วางแผ่นพลาสติกแข็งสำหรับกด (Spreader) ทับด้านบนโดยให้ด้านที่มีขอบวงกลมคว่ำลง ให้ขอบวงกลมครอบบริเวณหยดตัวอย่างแล้วใช้นิ้วชี้ค่อย ๆ กดแผ่นพลาสติกแข็งจนเห็นตัวอย่างกระจายทั่วบริเวณวงกลม (รูปที่ 14.3)



รูปที่ 14.1 ตัวอย่างอุปกรณ์ที่ใช้ถูพื้นผิวของบริเวณที่จะตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์

ที่มา: Bell และคณะ (2005)



รูปที่ 14.2 เทคนิคการถูด้วยไม้พันสำลี

(a) ใช้แรงกดไม้พันสำลีกับพื้นผิวเล็กน้อยให้ไม้โค้งเล็กน้อย หมุนก้านไม้พันลำสี อย่างสม่ำเสมอขณะถูพื้นผิว เพื่อจะได้ใช้พื้นที่ผิวของสำลีทั้งหมด

(b) ถูพื้นผิว 2 แนว เริ่มจากจุด 1a และจบที่จุด 1b ตามด้วยการถูจากจุด 2a ทันทีไปจนถึงจุด 2b

ที่มา: Bell และคณะ (2005)

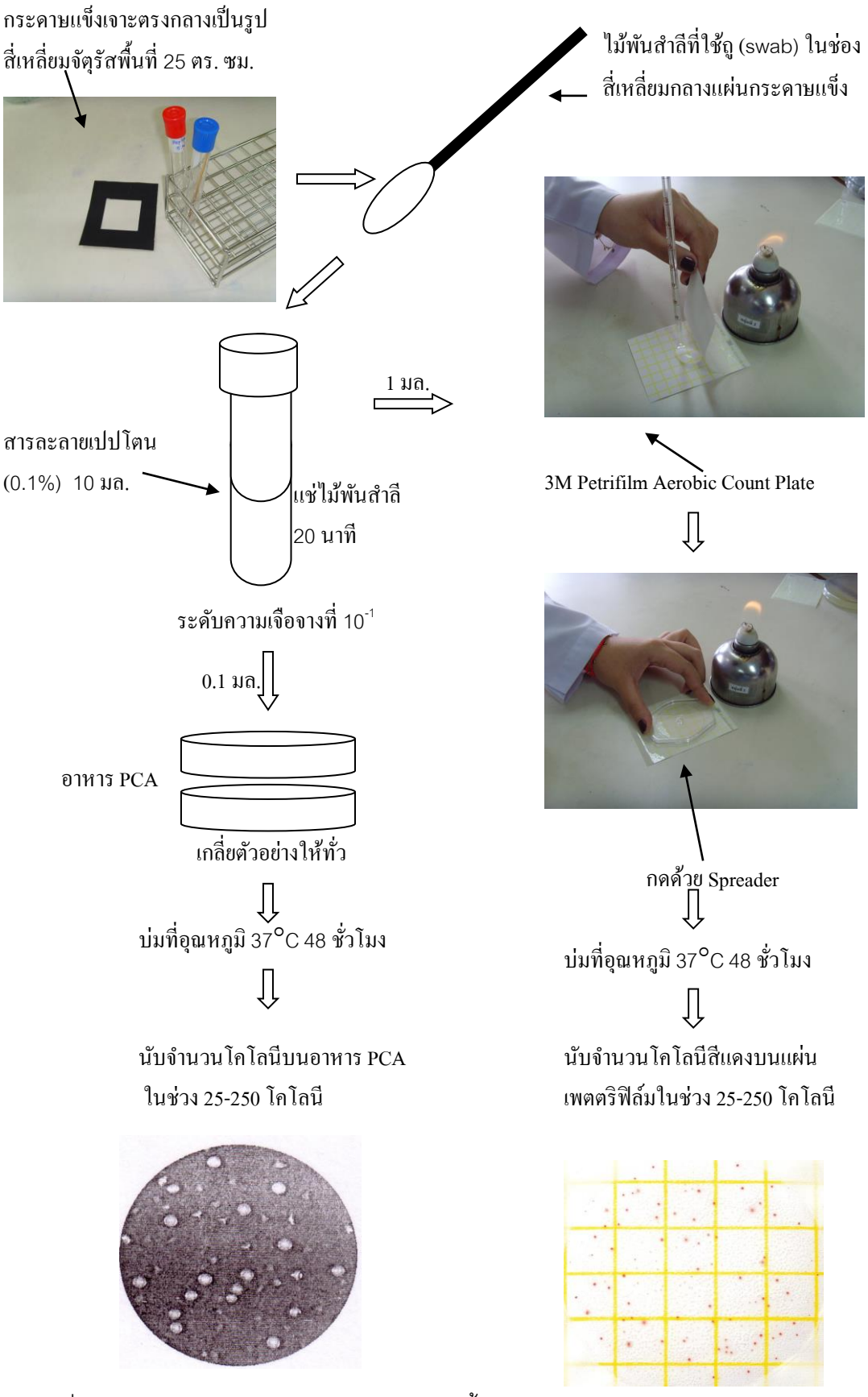
6. คว่ำจานอาหาร PCA และหงายแผ่นเพตตริฟิล์ม โดยให้ด้านที่มีแผ่นพลาสติกใสอยู่ข้างบน วางแผ่นฟิล์มนี้ซ้อนกันได้ ไม่เกิน 20 แผ่น นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนอาหาร PCA และนับโคโลนีสีแดงบนแผ่นเพตตริฟิล์ม นำจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร) มาคูณด้วย 10 จะได้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU) ต่อพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร

ตอนที่ 3 วิธีการชะล้างผิวของอุปกรณ์หรือภาชนะ

1. เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในภาชนะบรรจุที่ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์เช่น ขวดแก้ว ขวดพลาสติก หรือกล่องบรรจุอาหาร
2. ปิดฝาภาชนะ เขย่าภาชนะอย่างแรงตามแนวตั้ง 10 ครั้ง หมุนภาชนะ 90 องศาเขย่าอย่างแรงอีก 10 ครั้งตามแนวนอน หมุนอีก 90 องศาทำซ้ำเช่นเดิม
3. นำน้ำชะล้างภาชนะมาวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยปิเปตน้ำชะล้างมา 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่จานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ 3 จาน (จานละ 3.0 , 3.5 และ 3.5 มิลลิลิตร) จากนั้นปิเปตน้ำชะล้างใส่ในจานเพาะเชื้ออีก 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร (อาจใช้น้ำล้างภาชนะนี้วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น เชื้อราและยีสต์ แบคทีเรียโคลิฟอร์ม และจุลินทรีย์เฉพาะชนิดต่าง ๆ ได้ตามต้องการโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพการบ่มที่เหมาะสม)
4. เทอาหาร PCA ที่มีอุณหภูมิ 44-46°C ลงไปจานละ 15-18 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดีกับอาหาร คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. นับจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร PCA ทั้ง 3 จานที่ใส่ตัวอย่างรวม 10 มิลลิลิตร รวมจำนวนโคโลนีเข้าด้วยกันแล้วคูณด้วย 2 จะได้จำนวนโคโลนีต่อภาชนะ 1 ใบ และ นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหาร PCA ทั้ง 2 จานที่ใส่ตัวอย่างจานละ 1 มิลลิลิตร รวมจำนวนโคโลนีแล้วคูณด้วย 10 จะได้จำนวนโคโลนีต่อภาชนะ 1 ใบแล้วหาค่าเฉลี่ย ถ้านับโคโลนีในจานที่ใส่ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ได้มากกว่า 250 โคโลนี ให้รายงานว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่า 5,000 ต่อภาชนะ 1 ใบ

การแปลผลการตรวจสอบ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารที่ทำความสะอาดอย่างเพียงพอไม่ควรจะมีจำนวนจุลินทรีย์เกิน 100 โคโลนีต่อ 1 อุปกรณ์หรือต่อ 1 พื้นที่ที่ตรวจสอบ แต่ในหลายๆ กรณี ชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนสำคัญกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่น การมีเชื้อ *Saccharomyces bailii* และ/หรือ *Lactobacillus fructivorans* บนอุปกรณ์ที่ใช้ทำน้ำสลัดอาจมีผลต่อการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจหาจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย และเมื่อใช้วิธีการถูด้วยไม้พันสำลีเพื่อจุดประสงค์อื่นนอกเหนือจากการประเมินความสะอาดของอุปกรณ์ ในการแปลผลการตรวจสอบนี้จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหาร อุปกรณ์และวิธีการแปรรูปที่ใช้เพื่อที่จะประเมินได้ถึงความสำคัญของผลการตรวจสอบที่ได้



รูปที่ 13.3 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวด้วยเทคนิคการถูด้วยไม้พันสำลี

ที่มาของภาพ Petrifilm: คู่มือการใช้ 3M Petrifilm ของ บริษัท 3M Thailand Limited

<u>ตอนที่ 4</u> การเก็บตัวอย่างอากาศ (air sampling)

ในการทดลองนี้ให้ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในอากาศในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง เปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธีการดังนี้ 1) เปิดฝาจานอาหาร PCA ทิ้งไว้ โดยใช้เวลานานเท่ากับที่นักศึกษาจะเก็บอากาศด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอากาศ จากนั้นจึงปิดฝาจานนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 2) เก็บตัวอย่างอากาศด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอากาศ MICROBIO MB1 ดังรูปที่ 14.4 ในการเก็บตัวอย่างอากาศให้ทำการทดลองตามวิธีการดังต่อไปนี้

รูปที่ 14.4 เครื่องเก็บตัวอย่างอากาศ (MICROBIO MB1 Air Sampler)

1. เปิดฝา sampling head ที่ปลอดเชื้อของเครื่องเก็บตัวอย่างอากาศออก โดยให้จับเฉพาะตรงขอบ (รูป a) ห้ามจับบริเวณด้านหน้าและด้านหลังของ sampling head ที่มีรูสำหรับดูดอากาศ
2. วางจานอาหาร PCA ที่มีผิวหน้าแห้ง ลงไประหว่างที่หนีบจาน (spring clips) เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วปิด sampling head เข้าที่เดิม (รูป b)
3. เปิดสวิทซ์ของเครื่องโดยกดปุ่ม ON/OFF (รูป c)
4. เลือกปริมาตรของอากาศที่จะเก็บ (sampling volume) โดยสามารถเลือกได้ดังนี้: 25, 50,100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 1000, 1200 และ 1500 ลิตร) กดปุ่ม + หรือ - เพื่อ

เพิ่มหรือลดปริมาตรอากาศที่จะเลือก จากนั้นกดปุ่ม START เพื่อให้ turbofan ทำงานเพื่อดูดอากาศให้ได้ตามปริมาตรอากาศที่ตั้งค่าไว้ เมื่อเก็บตัวอย่างครบแล้วเครื่องจะหยุดทำงานเอง (ถ้าหากต้องการยกเลิก การเก็บตัวอย่างอากาศก็สามารถทำได้โดยกดปุ่ม CANCEL เพื่อให้ turbofan หยุดทำงาน)

5. เปิดฝา sampling head ออก นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากเครื่อง ปิดฝาจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจำนวนโคโลนีที่นับได้ ปริมาตรอากาศที่ทดสอบ อัตราความเร็วลมของ turbofan (100 ลิตรต่อนาที) ไปคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ในอากาศ (CFU ต่อลูกบาศก์เมตร) โดยใช้โปรแกรม MicroBio Reporter Software

หมายเหตุ: ดูวีดีโอวิธีตรวจเชื้อได้ใน YouTube (Suree Nanasombat)

บันทึกผลการทดลอง

1. การสัมผัสพื้นผิวโดยตรงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

บริเวณที่ทำการตรวจสอบคือ.....

แผ่นที่	จำนวนโคโลนีบนแผ่นเพตตริฟิล์ม	CFU ต่อ 20 ตารางเซนติเมตร
1		
2		

2. การถูด้วยไม้พันสำลี

บริเวณที่ทำการตรวจสอบคือ.....

2.1 บนอาหาร PCA

จานที่	จำนวนโคโลนีบนอาหาร PCA (ระดับความเจือจางที่ .....)	CFU ต่อ 25 ตารางเซนติเมตร
1		
2		

2.2 บนแผ่นเพตตริฟิล์ม

แผ่นที่	จำนวนโคโลนีบนแผ่นเพตตริฟิล์ม (ระดับความเจือจางที่ .....)	CFU ต่อ 25 ตารางเซนติเมตร
1		
2		

3. การชะล้างผิวของภาชนะ

ภาชนะที่ทำการตรวจสอบคือ.....

3.1 น้ำชะล้างภาชนะ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่ 3 จาน

จานที่	ปริมาตรน้ำชะล้างภาชนะ (มิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนีบนอาหาร PCA	รวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดใน 3 จาน	CFU ต่อภาชนะ 1 ใบ
1	3.0			
2	3.5			
3	3.5			

3.2 น้ำชะล้างภาชนะ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจาน จำนวน 2 จาน

จานที่	ปริมาตรน้ำชะล้างภาชนะ (มิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนีบนอาหาร PCA	รวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดใน 2 จาน	CFU ต่อภาชนะ 1 ใบ
1	1			
2	1			

ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ.....CFU ต่อภาชนะ 1 ใบ

4. การเก็บตัวอย่างอากาศ

บริเวณที่เก็บตัวอย่างอากาศคือ.....

วันที่เก็บตัวอย่าง..... เวลาเก็บตัวอย่าง.....

อุณหภูมิของอากาศ.....

วิธีการเก็บตัวอย่างอากาศ	จำนวนโคโลนี	จำนวนจุลินทรีย์ในอากาศ (CFU/ m^3)
1. เปิดฝาจานอาหาร PCA ไว้ 30 นาที		
2. เก็บตัวอย่างอากาศด้วยเครื่อง MICROBIO MB1 (ปริมาตรอากาศที่ทดสอบ.....ลิตร)		

คำถามท้ายบท

1. การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมของโรงงานแปรรูปอาหารมีความสำคัญอย่างไร สามารถใช้วิธีไหนในการวิเคราะห์ได้บ้าง อธิบายสัก 2 วิธี
2. ผลการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างไร
3. จงยกตัวอย่างชนิดของจุลินทรีย์ที่อาจพบได้ในสิ่งแวดล้อมมาสัก 3 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

บริษัท 3M Thailand Limited. 2546. คู่มือการใช้ 3M Petrifilm Aerobic Count Plate.

Collins, C.H., Lyne, P.M.,Grange, J.M. 2001. Collins and Lyne's Microbiological Methods, 7th ed. Butterworth Heinemann, Great Britain.

Frank , J.F. 1998. Food Microbiology: Lab Manual. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.

Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.

Sveum, W.H., Moberg, L.J., Rude, R.A., Frank, J.F. 1992. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 51-74.

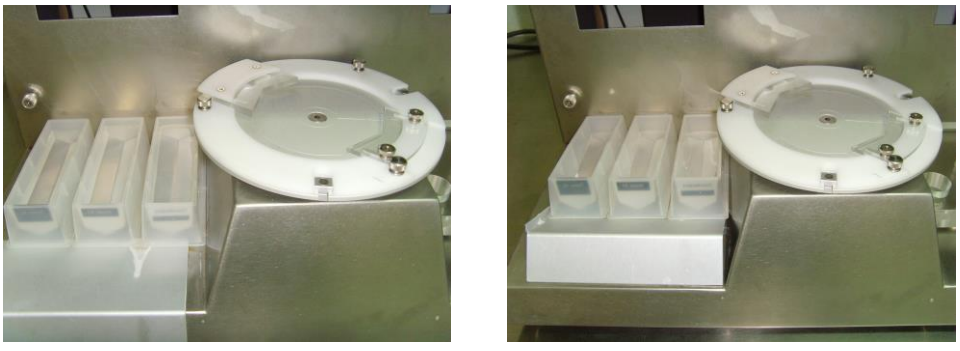
Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. John Wiley & Sons, USA.

ภาคผนวก ก
วิธีการใช้เครื่องจ่ายตัวอย่างลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ (Automated Spiral Plater รุ่น Autoplate® 4000)

การติดตั้งเบื้องต้น (Initial setup)

1. ควรวางเครื่อง spiral plater ห่างจากผนังด้านหลังและด้านข้างอย่างน้อย 6 นิ้วเพื่อการระบายอากาศอย่างเหมาะสม จัดให้บริเวณทำงานสะอาด ปราศจากเศษสิ่งของสกปรก
2. ต่อสายไฟเข้ากับด้านหลังเครื่อง spiral plater
3. ต่อ vacuum tubing เข้ากับ vacuum source

   หมายเหตุ: ข้อ1-3 ได้ทำเรียบร้อยแล้ว ห้ามดึงสายออกหรือเลื่อนเครื่องมือโดยเด็ดขาด
4. วางอ่างของเหลว 3 อ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (อาจนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave หรือ rinse ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (10% bleach solution หรือ 70% ethanol แล้วปิดฝาไว้) ทางซ้ายของแท่นหมุนตามลำดับดังนี้ จากขวาไปซ้ายคือ อ่างน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) อ่างน้ำที่ 1 (water station 1) และอ่างน้ำที่ 2 (water station 2) ดังภาพ เทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในอ่างน้ำที่ 1 และอ่างที่น้ำที่ 2 ส่วนอ่างน้ำยาฆ่าเชื้อ ให้เติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไปจนเต็มหรืออาจเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 กรณีที่ใช้งานกับจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์เท่านั้น ถ้าหากของเหลวเหล่านี้ผ่านการใช้ทำความสะอาดไปประมาณ 50 ครั้ง ของเหลวจะลดระดับจนถึงก้นอ่าง ให้เติมเของเหลวเพิ่มลงไป หรืออาจใช้อุปกรณ์ (wedge) ช่วยยกอ่างขึ้นดังรูปที่ ก.1 ด้านขวา สามารถปิดฝาครอบอ่างบางส่วนไว้ได้ขณะใช้งาน โดยเปิดฝาอ่างด้านที่ติดกับผนังเครื่องไว้อย่างน้อย 1.5 นิ้ว



รูปที่ ก.1 การควบคุมระดับของเหลวที่ลดลงในอ่างน้ำสำหรับทำความสะอาด

5. วางที่วางถ้วยใส่ตัวอย่าง (four-cup cupholder) ทางด้านขวาของแท่นหมุนโดยให้ขอบด้านซ้ายที่วางถ้วยติดกับแท่นหมุนและขอบด้านหลังติดกับตัวเครื่อง
6. ของเหลวจะถูกดึงโดยระบบสุญญากาศผ่านเข็มจ่าย (stylus) syringe และวาล์ว (value) และถูกดึงออกไปยัง vacuum pump reservoir ควรตรวจสอบการทำงานของ vacuum และวาล์วโดย
   ก. เปิดสวิทซ์เครื่อง Autoplate และสวิทซ์ของปั๊มสุญญากาศ (Vacuum source)
   ข. กดปุ่ม CLEAN
   ค. สังเกตของเหลวที่เคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกจาก syringe ถ้าไม่เห็นการเคลื่อนที่ของของเหลว หรือถ้าของเหลวหรืออากาศถูกผลักออกจากเข็มจ่ายที่อ่างน้ำที่ 2 ให้ตรวจดูว่าได้เปิดสวิทซ์ของ vacuum source แล้วหรือไม่หรือดูว่าต่อ vacuum source เข้ากับเครื่องอย่างเหมาะสมหรือไม่

การตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ สี Crystal violet

1. การตรวจสอบตำแหน่งที่เข็มจ่ายเริ่มต้นจ่ายตัวอย่าง

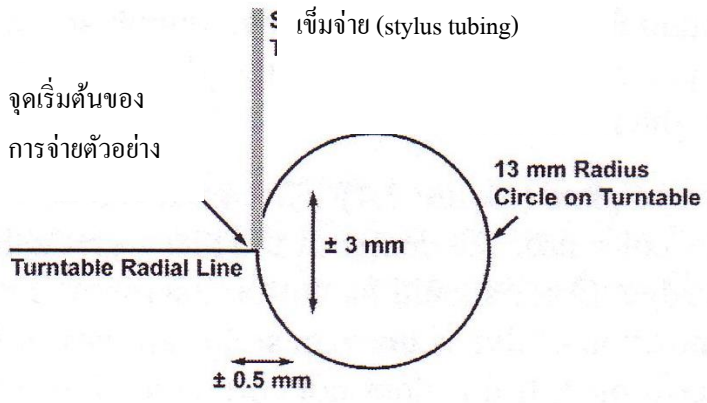
<u>วิธีทำ</u>

1.1 วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทอาหารไว้ล่วงหน้าจนผิวหน้าแห้งดีแล้วลงบนแท่นวางจาน

1.2 กดปุ่ม 100 mm สำหรับการใช้จานขนาด 100 มิลลิเมตร

1.3 กดปุ่ม test เพื่อให้เข็มจ่าย เลื่อนลงต่ำจนถึงจุดที่จะเริ่มจ่าย มองดูที่ผิวของวุ้นเพื่อตรวจดูว่าปลายเข็มจ่ายได้อยู่ที่จุดตัดของวงกลมที่มีรัศมี 13 มิลลิเมตรกับเส้น turnable radial line (รูปที่ ก.2) หรือไม่ ถ้าจะต้องปรับตำแหน่งเริ่มต้นการจ่าย ให้ดูที่ข้อ 6.1 ในคู่มือการใช้ฉบับภาษาอังกฤษ (Automated Spiral Plater User Guide)

1.4 กดปุ่ม test อีกครั้งเพื่อให้เข็มจ่ายเคลื่อนที่กลับมายังตำแหน่งพักของเข็ม



รูปที่ ก.2 การตรวจสอบตำแหน่งเริ่มต้นของการจ่ายตัวอย่าง

ที่มา: Automated Spiral Plater User Guide, Spiral Biotech

2. การทดสอบโดยจ่ายสีย้อมลงบนจานเพาะเชื้อ

เทสารละลาย crystal violet ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 ลงในถ้วยใส่ตัวอย่าง วางถ้วยที่ตำแหน่งซ้ายด้านหลังสุดของที่วางถ้วยใส่ตัวอย่าง ตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งที่ตัวอย่างจะถูกดูดขึ้นไป

2.1 ก่อนที่จะดูดสีขึ้นไป ท่อจ่ายตัวอย่างควรมีของเหลวบรรจุอยู่เต็ม ดังนั้นจึงต้องกดปุ่ม Clean ก่อน เพื่อที่ให้น้ำเข้าไปบรรจุอยู่ในท่อ

ข้อสังเกต: มีปุ่มอยู่ 2 ปุ่มให้เลือกที่ Auto section ที่แผงกดปุ่มตอนกลางคือ ปุ่ม MIN และ MAX เพื่อที่จะเลือกให้จ่ายตัวอย่างลงบนจานเพาะเชื้อเพียง 1 จาน หรือให้จ่ายตัวอย่างลงบนจาน มากกว่า 1 จานตามลำดับ สามารถเลือกกดปุ่ม MIN หรือ MAX ได้ก่อนที่กดจะปุ่ม FILL เช่นในการตรวจสอบครั้งนี้จะทำการตรวจสอบความถูกต้องของการจ่ายแบบ 50 µl exponential deposition key โดยกดปุ่ม

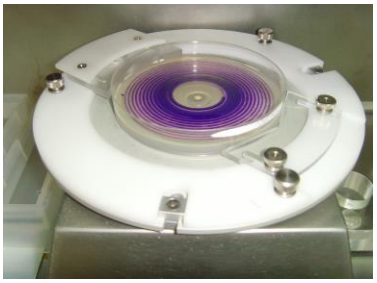
จากนั้น เลือกกดปุ่ม MIN ใน Auto section เข็มจ่ายจะเคลื่อนที่ลดระดับลงมาดูดสี

หมายเหตุ: การเลือก Exponential 50 µl Mode เครื่องจะจ่ายตัวอย่าง ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100 มิลลิเมตรหรือปริมาณ 54.3 ไมโครลิตรต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 150 มิลลิเมตรโดยจะจ่ายตัวอย่างปริมาณน้อยลงเรื่อยๆ เริ่มตั้งแต่จุดศูนย์กลางจานไปจนถึงขอบจาน Mode นี้ใช้สำหรับการตรวจนับจำนวนโคโลนีด้วยวิธี spiral plating วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100 มิลลิเมตรลงบนแท่นหมุน

2.2 เพื่อที่จะตั้งศูนย์กลางจาน ให้สังเกตวงกลมตามรอยจ่ายที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะระหว่างขอบนอกของจานไปยังวงกลมควรห่างกันอย่างสม่ำเสมอ ถ้าไม่เท่ากันให้หมุนน็อตบนชิ้นพลาสติกรูปตัว“V”เลื่อนจนกระทั่งจานเพาะเชื้อเข้าสู่ตำแหน่งกลางอย่างเหมาะสม จึงขันน็อตให้แน่น

2.3 สังเกตสีบนจานดังรูป แนวการจ่ายตามวงกลมจะต้องสม่ำเสมอโดยสีจะต้องเข้มมากบริเวณใกล้ๆจุดคูนย์กลาง แล้วค่อยๆ จางลงจนถึงขอบจาน สีต้องสม่ำเสมอในแต่ละแนว ถ้าการจ่ายสีไม่เท่ากัน จะต้องปรับ stylus alignment ตามวิธีการในข้อ 6.1 ในคู่มือการใช้ แต่ถ้ายังไม่สามารถแก้ปัญหาได้อีกให้ดูที่ข้อ 8.6 ในคู่มือการใช้เครื่อง Spiral Plater ฉบับภาษาอังกฤษ

2.4 ตรวจดู spiral pattern ว่า อยู่ในแนวเดียวกับ counting grid หรือไม่



รูปที่ ก.3 ลักษณะของ Exponential Dye Plate

วิธีการจ่ายตัวอย่างลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การทำความสะอาดเข็มจ่าย (Stylus disinfection)

ก่อนใช้เครื่อง Autoplate เพื่อเริ่มการทดลองจริง เพื่อให้แน่ใจว่าระบบการทำความสะอาดมีประสิทธิภาพ ทดลองให้เข็มจ่ายดูดแบคทีเรีย 10^6 CFU/ml แล้วกดปุ่ม Clean เพื่อทำความสะอาด หรือ กดปุ่ม Power clean ไว้ก่อน ถ้าหากแบคทีเรียนั้นสร้างสปอร์ เมื่อทำความสะอาดเสร็จแล้ว กดปุ่ม MAX fill เพื่อให้เครื่องดูดน้ำกลั่นปลอดเชื้อขึ้นไปและจ่ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 จาน นำไปบ่ม ถ้าหากไม่มีโคโลนีขึ้นแสดงว่าระบบการทำความสะอาดทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.1 การทำความสะอาดด้วย Power clean

ถ้ากดปุ่ม Power clean ไว้ก่อนที่จะทำความสะอาด เครื่อง Autoplate จะอยู่ใน Power clean mode (สังเกตไฟที่ปุ่ม Power clean จะติด) จากนั้นให้กดปุ่ม Clean เพื่อเริ่มทำความสะอาด ในระหว่างกระบวนการนี้เข็มจ่าย (stylus) จะถูกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 วินาที โดยในช่วงนี้ syringe จะดันน้ำยาฆ่าเชื้อเข้าและออกจากท่อ แรงถูและเวลาการสัมผัสที่เพิ่มขึ้นจะขจัดแบคทีเรียที่ยากต่อการทำลาย (difficult-to-kill bacteria)ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่น แบคทีเรียแกรมบวก

1.2 Expel

เมื่อจ่ายตัวอย่างที่มีเศษชิ้นตัวอย่าง แนะนำให้กดปุ่ม EXPEL (ไฟที่ปุ่มนี้จะติด) ก่อนที่จะทำความสะอาด เพื่อไล่ตัวอย่างที่ค้างอยู่ออกก่อน

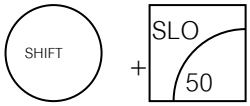
2. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารแข็งควรผสมกับสารละลายทำเจือจางให้เป็นเนื้อเดียวกัน เศษชิ้นอาหารอาจไปอุดตันเข็มจ่ายได้ ดังนั้นจึงควรกรองตัวอย่างเสียก่อนหรือตั้งทิ้งไว้สัก 2-3 นาทีเพื่อให้เศษอาหารตกลงที่ก้นภาชนะ แนะนำให้ใช้ถุงกรองเพื่อกรองเศษชิ้นตัวอย่าง อาจต้องเจือจางตัวอย่างเพื่อให้มั่นใจว่าจะมี จุลินทรีย์ขึ้นบนจานเพาะเชื้อในจำนวนที่นับได้

3. การเลือก Mode ในการสั่งจ่ายตัวอย่าง (deposition mode selection)

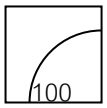
การเลือก Mode ในการสั่งจ่ายตัวอย่างขึ้นกับจุดประสงค์ของงานสามารถเลือกได้หลายแบบดังนี้

*** - **Exponential 50 µl mode** (50 µl/ 100 mm, 54.3 µl/ 150 mm) ใช้กับ spiral plating และการจ่ายสารต้านจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อเพื่อทำ Spiral Gradient Endpoint test ใน Mode นี้เครื่องจะจ่ายตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อขนาด 100 มิลลิเมตรหรือปริมาณ 54.3 ไมโครลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อขนาด 150 มิลลิเมตรโดยจะจ่ายตัวอย่างปริมาณน้อยลงเรื่อยๆ เริ่มตั้งแต่จุดศูนย์กลางจานไปจนถึงขอบจาน CFU range: $4.0\times10^2 - 4.0\times10^5$



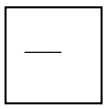
- **Slow Exponential 50 µl mode** (50 µl/ 100 mm, 54.3 µl/ 150 mm) ใช้เมื่อจ่ายสารประกอบอินทรีย์เช่น เอทานอล หรือเมื่อจ่ายตัวอย่างบนจานอาหารที่ผิวหน้าไม่แห้งเพื่อหลีกเลี่ยงการกระเด็นของตัวอย่าง

CFU range: $4.0\times10^{2} - 4.0\times10^{5}$



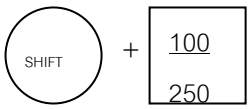
- **Exponential 100 µl mode** (100 µl/ 100 mm, 108.6 µl/ 150 mm) ใช้สำหรับการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียจากตัวอย่างที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์น้อย เครื่องจะจ่ายตัวอย่างช้ากว่า Exponential 50 µl mode เพื่อหลีกเลี่ยงการกระเด็นของตัวอย่าง

CFU range: $2.0\times10^{2} - 4.0\times10^{5}$



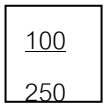
- **Uniform 20 µl mode** (20 µl/ 100 mm, 63.45 µl/ 150 mm) ใน mode นี้เครื่องจะจ่ายตัวอย่างด้วยอัตราคงที่เท่ากันตลอดตามรอยจ่ายตามแนววงกลม สามารถให้โคโลนีที่แยกกันจำนวนมาก

CFU range: $1.0\times10^{3} - 1.5\times10^{4}$



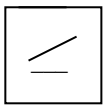
- **Uniform 100 µl mode** (100 µl/ 100 mm)เครื่องจะจ่ายตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตรด้วยอัตราคงที่เท่ากันตลอดตามรอยจ่ายตามแนววงกลม

CFU range: $2.0\times10^{2} - 3.0\times10^{3}$

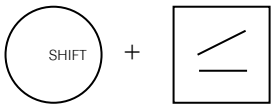


- **Uniform 250 µl mode** (250 µl/ 100 mm)เครื่องจะจ่ายตัวอย่างปริมาณ 250 ไมโครลิตรด้วยอัตราคงที่เท่ากันตลอดตามรอยจ่ายตามแนววงกลม ใช้สำหรับการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียจากตัวอย่างที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์น้อยมาก

CFU range: $8.0\times10^{1} - 3.0\times10^{3}$



*** - **Lawn mode** (20 µl/ 100 mm, 60.23 µl/ 150 mm) การใช้ mode นี้จะทำให้ได้การเจริญของจุลินทรีย์อย่างสม่ำเสมอตลอดทั่วทั้งจานเนื่องจากเครื่องจะจ่ายตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) ด้วยอัตราคงที่ในปริมาณเท่ากันเช่นเดียวกับ uniform mode แต่จ่ายถี่ขึ้นโดยมีระยะระหว่างวงกลมแคบลงครึ่งหนึ่ง mode นี้มีประโยชน์ในการกระจายเชื้อให้เท่าๆกันบนจานเพื่อทำ disk diffusion tests และศึกษา viral plagues หรือการผลิตเอนไซม์



- **Proportional mode** (20 µl/ 100 mm, 43.09 µl/ 150 mm) ใน mode นี้จะจ่ายตัวอย่างปริมาณลดลงเรื่อยๆเป็นสัดส่วนโดยตรงกับรัศมีจากจุดศูนย์กลางจาน ดังนั้นช่วงของความเข้มข้นจึงน้อยกว่า exponential mode มาก มี

ประโยชน์ในการดูการตอบสนองของจุลินทรีย์ต่อสารยับยั้งหรือสารที่ทำให้ผ่าเหล่า (mutagens) ในช่วงความเข้มข้นที่แคบมาก

สรุปวิธีการใช้เครื่อง Spiral Plater ในการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

1. เปิดสวิทซ์เครื่อง Autoplate
2. เปิดสวิทซ์ของ Vacuum source ความดันต้องอยู่ที่ระดับ 15-20 inches (380-510 mm.) Hg
3. วางอ่างของเหลว 3 อ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (อาจนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave หรือ rinse ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (10% bleach solution หรือ 70% ethanol แล้วปิดฝาไว้) ทางซ้ายของแท่นหมุนตามลำดับดังนี้ จากขวาไปซ้ายคือ อ่างน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) อ่างที่น้ำที่ 1 (water station 1) และอ่างที่น้ำที่ 2 (water station 2) จากนั้นเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในอ่างน้ำที่ 1 และอ่างน้ำที่ 2 ส่วนอ่างน้ำยาฆ่าเชื้อเติมโซเดียมไฮโปคลอไรส์ความเข้มข้น 5% ลงไปจนเต็ม
4. ตั้ง Mode การจ่ายตัวอย่างโดยกดปุ่ม SLO 50 สำหรับการจ่าย 50 µl ต่อจานและกดปุ่ม 100 mm. สำหรับการใช้จานเพาะเชื้อขนาด 100 มิลลิเมตร
5. กดปุ่ม CLEAN
6. กดปุ่ม MIN เพื่อที่จะเลือกให้จ่ายตัวอย่างลงบนจานเพียง 1 จาน หรือกดปุ่ม MAX เพื่อให้จ่ายตัวอย่างลงบนจาน มากกว่า 1 จาน (จ่ายได้อย่างต่อเนื่องมากที่สุด 5 จาน)
7. เติมสารละลาย crystal violet ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 ปริมาณ 3-4 มิลลิลิตรลงในถ้วยใส่ตัวอย่าง วางถ้วยที่หลุมด้านซ้ายมือหลังสุดของที่วางถ้วยใส่ตัวอย่าง ตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งที่ตัวอย่างจะถูกดูดขึ้นไป
8. กดปุ่ม FILL เพิ่มให้เข็มจ่าย ดูดตัวอย่างขึ้นไป
9. วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนแท่นหมุน ใช้ปากกาขีด 1 เส้น ตรงกลางขอบจานเพื่อให้ทราบตำแหน่งเริ่มต้นของ spiral line
10. เปิดฝาจานออกแล้วกดปุ่ม PLATE ตรวจสอบจุดเริ่มต้นของ spiral line กับเส้นที่ขีดไว้ที่ขอบจาน ให้สังเกตวงกลมตามรอยจ่ายที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะระหว่างขอบนอกของจานไปยังวงกลมควรห่างกันอย่างสม่ำเสมอ
11. กดปุ่ม CLEAN เพื่อทำความสะอาดเข็มจ่าย
12. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 7-11 เมื่อจ่ายเพื่อการวิเคราะห์จำนวนเชื้อ (กดปุ่ม FILL → วางจาน → อาหาร → ขีดตำแหน่งเริ่มต้น → เปิดฝาจานออก → กดปุ่ม PLATE→ กดปุ่ม CLEAN)
13. ก่อนปิดเครื่อง ถ้าจ่ายตัวอย่างที่มีเศษชิ้นส่วน ให้กดปุ่ม EXPEL เพื่อไล่ตัวอย่างที่ค้างอยู่ออก ก่อนกดปุ่ม POWER CLEAN (ไฟที่ปุ่มทั้งสองจะติด) จากนั้นกดปุ่ม CLEAN เข็มจ่าย (stylus) จะถูกฆ่าเชื้อ syringe จะดันน้ำยาฆ่าเชื้อเข้าและออกจากท่อ แบคทีเรียที่ยากต่อการทำลายจะถูกขจัดออก

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และวิธีเตรียม

Acid Broth

ส่วนประกอบ

Proteose Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
K_2HPO_4	4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Acid Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ปิเปตอาหาร 12-15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 5.0

Alkaline Peptone Water

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Alkaline Peptone Water

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เพื่อให้ได้ pH 8.5 ± 0.2 หลังฆ่าเชื้อ แบ่งอาหารใส่หลอดฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 10 นาที

Arginine-Glucose Slant (AGS)

ส่วนประกอบ

Peptone	5	กรัม	Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม	Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Tryptone	10	กรัม	Bromocresol purple	0.02	กรัม
NaCl	20	กรัม	วุ้น	13.5	กรัม
Glucose	1	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
L-Arginine (hydrochloride)	5	กรัม			

วิธีเตรียม Arginine-Glucose Slant (AGS)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนและคนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง (ขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร ใช้ 5 มิลลิลิตร) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 10-12 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวในลักษณะเอียง pH สุดท้าย 6.8-7.0

Baird-Parker Medium

ส่วนประกอบ

อาหารเหลวพื้นฐาน (Basal medium)

Tryptone	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Lithium Chloride.6H_2O	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม

Egg Yolk tellurite enrichment

ล้างไข่สดให้สะอาด แช่ไข่ทั้งเปลือกในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 10 นาที นำไข่ไปวางไว้บนจานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อทิ้งไว้จนแห้งจากนั้นทำให้แตกด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ แยกไข่แดงออกจากไข่ขาว เอาไข่แดงออกด้วย syringe ปลอดเชื้อหรือปิเปตปากกว้างใส่ลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ (เพื่อวัดปริมาตรของไข่แดง) ผสมไข่แดงกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจาก

เชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ลงไปในอัตราส่วน 3 : 7 โดยปริมาตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ส่วนผสมนี้ปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเทลลูไรส์ (potassium tellurite) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องกรองจุลินทรีย์ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

วิธีเตรียม Baird-Parker Medium ที่มี Egg Yolk tellurite enrichment

ชั่งส่วนผสมทุกชนิดตามสูตร ผสมให้เข้ากันดี ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ถ้าอาหารแข็งแล้วแต่ยังไม่ใช้ทันที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 1°C ได้นาน 1 เดือน หลอมเหลวก่อนใช้ ถ้าต้องการใช้ทันทีทำให้อาหารเย็นลงจนถึงอุณหภูมิ 48-50°C เติม Egg Yolk tellurite enrichment ที่มีอุณหภูมิ 45-50°C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน Baird-Parker Medium ที่ยังหลอมเหลวอยู่ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อย่าให้เกิดฟองอากาศ เทอาหาร 15-18 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

Bismuth Sulfite (BS) Agar

ส่วนประกอบ

Polypeptone หรือ peptone	10	กรัม	Bismuth sulfite (indicator)	8	กรัม
Beef extract	5	กรัม	Brilliant green	0.025	กรัม
Dextrose	5	กรัม	วุ้น	20	กรัม
$Na_2 HPO_4$ (anhydrous)	4	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
$FeSO_4$ (anhydrous)	0.3	กรัม			

วิธีเตรียม Bismuth Sulfite (BS) Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย ให้ความร้อนจนเดือด 1 นาที ส่วนที่ตกตะกอนจะไม่ละลาย ทิ้งให้เย็นลงจนถึง 45-50°C ทำให้ตะกอนแขวนลอยอย่างทั่วถึงโดยคนสม่ำเสมอก่อนเทอาหาร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15 × 100 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง 2 ชั่วโมง เปิดฝาเล็กน้อยแล้วจึงปิดฝา pH สุดท้าย 7.7 ± 0.2

ข้อควรระวัง: อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เตรียมก่อนใช้ 1 วัน และ เก็บไว้ในที่มืด (selectitivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงหลัง 48 ชั่วโมง)

Blood agar ที่เติมเลือดแกะ 5% (5% Sheep Blood Agar)

ส่วนประกอบ

Tryptone	15	กรัม
Phytone หรือ soytone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Blood Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 50°C เติม defribrinated sheep blood ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารที่เตรียมไว้ (basal medium) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อ หรืออาจใช้อาหาร Tryptic soy agar เป็น basal medium ก็ได้

Brain Heart Infusion Broth and Agar

ส่วนประกอบ

Medium 1

Calf brain infusion	200	กรัม
Beef heart infusion	250	กรัม
Proteose peptone หรือ Polypeptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Medium 1

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนละลาย แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 7.4 ± 0.2

Medium 2

Brain heart infusion	6	กรัม
Peptic digest of animal tissue	6	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	3	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	14.5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Medium 2

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนโดยต้ม 1 นาทีเพื่อให้ละลายอย่างสมบูรณ์ แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 7.4 ± 0.2

ในการเตรียม Brain Heart Infusion Agar ให้เติมวุ้น 15 กรัมลงใน Brain Heart Infusion Broth ปริมาตร 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ถ้าใช้สำหรับเพาะเลี้ยง *Vibrio* ที่ชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือเท่ากับร้อยละ 2-3

Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) Broth, 2%

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Oxgall	20	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Brilliant Green Lactose Bile Broth

ละลายเปปโตนและแลคโตสในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ละลาย oxgall ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร pH ของสารละลายนี้ควรเป็น 7.0-7.5 ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 975 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เติมสารละลาย brilliant green ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ปริมาตร 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 7.2 ± 0.2

Bromcresol Purple Dextrose Broth

ส่วนประกอบ

Dextrose	10	กรัม
Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bromcresol Purple (ร้อยละ 1.6 ในเอทานอล)	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Bromcresol Purple Dextrose Broth

ละลายส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปิเปตอาหาร 12-15 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2

Buffered Glycerin-Salt Solution

ส่วนประกอบ

Glycerin (reagent grade)	100	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (anhydrous)	12.4	กรัม
KH_2PO_4 (anhydrous)	4	กรัม
NaCl	4.2	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายเกลือ NaCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 900 มิลลิลิตร เติม glycerin, K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที (ถ้าจะเตรียม Buffered Glycerin-Salt Solution ความเข้มข้น 2 เท่า ใช้ glycerin 200 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร)

Buffered *Listeria* Enrichment Broth

ส่วนประกอบ

Media Base

Trypticase soy broth	30	กรัม
yeast extract	6	กรัม
monopotassium phosphate (anhydrous)	1.35	กรัมต่อลิตร
disodium phosphate (anhydrous)	9.6	กรัมต่อลิตร
sodium pyruvate (sodium salt)	1.11	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Media base

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2

Selective supplements

Acriflavin HCl	10	มิลลิกรัมต่อลิตร
Nalidixic acid (sodium salt)	40	มิลลิกรัมต่อลิตร
Cycloheximide	50	มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีเตรียม Selective supplements

เตรียม stock solution ของ acriflavin และ nalidixic acid ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดร้อยละ 0.5 (น้ำหนักโดยปริมาตร)ในน้ำกลั่น และเตรียม stock solution ของ cycloheximide ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร)ในสารละลายเอทานอลในน้ำความเข้มข้นร้อยละ 40 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ทำให้ stock solution เหล่านี้ปลอดเชื้อโดยการกรอง (filter sterilize) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C อย่าให้ acriflavin โดนแสง เติม selective supplement ทั้ง 3 ชนิดลงใน media base ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ปริมาณที่เติม คำนวณให้ได้ความเข้มข้นตามสูตร)

Buffered Peptone Water

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium phosphate, dibasic	3.5	กรัม
Potassium phosphate, monobasic	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Buffered Peptone Water

ละลายส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น คนให้ละลาย ปิเปตอาหารใส่ในภาชนะบรรจุ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2

Butterfield's phosphate-buffered dilution water

ส่วนประกอบ

Stock solution

KH_2PO_4	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ในตู้เย็น

การเตรียมสารละลายสำหรับทำเจือจาง (Dilution banks)

ปิเปต stock solution ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปบรรจุขวด ตามปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Christensen's Urea Agar

ส่วนประกอบของอาหารพื้นฐาน (base)

Peptone	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
Phenol red (6 ml of 1: 500 solution)	0.012	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น (ยกเว้น Urea) ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จะได้อาหารพื้นฐาน (basal medium) สำหรับ halophilic Vibrio spp. เติม NaCl อีก 15 กรัม (จะได้ความเข้มข้นของ NaCl สุดท้ายเป็นร้อยละ 2) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{O}C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 50-55 ^{O}C

สารละลายยูเรียเข้มข้น (Urea concentrate)

ส่วนประกอบ

Urea	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

นำยูเรียไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง เติมลงไปใน basal medium ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากัน pH สุดท้ายเท่ากับ 6.8 $\pm$ 0.1 แบ่งใส่หลอดหรือจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ ถ้าเตรียมเป็น agar slant นำมาเอียงให้มีความยาวของส่วนที่ลาดเอียง (slant) 3 เซ็นติเมตรและมีความลึกของก้นหลอด (butt) 2 เซ็นติเมตร

Cooked Meat Medium (CMM)

ส่วนประกอบ

Beef heart	454	กรัม
Proteose peptone	20	กรัม
Dextrose	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Cooked Meat Medium

ชั่งอาหาร Cooked Meat Medium สำเร็จรูป 12.5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรผสมแล้วทิ้งไว้นาน 15 นาทีเพื่อให้เปียกอย่างทั่วถึง หรือชั่ง 1.25 กรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 × 150 มิลลิ เมตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อให้อาหารเปียกทั้งหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{O}C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.2 ± 0.2 ก่อนใช้นำมาต้มไล่อากาศแล้วทำให้เย็นโดยไม่เขย่า

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

ส่วนประกอบ

Glucose	10	กรัม	Dichloran (0.2% ในเอทานอล)	1	มิลลิลิตร
Peptone	5	กรัม	Rose Bengal (5% ในน้ำ)	0.5	มิลลิลิตร
KH_2PO_4	1	กรัม	วุ้น	15	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Chloramphenical	100	มิลลิกรัม			

วิธีเตรียม Dichloran rose bengal chloramphenicol agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{O}C เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เหมาะสำหรับเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ จากตัวอย่างอาหารสดหรืออาหารที่มีค่า a_w สูง เมื่อเตรียมไว้แล้วยังไม่ใช้ทันที ให้เก็บไว้ในที่มืด เนื่องจากเมื่อสัมผัสกับแสง rose bengal จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดได้สูง โดยเฉพาะยีสต์ สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นเดือนในที่มืด

Dichloran 18% Glycerol Agar

ส่วนประกอบ

Glucose	10	กรัม	Dichloran (0.2% ในเอทานอล)	1	มิลลิลิตร
Peptone	5	กรัม	Chloramphenical	100	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	1	กรัม	วุ้น	15	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Glycerol, AR	220	กรัม			

วิธีเตรียม Dichloran 18% glycerol agar (a_w 0.955)

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ให้เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลายจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงเติมกลีเซอรอล 220 กรัม (ร้อยละ 18 น้ำหนักโดยน้ำหนัก) แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้เลี้ยงเชื้อจากอาหารที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.95 ซึ่งได้แก่จุลินทรีย์ที่ชอบสภาพแห้ง (xerophilic fungi) เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* หลายชนิดและเชื้อ *Xeromyces bisporus* จากอาหารที่มีค่า a_w ต่ำหรืออาหารแห้ง เช่น เมล็ดธัญชาติ ถั่ว แป้ง เครื่องเทศ และอื่นๆ

EC Broth

ส่วนประกอบ

Tryptose หรือ Trypticase	20	กรัม
Bile salts No. 3	1.5	กรัม
Lactose	5	กรัม
K_2HPO_4	4	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม EC Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปิเปตอาหาร 8 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ที่มีหลอดดักแก๊สขนาด 10 × 75 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 6.9 ± 0.2

Glycerin-Salt Solution (Buffered)

ส่วนประกอบ

Glycerin (reagent grade)	100	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (anhydrous)	12.4	กรัม
KH_2PO_4 (anhydrous)	4	กรัม
NaCl	4.2	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Buffered Glycerin-Salt Solution

ละลายเกลือในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 900 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม glycerin, K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ปรับ pH ให้ได้ 7.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับ Buffered Glycerin-Salt Solution ที่เข้มข้น 2 เท่า มี glycerin ร้อยละ 20 ให้ใช้ glycerin 200 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

Hektoen Enteric (HE) Agar

ส่วนประกอบ

Peptone	12	กรัม	NaCl	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม	Sodium thiosulfate	5	กรัม
Bile salts No. 3	9	กรัม	Ferric ammonium citrate	1.5	กรัม
Lactose	12	กรัม	Bromthymol blue	0.065	กรัม
Sucrose	12	กรัม	Acid fuchsin	0.1	กรัม
Salicin	2	กรัม	วุ้น	14	กรัม
			น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Hektoen Enteric (HE) Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย ให้ความร้อนจนเดือด เดือดไม่เกิน 1 นาที อย่าให้ความร้อนมากเกินไป ทิ้งให้เย็นลงจนถึง 50°C เทอาหาร 20 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15×100 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง 2 ชั่วโมง เปิดฝาเล็กน้อย pH สุดท้าย 7.5 ± 0.2 อย่าเก็บไว้นานเกิน 1 วัน

Iron Milk Medium (Modified)

ส่วนประกอบ

น้ำนมพร้อมมันเนย	1	ลิตร
Ferrous sulfate.$7H_2O$	1	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Modified iron milk medium

ละลาย Ferrous sulfate.$7H_2O$ ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมน้ำนมลงไปช้าๆ คนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ปิเปตอาหาร 11 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 °C เป็นเวลา 12 นาที

หมายเหตุ: ควรเตรียมทันทีก่อนใช้

Koser's Citrate Broth

ส่วนประกอบ

$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	1.5	กรัม
KH_2PO_4 (monobasic)	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
Sodium citrate$\cdot 2H_2O$	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Koser's Citrate Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน แบ่งใส่หลอดฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 6.7 ± 0.2

Lactose Broth

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Lactose	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Lactose Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน แบ่งอาหาร 225 มิลลิลิตรใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตรให้ได้ 225 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ pH สุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2

Lactose-Gelatin Medium (**สำหรับ** *Clostridium perfringens*)

ส่วนประกอบ

Tryptose	15	กรัม
yeast extract	10	กรัม
lactose	10	กรัม
phenol red (ร้อยละ 1ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95)	5	มิลลิลิตร
เจลาติน	120	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Lactose-Gelatin Medium

ผสม tryptose, yeast extract และ lactose ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อช่วยให้ละลาย เติมเจลาตินในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตรให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-60°C คนเพื่อให้ละลาย ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ± 0.2 เติม phenol red ผสมให้เข้ากัน ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 × 150 มิลลิเมตรนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 10 นาที ถ้ายังไม่ใช้ภายใน 8 ชั่วโมง ก่อนใช้ต้องนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-70°C เพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

Lauryl Tryptose Broth

ส่วนประกอบ

Tryptose หรือ Trypticase	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
K_2HPO_4	2.75	กรัม
KH_2PO_4	2.75	กรัม
NaCl	5	กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Lauryl Tryptose Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 ×150 มิลลิเมตร ที่มีหลอดดักแก๊สขนาด 10 × 75 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 6.8 ± 0.2

Levine's Eosin Methylene Blue (L-EMB) Agar

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Levine's Eosin Methylene Blue (EMB) Agar

ผสมเปปโตน KH_2PO_4 และวุ้นลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้เท่าปริมาตรเริ่มต้น แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร หรือ 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.1 ± 0.2

ก่อนใช้ นำอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 100 มิลลิลิตร มาหลอม แล้วเติมสารละลายต่อไปนี้ลงไป

1. สารละลาย lactose ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. สารละลาย Eosin Y ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. สารละลาย Methylene blue ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ปริมาตร 4.3 มิลลิลิตร

Lysine Decarboxylase Broth (for *Salmonella*)

ส่วนประกอบ

Gelysate หรือ peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
L-Lysine	5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Lysine Decarboxylase Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนละลาย ปิเปตอาหาร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 × 125 มิลลิเมตร คลายฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที หมุนฝาเกลียวให้แน่นขณะเก็บรักษาและหลังการถ่ายเชื้อ pH สุดท้าย เท่ากับ 6.8 ± 0.2

หมายเหตุ: สำหรับ halophilic *Vibrio* spp. เติมเกลือ NaCl จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 2-3

Lysine Iron Agar (LIA)

ส่วนประกอบ

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
L-lysine hydrochloride	10	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Sodium thiosulfate (anhydrous)	0.04	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม LIA

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนวุ้นละลายปิเปตอาหาร 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13 ×100 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 12 นาที ทั้งให้วุ้นแข็งในตำแหน่งลาดเอียงเพื่อให้มีส่วนของก้นหลอด (butt) 4 ซม. และส่วนของผิวหน้าลาดเอียง 2.5 ซม. pH สุดท้าย 6.7 ± 0.2

Lysine Indole Motility (LIM) Medium

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม	Ferric Amonium Citrate	0.5	กรัม
Pancreatic digest of casein	10	กรัม	Bromcresol purple	0.02	กรัม
Yeast extract	3	กรัม	วุ้น	2	กรัม
L-lysine HCl	10	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Dextrose	1	กรัม			

วิธีเตรียม LIM Medium

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 6.6 ± 0.2

Lysozyme Broth

ส่วนประกอบ

อาหารพื้นฐาน (Base)

เตรียม Nutrient broth 99 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายไลโซไซม์

ละลายไลโซไซม์ 0.1 กรัมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 นอร์มัลที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 65 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 20 นาที เจือจางจนได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 นอร์มัลที่ปลอดเชื้อหรือ อีกวิธีหนึ่งเติมไลโซไซม์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองจุลินทรีย์ผ่านแผ่นกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน

วิธีเตรียม Lysozyme Broth

เติมสารละลายไลโซไซม์ 1 มิลลิลิตร ลงใน Nutrient broth ปริมาตร 99 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปต 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตรที่ปลอดเชื้อ

MacConkey Agar

ส่วนประกอบ

Proteose peptone หรือ Polypeptone	3	กรัม
Peptone หรือ gelysate	17	กรัม
lactose	10	กรัม
Bile salts No. 3 หรือ bile salt mixture	1.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
วุ้น	13.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น คนขณะให้ความร้อนเพื่อละลายส่วนผสม ต้ม 1-2 นาที แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิ 45-50°C เทอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง (อย่าเปิดฝาจาน) pH สุดท้าย เท่ากับ 7.1 ± 0.2

Malonate Broth

ส่วนประกอบ

Yeast extract	1.0	กรัม
$(NH_4)_2(SO)_4$	2	กรัม
K_2HPO_4	0.6	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
NaCl	2	กรัม
Sodium malonate	3	กรัม
Glucose	0.25	กรัม
Bromthymol blue	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Malonate Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ทำให้ละลายโดยใช้ความร้อนถ้าจำเป็น ปิเปตอาหาร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 6.7 ± 0.2

Malt Extract Agar

ส่วนประกอบ

Malt extract	20	กรัม
Peptone	1	กรัม
Glucose	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Malt Extract Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที อย่าใช้เวลาฆ่าเชื้อนานเกินไปเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะอ่อนตัวถ้าให้ความร้อนนานเกินไปหรือให้ความร้อนซ้ำหลายๆครั้ง

Malt Extract Broth

ส่วนประกอบ

Malt extract base	6.0	กรัม
Maltose, technical	1.8	กรัม
Dextrose	6.0	กรัม
Yeast extract	1.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Malt Extract Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ปิเปตอาหาร 12-15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย เท่ากับ 4.7 ± 0.2

Malt Extract Yeast Extract 50% Glucose (MY50G) Agar

ส่วนประกอบ

Malt extract	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose, AR	500	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำกลั่น	500	กรัม

วิธีเตรียม MY50G

เติม malt extract, yeast extract และวุ้นลงในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 500 กรัมด้วยน้ำกลั่น เติมกลูโคสขณะร้อนคนอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันกลูโคสโมโนไฮเดรตเกาะกันเป็นก้อน ถ้าเกาะกันเป็นก้อนนำไปให้ความร้อนสักครู่ ฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำหรือต้มในหม้อน้ำเดือดนาน 30 นาที

อีกวิธีหนึ่ง อาจใช้กลูโคสโมโนไฮเดรตแบบ food grade แทนแบบ analytical gradeได้ โดยใช้กลูโคสแบบ food grade 550 กรัม ในการเตรียมให้ผสมส่วนผสมต่างๆ (ยกเว้นกลูโคส) ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตรให้ความร้อนจนวุ้นละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 450 มิลลิลิตรแล้วจึงเติมกลูโคส 550 กรัมลงไปขณะร้อน คนอย่างรวดเร็ว ฆ่าเชื้อโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที ค่า a_w สุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.89

Malt Extract Yeast Extract 5% Salt 12% Glucose (MY5-12) Agar และ Malt Extract Yeast Extract 10% Salt 12% Glucose (MY10-12) Agar

ส่วนประกอบ

Malt extract	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	50 (100 กรัม สำหรับ MY10-12)	กรัม
Glucose, AR	120	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม MY5-12 (หรือ MY10-12)

ในการเตรียมอาหาร MY5-12 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 10 นาที จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า a_w 0.93 สำหรับอาหาร MY 10-12 ฆ่าเชื้อโดยต้มในน้ำเดือด 30 นาที (ถ้าใช้ความร้อนมากเกินไปอาหารจะไม่แข็ง) จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า a_w 0.88

Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar

ส่วนประกอบ

beef extract	1	กรัม
peptone	10	กรัม
mannitol	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
phenol red (ร้อยละ 1 ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95)	2.5	มิลลิลิตร
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

สารละลาย polymyxin B ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ละลาย polymyxin B sulfate ความเข้มข้น 500,000 ยูนิตในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร กรองด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์ (filter-sterilize) เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

Egg yolk emulsion ความเข้มข้นร้อยละ 50

ล้างไข่สดให้สะอาด แช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นำไข่มาทำให้แตกด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ เอาไข่แดงออกด้วย syringe ปราศจากเชื้อหรือปิเปตปากกว้าง ใส่ลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ เติมสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ลงไปปริมาตรเท่ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

วิธีเตรียม Mannitol-Egg Yolk-Polymysin Agar ที่มี สารละลาย polymyxin B และ egg yolk emulsion

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย ปรับ pH เพื่อให้ได้ pH 7.2 ± 0.2 หลังฆ่าเชื้อ แบ่งอาหาร 225 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 50°C เติมสารละลาย polymyxin B ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติม Egg yolk emulsion ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตรลงในอาหาร MYP ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทอาหาร 18 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15 × 100 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้

Motility Medium (**สำหรับ** *Bacillus cereus*)

ส่วนประกอบ

Trypticase	10	กรัม
yeast extract	2.5	กรัม
dextrose	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
วุ้น	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Motility Medium

ชั่งส่วนผสมทุกชนิดตามสูตร ผสมให้เข้ากันดี ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย จากนั้นแบ่งอาหาร 100 มิลลิลิตรใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ทำให้เย็นถึง 50°C ปิเปตอาหาร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วันก่อนใช้

Motility-Nitrate Medium, buffered (สำหรับ *Clostridium perfringens*)

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
KNO_3	1	กรัม
Na_2HPO_3	2.5	กรัม
galactose	5	กรัม
Glycerine (reagent grade)	5	มิลลิลิตร
วุ้น	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Motility-Nitrate (buffered) Medium

ผสมส่วนผสมทุกชนิดยกเว้นวุ้น ปรับ pH ให้ได้ 7.3 ± 0.1 เติมวุ้น ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปิเปตอาหาร 11 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ถ้ายังไม่ใช้ภายใน 4 ชั่วโมง ก่อนใช้ต้องนำไปต้มไล่อากาศในหม้อน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็นในน้ำเย็น

Motility Test Medium (Semisolid)

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl*	5	กรัม
วุ้น	4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Motility Test Medium

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปิเปตอาหาร 8 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2

หมายเหตุ:

ถ้าใช้สำหรับ halophilic *Vibrio* spp. ให้เติมเกลือ NaCl ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 2-3

ถ้าใช้สำหรับ *Listeria* หมุนฝาเกลียวแต่ละหลอดให้แน่นพันด้วยพาราฟิน เก็บในตู้เย็นได้ถึง 2 สัปดาห์

ถ้าใช้สำหรับ *Salmonella* : บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตรใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 20×150 มิลลิลิตร คลายฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 45°C หมุนฝาเกลียวให้แน่น นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5-8°C เมื่อจะใช้ นำมาหลอมให้วุ้นละลายโดยการต้มในน้ำเดือด ทำให้เย็นถึง 45°C เทลงจานเพาะเชื้อขนาด 15×100 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ปิดฝาจาน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง (ให้ใช้ในวันที่เตรียม) ค่าพีเอชสุดท้าย 7.4 ± 0.2

MR-VP Broth

ส่วนประกอบ

ผงสำเร็จรูป Buffered peptone water (Difco หรือ	7	กรัม
BBL)	5	กรัม
Glucose	5	กรัม
K_2HPO_4	1	ลิตร
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียม MR-VP Broth

ละลายส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปิเปตอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Nitrate Broth

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
KNO_3 (ปราศจากไนไตร์ต)	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Nitrate Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปิเปตอาหาร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×125 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.0 ± 0.2

Nutrient Agar/ Broth

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้น (ไม่เติมวุ้นกรณีที่เตรียม Nutrient Broth)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Nutrient Agar/ Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ในขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 6.8 ± 0.2 ถ้าใช้เป็นอาหารพื้นฐานสำหรับ blood agar ให้เติม NaCl ลงไป 8 กรัมเพื่อป้องกัน hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือด

Oxford medium

ส่วนประกอบ

Columbia blood agar base	39	กรัม
esculin	1	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Lithium chloride	15	กรัม
Cycloheximide	0.4	กรัม
Colistin sulfate	0.02	กรัม
Acriflavin	0.005	กรัม
Cefotetan	0.002	กรัม
Fosfomycin	0.010	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Oxford agar medium

ผสมส่วนผสม 4 ชนิดแรก (คือ basal medium รวม 55.5 กรัม) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนเดือดเพื่อให้ละลายอย่างสมบูรณ์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 50°C แล้วเติม supplement ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันดี เทลงในจานเพาะเชื้อ

ในการเตรียม supplement ทำได้โดยละลาย cycloheximide, colistin sulfate, acriflavin, cefotetan และ fosfomycin ในสารละลายของเอทานอลและน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของเอทานอลและน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1) นำสารละลายของ supplement นี้ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองก่อนใช้

หมายเหตุ: Oxford basal medium และ supplement mixture สำเร็จรูปสามารถหาซื้อได้

PALCAM Listeria Selective Agar

ส่วนประกอบ

Basal medium

Peptone	23	กรัม	Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Starch	1	กรัม	Esculin (aesculin)	0.8	กรัม
NaCl	5	กรัม	Dextrose (glucose)	0.5	กรัม
Columbia agar	13	กรัม	Lithium chloride	15	กรัม
Mannitol	10	กรัม	Phenol red	0.08	กรัม
			น้ำกลั่น	1	ลิตร

Selective agents

Polymyxin B sulfate	10	มิลลิกรัม
Acriflavin	5	มิลลิกรัม
Ceftazidine	20	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	2	มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม PALCAM Listeria Selective Agar</u>

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ชั่งผง basal medium (ที่ผสมส่วนผสมทุกอย่างเข้ากันดีแล้วยกเว้น selective agents 3 ชนิดไม่ต้องเติมลงไป) ปริมาณ 34.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ละลายส่วนผสมของ selective agent ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 17.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง (filter sterilize) เติมสารละลาย selective agent (selective agent supplement solution) นี้ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงใน basal medium ปลอดเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ทิ้งไว้ให้เย็นลงถึง 50°C ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.1

<u>หมายเหตุ</u>: ผง basal medium และ lyophilized supplement mixture สำเร็จรูปสามารถหาซื้อได้

Phenol Red Carbohydrate Broth

(Phenol Red dulcitol Broth, Phenol Red lactose Broth หรือ Phenol Red lactose Broth)

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryticase หรือ Proteose peptone No. 3	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Beef extract (optional)	1	กรัม
phenol red (ร้อยละ 0.25 ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95)	7.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

คาร์โบไฮเดรต*

- ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับชนิดของอาหารที่เตรียมดังนี้:

*ใช้ dulcitol 5 กรัม (กรณีที่เตรียม Phenol Red dulcitol Broth) หรือ ใช้แลคโตส 10 กรัม (กรณีที่เตรียม Phenol Red lactose Broth) หรือ ใช้ซูโครส 10 กรัม (กรณีที่เตรียม Phenol Red Sucrose Broth)

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปีเปตอาหาร 2.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C เป็นเวลา 10 นาที pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2

อีกวิธีหนึ่ง

ผสมส่วนผสมเกือบทุกชนิดในน้ำกลั่น ยกเว้นสารคาร์โบไฮเดรต ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตรให้ความร้อนเป็นครั้งคราว ปีเปตอาหาร 2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตรที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นลง ละลายสารคาร์โบไฮเดรตในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองแบคทีเรีย เติมสารละลายคาร์โบไฮเดรตปลอดเชื้อที่กรองได้ลงไปในอาหารปลอดเชื้อแต่ละหลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าเบาๆเพื่อให้ผสมกัน pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2

หมายเหตุ: สำหรับ halophilic *Vibrio* spp. เติมเกลือ NaCl จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 2-3

Phenol Red Glucose Broth

ส่วนประกอบ

Proteose peptone No. 3	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Beef extract (optional)	1	กรัม
Dextrose	5	กรัม
phenol red (0.25% ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95)	7.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Phenol Red Glucose Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปีเปตอาหาร 2.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C เป็นเวลา 10 นาที pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2

Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7.4

ส่วนประกอบ

NaCl	7.650	กรัม
Na_2HPO_4, anhydrous	0.724	กรัม
KH_2PO_4	0.210	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Phosphate-Buffered Saline (PBS)

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

0.02 M Phosphate Saline Buffer (pH 7.3-7.4)

เตรียม stock solution ของ monosodium phosphate และ disodium phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 8.5 และเจือจาง 1:10 เพื่อเตรียม 0.02 M Phosphate-Buffered Saline

Stock solution 1

Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4, anhydrous, reagent grade)	28.4	กรัม
NaCl (reagent grade)	85.0	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้	1.0	ลิตร

Stock solution 2

Sodium phosphate monobasic monohydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$, monohydrate, reagent grade)	27.6	กรัม
NaCl (reagent grade)	85.0	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้	1.0	ลิตร

วิธีเตรียม Phosphate Saline Buffer

นำ Stock solution 1 และ Stock solution 2 แต่ละชนิดมาเจือจาง 1:10 ตัวอย่างเช่น

Stock solution 1	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร
(pH ประมาณ 8.2)		
Stock solution 2	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร
(pH ประมาณ 5.6)		

จากนั้นใช้ pH meter ช่วยในการปรับ pH ของ solution 1 ที่เจือจางแล้วให้ได้ pH 7.3-7.4 โดยเติม solution 2 ที่เจือจางแล้วปริมาตร 65 จะได้ Phosphate Saline Buffer ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ซึ่งใช้ในการทดสอบความไวต่อไลโซสตาฟรินของ *S. aureus*

Plate Count Agar (PCA) หรือ Standard Method Agar

ส่วนประกอบ

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Plate Count Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.0 ± 0.2

Potato Dextrose Agar

ส่วนประกอบ

Potato infusion	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Potato Dextrose Agar

เตรียม potato infusion โดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ ไม่ต้องปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัมใส่ในภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตรนำไปต้ม 30 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง น้ำมันฝรั่งที่กรองได้คือ potato infusion เติมวุ้นและ dextrose ลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 5.6 ± 0.2

Potassium Cyanide (KCN) broth

ส่วนประกอบ

*Potassium cyanide (KCN)	0.5	กรัม
Proteose peptone No. 3 หรือ polypeptone	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
KH_2PO_4	0.225	กรัม
Na_2HPO_4	5.64	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม KCN broth

ชั่งส่วนผสม แล้วละลายในน้ำกลั่น ยกเว้น potassium cyanide นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5-8°C pH สุดท้าย 7.6 ± 0.2

เตรียม KCN stock solution โดยละลาย KCN 0.5 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิ 5-8°C (ควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน)

ใช้ลูกยางหรือ bulb pipette (ห้ามใช้ปากดูดเป็นอันขาดและควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน) ปิเปตสารละลาย KCN stock solution ที่เย็นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่เย็นและปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้ว ปิเปตอาหารนี้ 1.0-1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใช้หลอดที่ปิดด้วยจุกคอร์กเบอร์ 2 จุ่มจุกคอร์ก ลงในพาราฟิน แล้วนำไปปิดฝาหลอด (อย่าให้พาราฟินไหลลงไปในหลอด) เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิ 5-8°C ไม่เกิน 2 สัปดาห์ก่อนใช้

ข้อควรระวัง: KCN มีพิษ ห้ามใช้ปากดูดเป็นอันขาดและควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน

Potato Dextrose Agar, Acidified

วิธีเตรียม Acidified Potato Dextrose Agar

เตรียมอาหาร PDA นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เติมกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.85 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 48°C เขย่าเบาๆ เพื่อให้กรดผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จะทำให้ค่า pH ของ PDA ลดลงถึง 3.5

Purple carbohydrate fermentation broth base **ที่เติมสารคาร์โบไฮเดรตร้อยละ** 0.5

ส่วนประกอบ

Proteose peptone No. 3	10	กรัม
Beef extract	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
สารคาร์โบไฮเดรต (เช่น dextrose, esculin, maltose, mannitol, rhamnose และ xylose ชนิดใดชนิดหนึ่ง)	5	กรัม

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น บรรจุลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C เป็นเวลา 10 นาที pH สุดท้าย 6.8 ± 0.2

Rappaport-Vassiliadis Medium

อาหารเหลวพื้นฐาน

Tryptone	5	กรัม
NaCl	8	กรัม
KH_2PO_4	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สารละลาย Magnesium chloride

$MgCl_2.6H_2O$	400	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่ง $MgCl_2.6H_2O$ จากขวดที่เพิ่งเปิดใหม่เพราะ $MgCl_2.6H_2O$ ดูดความชื้นได้ดีมาก ละลายในน้ำกลั่น แล้วเก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 1 ปี

สารละลาย Malachite green oxalate

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ควรใช้ malachite green oxalate ของบริษัท Merck เพราะถ้าใช้ของบริษัทอื่นอาจมีประสิทธิภาพไม่เท่ากัน เก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

วิธีเตรียม Rappaport-Vassiliadis Medium

ผสมอาหารเหลวพื้นฐาน 1,000 มิลลิลิตร สารละลาย Magnesium chloride 100 มิลลิลิตร และสารละลาย Malachite green oxalate 10 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,110 มิลลิลิตร (ควรเตรียมอาหารเหลวพื้นฐานในวันที่จะผสมสารละลายทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน) ปิเปตอาหาร 10 มิลลิ ลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 °C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 5.5 ± 0.2 เก็บไว้ในตู้เย็น ใช้ภายใน 1 เดือน

Rose Bengal Chloramphenicol Agar

ส่วนประกอบ

Glucose	10	กรัม	Rose Bengal	50	มิลลิกรัม
Peptone	5	กรัม	Chloramphenical	100	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	1	กรัม	วุ้น	15	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Rose bengal chloramphenicol agar

ผสมส่วนผสมทุกอย่างเข้าด้วยกันแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บในที่มืด

Selenite Cystine Broth

ส่วนประกอบ

Medium 1 (modification of Leifson's formulation for selenite broth)

Tryptone หรือ Polypeptone	5	กรัม
Lactose	4	กรัม
Sodium acid selenite ($NaHSeO_3$)	4	กรัม
Na_2HPO_4	10	กรัม
L-Cystine	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Medium 1

ผสมส่วนผสมทุกอย่างเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อให้ส่วนผสมละลาย ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที อย่านำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ pH สุดท้าย 7.0 ± 0.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่เตรียม

Medium 2 (North-Bartram modification)

Polypeptone	5	กรัม
Lactose	4	กรัม
Sodium acid selenite ($NaHSeO_3$)	4	กรัม
Na_2HPO_4	5.5	กรัม
KH_2PO_4	4.5	กรัม
L-Cystine	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Medium 2

ผสมส่วนผสมทุกอย่างเข้าด้วยกัน คนขณะความร้อนจนส่วนผสมละลาย ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที อย่านำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่เตรียม

Spray's Fermentation Medium (**สำหรับ** *Clostridium perfringens*)

ส่วนประกอบ

Tryptone	10	กรัม
Neopeptone	10	กรัม
Sodium thioglycollate	0.25	กรัม
วุ้น	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Spray's Fermentation Medium

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ยกเว้นวุ้น นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.4 ± 0.2 เติมวุ้นลงไปให้ความร้อนจนกระทั่งวุ้นละลาย ปิเปตอาหาร 9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 125 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้ต้องนำไปต้มไล่อากาศในหม้อน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็นในน้ำเย็น เติมสารคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร 9 มิลลิลิตร

Sporulation Broth (**สำหรับ** *Clostridium perfringens*)

ส่วนประกอบ

Polypeptone	15	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Soluble starch	3	กรัม
$MgSO_4$ (anhydrous)	0.1	กรัม
Sodium thioglycollate	1	กรัม
Na_2HPO_4	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Sporulation Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 7.8 ± 0.1 ปิเปตอาหาร 15 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20×150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Tetrathionate Broth

ส่วนประกอบ

Polypeptone	5	กรัม
Bile salts	1	กรัม
Calcium carbonate	10	กรัม
Sodium thiosulfate.$5H_2O$	30	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tetrathionate Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดลงในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนเดือด อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (สิ่งที่ตกตะกอนจะไม่ละลายอย่างสมบูรณ์) เก็บที่อุณหภูมิ 5-8°C pH สุดท้ายเท่ากับ 8.4 ± 0.2

Thioglycollate Medium

ส่วนประกอบ

L-Cystine	0.5	กรัม	sodium thioglycollate	0.5	กรัม
NaCl	2.5	กรัม	(หรือ thioglycollic acid)		
dextrose	5	กรัม	สารละลาย resazurin (1:1000)	1	มิลลิลิตร
yeast extract	5	กรัม	วุ้น	0.75	กรัม
tryptone	15	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Thioglycollate Medium

เติม L-cystine, NaCl, dextrose, yeast extract และ tryptone ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนเพื่อให้ละลาย จากนั้นเติม sodium thioglycollate หรือ thioglycollic acid ลงไป ปรับ pH เพื่อให้ได้ pH หลังฆ่าเชื้อเป็น 7.1 ± 0.2 เติมสารละลาย resazurin ผสมให้เข้ากัน ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar

ส่วนประกอบ

Yeast extract	5	กรัม	NaCl	10	กรัม
Peptone	10	กรัม	Ferric citrate	1	กรัม
sucrose	20	กรัม	Bromthymol blue	0.04	กรัม
Sodium thiosulfate $5H_2O$	10	กรัม	Thymol blue	0.04	กรัม
Sodium citrate 2 H_2O	10	กรัม	วุ้น	15	กรัม
Sodium cholate	3	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Oxgall	5	กรัม			

วิธีเตรียม Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar

เตรียมในฟลาสก์ปริมาตรอย่างน้อย 3 เท่าของปริมาตรที่ต้องการใช้ เติมส่วนผสมลงในน้ำกลั่นที่อุ่น ให้ความร้อนจนละลาย ต้มจนเดือดแล้วยกลงทันที อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เย็นถึง 50°C เทลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

Toluidine Blue-DNA Agar

ส่วนประกอบ

Deoxyribonucleic acid (DNA)	0.3	กรัม
$CaCl_2$ (anhydrous)	1.1	กรัม
NaCl	10	กรัม
Toluidine blue O	0.083	กรัม
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6.1	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Toluidine Blue-DNA Agar

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9.0 เติมส่วนผสมที่เหลือยกเว้น toluidine blue O ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลายส่วนผสม จากนั้นจึงเติม toluidine blue O ลงไป เทใส่ฟลาสก์ ไม่จำเป็นต้องสเตอริไลซ์ถ้าใช้ทันที แต่ถ้านำไปสเตอริไลซ์จะสามารถเก็บอาหารได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 เดือน

Triple Sugar Iron (TSI) Agar

ส่วนประกอบ

Medium 1

Polypeptone	20	กรัม	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	5	กรัม	$Na_2S_2O_3$	0.2	กรัม
Lactose	10	กรัม	Phenol red	0.025	กรัม
Sucrose	10	กรัม	วุ้น	13	กรัม
Glucose	1	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

Medium 2

Beef extract	3	กรัม	$FeSO_4$	0.2	กรัม
Yeast extract	3	กรัม	NaCl	5	กรัม
Peptone	15	กรัม	$Na_2S_2O_3$	0.3	กรัม
Proteose peptone	5	กรัม	Phenol red	0.024	กรัม
Glucose	1	กรัม	วุ้น	12	กรัม
Lactose	10	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Sucrose	10	กรัม			

วิธีเตรียม Triple Sugar Iron (TSI) Agar

อาจใช้สูตรของ medium 1 หรือ medium 2 ในการเตรียมก็ได้

ผสมส่วนผสมของ medium 1 ลงในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนเป็นครั้งคราว ต้มนาน 1 นาที เพื่อละลายส่วนผสม เติมลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตรประมาณ 1/3 ของปริมาตรหลอด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2

สำหรับ medium 2 เตรียมทำนองเดียวกับ medium 1 แต่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2 ก่อนอาหารแข็งตัว นำหลอดมาเอียงให้มีความยาวของส่วน slant 4-5 เซนติ เมตร และส่วนของ butt ยาว 2-3 เซนติเมตร

Trypticase (Tryptic) Soy Agar

ส่วนประกอบ

Trypticase peptone	15	กรัม
Phytone peptone	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Trypticase (Tryptic) Soy Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนและคนจนวุ้นละลาย ต้ม 1 นาที แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2 (หมายเหตุ: ถ้าใช้กับ *Vibrio* spp. ซึ่งชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 2-3)

Trypticase Soy Agar with 0.6% Yeast Extract (TSAYE)

ส่วนประกอบ

Trypticase soy agar	40	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม TSAYE

ชั่งส่วนผสม เติมน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนและคนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2

Trypticase Soy-Polymyxin Broth

วิธีเตรียม Trypticase Soy-Polymyxin Agar

เตรียมอาหารเหลว Trypticase Soy Broth (TSB) ตามสูตรข้างต้น ปิเปตอาหาร 15 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย polymyxin B ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดอาหาร TSB

วิธีเตรียมสารละลาย polymyxin B ความเข้มข้นร้อยละ 0.15

ละลาย polymyxin B sulfate ความเข้มข้น 500,000 ยูนิตลงในน้ำกลั่น 33 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ (filter-sterilize) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

Trypticase Soy-Sheep Blood Agar

วิธีเตรียม Trypticase Soy-Sheep Blood Agar

เตรียมอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 50°C เติม defibrinated sheep blood ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปในอาหาร TSA 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทอาหาร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15 × 100 มิลลิเมตร (สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปได้)

Tryptone (Tryptophane) Broth, 1%

ส่วนประกอบ

Tryptone หรือ trypticase	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tryptone Broth และ Tryptone Salt Broth

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปิเปตอาหาร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 125 หรือ 16 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 6.9 ± 0.2

Tryptone Broth (T_1N_0) และ Tryptone Salt Broth (T_1N_1, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8, T_1N_{10})

ส่วนประกอบ

Tryptone	10	กรัม
NaCl	0, 10, 30, 60, 80 หรือ 100	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tryptone Broth และ Tryptone Salt Broth

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น สำหรับอาหาร T_1N_0 ไม่เติม NaCl ส่วนอาหาร T_1N_1, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 และ T_1N_{10} เติมเกลือ 10, 30, 60, 80 และ 100 กรัมซึ่งเท่ากับความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 1, 3, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 × 125 มิลลิเมตร ปิดฝาให้แน่นเพื่อรักษาความเข้มข้นของเกลือให้คงที่ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2

Tryptone Yeast Extract Agar

ส่วนประกอบ

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
*Carbohydrate	10	กรัม
Bromcresol purple	0.04	กรัม
วุ้น	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tryptone Yeast Extract Agar

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ± 0.2 เทใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 125 มิลลิเมตร ประมาณ 2/3 ของปริมาตรหลอด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°C เป็นเวลา 20 นาที

(หมายเหตุ: *Glucose และ mannitol เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ใช้สำหรับการจำแนกชนิด *Staphylococcus aureus*)

Tryptose-Sulfite-Cycloserine (TSC) Agar

ส่วนประกอบ

Tryptose	15	กรัม
yeast extract	5	กรัม
soytone	5	กรัม
ferric ammonium citrate	1	กรัม
sodium metabisulfite	1	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

สารละลาย D-cycloserine

ละลาย D-cycloserine 1 กรัม (ผลึกสีขาว จากบริษัท Sigma Chemical) ในน้ำกลั่น 200 มิลลิ ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองจุลินทรีย์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

Egg yolk emulsion ความเข้มข้นร้อยละ 50

สร้างไข่สดให้สะอาด แช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นำไข่มาทำให้แตกด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ เอาไข่แดงออกด้วย syringe ปราศจากเชื้อหรือปิเปตปากกว้าง ใส่ลงในบีกเกอร์ปลอด

เชื้อ เติมสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ลงไปปริมาตรเท่ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

วิธีเตรียม Tryptose-Sulfite-Cycloserine Agar

เติมสารละลาย D-cycloserine ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TSC ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม Egg yolk emulsion ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เท อาหาร 18 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15×100 มิลลิเมตร คลุมจานอาหารด้วยผ้า ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง 1 คืนก่อนใช้

Tyrosine Agar

ส่วนประกอบพื้นฐาน

เตรียม Nutrient Agar (NA) แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นถึง 48°C

Tyrosine suspension

ชั่งแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) 0.5 กรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 20×150 มิลลิเมตรที่มีน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 12°C เป็นเวลา 15 นาที

วิธีเตรียม Tyrosine Agar

ผสม NA 100 มิลลิลิตร กับ Tyrosine suspension ที่เตรียมไว้ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับขวด 2-3 ครั้ง ปิเปตอาหาร 3.5 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในหลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิ เมตร โดยแกว่งขวดเพื่อผสมบ่อยๆ เอียงหลอดเพื่อให้ได้ผิวหน้าลาดเอียง (slant) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการแยกตัวของไทโรซีน

Violet Red Bile (VRB) Agar

ส่วนประกอบ

Yeast Extract	3	กรัม	Neutral red	0.03	กรัม
Peptone	7	กรัม	Crystal violet	0.002	กรัม
NaCl	5	กรัม	วุ้น	15	กรัม
Bile salts	1.5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Lactose	10	กรัม			

วิธีเตรียม Violet Red Bile (VRB) Agar

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ± 0.2 คนขณะให้ความร้อน ต้มให้เดือดเป็นเวลา 2 นาที อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

Universal Preenrichment Broth

ส่วนประกอบ

Tryptone	5	กรัม	Dextrose	0.5	กรัม
Proteose peptone	5	กรัม	$MgSO_4$	0.25	กรัม
KH_2PO_4	15	กรัม	Ferric Ammonium Citrate	0.1	กรัม
Na_2HPO_4	7	กรัม	Sodium pyruvate	0.2	กรัม
NaCl	5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Universal Preenrichment Broth

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ให้ความร้อน คนให้ส่วนผสมละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 6.3 ± 0.2

Urea Broth

ส่วนประกอบ

Urea	20	กรัม
yeast extract	0.1	กรัม
Na_2HPO_4	9.5	กรัม
K_2HPO_4	9.1	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Urea Broth

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น อย่านำไปให้ความร้อน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรอง (membrane) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูบนแผ่นกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ปิเปตอาหาร 1.5-3.0 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร pH สุดท้ายเท่ากับ 6.8 ± 0.2

Urea Broth (Rapid)

ส่วนประกอบ

Urea	20	กรัม
yeast extract	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.091	กรัม
Na_2HPO_4	0.095	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Urea Broth (Rapid)

การเตรียม urea broth (rapid) ทำเหมือนกับการเตรียม urea broth ทุกประการ

Voges-Proskauer Medium (Modified)

ส่วนประกอบ

Proteose peptone	7	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Modified Voges-Proskauer Medium

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ถ้าจำเป็น ปิเปตอาหาร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 × 150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 10 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 6.5 ± 0.2

Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

ส่วนประกอบ

Yeast extract	3	กรัม	Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
L-lysine	5	กรัม	Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Xylose	3.75	กรัม	NaCl	5	กรัม
Lactose	7.5	กรัม	Phenol red	0.08	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม	วุ้น	15	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย ให้ความร้อนจนเดือดแล้วยกลง อย่าให้ความร้อนมากเกินไป ทิ้งให้เย็นลงจนถึง 50°C เทลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง 2 ชั่วโมง เปิดฝาเล็กน้อยจากนั้นจึงปิดฝา pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2 อย่าเก็บไว้นานเกิน

ภาคผนวก ค
สารเคมีที่ใช้ทดสอบ (reagent)

Basic Fuchsin Staining Solution

ส่วนประกอบ

สีย้อม basic fuchsin	0.5	กรัม
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	20	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Basic Fuchsin Staining Solution

ละลายสีย้อม basic fuchsin 0.5 กรัมในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เจือจางจนได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง whatman No. 31 เพื่อขจัดสีที่ไม่ละลาย (หรืออาจใช้ TB staining solution จากบริษัท Difco)

Brilliant Green Dye Solution, 1%

ส่วนประกอบ

Brilliant green dye	1	กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	10	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Brilliant Green Dye Solution, 1%

ละลายสีย้อม 1 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร เจือจางจนได้ 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้ทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เชื้อที่ทราบว่าจะให้ผลบวก และเชื้อที่ทราบว่าจะให้ผลลบ

Bromcresol Purple Dye Solution, 0.2%

ส่วนประกอบ

Bromcresol purple dye	0.2	กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Bromcresol Purple Dye Solution, 0.2%

ละลายสีย้อม 0.2 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางจนได้ 100 มิลลิลิตร

Ethanol solution, 70%

ส่วนประกอบ

เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	700	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้	950	มิลลิลิตร

Gram Staining Solution

1. Hucker's crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (ความเข้มข้นของสีย้อมร้อยละ 90)	2	กรัม
Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95	20	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกัน กรองผ่านกระดาษกรองหยาบ

2. Gram's iodine

ส่วนประกอบ

Iodine	1	กรัม
Potassium iodide (KI)	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Gram's iodine

ใส่ KI ลงในครก เติม iodine บดให้ละเอียดเป็นเวลา 5-10 วินาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร บดต่อ แล้วเติมอีก 5 มิลลิลิตรบดต่อ เติมอีก 10 มิลลิลิตรบดต่อไป เทสารละลายนี้ใส่ขวด ใช้น้ำกลั่นล้างครกเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 300 มิลลิลิตร

3. Hucker's counterstain (stock solution)

ส่วนประกอบ

Safranin O (certified)	2.5	กรัม
Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมสารละลายที่จะใช้งาน

เติม stock solution 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ส่วนประกอบ

HCl (เข้มข้น)	89	มิลลิลิตร

เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1 ลิตร

Kovacs' Reagent

ส่วนประกอบ

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Amyl alcohol (normal)	75	มิลลิลิตร
HCl (เข้มข้น)	25	กรัม

วิธีเตรียม Kovac's Reagent

ละลาย *p*-dimethylaminobenzaldehyde 5 กรัมในเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก (เข้มข้น) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้าๆ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

Methylene Blue Stain (Loeffler's)

สารละลาย A

ส่วนประกอบ

Methylene blue (90% dye content)	0.3	กรัม
Ethanol	30	มิลลิลิตร

สารละลาย B

ส่วนประกอบ

Diluted potassium hydroxide (0.01%	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมสารละลาย A เข้ากับสารละลาย B

Mounting Fluids for Fungi

การเตรียมสไลด์ครั้งแรก ควรใช้น้ำเพราะจะเห็นรูปร่าง ขนาด และสีของเชื้อราตามธรรมชาติมากที่สุด (ไม่มีการหดตัว) สำหรับ Zygomycetes, Coelomycetes และยีสต์ ควรเตรียมสไลด์ด้วยน้ำหรือ Shear's mounting fluid แต่ถ้าเชื้อราสร้างโคนิเดียแห้งจำนวนมาก (เช่น *Penicillium*) ควรเติมเอทานอลลงบนสไลด์ด้วย เพราะการใช้น้ำจะทำให้แห้งเร็ว สำหรับพวก Deuteromycetes และ Ascomycetes สามารถใช้กรดแลคติกที่มีหรือไม่มีสีย้อม (cotton blue หรือ aniline blue) นอกจากนี้การหยดแอลกอฮอล์เล็กน้อยลงไปบนสไลด์ หรือลนสไลด์ผ่านเปลวไฟเล็กน้อยอาจช่วยลดการติดกันที่มากเกินไปของสปอร์หรือช่วยขจัดฟองอากาศบนสไลด์

1. สารละลายกรดแลคติกผสม cotton blue หรือ aniline blue

ส่วนประกอบ

cotton blue หรือ aniline blue	1	กรัม
DL-lactic acid ความเข้มข้นร้อยละ 85	1	ลิตร

2. Shear's mounting fluid

ส่วนประกอบ

potassium acetate	3	กรัม
glycerin	60	มิลลิลิตร
สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	90	กรัม
น้ำกลั่น	150	มิลลิลิตร

Nitrite Detection Reagents

ส่วนประกอบ

Reagent A: Sulfanilic acid reagent

Sulfanilic acid	1	กรัม
สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น 5 นอร์มัล	125	มิลลิลิตร

Reagent B: N-(l-naphthyl) ethylenediamine reagent

N-(l-naphthyl)ethylenediamine	0.25	กรัม
dihydrochloride	200	มิลลิลิตร
สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น	5	นอร์มัล

Reagent C: α-Naphthol reagent

α-Naphthol	1	กรัม
สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น 5 นอร์มัล	200	มิลลิลิตร

(สารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น 5 นอร์มัล เตรียมได้โดยเติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น 71.25 มิลลิลิตร)

ควรเก็บ reagent ไว้ในขวดสีชาซึ่งมีจุกที่ใช้ดูดสาร ในการทดสอบ เติม reagent แต่ละชนิด (reagent A, B หรือ C) ปริมาตร 0.1-0.5 มิลลิลิตร (ตามคำแนะนำในวิธีการทดสอบ) ลงในหลอดเชื้อที่บ่มแล้ว การเกิดสีม่วงแดงหลังการทดสอบด้วย reagent A และ reagent B หรือ การเกิดสีส้มหลังการทดสอบด้วย reagent A และ reagent C ชี้ให้เห็นว่าไนเตรตได้ถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์ ถ้าไม่เกิดสีการทดสอบการมีไนเตรต ทำได้โดยเติมผงซิงค์ (zinc) ลงไปเล็กน้อย ถ้าเกิดสีขึ้นแสดงว่าไนเตรตไม่ถูกรีดิวซ์

Methyl Red Indicator

ส่วนประกอบ

Methyl red	0.1	กรัม
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	300	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

ละลาย methyl red ในเอทานอล 300 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

Oxidase reagent

ส่วนประกอบ

N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine·2HCl	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: สารนี้ควรเตรียมใหม่ๆ แต่ reagent ที่เตรียมแล้วสามารถเก็บไว้ได้ 7 วันถ้าหากเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วนำไปแช่เย็น

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ส่วนประกอบ

NaOH	40	กรัม

น้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร

ใช้ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Voges-Proskauer (VP) Test Reagents

สารละลาย 1

α-Naphthol	5	กรัม
Alcohol (absolute)	100	มิลลิลิตร

สารละลาย 2

Potassium hydroxide	40	กรัม
น้ำกลั่น ใช้ปรับปริมาตรให้ได้	100	มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ Voges-Proskauer (VP test)

ถ่ายเชื้อที่ผ่านการบ่มมาแล้ว 48 ชั่วโมง ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 1 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรและสารละลาย 2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าหลอด เพื่อที่จะเร่งปฏิกิริยาทำได้โดยการเติมผลึกครีเอตินลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงจึงอ่านผล

ภาคผนวก ง
การเตรียม McFarland Standard

McFarland Standard เบอร์ 1-10 ใช้สำหรับเปรียบทียบความขุ่นกับความขุ่นของของสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียและยีสต์เพื่อใช้ประมาณความหนาแน่นของเซลล์หรือจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร การเตรียม McFarland Standard เบอร์ 1-10 ทำได้ดังนี้

1. เตรียมหลอดทดลองที่ทำด้วยแก้วใสทนสารเคมีและมีฝาปิดสนิทจำนวน 10 หลอดที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ อาจเป็นหลอดฝาเกลียวหรือหลอดที่มีจุกยางอุด ล้างให้สะอาด อบให้แห้ง เขียนหมายเลข 1-10 กำกับที่หลอด

2. เตรียมสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% sulfuric acid aqueous solution) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรและเตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% barium chloride aqueous solution) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. ในหลอดทดลอดแต่ละหมายเลข ปิเปตสารละลายทั้งสองชนิดลงในหลอดทดลอดแต่ละหมายเลข (โดยใช้ micropipette) ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (ตามตารางข้างล่างนี้) ผสมให้เข้ากันดีแล้วปิดฝาให้แน่นสนิท

หมายเลขของ McFarland Standard	1% sulfuric acid aqueous solution (ml)	1% barium chloride aqueous solution (ml)
1	9.9	0.1
2	9.8	0.2
3	9.7	0.3
4	9.6	0.4
5	9.5	0.5
6	9.4	0.6
7	9.3	0.7
8	9.2	0.8
9	9.1	0.9
10	9.0	1.0

ภาคผนวก จ
วิธีการย้อมแกรมและย้อมสปอร์

การย้อมแกรม

วิธีทำ

1. สเมียร์เชื้อเป็นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์ ทิ้งให้แห้งในอากาศ ตรึงเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
2. หยด crytal violet-ammonium oxalate ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
3. เปิดก๊อกน้ำให้ไหลเบา ๆ ล้างรอยสเมียร์ด้วยน้ำนาน 5 วินาที
4. ล้างรอยสเมียร์ด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram's iodine) เทส่วนเกินทิ้งไป แล้วเทน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์อีกครั้ง ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
5. ล้างด้วยน้ำอีกครั้งเช่นเดียวกับข้อ 3
6. หยดสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อชะล้างสีบนรอยสเมียร์
7. ล้างด้วยน้ำอีกครั้งเช่นเดียวกับข้อ 3
8. หยด safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
9. ล้างด้วยน้ำอีกครั้งเช่นเดียวกับข้อ 3
10. ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

การย้อมสปอร์

วิธีทำ

1. สเมียร์เชื้อเป็นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์ ทิ้งให้แห้งในอากาศ ตรึงเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
2. หยดสี malachite green ให้ท่วมรอยสเมียร์ วางบนที่วางสไลด์สำหรับย้อมสี
3. ยกที่วางสไลด์ซึ่งมีสไลด์วางพาดอยู่ นำไปวางบนหม้อน้ำเดือดนาน 5 นาที เติมสีเพิ่มถ้าสีแห้ง
4. เปิดก๊อกน้ำให้ไหลเบา ๆ ล้างรอยสเมียร์ด้วยน้ำเป็นเวลา 5 วินาที
5. หยดสี safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์
6. ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ภาคผนวก ฉ

ตาราง MPN

ตารางที่ 1 ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่างและค่า Confidence intervals ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้อาหารเหลว 3 หลอด ที่แต่ละระดับความเจือจางซึ่งมีปริมาณ ตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g	Confidence limit		จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g	Confidence limit	
0.10	0.01	0.001		ต่ำ	สูง	0.10	0.01	0.001		ต่ำ	สูง
0	0	0	<3.0	- -	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	- -

ตารางที่ 2 ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่างและค่า Confidence intervals ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้อาหารเหลว 5 หลอด ที่แต่ละระดับความเจือจางซึ่งมีปริมาณตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g	Confidence limit		จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g	Confidence limit	
0.10	0.01	0.001		ต่ำ	สูง	0.10	0.01	0.001		ต่ำ	สูง
0	0	0	<1.8	- -	6.8	2	2	0	9.3	3.4	22
0	0	1	1.8	0.09	6.8	2	2	1	12	4.1	26
0	1	0	1.8	0.09	6.9	2	2	2	14	5.9	36
0	1	1	3.6	0.7	10	2	3	0	12	4.1	26
0	2	0	3.7	0.7	10	2	3	1	14	5.9	36
0	2	1	5.5	1.8	15	2	4	0	15	5.9	36
0	3	0	5.6	1.8	15	3	0	0	7.8	2.1	22
1	0	0	2	0.1	10	3	0	1	11	3.5	23
1	0	1	4	0.7	10	3	0	2	13	5.6	35
1	0	2	6	1.8	15	3	1	0	11	3.5	26
1	1	0	4	0.7	12	3	1	1	14	5.6	36
1	1	1	6.1	1.8	15	3	1	2	17	6	36
1	1	2	8.1	3.4	22	3	2	0	14	5.7	36
1	2	0	6.1	1.8	15	3	2	1	17	6.8	40
1	2	1	8.2	3.4	22	3	2	2	20	6.8	40
1	3	0	8.3	3.4	22	3	3	0	17	6.8	40
1	3	1	10	3.5	22	3	3	1	21	6.8	40
1	4	0	11	3.5	22	3	3	2	24	9.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	3	4	0	21	6.8	40
2	0	1	6.8	1.8	15	3	4	1	24	9.8	70
2	0	2	9.1	3.4	22	3	5	0	25	9.8	70
2	1	0	6.8	1.8	17	4	0	0	13	4.1	35
2	1	1	9.2	3.4	22	4	0	1	17	5.9	36
2	1	2	12	4.1	26	4	0	2	21	6.8	40

ตารางที่ 2 ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่างและค่า Confidence intervals ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้อาหารเหลว 5 หลอดที่แต่ละระดับความเจือจางซึ่งมีปริมาณตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม (ต่อ)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g	Confidence limit		จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g	Confidence limit	
0.10	0.01	0.001		ต่ำ	สูง	0.10	0.01	0.001		ต่ำ	สูง
4	0	3	25	9.8	70	5	1	3	84	34	220
4	1	0	17	6	40	5	2	0	49	15	150
4	1	1	21	6.8	42	5	2	1	70	22	170
4	1	2	26	9.8	70	5	2	2	94	34	230
4	1	3	31	10	70	5	2	3	120	36	250
4	2	0	22	6.8	50	5	2	4	150	58	400
4	2	1	26	9.8	70	5	3	0	79	22	220
4	2	2	32	10	70	5	3	1	110	34	250
4	2	3	38	14	100	5	3	2	140	52	400
4	3	0	27	9.9	70	5	3	3	180	70	400
4	3	1	33	10	70	5	3	4	210	70	400
4	3	2	39	14	100	5	4	0	130	36	400
4	4	0	34	14	100	5	4	1	170	58	400
4	4	1	40	14	100	5	4	2	220	70	440
4	4	2	47	15	120	5	4	3	280	100	710
4	5	0	41	14	100	5	4	4	350	100	710
4	5	1	48	15	120	5	4	5	430	150	1,100
5	0	0	23	6.8	70	5	5	0	240	70	710
5	0	1	31	10	70	5	5	1	350	100	1100
5	0	2	43	14	100	5	5	2	540	150	1700
5	0	3	58	22	150	5	5	3	920	220	2600
5	1	0	33	10	100	5	5	4	1600	400	4600
5	1	1	46	14	120	5	5	5	>1600	700	--

ที่มา: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm