

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* จากอาหารทะเล
และการศึกษาการยับยั้งการเจริญด้วยความร้อน

นางสาวนวรรณ์ โทธีราช
นางสาวประทุม แสนมา

ฉพ.
๒๑๑๑ก
๒๕๕๑

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน ๗๒๕๗๗
วัน,เดือน,ปี ๒๐ ส.ย. ๒๕๕๐

b. 11769502
i.....

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา ๒๕๔๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood
and thermal inactivation study**



**Miss. Nawarat Potiraj
Miss. Pratoom Sanma**

**Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Bachelor of Science Department of Applied
Biology Programme of Industrial Microbiology Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2006**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การแยกเชื้อ และจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* จากอาหารทะเล
และการศึกษาการยับยั้งการเจริญด้วยความร้อน
(Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood
and thermal inactivation study)

นักศึกษา นางสาววรัตน์ โพธิราช รหัส 46050465
นางสาวประทุม แสนมา รหัส 46050469
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ธรรมนอง	นวลพรรณ ธรรมนอง
กรรมการ ผศ.ลินจง สุขดำรง	ลินจง สุขดำรง
กรรมการ ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ	สุรีย์ นานาสมบัติ

นวลพรรณ ธรรมนอง
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
หัวหน้าภาควิชา

อธิการบดีของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ	การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> จากอาหารทะเล และการศึกษาการยับยั้งการเจริญด้วยความร้อน
นักศึกษา	นางสาวนวรรณ์ โพธิราช รหัส 46050465 นางสาวประทุม แสนมา รหัส 46050469
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ได้แก่ กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่ ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายใน กรุงเทพมหานคร ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่พบในอาหารทะเลทั้งหมดอยู่ในช่วง 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPN ต่อกรัม โดยตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้จากตัวอย่างอาหารทะเลร้อยละ 80 ของตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ จากนั้นได้แยกเชื้อจาก 14 โคลนที่คาดว่าจะ เป็น *V. parahaemolyticus* เพื่อนำมาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 14 ไอโซเลต คือเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยเชื้อที่แยกได้จาก กุ้ง (ไอโซเลต SH1) มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับคุณสมบัติของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด (ร้อยละ 99.9)

จากนั้นจึงได้ศึกษาอัตราการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง, ไอโซเลต GS1 ที่แยกได้จากปลา และไอโซเลต MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก ด้วยความร้อน โดยได้หาค่า Decimal Reduction Time (*D* value) ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตในกุ้ง ปลา และปลาหมึกที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด ค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* จะลดลงตามอุณหภูมิของการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้น โดยค่า $D_{65^{\circ}\text{C}}$, $D_{75^{\circ}\text{C}}$, $D_{85^{\circ}\text{C}}$ และ $D_{95^{\circ}\text{C}}$ ของ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 ไอโซเลตมีค่าอยู่ในช่วง 42.26 – 44.08 วินาที, 25.19 – 27.47 วินาที, 24.41 – 27.05 วินาที และ 16.13 – 16.52 วินาที ตามลำดับ และได้หาค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิดมาเขียนกราฟ thermal death time เพื่อหาค่า *Z* พบว่าค่า *Z* ของ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต SH1 ในกุ้ง ไอโซเลต GS1 ในปลา และไอโซเลต MS2 ในปลาหมึก มีค่าเป็น 1.14, 1.16 และ 1.12 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Special Project Title	Isolation and identification of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> from seafood and thermal inactivation study
Name	Miss Nawarat Potiraj 46050465 Miss Pratoom Sanma 46050469
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Suree Nanasombat

Abstract

In this study, the number of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh seafoods such as shrimp, fish, squid, oyster and mussel (10 samples each) sold in Bangkok was analyzed. Viable populations of *V. parahaemolyticus* in all types of seafoods were in the range of 24 to > 11,000 MPN/g. Eighty percent of all seafood samples tested were found positive for *V. parahaemolyticus*. The bacteria from 14 colonies appeared as typical colony of *V. parahaemolyticus* were then isolated for identification using morphological and biochemical tests. The results showed that all 14 bacterial isolates were *V. parahaemolyticus*. The isolate SH1 isolated from shrimp showed the most similar biological properties, compared to those of *V. parahaemolyticus* (99.9%)

Thermal inactivation rates of *V. parahaemolyticus* SH1 isolated from shrimp, *V. parahaemolyticus* GS1 isolated from fish and *V. parahaemolyticus* MS2 isolated from squid were studied by determining of Decimal Reduction Time (*D* value) of those three bacterial isolates in shrimp, fish and squid at 65°C, 75°C, 85°C and 95°C. The results showed that *D* value of *V. parahaemolyticus* in each type of seafood decreased as heating temperature increased, and $D_{65^{\circ}\text{C}}$, $D_{75^{\circ}\text{C}}$, $D_{85^{\circ}\text{C}}$ and $D_{95^{\circ}\text{C}}$ of three *V. parahaemolyticus* isolates were in the range of 42.26–44.08 sec, 25.19–27.47 sec, 24.41–27.05 sec and 16.13–16.52 sec, respectively. Then, the thermal death time curve of *V. parahaemolyticus* in each type of samples was plotted using *D* value at different heating temperature to determine *Z* value. The results showed that *Z* values of *V. parahaemolyticus* isolate SH1 in shrimp, isolate GS1 in fish and isolate MS2 in squid were 1.14°C, 1.16°C and 1.12°C, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงการพิเศษ ตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ในหัวข้อเรื่องการแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* จากอาหารทะเล และการศึกษาการยับยั้งการเจริญด้วยความร้อน โครงการพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลงได้ด้วยดี หากไม่ได้รับการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำทางการปฏิบัติ ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการพิเศษนี้ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขในส่วนของข้อบกพร่องของโครงการพิเศษ ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นवलพรรณ ฅ ระนอง และ ผศ. ถินจง สุขล้าภู ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ เกี่ยวกับโครงการพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนทุนทรัพย์ในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆ

ขอขอบพระคุณที่ปรีญาโทและเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

คณะผู้จัดทำใคร่ขอถือโอกาสนี้ขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนาม และไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากโครงการพิเศษนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง คณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงการพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณงามความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลงไปด้วยดี

นางสาววรัศนี โพธิราช

นางสาวประทุม แสนมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูป	VI
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	37
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และวิธีเตรียม	60
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ทดสอบ (reagents)	65
ภาคผนวก ค วิธีการทดสอบ	66
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ผลการทดลอง	71
ภาคผนวก จ ตารางวิเคราะห์ผลการทดลอง	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การได้รับอันตรายของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11
2. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และพีเอชที่มีผลต่อค่า D value ของสปอร์ของ <i>Bacillus cereus</i>	26
3. รายงานค่า D value ของ <i>Salmonella</i> Senftenberg 775W	28
4. ผลของจำนวนสปอร์ของ <i>Clostridium botulinum</i> ที่มีต่อค่า Thermal death time ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	29
5. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่า Thermal death time ของสปอร์	31
6. จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่พบ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	37
7. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารทะเล	38
8. คุณสมบัติทางชีวเคมีขั้นต้นของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่แยกจากอาหารทะเล	40
9. ผลการทดสอบของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเลโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E	41
10. ค่า Decimal reduction time (D value) ของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเล	45
11. ตาราง MPN	83
12. คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	84
13. ตารางอ่านผลสำหรับชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 E	85

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> ข้อมติคตีแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้ง	5
2. ลักษณะเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> มีแฟลกเจลลาหนึ่งเส้นที่อยู่ปลาย ด้านหนึ่งของเซลล์	5
3. ลักษณะเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> บนอาหาร TCBS	7
4. กราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Survival curve)	24
5. กราฟ thermal death time ของจุลินทรีย์	24
6. กราฟ Thermal death time ของ <i>V. parahaemolyticus</i> SH1 ในกุ้ง <i>V. parahaemolyticus</i> GS1 ในปลา และ <i>V. parahaemolyticus</i> MS2 ในปลาหมึก	47
7. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 65 °C ($D_{65^{\circ}\text{C}}$)	71
8. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 75 °C ($D_{75^{\circ}\text{C}}$)	72
9. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 85 °C ($D_{85^{\circ}\text{C}}$)	73
10. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 95 °C ($D_{95^{\circ}\text{C}}$)	74
11. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 65 °C ($D_{65^{\circ}\text{C}}$)	75
12. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 75 °C ($D_{75^{\circ}\text{C}}$)	76
13. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 85 °C ($D_{85^{\circ}\text{C}}$)	77
14. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 95 °C ($D_{95^{\circ}\text{C}}$)	78
15. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 65 °C ($D_{65^{\circ}\text{C}}$)	79

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
16. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหา ค่า D ที่อุณหภูมิ 75 °C ($D_{75^{\circ}\text{C}}$)	80
17. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหา ค่า D ที่อุณหภูมิ 85 °C ($D_{85^{\circ}\text{C}}$)	81
18. กราฟการอยู่รอดของ <i>V. parahaemolyticus</i> MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหา ค่า D ที่อุณหภูมิ 95 °C ($D_{95^{\circ}\text{C}}$)	82



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ

เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้ง (Nester และคณะ, 1983) สามารถเจริญอยู่ได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ที่อุณหภูมิ 25-44 องศาเซลเซียส เชื้อชนิดนี้เป็นฮาโลฟิลิกแบคทีเรีย (halophilic bacteria) ชอบเจริญในที่ที่มีความเค็ม โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เจริญได้คือร้อยละ 1-8 เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเล ในฤดูหนาวจะเป็นระยะพักตัวของเชื้อ เนื่องจากมีอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนในช่วงฤดูร้อนจะมีการแพร่ระบาดและแพร่กระจายเชื้อในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเล โดยจะปนเปื้อนไปกับหอยนางรม กุ้ง และสัตว์ทะเลอื่น (Boyd และ Hoerl, 1991)

ปัจจุบันการบริโภคอาหารทะเลของประชากรโลกเพิ่มขึ้นทุกปี การบริโภคอาหารทะเลที่ดิบ หรือไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่เพียงพอจะทำให้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อนี้สูงทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยจะเกิดอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ โดยมีระยะฟักตัว 12-24 ชั่วโมง จะเกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดศีรษะ ปวดท้อง มีไข้ และถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีเลือดหรือเมือกปนเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อสร้างสารพิษพวก hemolysin ที่มีผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหาร อาการจะบรรเทาได้เองภายใน 1-4 วัน โดยไม่ต้องรักษา นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อตามบาดแผลร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นได้ด้วย (Boyd และ Hoerl, 1991)

ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* เนื่องจากการบริโภคอาหารทะเล จากสถิติของระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พบเชื้อนี้เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ. 2540-2545 ตามลำดับ ข้อมูลจากศูนย์เฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อต่อต้านจุลชีพสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ในการเพาะเชื้อจากผู้ป่วยกลุ่มอุจจาระร่วงในโรงพยาบาลเครือข่าย 32 แห่ง พบว่าในปี พ.ศ. 2543 พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งคือพบเชื้อ 1,310 จากผู้ป่วย 5,337 ราย (ร้อยละ 31.7) ในปี พ.ศ. 2544 ถึง พ.ศ. 2546 ผลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขระหว่างปี พ.ศ. 2543 - มิ.ย. 2547 พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวนรวมทั้งสิ้น

629 สายพันธุ์ จากผู้ป่วย 543 สายพันธุ์ จากอาหารทะเล 78 สายพันธุ์ และจากน้ำ 8 สายพันธุ์ (ศรีวรรณ, 2548)

แบคทีเรียชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 5 นาที แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและ 100 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 1 นาที สามารถทำลาย *V. parahaemolyticus* ได้ (มีทนา, 2545) มีรายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์หนึ่งมีจำนวน 500 เซลล์ต่อมิลลิตรในกุ้งบดถูกทำลายหมดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใน 1 นาที แต่ถ้ามีจำนวนเซลล์มากขึ้นถึง 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิตร การทำลายเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะทำให้มีบางเซลล์ที่อยู่รอดได้ ดังนั้นถ้าได้รับ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลที่ผ่านการแปรรูปอาจเป็นผลมาจากการให้ความร้อนไม่เพียงพอ การปนเปื้อนข้ามหรือปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อน รวมทั้งการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (Jay และคณะ, 2005)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการต้านทานความร้อนที่ต่างกัน โดยการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์จะแสดงในรูปของค่า *D* value ซึ่งจะเป็นระยะเวลาที่จะทำลายเชื้อจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งให้ลดลงร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle ซึ่งถ้าหากค่า *D* value สูง แสดงว่าต้องใช้เวลาในการทำลายจุลินทรีย์นานขึ้น ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ในอาหารจะต้องใช้อุณหภูมิระดับต่าง ๆ โดยที่อุณหภูมิเดียวกันนั้นเชื้อแต่ละชนิดจะมีค่า *D* value ต่างกัน สำหรับ *V. parahaemolyticus* นั้นมีรายงานว่าค่า D_{170C} ของ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วง 0.8-65.1 นาที (Jay และคณะ, 2005) นอกจากนี้ Banwart, 1989 ได้ทำการศึกษาค่า *D* value ของ *V. parahaemolyticus* ในหอยกาบบดที่อุณหภูมิ 49-55 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสช่วงของค่า *D* value อยู่ระหว่าง 0.03 ถึง 0.21 นาที

ดังนั้นการให้ความร้อนอย่างเพียงพอในการประกอบอาหารจะทำให้ปลอดภัยจากการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *V. parahaemolyticus* ได้ เนื่องจากความร้อนในการประกอบอาหารนั้นจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ โดยจะทำให้โปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อไปได้

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด และศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ด้วยความร้อน โดยการหาค่า *D* value และ *Z* value ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล เพื่อให้ทราบถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่จะสามารถทำลาย *V. parahaemolyticus* ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 เพื่อวิเคราะห์หาจำนวน แยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลโดยใช้ความร้อน

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการตรวจหาปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี Most Probable Number จากนั้นทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสด และนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ได้มาศึกษาการยับยั้งการเจริญโดยใช้ความร้อน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ
- 1.4.2 ทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลสดที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ
- 1.4.3 ลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคของผู้บริโภค ที่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* เข้าไป

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- 1.5.1 ตรวจหาปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่ จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี Most Probable Number (MPN)
- 1.5.2 ทำการจำแนกชนิดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลสด รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่
 - การเจริญในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ ร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10
 - การเจริญในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) และ Lysine Indole Motility (LIM) ที่เติมโซเดียมกลูไครด์ร้อยละ 2
 - ทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)
 - ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase)
- ทดสอบยีนยีนโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 E

1.5.3 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล โดยใช้ความร้อนในอาหารทะเลสด 3 ชนิด คือ กุ้ง ปลา และปลาหมึก โดยนำเอาเนื้อของอาหารทะเลสดบดมาเติมสารแขวนลอยของเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงไป 20 ไมโครลิตรในตัวอย่างอาหารทะเลสด นำไปทดลองปลูกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากนั้นนำหลอดอาหารทะเลทั้งหมดไปให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิที่ต้องการหาค่า D ได้แก่

- ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 วินาที
- ที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 วินาที
- ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 วินาที

จากนั้นนำหลอดตัวอย่างอาหารที่ให้ความร้อนในแต่ละระดับอุณหภูมิที่เวลาต่าง ๆ ไปตรวจหาจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิต โดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหาร TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 คำนวณหาค่า D value และ Z value

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

2.1.1 ฐานวิทยา

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเล (Boyd และคณะ, 1991) พบครั้งแรกในปี 1950 ที่เมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น เชื้อนี้จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรงหรือโค้ง (Nester และคณะ, 1983) มีความยาวตั้งแต่ 1-3 ไมครอน กว้าง 0.4-0.6 ไมครอน ไม่สร้างแคปซูลและไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลว โดยใช้แฟลกเจลลาหนึ่งเส้นที่อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์บางสายพันธุ์อาจมีแฟลกเจลลารอบเซลล์ (Boyd และคณะ, 1991; Baumann และ Schubert, 1984) ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลสได้ หมักกลูโคสไม่ให้เกิด (สุริย์, 2549)

รูปที่ 1 ลักษณะเซลล์ *V. parahaemolyticus* ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรงหรือโค้ง
ที่มา : <http://www.city.niigata.niigata.jp/info/sikenjo/511kin.htm>



รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์ *V. parahaemolyticus* มีแฟลกเจลลาหนึ่งเส้นที่อยู่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์

ที่มา : <http://www.ehagroup.com/epidemiology/illnesses/vibrio-parahaemolyticus.asp>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 แหล่งที่พบของ *V. parahaemolyticus*

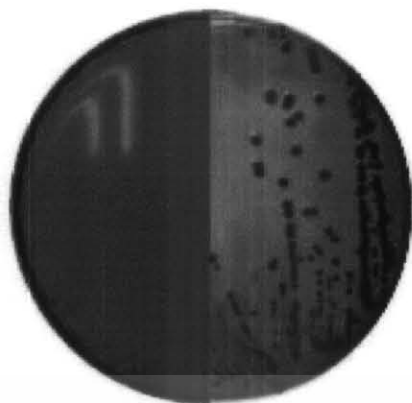
2.1.2.1 การแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมในทะเล

การกระจายของ *V. parahaemolyticus* ในสิ่งแวดล้อมในทะเลเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำ การตรวจพบ *V. parahaemolyticus* มีน้อยมากในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิต่ำ จนกระทั่งอุณหภูมิของน้ำทะเลเพิ่มขึ้นถึง 15 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่านี้ จากการศึกษาสภาพแวดล้อมของ *V. parahaemolyticus* ที่อ่าว Chesapeake ในรัฐ Maryland ของประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า *V. parahaemolyticus* มีชีวิตรอดในตะกอนใต้น้ำ ในระหว่างฤดูหนาว และจะถูกปล่อยออกมาอยู่ในน้ำ เมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นถึง 14 องศาเซลเซียส ในช่วงปลายของฤดูใบไม้ผลิ หรือช่วงเริ่มต้นฤดูร้อน และจากการสำรวจอีกครั้งหนึ่งใน 9 รัฐตามชายฝั่งทะเลของประเทศสหรัฐอเมริกาในระหว่างปี ค.ศ. 1984 และ ค.ศ. 1985 มีรายงานว่ามีความหนาแน่นของจำนวน *V. parahaemolyticus* (4 เซลล์ ต่อ 100 มิลลิลิตร) ในน้ำทะเลเมื่ออุณหภูมิของน้ำลดลงต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลสามารถเพิ่มขึ้นถึง 1,000 เซลล์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 25 องศาเซลเซียส การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ เกี่ยวกับการพบ *V. parahaemolyticus* ในสภาพแวดล้อมการเจริญของหอยนางรมในรัฐ Oregon ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2002 ถึงเดือนตุลาคม 2003 พบว่าการมี *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลนั้นมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยจะพบจำนวน *V. parahaemolyticus* สูงสุดในน้ำทะเลช่วงฤดูร้อน (Su และ Liu, 2007)

2.1.2.2 การมีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอย

ระดับของการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยก็มีความเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำ ดังนั้นจึงมักตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ได้บ่อยในหอยนางรมที่เก็บในช่วงฤดูใบไม้ผลิ และฤดูร้อนมากกว่าในฤดูหนาว ถึงแม้ว่าความหนาแน่นของจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมนั้นมักจะต่ำกว่า 10^3 CFU ต่อกรัม แต่ก็อาจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากกว่า 10^3 CFU ต่อกรัมได้ในหอยนางรมที่เก็บได้จากน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิปานกลาง และเชื้อนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในหอยนางรมถ้ามีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น จากการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่ไม่ได้แช่เย็นอาจเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว 50–790 เท่าของจำนวนเซลล์เริ่มต้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บเกี่ยว ถ้าหอยนางรมนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างหอยนางรม 370 ชุด จากร้านอาหาร แผงขายหอยนางรม ตลาดชายฝั่ง และตลาดขายส่งอาหารทะเล ท้ายอเมริกาในระหว่าง เดือนมิถุนายน 1998 ถึงเดือนกรกฎาคม 1999 พบการแพร่กระจายตามฤดูกาลของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่จำหน่ายในตลาดโดยพบปริมาณมาก บางแห่งตรวจพบมากกว่า 1,000 MPN ต่อกรัม ในช่วงฤดูร้อน (Su และ Liu, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ลักษณะเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร TCBS
ที่มา : <http://www.city.niigata.niigata.jp/info/sikenjo/511kin.htm>

2.1.3 รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล

การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลส่วนใหญ่จะพบในแถบเอเชีย และอเมริกา แต่จะพบน้อยในยุโรป ซึ่งมีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลชนิดต่างๆ ดังนี้

Wong และคณะ (1999) ได้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่นำเข้ามาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม โดยพบเชื้อทั้งหมด 315 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 686 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 45.9 ซึ่งอาหารทะเลที่นำเข้ามาจากประเทศไทยนั้นพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปู 26 ตัวอย่าง จาก 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 81.3 และพบในกุ้ง 47 ตัวอย่าง จาก 62 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75.8

Jakšić และคณะ (2002) ได้ตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากปลา กุ้ง และหอยสองฝาจาก Adriatic Sea ประเทศโครเอเชีย จำนวน 11 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 117 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.40

Bilung และคณะ (2005) ได้ตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากหอยแครงที่ได้จาก Tanjong Karang , Kuala Selangor ประเทศมาเลเซีย ระหว่างเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน ปี 2003 จำนวน 62 ตัวอย่าง จากตัวอย่างหอยแครงทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง และมีค่า Most Probable Number (MPN) มากกว่า 1,100 MPNต่อกรัม

Ottaviani และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแมลงภูในแถบชายฝั่งทะเล Adriatic Sea ประเทศอิตาลี ระหว่างเดือนธันวาคม ปี 2002 จนถึงเดือนมกราคม ปี 2004 จำนวน 144 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 25 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 24.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Colakoglu และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลของชายฝั่ง Dardanelles ในประเทศตุรกีทั้งหมด 127 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอยแมลงภู่ 97 ตัวอย่าง และกุ้ง 30 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพียงร้อยละ 0.8 แต่พบ *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *Aeromonas hydrophila* ปริมาณร้อยละ 26.7, 9.4 และ 29.1 ตามลำดับ

Normanno และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และจุลินทรีย์ชนิดอื่นในหอยแมลงภู่ที่จำหน่ายใน Puglia region ประเทศอิตาลี จำนวน 600 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม ปี 2001 จนถึงเดือนมกราคม ปี 2003 พบว่าพบปริมาณเชื้อ *Vibrio* ทั้งหมด 64 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยจะพบมากสุดในเดือนพฤษภาคม และเป็นเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 17 ตัวอย่าง ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นนั้นพบน้อยมาก

Lhafi และคณะ (2007) ได้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยแมลงภู่จากทะเล German Wadden ประเทศเยอรมนีร้อยละ 39.5 จากทั้งหมด 90 ตัวอย่าง

2.1.4 ลักษณะการเจริญทางชีวภาพและกายภาพของ *V. parahaemolyticus*

2.1.4.1 ความต้องการโซเดียมคลอไรด์และผลของปริมาณน้ำอิสระ (Water Activity)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ค่อนข้างชอบเกลือ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วงร้อยละ 2-4 และเจริญได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่าร้อยละ 0.5 การเจริญของ *V. parahaemolyticus* จะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ซึ่งเป็นลักษณะที่มีประโยชน์ในการใช้แยกความแตกต่างออกจาก *V. alginolyticus* ถ้า a_w ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *V. parahaemolyticus* คือ 0.992 ในสภาพนี้มีโซเดียมคลอไรด์อยู่ และ a_w ต่ำสุดของการเจริญของเชื้อนี้คือ 0.948 ความต้องการปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และอุณหภูมิในการเจริญนั้นผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของตัวถูกละลาย และการมีปริมาณน้ำอิสระน้อย (a_w) จะต้องมีการใช้สารละลาย (Schultz และ Smith, 1994)

2.1.4.2 ผลของพีเอช

ค่าพีเอชที่เหมาะสมของ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วง 7.5 - 8.6 แต่เชื้อนี้จะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่พีเอช 4.8 - 11.0 ซึ่ง *V. parahaemolyticus* จะมีความต้านทานต่อความร้อนและความเย็นได้ดีที่สุดในสภาพที่มีพีเอชเป็นกลาง ในสภาพที่มีอุณหภูมิ 10.8 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* ในกุ้งสุกที่มีซอสคืออกเทล (พีเอช 3.8) จะลดจำนวนลงมากกว่าในกุ้งสุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่มีขอสคือคเทล ทีเอชมีผลต่อการเกาะติดของเซลล์ *V. parahaemolyticus* กับผิวไคตินและมีผลต่อการสร้างแฟลกเจลลา (Schultz และ Smith, 1994)

2.1.4.3 การไวต่อความร้อน

V. parahaemolyticus มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อนี้มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ อุณหภูมิต่ำที่สุดที่เชื้อนี้สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเท่าที่มีการบันทึกไว้คือ 5 องศาเซลเซียส แต่โดยทั่วไป *V. parahaemolyticus* จะมีจำนวนลดลงเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีชีวิตจำนวนมากสามารถแยกได้จากกุ้งทั่วไป หอยนางรม หรือปลาบดที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ หรือจากหอยนางรมที่เก็บไว้ทั้งเปลือก ตำแหน่งแรกที่เกิดการบาดเจ็บจากความเย็นอาจจะเป็นที่เชื้อหุ้มเซลล์ เนื่องจาก $MgCl_2$ มีส่วนช่วยในการฟื้นคืนสภาพและเซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บแต่ไม่ถึงตายมีความไวสูงต่อสารเคมี (detergents) (Schultz และ Smith, 1994)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) โดยอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญอยู่ที่ 42-44 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้จะผันแปรเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ กันที่เป็นองค์ประกอบของ cell-envelop และช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ มี Z value อยู่ที่ 5.5-12.4 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียสถึง 55 องศาเซลเซียส สามารถตรวจพบการอยู่รอดได้ในกึ่งบดที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เมื่อเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิกรัม *V. parahaemolyticus* ที่เกิดการบาดเจ็บแต่ไม่ถึงตายสามารถฟื้นคืนสภาพได้ในอาหาร non-selective media หรือ TCBS agar ที่มีการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ จากการศึกษาเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะพบว่าสารสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีน จำเป็นต่อการฟื้นคืนสภาพจากการบาดเจ็บแต่ไม่ถึงตายจากความร้อน (Schultz และ Smith, 1994)

2.1.5 การได้รับอันตรายของ *Vibrio parahaemolyticus*

2.1.5.1 สารเจือปนในอาหาร

สารเจือปนอาหารหลายชนิดที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* รวมถึง โพแทสเซียมซอร์เบท (potassium sorbate) โซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) โมโนลอรีน (monolaurin) โมโนคาพรีน (monocaprin) โพรพิล-p-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (propyl-p-hydroxy-benzoate) การเติมสารเจือปนที่มีฤทธิ์ยับยั้งลงในเนื้อปูหรือปูบดมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำให้มีจำนวนเซลล์ต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารเจือปนดังกล่าว และสารเจือปนนี้ทำให้ *V. parahaemolyticus* มีการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น (Schultz และ Smith, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.2 สารปฏิชีวนะ

V. parahaemolyticus มีความไวต่อคลอแรมฟิสิกอล (chloramphenicol) เตตราไซคลิน (tetracycline) อะมิโนไกลโคไซด์ (amino-glycosides) เซฟไตรโซสปอริน (third-generation cephalosporins) aztreonam, imipenem และ quinolones (ตารางที่ 1) เพนนิซิลิน (Penicillin) และเซฟไตรโซสปอรินชนิดเก่าไม่มีผลต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการวิเคราะห์เกือบร้อยละ 50 ของสายพันธุ์สามารถสร้าง beta-lactamase ได้ อย่างไรก็ตาม *V. parahaemolyticus* จะถูกทำลายได้ง่ายเมื่อใช้ ซัลแบคแทม (sulbactam) ร่วมกับแอมพิซิลลิน (ampicillin) ควิโนโลน (Quinolones) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีผลในการต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด ความเข้มข้นต่ำสุดของซิโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) ในการยับยั้งเชื้อนี้คือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการใช้โอฟลอกซาซิน (ofloxacin) นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) อินอร์ซาซิน (enoxacin) และพีฟลอกซาซิน (pefloxacin) ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Schultz และ Smith, 1994)

2.1.5.3 ปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางชีวภาพหลายปัจจัยด้วยกันที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* แบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) บางชนิดสามารถทำลาย *V. parahaemolyticus* ได้ ซึ่งแยกได้จากสัตว์น้ำเปลือกแข็ง และแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟาจขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ และปริมาณ *Vibrio* ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง *Vibrio* สายพันธุ์อื่น ๆ อาจเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับฟาจนี้ซึ่งจะสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ได้ แต่สำหรับฟาจสำหรับสิ่งมีชีวิตที่แยกได้จากซุปรอยนางรม มาสามารถติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* หรือ *Salmonella newport* ได้ การมีฟาจจำนวนมากที่สามารถติดเชื้อเข้าสู่ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยากันมากกว่าซึ่งแยกได้จากซุปรอยนางรม ซึ่งอาจสะท้อนให้เห็นถึงการมีเซลล์ชนิดนี้มากในสิ่งแวดล้อม (Schultz และ Smith, 1994)

Pseudomonas species ในหอยนางรมอาจมีผลในการยับยั้ง *V. parahaemolyticus* และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยากันมากกว่าถูกยับยั้งเป็นจำนวนมาก และตัวการในการยับยั้ง คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เกิดจาก *Pseudomonas* เชื้อ *Bdellovibrio* เป็นปรสิตใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีอยู่ตามปากแม่น้ำ ปรสิตอาจจะมิบทบาทต่อการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลหรือสิ่งแวดล้อมที่ซึ่งมีเชื้อ *Bdellovibrio* เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค (Schultz และ Smith, 1994)

2.1.5.4 ปัจจัยทางกายภาพ

มีปัจจัยทางกายภาพหลายปัจจัยที่สามารถควบคุมการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้ นอกจากนี้ความร้อน แสงอัลตราไวโอเลต (UV) รังสี และความดันสูง ก็ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้ จากการทดลอง *V. parahaemolyticus* 3 สายพันธุ์ พบว่าไม่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถอยู่รอดหรือเจริญที่ 200, 400, 600, 800 หรือ 1,000 ความดันบรรยากาศ (atm) สาเหตุหลักที่สนับสนุนคือ neritic หรือ estuarine origin และถิ่นที่อยู่ของ *V. parahaemolyticus* ที่ deep ocean แยก *Pseudomonas bathycetes* สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญได้ที่ความดันนี้ (Schultz และ Smith, 1994)

ตารางที่ 1 การได้รับอันตรายของ *Vibrio parahaemolyticus*

การต้านเชื้อแบคทีเรีย	MIC ₉₀ ^a (µg/ml)
ampicillin	> 128
ampicillin/sulbactam	4
carbencillin	> 512
piperacillin	> 512
cephalothin	64
cefoperazone	16
cefuroxime	64
axtreonam	≤ 0.5
imipenem	80
chloramphenicol	0.5
tetracycline	0.5
fulthamethoxazole	> 512
trimethoprim	4
genamicin	1.0
amikacin	40
titrofloxacin	≤ 0.25

^a การยับยั้งการเจริญร้อยละ 90

2.1.6 การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *V. parahaemolyticus*

2.1.6.1 การเกิดโรคอาหารเป็นพิษในเอเชีย

V. parahaemolyticus พบว่าเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคทางเดินอาหารเป็นครั้งแรก ในจังหวัดโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1951 ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคระบาดจากการบิน โลกปลาซาร์ดิน โดยมีผู้ป่วยถึง 272 รายและมีผู้เสียชีวิต 20 ราย หลังจากนั้นมียางานว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษถึงร้อยละ 20-30 ของจำนวนผู้ป่วยเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในประเทศญี่ปุ่น และพบว่าเป็นสาเหตุทั่วไปของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากอาหารทะเลในประเทศแถบเอเชียเป็นจำนวนมาก (Su และ Liu, 2007)

V. parahaemolyticus เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในประเทศญี่ปุ่น ระหว่างปี 1996 และ 1998 (1710 ครั้งของการเกิดโรคมียุโรป่วย 24,373 คน) และ คิดเป็นร้อยละ 69 (ผู้ป่วย 1028 คน) ของการระบาดจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด (ผู้ป่วย 1495 คน) ที่พบในประเทศไต้หวัน ระหว่างปี 1981 และ 2003 และคิดเป็นร้อยละ 31.1 จากการเกิดโรคระบาดจากโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด 5,770 กรณี ในประเทศจีน ระหว่างปี 1991 และ 2001 (Su และ Liu, 2007)

2.1.6.2 การเกิดโรคอาหารเป็นพิษในยุโรป

มีการแพร่ระบาดของ *V. parahaemolyticus* มีรายงานว่าพบน้อยมากในแถบยุโรป ซึ่งตรงกันข้ามกับประเทศในแถบเอเชีย อย่างไรก็ตามมีการระบาดเกิดขึ้นเป็นระยะๆ ในหลายประเทศ เช่น สเปนและฝรั่งเศส ในปี 1989 มีรายงานว่าในประเทศสเปนมีการเกิดโรคทางเดินอาหาร 8 กรณีจากการบริโภคปลาและหอย ในปี 1999 ที่ Galicia ประเทศสเปน มีการระบาดเกิดขึ้น โดยมีผู้ป่วย 64 ราย ซึ่งบริโภคหอยนางรมดิบ ในปี 1997 ในประเทศฝรั่งเศส มีการระบาดอย่างหนัก โดยมีผู้ป่วย 44 รายซึ่งบริโภคกุ้งที่นำเข้าจากเอเชีย ในเดือนกรกฎาคม 2004 ที่ประเทศสเปน มีรายงานการระบาดที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* โดยมีผู้ป่วย 80 ราย ซึ่งเป็นแขกในงานแต่งงานที่ภัตตาคารแห่งหนึ่ง มีการระบาดจากการบริโภคปูดำที่ผ่านการผลิตมาอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ (Su และ Liu, 2007)

2.1.6.3 การเกิดโรคอาหารเป็นพิษในอเมริกา

V. parahaemolyticus จำแนกได้เป็นครั้งแรกจากการระบาดที่อเมริกาในปี 1971 หลังจากเกิดการระบาด 3 ครั้ง ที่มีผู้ป่วย 425 กรณี ของการเกิดโรคทางเดินอาหาร ที่เกิดจากการบริโภคปูที่ผ่านการผลิตมาอย่างไม่เหมาะสม ในรัฐ Maryland หลังจากนั้นมีการรายงานจากเขตชายฝั่งทะเลของอเมริกาทุกแห่งถึงการระบาดของ *V. parahaemolyticus* อีกเป็นระยะๆ ซึ่งเกิดจากการบริโภคหอยดิบหรือ อาหารทะเลที่ผ่านความร้อนแล้ว ในระหว่างปี 1973 และ 1998 มีการรายงานถึง CDC ว่าเกิดการระบาดที่เป็นผลมาจาก *V. parahaemolyticus* ประมาณ 40 ครั้ง ในจำนวนนี้มีการระบาดหลักๆ 4 ครั้งจากการเกิดโรคมามากกว่า 700 กรณี ซึ่งเกิดจากการบริโภคหอยนางรมดิบ ในด้านตะวันตกเฉียงเหนือของมหาสมุทรแปซิฟิก (Oregon, Washington, California และ British Columbia of Canada) ในปี 1998 มีการระบาด 2 ครั้งใน Washington (43 กรณี) และ Texas (416 กรณี) ซึ่งเกิดจากการบริโภคหอยนางรมดิบ นอกจากนี้ยังมีการระบาดของ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ส่งผลกระทบถึง 8 กรณี โดยมีการรายงานใน Connecticut, New Jersey และ New York ระหว่างเดือนกรกฎาคม และเดือนกันยายน ปี 1998 ซึ่งเกิดจากการบริโภคหอยนางรมและหอยสองฝาที่เก็บจาก Long Island Sound ของ New York เมื่อเร็วๆนี้ มีผู้โดยสาร 14 คน ในเรือเอกสาร์นี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ท่องเที่ยวใน Alaska เกิดโรคทางเดินอาหารภายหลังจากบริโภคหอยนางรมดิบที่ผลิตใน Alaska ในช่วงฤดูร้อนปี 2004 เมื่อไม่นานมานี้มีการเกิดโรคระบาดจาก *V. parahaemolyticus* 177 กรณี ในช่วงฤดูร้อนปี 2006 โดยเกิดจากปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่เก็บจาก Washington และ British Columbia การเกิดโรคระบาดนี้ชี้ให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม ซึ่งเกี่ยวกับความปลอดภัยต่อการบริโภคในอเมริกา (Su และ Liu, 2007)

2.1.7 รายงานการระบาดของโรคที่เกิดจาก *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรืออาหารที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ส่วนใหญ่พบในเอเชียและอเมริกาเหนือ (Bag และคณะ, 1999; DePaola และคณะ, 2000; Matsumoto และคณะ, 2000; Okuda และคณะ, 1997) ส่วนในยุโรปนั้นพบว่ามียางานการเกิดโรคจาก *V. parahaemolyticus* น้อยมาก (Lemoine และคณะ, 1999; Lazona-Leon และคณะ, 2003)

การระบาดของโรคทางเดินอาหารจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* เกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1951 ที่เมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น (Daniels และคณะ, 2000) โดยมีผู้ป่วย 272 ราย และผู้เสียชีวิต 20 ราย ซึ่งเกิดจากการรับประทานปลาซาร์ดีน นับแต่นั้นมามีรายงานการเกิดโรคทางเดินอาหารที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* คิดเป็นร้อยละ 20-30 ของโรคทางเดินอาหารที่เกิดขึ้นทั้งหมดในประเทศญี่ปุ่น และก็มีรายงานการเกิดโรคทางเดินอาหารที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* ในประเทศต่างๆ ในแถบเอเชีย

การติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ปี 1996 ซึ่งมีรายงานการระบาดของเชื้อในประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น ไต้หวัน อเมริกา ทาว เกาหลี ซิลี บังกลาเทศ รัสเซีย ไทย สเปน ฝรั่งเศส และเวียดนาม

ในปี 1995 ที่ประเทศไต้หวัน พบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคทางเดินอาหารจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 ร้อยละ 0.6 (พบ 3 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 526 ราย) แต่ในปี 1996 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50.1 (พบ 372 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 742 ราย) และในปี 1997 จะเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง ร้อยละ 83.8 (พบ 990 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 1,181 ราย) นอกจากนี้ที่ประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีรายงานการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 ในปี 1988-1995 คิดเป็นร้อยละ 3 และพบว่าในปี 1996-2001 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 75 (Yamazaki และคณะ, 2000)

ในปี 1996 ได้เกิดการระบาดของโรคทางเดินอาหารจากการรับประทานปูสดที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีผู้ป่วยทั้งหมดกว่า 691 ราย (Powsey, 2002)

ในปี 1997 มีรายงานการระบาดของโรคทางเดินอาหารในอเมริกาเหนือ จากการรับประทานหอยนางรมที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยพบว่ามีผู้ป่วยทั้งหมด 209 ราย และมีผู้เสียชีวิต 1 ราย ซึ่งมีข้อเสนอว่าการระบาดของโรคน่าจะเกิดจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้น จึงทำให้เกิดการแพร่เชื้อในคน (CDC, 1998)

ในปี 1998 มีรายงานการระบาดของโรคทางเดินอาหารจากการรับประทานหอยเป่าเชื้อที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไต้หวัน

ในปี 2003 พบว่าเกิดการระบาดของโรคท้องร่วงจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศอินเดีย โดยมีผู้ป่วยถึง 200 ราย

ในปี 2003-2004 มีรายงานพบการระบาดของโรคทางเดินอาหารจากการรับประทานหอยนางรมดิบในสิงคโปร์ โดยพบผู้ป่วยทั้งหมด 305 ราย ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย (ร้อยละ 94) ปวดเกร็งที่ท้อง (ร้อยละ 72) อาเจียน (ร้อยละ 69) และมีไข้ (ร้อยละ 54) (Ng และคณะ, 2005)

ในต้นปี 2005 พบว่ามีรายงานการระบาดของโรคทางเดินอาหารที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* ในประเทศชิลี โดยพบว่ามีผู้ติดเชื้อมากกว่า 10,000 ราย และพบว่ามีผู้เสียชีวิต 1 ราย (Heitman และคณะ, 2005)

ในปี 2006 มีรายงานการระบาดของโรคทางเดินอาหารที่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยพบผู้ป่วยทั้งหมด 177 ราย (CDC, 2006)

2.1.8 ปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรค

เป็นที่ทราบกันดีว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมหรืออาหารทะเลนั้นไม่ก่อให้เกิดโรค *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ทางคลินิกนั้นมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในด้านความสามารถของเชื้อในการผลิต Thermostable direct hemolysin (TDH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหาร Wagatsuma blood agar ได้ กิจกรรมในการย่อยเม็ดเลือดแดง เรียกว่า ปฏิกริยาคานากาวา (Kanagawa phenomenon) มีรายงานว่าโดยปกติแล้วมักจะเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ แต่พบน้อยมากในสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ดังนั้น TDH เป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง (virulence factor) ของ *V. parahaemolyticus* (Su และ Liu, 2007)

ถึงแม้ว่าการตรวจสอบเกี่ยวกับการระบาดของโรคได้ชี้ให้เห็นถึงการเกี่ยวข้องกันระหว่างปฏิกริยาคานากาวา (KP) และการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* แต่สายพันธุ์ที่ให้ผลลบกับปฏิกริยาคานากาวา (KP-negative) ซึ่งไม่ผลิต TDH แต่ผลิต TDH-related hemolysin นั้นเคยแยกได้จากผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ จากรายงานการวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ทางคลินิก 215 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย พบว่ามียีน TDH (tdh) และ TRH (trh) และพบว่ามี 52 สายพันธุ์ (ร้อยละ 24.3) จะมีเพียงยีน trh จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า TRH เป็นปัจจัยเอ็กสาร์เป็นเอ็กสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ก่อให้เกิดโรคใน *V. parahaemolyticus* สำหรับยีน TDH (tdh) และ TRH (trh) นี้ได้มีผู้ทดลองโคลน (clone) และหาลำดับเบส (sequence) ของ Oligonucleotide probe สำหรับยีน tdh และ trh ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ที่รุนแรงของ *V. parahaemolyticus* (Su และ Liu, 2007)

ขณะที่กลไกการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคพบว่าเกี่ยวข้องกับกรรมยีน tdh และ trh แต่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ TDH และ TRH ก็ควรทำการจำแนกเช่นกัน เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง TDH และ TRH ชักนำให้เกิดการสะสมของเหลวในหนูแรกเกิด และเร็ว ๆ นี้พบว่าโปรตีนที่ไม่ทนต่อความร้อน (serine protease) ที่ผลิตจาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ทางคลินิกซึ่งไม่มียีน tdh และ trh เป็นโปรตีนชนิดที่ถูกพิจารณาว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง โปรติเอสบริสุทธิ์นี้มีผลต่อการเจริญของเซลล์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์จีน (HeLa, Vero และ Caco-2 cell) โดยโปรตีนนี้ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและเป็นสาเหตุของการที่เลือดไหลออกมาบริเวณเนื้อเยื่อ (tissue hemorrhage) และการตายในหนูเมื่อดูดโปรตีนชนิดนี้เข้าในคิ้วหนู อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลการตรวจสอบในส่วนของสายพันธุ์ทางคลินิกและถึงแควด้อม (Su และ Liu, 2007)

2.1.9 การค้นพบของสายพันธุ์ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรค

โรคระบาดส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีสาเหตุมาจากซีโรไทป์ที่หลากหลายของ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1996 ได้มีรายงานการเพิ่มขึ้นของการเกิดโรคทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3:K6 ซีโรวารี่ถูกจำแนกได้เป็นครั้งแรกในระหว่างการตรวจสอบอย่างละเอียดของโรงพยาบาลในการศึกษาการติดเชื้อจาก *V. parahaemolyticus* ใน Calcutta ประเทศอินเดีย ระหว่างปี ค.ศ. 1994 และปี ค.ศ. 1996 จากการสำรวจนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นอย่างฉับพลันของการเกิดโรคทางเดินอาหารซึ่งเกี่ยวข้องกับซีโรวารี่ถึงร้อยละ 63 จากสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดที่แยกได้ผู้ป่วยใน Calcutta ระหว่างเดือนกันยายน 1996 และเดือนเมษายน 1997 สายพันธุ์ก่อโรคที่มีความรุนแรงสูงนี้พบมากขึ้นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแยกได้จากนักท่องเที่ยวจากหลาย ๆ ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เดินทางไปประเทศญี่ปุ่น (Su และ Liu, 2007)

V. parahaemolyticus O3:K6 ถูกจำแนกได้ครั้งแรกในประเทศอเมริกาในปี ค.ศ. 1998 และเป็นการระบาดครั้งใหญ่ (มีผู้ป่วย 416 ราย) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยนางรมในประเทศอเมริกา ต่อมาซีโรวารี่นี้ได้ทำให้เกิดการระบาดขึ้นอีกจากการบริโภคสัตว์น้ำเปลือกแข็งใน Connecticut, New Jersey และ New York หลังจากนั้นได้มีรายงานว่ามีการแพร่ระบาดของซีโรวารี่นี้ในทวีปอื่น ในปี ค.ศ. 2004 *V. parahaemolyticus* O3:K6 แยกได้จากผู้ป่วยที่เกิดโรคระบาดในประเทศชิลีและสเปน การแยกสายพันธุ์ O3:K6 จากการระบาดที่เกิดขึ้นในประเทศอเมริกาทำให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตระหนักมากขึ้นถึงความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการบริโภคสัตว์น้ำเปลือกแข็งในประเทศอเมริกา อย่างไรก็ตามซีโรวารนี้ได้ถูกเชื่อมโยงว่าเกี่ยวข้องกับการเจ็บป่วยที่เกิดจากการบริโภคหอยนางรมดิบในประเทศอเมริกาในปี ค.ศ. 1999 (Su และ Liu, 2007)

2.1.10 การควบคุมและการป้องกัน

2.1.10.1 แนวทางในการควบคุมและป้องกัน

การมีเชื้อ *Vibrio* อยู่ตามธรรมชาติในทะเลและสภาพแวดล้อมตามชายฝั่งทะเลจึงเป็นไปได้เลยที่จะไม่มีแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ในอาหารทะเล จากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคระบาดในปี ค.ศ. 1997 และปี ค.ศ. 1998 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) จัดให้มีการแนะนำแนวทางต่อ Interstate Shellfish Sanitation Conference (ISSC) ในการจัดการกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งจำกัดให้มี *V. parahaemolyticus* ที่มีชีวิตได้ถึง 10,000 เซลล์หรือน้อยกว่าในอาหารทะเล 1 กรัม อย่างไรก็ตามการตรวจสอบตัวอย่างอาหารทะเลที่ดำเนินการโดยรัฐและเจ้าหน้าที่ส่วนกลางหลังเกิดการระบาดในปี ค.ศ. 1998 พบว่าจำนวน *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมส่วนใหญ่ในพื้นที่ที่หอยนางรมเจริญนั้นมีเซลล์ *Vibrio* น้อยกว่า 1,000 เซลล์ต่อกรัม และบางบริเวณอาจพบต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อกรัม การตรวจพบนี้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ว่าปริมาณที่พบเชื้อปริมาณต่ำนี้เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค และแนวทางของ FDA อาจจะไม่เพียงพอในการป้องกันผู้บริโภคจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยนางรมดิบ (Su และ Liu, 2007)

เพื่อที่จะจำกัดการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรมหน่วยงาน The National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish จึงได้กำหนดเกณฑ์ของเวลากับอุณหภูมิซึ่งจะจำกัดเวลาสูงสุดที่หอยนางรมอยู่ที่อุณหภูมิสูง สัตว์น้ำเปลือกแข็งที่ถูกเก็บมาเพื่อบริโภค ๗ จำเป็นที่จะต้องทำให้เย็นลงถึง 10 องศาเซลเซียส (50 องศาฟาเรนไฮต์) ภายใน 10 ชั่วโมงหลังเก็บเมื่ออุณหภูมิอากาศเฉลี่ยสูงสุดของทุกเดือนคือ ≥ 27 องศาเซลเซียส (81 องศาฟาเรนไฮต์) ภายใน 12 ชั่วโมงหลังเก็บเมื่ออุณหภูมิของอากาศอยู่ระหว่าง 19 และ 27 องศาเซลเซียส (66-80 องศาฟาเรนไฮต์) และภายใน 36 ชั่วโมงหลังเก็บเมื่ออุณหภูมิของอากาศ < 18 องศาเซลเซียส (66 องศาฟาเรนไฮต์) ในการพยายามที่จะลดการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยนางรม ซึ่งหอยนางรมสำหรับการบริโภคดิบในรัฐ Mississippi ของอเมริกาถูกกำหนดให้เก็บได้ในช่วงกลางเดือนกันยายนถึงเดือนเมษายน ไม่ให้เก็บหอยนางรมที่กินทะเลในช่วงฤดูร้อนและเวลาอื่น ๆ เมื่อฝนตกหนักซึ่งเป็นสาเหตุของการไหลของน้ำที่ปนเปื้อนเข้ามา การวางแผนการเก็บหอยนางรมแบบนี้ช่วยลดการเกิดการเจ็บป่วยของโรคจาก *V. parahaemolyticus* น้อยลงจากการบริโภคหอยนางรมในรัฐ Mississippi (Su และ Liu, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้การควบคุมอุณหภูมิในแผนการปฏิบัติในการจับสัตว์น้ำอาจมีผลกระทบ ต่อจำนวน *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม ในการเก็บแบบนี้แสดงให้เห็นถึงสภาพอากาศที่ทำให้ *V. parahaemolyticus* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในหอยนางรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวันที่ อากาศอบอุ่นและมีแสงแดดส่อง จึงได้มีการศึกษาถึงผลกระทบของกระแสน้ำลคของ สภาพแวดล้อมของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม และพบว่าความหนาแน่นเฉลี่ยของ จำนวน *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมมากกว่า 4-8 เท่าของจำนวนเชื้อเริ่มต้น จากการศึกษา พบว่าความหนาแน่นของจำนวน *V. parahaemolyticus* อาจเพิ่มขึ้นได้ในหอยนางรมในระหว่างช่วง กระแสน้ำลคในช่วงฤดูร้อน ดังนั้นจึงแนะนำให้หลีกเลี่ยงการเก็บเกี่ยวหอยนางรมหลังการเผชิญ ต่ออุณหภูมิปกติซึ่งอาจช่วยลดการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการบริโภคหอยนางรมดิบ (Su และ Liu, 2007)

2.1.10.2 Relaying และ Depuration

Relaying และ Depuration เป็นวิธีการทั่วไปในการลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อน ในสัตว์น้ำเปลือกแข็ง ในกระบวนการ relaying จะทำการย้ายสัตว์น้ำเปลือกแข็งก่อนทำการเก็บ ผลผลิตจากพื้นที่ที่สกปรกไปยังแหล่งน้ำตามธรรมชาติอื่นที่ปราศจากมลภาวะ อย่างไรก็ตามมีการ เพิ่มขึ้นของมลพิษตามชายฝั่งทะเลเกิดขึ้นเนื่องจากของเสียจากสัตว์ในสถานที่เพาะเลี้ยงบริเวณ สภาพแวดล้อมทางทะเลมีผลทำให้พื้นที่การเจริญเติบโตของสัตว์น้ำเปลือกแข็งสกปรก ความสะอาดที่ไม่เพียงพอและสภาพแวดล้อมที่สกปรกในแหล่งที่สัตว์น้ำเปลือกแข็งเจริญทำให้ต้อง มีการปฏิบัติตามกระบวนการ relaying (Su และ Liu, 2007)

Depuration เป็นกระบวนการควบคุมในการกำจัดทรายและกรวดออกจากลำไส้ของ สัตว์น้ำเปลือกแข็งในน้ำทะเลที่สะอาด กระบวนการนี้ทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนในสัตว์น้ำเปลือก แข็งลดลง กระบวนการนี้ช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่แช่เย็น อย่างไรก็ตามจาก การศึกษาพบว่าการ depuration โดยน้ำทะเลที่สะอาดไม่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรีย ที่ทนอยู่ได้นานเช่น *Vibrio* spp. ในสัตว์น้ำเปลือกแข็งเนื่องจากมีแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในลำไส้ ส่วนใหญ่หลังจากทำ depuration จำนวนแบคทีเรียที่รอดจากการอากาศทั้งหมดจะลดลง 1 log cycle อย่างไรก็ตามมีรายงานน้อยมากถึงการลดจำนวนของแบคทีเรียที่มีอยู่ลงถึงน้อยกว่า 10^4 เซลล์ต่อ กรัม จากรายงานการศึกษาพบว่าหอยนางรมที่ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ในห้องทดลองจะต้อง ผ่านการ depuration นาน 16 วันจึงจะลดจำนวนลงถึงตรวจไม่พบเชื้อนี้ และมีการศึกษา คล้าย ๆ กันนี้ของ Eyles และ Davey (1984) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในค่าเฉลี่ยของจำนวน *V. parahaemolyticus* ของหอยนางรมที่ผ่านและไม่ผ่านการ depuration (Su และ Liu, 2007)

เพื่อที่จะลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหอยนางรมอย่างมีประสิทธิภาพจึงมีผู้ ทำการศึกษาการ depuration ร่วมกับการใช้คลอรีน แสงอัลตราไวโอเล็ต ไอโชน หรือ iodophors อย่างไรก็ตามทั้งหมดนี้ไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัด *V. parahaemolyticus* ในสัตว์น้ำเปลือกแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

Croci และ คณะ (2002) ได้ศึกษาการ depuration ของหอยแมลงภู่ซึ่งทำให้ปนเปื้อนด้วย *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในน้ำที่มีไอโชน พบว่า *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่ที่นึ่งลดลงประมาณ 1 log cycle ซึ่งลดลงน้อยกว่า *E. coli* (ลดประมาณ 3 log cycle) หลังจากผ่านไป 44 ชั่วโมง Ren และ Su (2006) ได้ทดสอบผลของการใช้น้ำที่ผ่านกระบวนการ electrolyzed oxidizing (EO) ในการ depuration พบว่ามีการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่ทำให้ปนเปื้อนในหอยนางรม และยังพบว่าทั้งสองสายพันธุ์จะลดลงประมาณ 1.0 log cycle หลังจากอยู่ที่อุณหภูมิห้อง 8 ชั่วโมง (Su และ Liu, 2007)

2.1.10.3 กระบวนการให้ความร้อน

กระบวนการให้ความร้อน เช่น การเก็บรักษาโดยการแช่เย็น การแช่แข็ง และการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิต่ำ สามารถทำให้ *Vibrio* species ในหอยนางรมลดลงได้สำเร็จ Thompson และ Vanderzant (1976) รายงานว่าจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมลดลงจากมากกว่า 11,000 เป็น 0.36 MPNต่อกรัม หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน Muntada-Garriga และคณะ (1995) รายงานว่าเซลล์ที่มีชีวิตของ *V. parahaemolyticus* (10^5 - 10^7 CFU ต่อกรัม) ในหอยนางรมบดจะถูกยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส และ -24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-28 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อเริ่มต้นและอุณหภูมิในการแช่แข็ง Andrews และคณะ (2000) ได้พัฒนาการพาสเจอร์ไรส์ด้วยอุณหภูมิต่ำสำหรับหอยนางรมที่เก็บทั้งเปลือกโดยให้ความร้อนในน้ำที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ให้มีอุณหภูมิภายในหอยนางรมเป็น 48-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที มีรายงานว่ากระบวนการนี้ทำให้ *V. parahaemolyticus* ลดลงในหอยนางรมจากจำนวน 1.2×10^7 MPNต่อกรัม จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (< 3 MPNต่อกรัม) ประโยชน์อีกประการหนึ่งของการให้ความร้อนที่ไม่สูงก็คือ หอยนางรมจะตายและส่วนที่ยืดจะถูกเปิดออกเองในระหว่างการให้ความร้อน แต่หอยนางรมจำเป็นที่จะต้องปิดอยู่ที่ที่จะเข้าสู่กระบวนการผลิต เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำภายในของหอยนางรมในระหว่างการดำเนินการ ข้อเสียหลักของการพาสเจอร์ไรส์ด้วยกระบวนการนี้คือ อาจจะเป็นสาเหตุทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของหอยนางรมเปลี่ยนไป เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพในระหว่างการให้ความร้อน

2.1.10.4 กระบวนการให้ความดันสูง

กระบวนการให้ความดันไอน้ำสูงเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ความร้อน (non-thermal process) ซึ่งสามารถใช้ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์โดยจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงสารอาหาร รสชาติ และลักษณะที่ปรากฏดั้งเดิมของอาหาร จากการศึกษาพบว่า กระบวนการให้ความดันสูง (high-pressure processing; HPP) มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม Cook (2003) ได้รายงานว่า การให้ความดันสูงที่ 300 MPa เป็นเวลา 180 วินาที เพียงพอที่จะทำให้ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมลดลงมากกว่า 5 log

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CFUต่อกรัม รวมถึง *V. parahaemolyticus* O3:K6 ในหอยนางรมด้วย Calik และคณะ (2002) พบว่าการให้ความดันสูงที่ 345 MPa เป็นเวลา 30 และ 90 วินาทีเป็นสภาพที่เหมาะสมในการทำให้เชื้อ *V. parahaemolyticus* บริสุทธิ์ลดลงจากจำนวน $7.6 \times 10^6 - 5.5 \times 10^8$ CFUต่อมิลลิกรัม และ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมลดลงจาก $8.4 \times 10^5 - 3.4 \times 10^7$ CFUต่อกรัม จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (< 10 CFUต่อมิลลิกรัม หรือ CFUต่อกรัม) เช่นเดียวกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิค่า การให้ความดันสูงจะทำให้หอยนางรมเปิดโดยการทำลายกล้ามเนื้อที่ยึดติดซึ่งหอยนางรมจำเป็นที่จะต้องปิดอยู่เพื่อป้องกันการหลุดออกมาของเนื้อหอยในระหว่างดำเนินการ He และคณะ (2002) ได้รายงานว่า การให้ความดันสูงที่ 240-275 MPa เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับ shucking Pacific oyster ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏเล็กน้อย ข้อเสียหลักของการให้ความดันสูงในการทำให้ *V. parahaemolyticus* ลดลงในหอยนางรมคือ ระบบความดันสูงจะใช้ต้นทุนสูงซึ่งไม่ถ่วงดุลกับผู้ผลิตหอยนางรมจะจัดหาเงินทุนมาได้

2.1.10.5 การใช้รังสี

การใช้รังสีเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ไม่อาศัยความร้อน แต่สามารถทำลายแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ จากการศึกษาพบว่า การใช้รังสีในปริมาณค่า (< 3 kGy) จะไม่สามารถฆ่าหอยนางรมหรือมีผลต่อคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของหอยนางรม Andrews และคณะ (2003) ได้รายงานว่าตามธรรมชาติในหอยนางรมจะมี *V. vulnificus* (3 logต่อกรัม) ซึ่งถูกทำให้ลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยการฉายรังสีแกมมา Cobalt 60 ที่ 0.75 kGy ในการเดิมเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 (10^4 cellต่อกรัม) ลงในหอยนางรมแล้วฉายรังสีที่ 1.0 - 1.5 kGy สามารถลดการปนเปื้อนลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ผู้ตรวจสอบสรุปว่า การฉายรังสีที่น้อยกว่า 2 kGy ในหอยนางรมจะมีอัตราการรอดสูงและไม่มีผลต่อคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส การวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้อาสาสมัคร 146 คน ซึ่งใช้การทดสอบเพื่อสืบหาความแตกต่าง (difference tests) พบว่าไม่สามารถแยกแยะหอยนางรมที่ฉายรังสีออกจากหอยนางรมที่ไม่ฉายรังสีได้ ถึงแม้ว่าการฉายรังสีจะมีประสิทธิภาพในการกำจัด *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม แต่ผู้บริโภคไม่ยอมรับอาหารที่ผ่านกัมมันตภาพรังสี และจำเป็นจะต้องทราบขีดจำกัดในการใช้วัสดุกัมมันตภาพรังสีเพื่อความปลอดภัย

2.2 การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (Heat Resistance)

การให้ความร้อนขึ้นในการสเตอริไลเซชันถูกใช้มาเป็นเวลาหลายปี ซึ่งพบว่าความร้อนจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจะทำให้เกิดการเสียสภาพ (denaturation) และเกิดการตกตะกอนของโปรตีน (coagulation) ทำให้ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) แตกหัก ทำให้อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) เกิดการชำรุด ทำลายเชื้อหิวโซโคพลาซิม และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ (Banwart, 1989)

การเสียดภาพหรือการตกตะกอนของโปรตีน จะเกี่ยวข้องกับการหายใจของเซลล์ หรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งจะเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายได้ ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการรั่วของเซลล์ โดยจะทำให้ห้องค้ประกอบภายในเซลล์รั่วออกมาซึ่งแสดงให้เห็นว่าเยื่อชั้นของเซลล์จะถูกทำลาย อย่างไรก็ตามพบว่าที่อุณหภูมิสูง เซลล์จะตายก่อนที่จะเกิดการรั่วของเซลล์ Scheie และ Ehrenspeck (1973) ได้เสนอว่าความร้อนจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียดภาพของโปรตีนในผนังเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการทำลายชั้นเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan layer) ซึ่งจะทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้พบว่าความเสียหายที่เกิดขึ้นยังจะเกิดจากแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ภายในเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์ถูกทำลายด้วย ดังนั้นจึงสามารถตั้งสมมติฐานได้ว่า การที่เซลล์ถูกทำลายด้วยความร้อนนั้น จะเกิดจากการเสียหายที่เยื่อหุ้มเซลล์ และการที่เซลล์ตายโดยเกิดจากการรั่วของเซลล์ที่อุณหภูมิสูงนั้น น่าจะเกิดจากกลไกอื่นที่เกี่ยวข้อง Russell และ Harries (1968) ได้รายงานว่าเซลล์ปกติ เช่น *E. coli* การทำลายอาร์เอ็นเอจะสัมพันธ์กับความร้อนที่ทำให้เซลล์ตาย ความร้อนของ *E. coli* จะถูกปล่อยออกมาจากเยื่อหุ้มภายนอก (outer membrane) ซึ่งจะส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ การซ่อมแซมทั้งส่วนของอาร์เอ็นเอและเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรายงานไว้ใน *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งพบว่าในช่วงเริ่มต้นของการเจริญนั้น จะเกิดการซ่อมแซมทั้งส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์และ RNA ที่ถูกทำลาย (Banwart, 1989)

เซลล์ปกติ (Vegetative cell) ของแบคทีเรีย รา และยีสต์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ 10-15 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาที่เหมาะสมพบว่าเซลล์จุลินทรีย์ รวมทั้งไวรัสจะถูกทำลายทั้งหมด บางครั้งอุณหภูมิสูงจะสามารถทำลายจุลินทรีย์พวก thermophilic หรือ thermoduric เซลล์ปกติจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ณ เวลา 10 นาที ในส่วนของการให้ความร้อนแก่สปอร์ที่อุณหภูมิ 70-100 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดความเสียหายแก่กรดดิพิโคลินิก (dipicolinic acid; DPA) โปรตีน และองค์ประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มสปอร์ มีรายงานว่าความตายของสปอร์จะเร็วกว่าการปลดปล่อยของ DPA การตายของสปอร์จะเกิดระหว่างที่มีการงอกของสปอร์หรือหลังจากที่สปอร์งอกแล้ว มีรายงานว่าในช่วงแรกของการให้ความร้อนแก่สปอร์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี และจะเกิดการสอดแทรกของน้ำไปยังส่วนกลางของสปอร์ระหว่างเกิดการงอก และยังมีรายงานว่าองค์ประกอบของสปอร์จะเป็นตัวกำหนดบริเวณที่เกิดความเสียหายของสปอร์ นอกจากนี้สปอร์ของ *Byssochlamys fulva* สามารถรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง สปอร์ของแบคทีเรียจะมีการต้านทานความร้อนสูงสุด โดยพบว่าสปอร์ของ *Bacillus stearothermophilus* ที่มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 ถึง 10^6 สปอร์ต่อกรัม สามารถรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลามากกว่า 20 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเรื่องนี้จะมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง เนื่องจากการต้านทานความร้อนสูง และพบว่าเรื่องนี้จะทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารกระป๋องประเภทที่มีกรดต่ำ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีรายงานการยับยั้งด้วยความร้อนของฟาจ (phage) และไวรัสจะเกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งการตกตะกอนของโปรตีนจะมีความสำคัญต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน ซึ่งการเสถียรภาพของโปรตีนจะเกิดขึ้นในหลายบริเวณของเซลล์หรือโปรตีน (Banwart, 1989)

การให้ความร้อนแบบเปียก เช่นการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ สามารถทำลายจุลินทรีย์โดยการทำให้กรคนิวคลีอิก โปรตีน และเอนไซม์เสถียรภาพ การที่ตีเอ็นเอถูกทำให้เสถียรภาพอาจเป็นข้อดีในการทำให้เซลล์ปกติตาย ในส่วนของสปอร์นั้นช่วงการงอกของสปอร์ เช่น ช่วงที่ไวต่อความร้อนมากที่สุด ระหว่างการให้ความร้อนที่ไม่สูงมากนัก ผนังเซลล์ของไซโคพลาสมิกที่เป็นส่วนหลักจะถูกทำให้บวมเป่ง การให้ความร้อนแบบแห้งจะทำให้จุลินทรีย์ตายน้อยกว่าการให้ความร้อนแบบเปียก โดยการให้ความร้อนแบบแห้งจะทำลายจุลินทรีย์โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และการออกซิเดชัน การให้ความร้อนแบบแห้งจำเป็นที่จะต้องใช้อุณหภูมิสูงและเวลานาน ในการที่จะทำให้เซลล์ตายได้เท่ากับการให้ความร้อนแบบเปียก (Montville, 2005)

จำนวนแบคทีเรียที่ตาย โดยดูจากลอการิทึมของจุดนาตรศรของอุณหภูมิคงที่ในการให้ความร้อน ซึ่งในเวลาเท่ากันในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่ไรทำลายจะมีเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียเท่ากัน ถ้าไม่คำนึงถึงจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น ตัวอย่าง เช่น ถ้ามีแบคทีเรียไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จะสามารถทำลายแบคทีเรียได้ร้อยละ 90 ที่ 10 นาที จะทำลายแบคทีเรียได้ร้อยละ 99 และที่ 15 นาที จะทำลายแบคทีเรียได้ร้อยละ 99.9 ตามทฤษฎีแล้วจำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกทำลายไม่สามารถถูกทำลายได้ถึงร้อยละ 100 อีกทางหนึ่งถ้าดูจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น โดยให้มีเท่ากับ 10,000 เซลล์หลังจากให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาทีจะทำให้เซลล์ลดลงเหลือ 1,000 เซลล์เช่นเดียวกันถ้าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10,000,000 เซลล์หลังจากให้ความร้อนจะมีแบคทีเรีย 1,000,000 เซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ (Montville, 2005)

การให้ความร้อนเป็นเวลานานในการถนอมอาหาร เป็นการพาสเจอร์ไรส์หรือการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ทางการค้า หรือเป็นการเตรียมอาหารสำหรับบริโภค โดยทั่วไปวัตถุประสงค์ของกระบวนการให้ความร้อนเป็นการหยุดกิจกรรมของเซลล์ปกติ เอนโดสปอร์ และ/หรือเอนไซม์ และเน้นการลดโอกาสในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญขึ้นอย่างทวีคูณในอาหารเฉพาะอย่าง อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่มีการหยุดกิจกรรมอย่างสมบูรณ์โดยวิธีการตรง และ/หรือทางอ้อม ก็ทำให้องค์ประกอบหลักถูกทำลาย เช่น เอนไซม์ และดีเอ็นเอ ในทางกลับกันการหยุดกิจกรรมอาจเป็นผลมาจากการบวมเป่งโดยองค์ประกอบของเซลล์ที่ไม่ใช่ส่วนหลักถูกทำลาย ผลรวมของจำนวนส่วนประกอบเป้าหมายที่มีการบวมเป่งลดลงจนกระทั่งเซลล์เจริญในสภาวะเครียดที่ระยะเวลาไม่นานพอเป็นไปไม่ได้ที่จะไม่มีการซ่อมแซมตัวเอง หรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ หรือตำแหน่ง เกิดการหยุดกิจกรรมของเซลล์ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วน โดยตรงกับผลรวมของเซลล์ที่ถูกทำลาย ผลจากการให้ความร้อนที่ทำให้ความหนาแน่นของจำนวนแบคทีเรียถูกอธิบายด้วยกราฟอัตรการเจริญของเซลล์ที่รอดชีวิต และอธิบายในส่วนของการสังเกตจุดนาตรศรของเซลล์ที่หยุดกิจกรรม โดยทั่วไปเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเซลล์ปกติที่สามารถเจริญเติบโตได้ในการให้ความร้อนลักษณะเดียวกัน อาหารชนิดเดียวกัน จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆตามเวลาที่เพิ่มขึ้น อัตราในการหยุดกิจกรรมของเซลล์ถูกรายงานใน รูปแบบของค่า Decimal reduction time (D value) โดยได้จากความชันของกราฟจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต หรือเวลาที่ทำให้จุลินทรีย์ลดลง 1 log cycle นำอุณหภูมิที่ใช้ในการหาค่า D value มาเขียนกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างค่า D กับอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อน ในการหยุดกิจกรรมจะได้ค่า Z_0 -value จากความชัน หรือการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ทำให้ค่า D value ลดลง 10 เท่า (Sofos, 2005)

2.2.1 ความสัมพันธ์ของการด้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปการด้านทานความร้อนของจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์พวกไซโครไฟล์ (psychrophile) จะมีความไวต่อความร้อนสูงสุด รองลงมาได้แก่พวกมีโซไฟล์ (mesophile) และเทอร์โมไฟล์ (thermophile) แบคทีเรียที่สร้างสปอร์จะมีการด้านทานความร้อนสูงกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ และโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียพวกเทอร์โมไฟล์ที่สร้างสปอร์จะมีการด้านทานความร้อนสูงกว่าแบคทีเรียพวกมีโซไฟล์ที่สร้างสปอร์ และพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะมีการด้านทานความร้อนสูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียรูปกลม (cocci) จะมีการด้านทานความร้อนสูงกว่าแบคทีเรียรูปท่อน อีสค์และราจะค่อนข้างไวต่อความร้อน แอสโคสปอร์ของอีสค์จะมีการด้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์ของอีสค์เพียงเล็กน้อย สปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ของราจะมีการด้านทานความร้อนสูงกว่าไมซีเทียมของราเพียงเล็กน้อย (Banwart, 1989)

2.2.2 การหา Thermal Death time

Thermal Death time (TDT) เป็นเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่ง ในอุณหภูมิที่กำหนด ซึ่งวิธีนี้จะใช้อุณหภูมิที่คงที่ เมื่อหาเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีค่า Thermal Death point (TDP) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งในเวลา 10 นาที (Jay, 2000)

การหาค่า TDT ทำได้หลายวิธี ทั้งวิธี tube, can, tank, flask, thermoresismeter, unsealed tube และ capillary tube (Jay, 2000) การหาค่า TDT โดยมีวิธีการดังนี้ (Jay, 2005; สุมาลี, 2541)

1. การเตรียมเซลล์หรือสปอร์ นำเซลล์หรือสปอร์ ซึ่งเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม มาใส่ในอาหารเหลวหรือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (buffer phosphate solution) ทำการตรวจนับจำนวนโดยวิธี counting chamber method หรือ viable count แล้วใช้ปิเปตดูดใส่ลงในหลอดแก้วหลายหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดแก้วให้สนิท (Jay, 2005; สุมาลี, 2541)

2. การให้ความร้อน นำหลอดเชื้อที่เตรียมไว้มาใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ทำการจับเวลาเมื่ออุณหภูมิภายในหลอดเท่ากับอุณหภูมิในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำหลอดออกมาในระยะเวลาต่างๆกัน โดยหลอดที่นำออกมาต้องทำให้เย็นทันที โดยแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง ทำการตรวจหาจำนวนเซลล์หรือสปอร์ที่ยังเหลืออยู่ จนกระทั่งตรวจไม่พบการเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

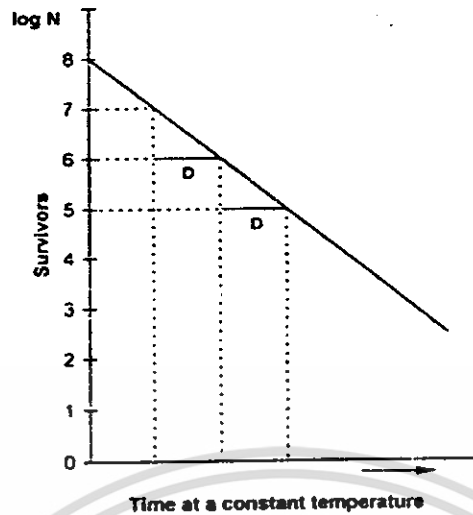
เลี้ยงเชื้อจึงหยุดการทดลอง (Jay, 2005; สุมาลี, 2541)

3. การตรวจหาจุลินทรีย์ ในการตรวจหาจุลินทรีย์ที่ยังเหลืออยู่หลังจากการให้ความร้อน ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เนื่องจากเซลล์หรือสปอร์ที่ผ่านการให้ความร้อนอย่างมากจะต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อการเติบโตมากขึ้น หลังจากให้ความร้อนแก่เชื้อในอ่างน้ำควบคุม อุณหภูมิ (water bath) แล้วจึงนำหลอดเชื้อออกจากอ่างน้ำดังกล่าว ไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อตรวจหาเซลล์หรือสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ หรือจะทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังคงเหลืออยู่โดยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อไป (Jay, 2005; สุมาลี, 2541)

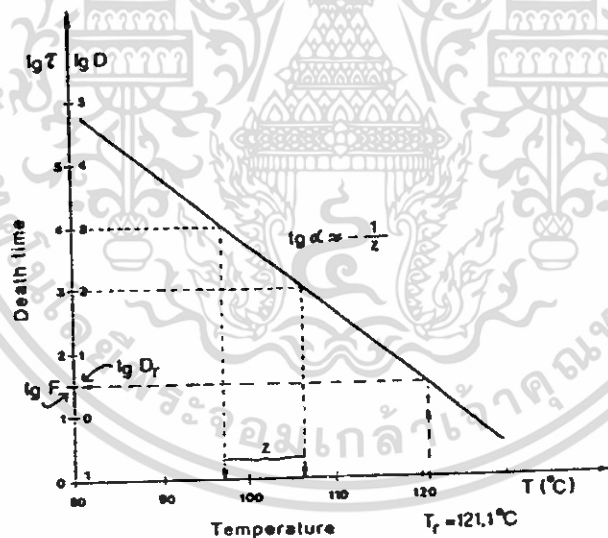
โดยปกติแล้วในการหาค่า TDT จะทำได้โดยการนำเซลล์หรือสปอร์ที่ทราบจำนวนใส่ลงในหลอดอาหารเพื่อจะได้ทราบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต นำหลอดเชื้อมาใส่ใน oil bath หรือให้ความร้อนตามระยะเวลาที่ต้องการ เมื่อครบเวลาให้นำหลอดเชื้อออกมาแล้วทำให้เย็นทันทีโดยใช้น้ำเย็น หลังจากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม แล้วจึงตรวจนับจำนวนเซลล์หรือสปอร์ที่เหลืออยู่ (Jay, 2000)

2.2.3 D value และ Z value

เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตกับเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (รูปที่ 4) ณ อุณหภูมิระดับหนึ่ง จะทำให้หาเวลาที่ใช้ในการทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลง 10 เท่า (หรือร้อยละ 90) ค่านี้เรียกว่า D value หรือ decimal reduction value โดยค่า D value เป็นค่าที่แสดงถึงเวลาที่ต้องการในการทำลายจุลินทรีย์ไปร้อยละ 90 (1 log unit) ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งกราฟดังกล่าวก็คือ Survival curve (กราฟการรอดชีวิต) จะแสดงถึงอัตราการตายของชนิดจุลินทรีย์ที่ศึกษาในอาหารหรือสารแขวนลอยเฉพาะที่อุณหภูมิเฉพาะระดับหนึ่งภายใต้สภาวะที่ศึกษาอัตราการตายของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำระดับหนึ่งจะคงที่ และไม่ขึ้นกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น และถ้านำค่า log ของ D values มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่ให้ความร้อน จะได้กราฟ thermal death time (รูปที่ 5) ค่า thermal death time เป็นเวลาที่จะต้องใช้ในการทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งที่อุณหภูมิหนึ่ง อย่างไรก็ตามในกระบวนการให้ความร้อนนั้น จุลินทรีย์จะถูกทำลายที่หลายระดับอุณหภูมิ โดยในกระบวนการผลิตนั้นความร้อนของอาหารเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงอุณหภูมิของการแปรรูป และคงไว้ที่อุณหภูมิระดับนั้นจนครบเวลาจึงทำให้เย็น ที่อุณหภูมิสูงจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ดี (ค่า D น้อย) กว่าที่อุณหภูมิต่ำ กราฟ thermal death time แสดงถึงว่าการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างไร ที่อุณหภูมิของการให้ความร้อนต่างกัน ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณการตายของจุลินทรีย์ในแต่ละกระบวนการของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับหนึ่งร่วมกับเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (Montville, 2005)



รูปที่ 4 กราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Survival curve) อัตราการตายของชนิดจุลินทรีย์ที่ศึกษา ในอาหาร หรือสารแขวนลอยเฉพาะที่อุณหภูมิเฉพาะระดับหนึ่ง ภายใต้สภาวะที่ศึกษา
ที่มา : Montville และ Matthews (2005)



รูปที่ 5 กราฟ thermal death time ของจุลินทรีย์
ที่มา : Montville และ Matthews (2005)

ค่า Z value จะแสดงถึงการตายของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิได้อย่างไร ค่า Z คืออุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้นต่อการลดลงของ D value 10 เท่า จากกราฟค่า Z value จะเท่ากับความชัน (slope) ของกราฟ thermal death time ค่า Z value สามารถคำนวณได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$t_2 = t_1 \times 10^{(T_1 - T_2)/z}$$

เมื่อ T_1 คือ อุณหภูมิที่ระดับสูงของ 2 อุณหภูมิ โดยที่ค่า D value เท่ากับ t_1

T_2 คือ อุณหภูมิที่ระดับต่ำ โดยที่ค่า D value เท่ากับ t_2

Z คือ อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะทำให้ค่า D value ลดลง 10 เท่า เช่น ถ้า D value ที่อุณหภูมิ 250 องศาฟาเรนไฮด์ เป็น 2 นาที แล้วค่า Z value เป็น 18 องศาฟาเรนไฮด์ ดังนั้นค่า D value ที่อุณหภูมิ 232 องศาฟาเรนไฮด์ เป็น 20 นาที โดยอุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลง 18 องศาฟาเรนไฮด์ เพื่อให้ค่า D เปลี่ยน 10 เท่า (Montville และ Matthews, 2005)

การคำนวณหาความร้อน (D value) และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Z value) ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน มีความแตกต่างกันระหว่างสปิซิส สายพันธุ์ที่อยู่ในสปิซิสเดียวกัน รวมถึงในสปอร์และในเซลล์ปกติ สปอร์ของแบคทีเรียจะมีการคำนวณหาความร้อนสูงกว่าเซลล์ปกติที่อยู่ในสปิซิสเดียวกัน สปอร์บางชนิดสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหลายนาที และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหลายชั่วโมง การคำนวณหาความร้อนของสปอร์ต่ำสุด ($D_{100^\circ\text{C}}$) อยู่ที่น้อยกว่า 1 นาที แต่ในเซลล์ปกติของแบคทีเรีย ยีสต์และรา มีค่า D value น้อยกว่า 0.1 นาทีที่อุณหภูมิ 70 ถึง 80 องศาเซลเซียส (Montville, 2005)

อายุของเซลล์ ช่วงระยะเวลาในการเจริญ อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเจริญ และสภาพของเซลล์ จะมีผลต่อการคำนวณหาความร้อนของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ซึ่งต่างจากค่าคงที่ทางเคมี เช่น pK_a หรือน้ำหนักโมเลกุล โดยค่า D และ Z value จะขึ้นอยู่กับค่าเหล่านี้ที่เหมาะสม เนื่องจากค่า D และ Z value ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ดังนั้นการหาค่านี้จึงควรหาในสถานะหนึ่งๆ เท่านั้น (Montville, 2005)

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการคำนวณหาความร้อนของจุลินทรีย์

2.2.4.1 น้ำ

การคำนวณหาความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์จะสูงขึ้นเมื่อความชื้น ปริมาณน้ำหรือปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_w) ลดลงเช่น สปอร์ของ *Bacillus cereus* เมื่ออยู่ในสภาพที่มี a_w 1.00 และมีพีเอช 6.5 จะมีค่า $D_{95^\circ\text{C}}$ เป็น 2.386 นาที ขณะที่ที่ a_w 0.86 จะมีค่า $D_{95^\circ\text{C}}$ เป็น 13.842 นาที (ตารางที่ 2) เมื่อนำเซลล์แห้งใส่ในหลอดทดลองแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อน พบว่าจะมีการคำนวณหาความร้อนสูงกว่าเซลล์เปียก เนื่องจากการเสียดสภาพของโปรตีนจะเกิดขึ้นได้เร็ว ในสภาพที่มีน้ำมากกว่าในอากาศ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสียดสภาพของโปรตีนอาจเป็นกลไกที่ทำให้เซลล์ตาย หรือเป็นสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ การที่น้ำช่วยให้โปรตีนเสียดสภาพได้ง่ายนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน แต่ได้มีการชี้ให้เห็นว่าการให้ความร้อนโปรตีนในสภาพที่มีน้ำเป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างหมู่-SH อิสระ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับน้ำของโปรตีน การที่มีน้ำ

จะช่วยให้ความร้อนแตกสลายพันธะเปปไทด์ โดยกระบวนการนี้ต้องการพลังงานมาก ซึ่งผลที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการต้านทานความร้อนได้ดี (Jay และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และพีเอชที่มีผลต่อค่า D value ของสปอร์ของ *Bacillus cereus*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)	D value (นาที)		
		พีเอช 6.5	พีเอช 5.5	พีเอช 4.5
95	1.00	2.386	1.040	0.511
95	0.95	5.010	2.848	1.409
95	0.86	13.842	14.513	7.776
85	1.00	63.398	13.085	5.042
85	0.86	68.909	91.540	33.910

ที่มา : Jay และคณะ (2005)

2.2.4.2 ไขมัน

การต้านทานความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์จะสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพที่มีไขมัน ซึ่งการป้องกันของไขมันช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีผลต่อความชื้นของเซลล์โดยตรง มีรายงานกรดไขมันสายยาวมีผลช่วยป้องกันเซลล์ของ *Clostridium botulinum* ต่อความร้อนและกรดไขมันสายยาวช่วยให้เซลล์ต้านทานความร้อนได้ดีกว่ากรดไขมันสายสั้น (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.3 เกลือ

ผลของเกลือต่อการต้านทานความร้อนเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือ ความเข้มข้นที่ใช้ และปัจจัยอื่นๆ เกลือบางชนิดมีผลป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่เกลือบางชนิดมีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์มีความไวต่อความร้อนมากขึ้น เกลือบางชนิดอาจช่วยลดปริมาณน้ำอิสระ ดังนั้นจึงมีการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น โดยกลไกที่เหมือนกับการทำแห้ง ขณะที่เกลือบางชนิดอาจช่วยเพิ่มปริมาณน้ำอิสระ เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} ดังนั้นจึงทำให้ไวต่อความร้อนมากขึ้น เห็นได้จากการเติม $CaCl_2$ ลงในอาหารเลี้ยงสปอร์ของ *Bacillus megaterium* ทำให้สปอร์มีการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น ขณะที่การเติมแอล-กลูตาเมต (*L-glutamate*), แอล-โพรลีน (*L-proline*) หรือฟอสเฟตลงไป ทำให้การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ลดลง (Jay และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.4 คาร์โบไฮเดรต

การที่มีน้ำตาลในอาหารจะทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นทนต่อความร้อนได้มากขึ้น ซึ่งผลต่อการต้านทานความร้อนนี้บางส่วนเนื่องมาจากการลดลงของปริมาณน้ำอิสระที่มีสาเหตุจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง ซึ่งมีความแปรผันเกี่ยวข้องกับชนิดของน้ำตาลและแอลกอฮอล์ซึ่งสัมพันธ์กับผลการต้านทานความร้อน (ตารางที่ 3 ค่า D value ของ *Salmonella* Senftenberg 775W) ในสภาพที่มีค่า a_w ระดับเดียวกันจากการใช้กลีเซอรอลและซูโครส พบว่าจุลินทรีย์มีความไวต่อความร้อนแตกต่างกันมาก มีรายงานว่าซูโครสช่วยเพิ่มความต้านทานต่อความร้อนของ *Salmonella* Senftenberg มากกว่าคาร์โบไฮเดรตอีก 4 ชนิดที่ทำการทดสอบ ซึ่งสามารถเรียงลำดับคาร์โบไฮเดรตทั้ง 5 ชนิด จากมากไปน้อยได้คือ ซูโครส > กลูโคส > ซอร์บิทอล > ฟรุคโตส > กลีเซอรอล (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.5 พีเอช

จุลินทรีย์มีการต้านทานความร้อนสูงสุดในสภาพที่มีพีเอชเหมาะสมต่อการเจริญ โดยทั่วไปนั้นอยู่ที่พีเอช 7.0 การที่มีพีเอชต่ำหรือสูงกว่าค่าที่เหมาะสมทำให้ความไวต่อความร้อนสูงขึ้น (ตารางที่ 2) ซึ่งข้อเท็จจริงนี้จะมีประโยชน์ต่อกระบวนการให้ความร้อนแก่อาหารที่มีกรดสูง โดยพบว่า การให้ความร้อนในการสเตอริไลซ์จะต่ำกว่าการให้ความร้อนอาหารที่มีพีเอชใกล้เคียงกลาง การพาสเจอร์ไรส์ไข่ขาวเป็นตัวอย่างของอาหารที่เป็นค่า ซึ่งต้องทำให้เป็นกลางก่อนการให้ความร้อน ในทางปฏิบัติจะไม่ทำกับอาหารชนิดอื่น ไข่ขาวมีพีเอช 9.0 ซึ่งเมื่อนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 60-62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5-4 นาที จะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งจะให้ความหนืดเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลต่อปริมาตรและเนื้อสัมผัสของเค้กที่ทำจากไข่ขาวพาสเจอร์ไรส์นี้ มีรายงานว่าอาจทำการพาสเจอร์ไรส์ไข่ขาวด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการพาสเจอร์ไรส์ไข่ขาวทั้งฟองเมื่อพีเอชลดลงมาถึง 7.0 การลดลงของพีเอช ทำให้ทั้งจุลินทรีย์และโปรตีนของไข่ขาวมีความเสถียรต่อความร้อนมากขึ้น การเติมเกลือของธาตุเหล็กหรืออลูมิเนียมลงไปจะช่วยเพิ่มความคงตัวของโปรตีน conalbumin ของไข่ที่ไวต่อความร้อนมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 60-62 องศาเซลเซียส แบบที่เรียกอยู่ในไข่ขาวที่มีพีเอช 5.4-5.6 จะมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าที่อยู่ในพีเอช 8.0-8.5 (ตารางที่ 3) ซึ่งต่างกับการต้านทานความร้อนในอาหารชนิดอื่น สิ่งนี้เป็นจริงเมื่อทำการปรับพีเอชให้มีสภาพเป็นกรดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เมื่อใช้กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก หรือกรดแลคติกในการปรับพีเอชให้มีสภาพเป็นกรด จะทำให้การต้านทานความร้อนลดลง (Jay และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3 รายงานค่า D value ของ *Salmonella* Senftenberg 775W

อุณหภูมิ (°C)	D values	สภาวะ
61	1.1 นาที	ไข่ทั้งฟอง
61	1.19 นาที	Tryptose broth
60	9.5 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 5.5
60	9.0 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 6.5
60	4.6 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 7.4
60	0.36 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 8.5
65.6	34-35.3 วินาที	นม
71.7	1.2 วินาที	นม
70	360-480 นาที	นมช็อกโกแลต
55	4.8 นาที	Trypticase soy broth, ระยะลือก เจริญที่ 35°C
55	12.5 นาที	Trypticase soy broth, ระยะลือก เจริญที่ 44°C
55	14.6 นาที	Trypticase soy broth, ระยะสเตรชันนารี เจริญที่ 35°C
55	42.0 นาที	Trypticase soy broth, ระยะสเตรชันนารี เจริญที่ 44°C
57.2	13.5 นาที	a_w 0.99 (4.9% กลีเซอรอล) พีเอช 6.9
57.2	31.5 นาที	a_w 0.90 (33.9% กลีเซอรอล) พีเอช 6.9
57.2	14.5 นาที	a_w 0.99 (15.4% ซูโครส) พีเอช 6.9
57.2	62.0 นาที	a_w 0.90 (58.6% ซูโครส) พีเอช 6.9
60	0.2-6.5 นาที	Heart infusion broth พีเอช 7.4
60	2.5 นาที	a_w 0.90, Heart infusion broth, กลีเซอรอล
60	75.2 นาที	a_w 0.90, Heart infusion broth, ซูโครส
65	0.29 นาที	0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 6.5
65	0.8 นาที	30% ซูโครส
65	43.0 นาที	70% ซูโครส
65	2.0 นาที	30% กวโคส
65	17.0 นาที	70% กวโคส
65	0.95 นาที	30% กลีเซอรอล
65	0.70 นาที	70% กลีเซอรอล
55	35 นาที	a_w 0.997, Tryptone soya agar, พีเอช 7.2

ที่มา : Jay และคณะ (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.6 โพรตีนและสารประกอบอื่นๆ

โพรตีนในอาหารที่ให้ความร้อนจะช่วยป้องกันจุลินทรีย์ ดังนั้นอาหารที่มีปริมาณโพรตีนสูงจะต้องให้ความร้อนสูงกว่าอาหารที่มีปริมาณโพรตีนต่ำจึงจะทำให้มีผลสุดท้ายเหมือนกัน สำหรับจำนวนจุลินทรีย์ที่เท่ากันการมีอนุภาคที่มีขนาดเท่ากับอนุภาคคอลลอยด์ในอาหารที่จะให้ความร้อนจะช่วยป้องกันเซลล์ต่อความร้อน เช่น ในสภาพที่มีทีเอชจำนวนจุลินทรีย์และอื่นๆ ที่เหมือนกันจะใช้เวลาในการสเตอริไลต์ pea purée นานกว่าอาหาร nutrient broth (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.7 จำนวนจุลินทรีย์

ถ้ามีจำนวนจุลินทรีย์มากการต้านทานความร้อนจะสูงด้วย (ตารางที่ 4) โดยมีผู้เสนอว่ากลไกป้องกันความร้อนของจุลินทรีย์จำนวนมากเนื่องมาจากการสร้างสารป้องกันที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีการตรวจยืนยันหาสารประกอบนั้น เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่าโพรตีนจะมีผลป้องกันต่อความร้อน พบว่าสารประกอบภายนอกของเซลล์ ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าโพรตีนช่วยป้องกันเซลล์ต่อความร้อนได้ ดังนั้นสารประกอบที่ปล่อยออกภายนอกเซลล์ซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อคาดว่าเป็นโพรตีนจะนั่นจึงช่วยป้องกันเซลล์ บางครั้งการต้านทานความร้อนที่สูงของเซลล์จำนวนมากจะสำคัญเท่ากับการต้านทานความร้อนของเซลล์จำนวนน้อย เนื่องจากเป็นไปได้ที่ในธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อความร้อนได้ในระดับต่างกันอยู่ปะปนกัน (Jay และคณะ, 2005)

ตารางที่ 4 ผลของจำนวนสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ที่มีต่อค่า Thermal death time ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

จำนวนสปอร์	Thermal death time (นาที)
72,000,000,000	240
1,640,000,000	125
32,000,000	110
650,000	85
16,400	50
328	40

ที่มา : Jay และคณะ (2005)

2.2.4.8 อายุของเซลล์

เซลล์แบคทีเรียมีแนวโน้มต้านทานความร้อนได้สูงสุดในระยะสแตชันนารี (เซลล์แก่) และต้านทานความร้อนได้น้อยในระยะล็อก (logarithmic phase) ซึ่งเป็นจริงในเชื้อ *S. Senftenberg* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ตารางที่ 3) โดยเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้ในระยะสแตนด์นารีสามารถต้านทานความร้อนได้มากกว่าเซลล์ในระยะลือกหลายเท่า อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าเซลล์ในช่วงเริ่มต้นของระยะแล็กด้านทานความร้อนได้สูง แต่การต้านทานความร้อนลดลงต่ำสุดเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะลือก และมีรายงานว่าสปอร์ของแบคทีเรียที่แก่มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าสปอร์ที่อ่อน กลไกการต้านทานความร้อนที่สูงขึ้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความแอกทีฟน้อยนั้นซับซ้อนมาก และยังไม่เข้าใจอย่างแน่ชัด (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.9 อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ

การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น สิ่งนี้เป็นจริงโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ได้ ถึงแม้ว่ากลไกที่เกิดขึ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็เป็นไปได้ว่าการคัดเลือกทางพันธุกรรมมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้ดี มีรายงานว่า S. Senftenberg ที่เจริญที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 เท่า (ตารางที่ 3) (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.10 สารยับยั้งการเจริญ

การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะลดลง เมื่อให้ความร้อนในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะที่ทนความร้อน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น มีรายงานว่าการใช้ความร้อนร่วมกับสารปฏิชีวนะหรือการใช้ความร้อนร่วมกับไนโตรดิมิประสิทธิภาพในการควบคุมการเสียบของอาหาร ได้ดีกว่าการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว การเติมสารยับยั้งลงไป ในอาหารก่อนที่จะนำไปให้ความร้อนจะช่วยลดปริมาณความร้อนที่ใช้หลังจากที่จะต้องใช้เมื่อให้ความร้อนเพียงอย่างเดียว (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.11 เวลาและอุณหภูมิ

จากการที่คาดว่า การให้ความร้อนเป็นเวลานานจะมีผลทำลายจุลินทรีย์ได้คิ้นนั้นก็มักเป็นสิ่งที่ เป็นจริงบ่อยครั้ง แต่กฎพื้นฐานนี้ก็มิข้อยกเว้น อย่างไรก็ตามกฎที่เชื่อถือได้มากกว่าก็คือยิ่งให้ ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมากขึ้นเท่าใดก็จะมีผลทำลายจุลินทรีย์ได้คิ้นมากขึ้นเท่านั้น (ตารางที่ 5) ในกรณีของสปอร์ของแบคทีเรียถ้าอุณหภูมิที่ให้ความร้อนเพิ่มสูงขึ้น จะใช้เวลาลดลงเพื่อให้ได้ผลที่ เหมือนกัน จากหลักการนี้พบว่า ผลของความร้อนจะเกิดขึ้นทันทีทันใด และไม่มีสิ่งใดมาขัดขวาง ขนาดของภาชนะหรือภาชนะบรรจุ และชนิดของภาชนะบรรจุ (แก้ว เหล็ก พลาสติก) ที่ใช้บรรจุถึง ที่จะให้ความร้อนก็มีความสำคัญ อาหารที่บรรจุในภาชนะขนาดใหญ่จะใช้เวลาในการพาสเจอไรส์ หรือสเตอริไลส์นานกว่าอาหารที่บรรจุอยู่ในภาชนะขนาดเล็ก เช่นเดียวกับภาชนะที่มีผนังซึ่งการนำ ความร้อนจะไม่คิ (Jay และคณะ, 2005)

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่า Thermal death time ของสปอร์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	<i>Clostridium botulinum</i> (สปอร์แขวนลอยจำนวน 6.0×10^{13} สปอร์ในบัฟเฟอร์พีเอช 7)	จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง(thermophile) (1.5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำข้าวโพดที่พีเอช 6.1)
100	260 นาที	1,140 นาที
105	120 นาที	-
110	36 นาที	180 นาที
115	12 นาที	60 นาที
120	5 นาที	17 นาที

ที่มา : Jay และคณะ (2005)

2.2.4.12 ผลของอุลตราโซนิก (Ultrasonics)

เอนโคสปอร์ของแบคทีเรียที่ผ่านอุลตราโซนิก ก่อนที่จะนำไปให้ความร้อน หรือระหว่างการให้ความร้อน มีผลทำให้สปอร์ต้านทานความร้อนได้ไม่ดี (Jay และคณะ, 2005)

2.2.4.13 ชนิดของเซลล์จุลินทรีย์

สปอร์มีความต้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์ปกติประมาณ 10^4 - 10^7 เท่า ถึงแม้จะมีหลายทฤษฎีที่กล่าวถึงการต้านทานความร้อนได้ดีของสปอร์ แต่กลไกการต้านทานความร้อนที่แท้จริงก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้วิธีการสร้างสปอร์ก็อาจมีผลต่อการต้านทานความร้อนของสปอร์ได้ แอสโคสปอร์ของยีสต์มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์ปกติ 30 ถึง 350 เท่า หรือ 100 เท่า (Banwart, 1989)

2.2.4.14 การเจริญในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ (Sporulation medium)

มีรายงานว่า ไอออนของแคลเซียมและแมงกานีสในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ทำให้การต้านทานความร้อนของสปอร์เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบหลักฐานที่แน่นอนที่แสดงถึงการที่ไอออนโมโนวาเลนต์ช่วยเพิ่มคุณสมบัติการทนความร้อนของสปอร์ และไม่พบว่าการเติมไอออนของแมงกานีสในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ของ *Bacillus stearothermophilus* ช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อน และยังมียางานอีกว่าพีเอชของอาหารชักนำการสร้างสปอร์มีผลต่อการต้านทานความร้อนของสปอร์ ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ชนิดของเปปโตน แหล่งคาร์บอน และกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อยังส่งผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ และพบว่าสปอร์ที่เลี้ยงในอาหาร cooked meat medium มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในเนื้อดิบ มีรายงานว่า โคนิเดียมของ *Aspergillus* ที่เจริญในอาหารที่มีโปรตีนต่ำ และมีกลูโคสสูง มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเมื่อเจริญในอาหารที่มีโปรตีนสูงแต่มีกลูโคสต่ำ และมีรายงานว่า แคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อชักนำการต้านทานความร้อนของ *E. coli* (Banwart, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 การต้านทานต่อความร้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 5 นาที แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและ 100 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 1 นาที สามารถทำลาย *V. parahaemolyticus* ได้ จากรายงานพบว่าอาหารทะเลที่ทำให้ร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สามารถฆ่าเชื้อนี้ได้ มีรายงานว่าค่า D_{47C} ของ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วง 0.8-65.1 นาที (สุริย์, 2549) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาค่า D value ของ *V. parahaemolyticus* ในหอยกาบสด ที่อุณหภูมิ 49-55 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ช่วงของค่า D value อยู่ระหว่าง 0.03 ถึง 0.21 นาที (Banwart, 1989) ถึงแม้ว่าโดยปกติ *V. parahaemolyticus* ไม่ทนต่อความเย็น และมีรายงานที่ไม่เห็นด้วยโดยพบว่าในอาหารแช่แข็งที่อุณหภูมิ -2 ถึง 30 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* มีความทนทานมากกว่าในอาหารแช่เย็นที่อุณหภูมิ 1 ถึง 7 องศาเซลเซียส ซึ่งมีรายงานสนับสนุนการเก็บรักษา *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีผู้ที่ศึกษาเกี่ยวกับการมีชีวิตอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลพบว่า *V. parahaemolyticus* ที่พบในสัตว์มีเปลือกไม่ทนต่อความร้อน แต่บางครั้งทนต่อความเย็น โดยนำเอาเนื้อกุ้งมาทดลองปลูกเชื้อ (inoculate) *V. parahaemolyticus* ลงไป 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ถูกทำลายทั้งหมดด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส 80 องศาเซลเซียส และ 100 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1 นาที แต่ถ้าปลูกเชื้อปริมาณ 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีบางเซลล์สามารถรอดชีวิตอยู่ได้หลังจากให้ความร้อน 60-80 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 15 นาที นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์หนึ่งมีจำนวน 500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในกุ้งสดถูกทำลายหมดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใน 1 นาที แต่ถ้ามีจำนวนเซลล์มากขึ้นถึง 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การทำลายเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะทำให้มีบางเซลล์ที่อยู่รอดได้ (Jay, 2005) และมีผู้ศึกษาว่า *V. parahaemolyticus* ถูกทำลายด้วยกรดมะนาว (citric acid) พีเอช 4.4 ในเวลาเพียง 30 นาที (ศรีวรรณ, 2548)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัสดุคืบ

วัสดุคืบที่ใช้ในการทดลองได้แก่ กุ้ง หอยนางรม หอยแมลงภู่ ปลา ปลาหมึก จำนวน อย่างละ 10 ตัวอย่าง ได้จากตลาดบางคอกแหลม ตลาดมินบุรี ตลาดศศพัฒนาการ ตลาดเข้มเจริญ-รัตน ตลาดตลาดปลาเค้า ตลาดสายหยุด ตลาดสุทธิสาร ตลาดใหม่คอนเมือง ตลาดอุดมผล และ ตลาดเอี่ยมสมบัติ ในเขตกรุงเทพมหานคร

3.1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar, Trypticase Soy Broth (TSB), Phosphate-Buffered Saline (PBS), Alkaline Peptone Water (APW), Triple Sugar Iron (TSI) Agar, Lysine Indole Motility (LIM) Medium, Tryptone Broth, Urea Broth และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.1.4 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ไดโซเดียมไฮโครเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4 , anhydrous) โพแทสเซียมไดโซโครเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine.2HCL ฟีนอลเรด (Phenol red) ไฮโครเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) สารละลายลูกอลไอโอดีน (Lugol's iodine) เอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ซาฟรานิน (Safranin) Kovac's reagent และ McFarland Standard

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ชุดทดสอบ API 20 E ของบริษัท bioMérieux กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง (Bright Field Microscope) ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) เครื่องซั่ง เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) เครื่องผสม ตัวอย่างในหลอดทดลอง (vortex) ไมโครเวฟ เครื่องคืบอาหาร (Stomacher) และเครื่องแก้ว พร้อมอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็น

3.2. วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์จำนวน การแยกเชื้อและการจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด

ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารทะเลจำนวน 5 ชนิดได้แก่ กุ้ง หอยแมลงภู่ หอยนางรม ปลา และปลาหมึก ชนิดละ 10 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Most Probable Number (สุริย์, 2549) คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะที่น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* คือมีลักษณะกลม สีเขียวหรือน้ำเงินเขียวทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตรจากอาหารทะเลแต่ละตัวอย่าง โดยนำมาแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร TCBS จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนหลอดอาหาร TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 การเจริญในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) Agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 การเจริญในอาหาร Lysine Indole Motility (LIM) Medium ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase Test) การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test) และการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease Test) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E (วิธีการตามภาคผนวก ข) และแปลผลการทดสอบที่ได้โดยใช้โปรแกรมการจำแนกชนิด (APIWEB STAND ALONE V 1.1.0 ของบริษัท bioMérieux) ทำให้ได้ทราบสปีชีส์ของเชื้อที่ทดสอบ

3.2.2 การศึกษาการต้านทานความร้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากกุ้ง ปลา และปลาหมึก

การศึกษาการต้านทานความร้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล ทำได้โดยหาค่า *D* ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้ง ปลา และปลาหมึก ที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการของ Penna และ Moraes (2001) และนำค่า *D* ที่ได้ของแต่ละชนิดของตัวอย่างมาเขียนกราฟ เพื่อหาค่า *Z* ทำการทดลองตามวิธีการดังนี้

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เชื้อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลจากข้อ 3.2.1 โดยเลือกไอโซเลตที่แยกได้จากกุ้ง ปลา และปลาหมึก ลงในอาหารเหลว TSB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 โดยในการล้างแต่ละครั้งจะใช้สารละลาย เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเอกลำเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเท ส่วนใสทิ้งไป หลังจากล้างเซลล์แล้วทำให้เป็นสารแขวนลอยของเชื้อแล้วนำไปปรับความขุ่นให้ เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร และทำการนับปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหาร TSA ที่มี โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2

3.2.2.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารทะเล

ทำการเตรียมตัวอย่างอาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง ปลา และปลาหมึก โดยทำความสะอาดแล้วนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ ตัวอย่างอาหารทะเลปราศจากเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อที่ปราศจาก เชื้อ

3.2.2.3 การหาค่า Decimal reduction time (*D* value)

ทำการหาค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* SH1 ในกุ้ง *V. parahaemolyticus* GS1 ในปลา และ *V. parahaemolyticus* MS2 ในปลาหมึก ที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส โดยในการหาค่า *D* ที่แต่ละระดับอุณหภูมิในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิดทำได้โดย นำตัวอย่างอาหารทะเลมาชั่งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อปริมาณ 11 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อจำนวน 7 หลอด เติมสารแขวนลอยของเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2.1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างอาหารทะเลบด 6 หลอด ซึ่งจะให้ความเข้มข้นของเซลล์ เริ่มต้นในตัวอย่างอาหารทะเลบดประมาณ 10^8 CFUต่อกรัม สำหรับอาหารทะเลอีก 1 หลอด ซึ่งไม่เติมเชื้อจะใช้เพื่อควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำหลอดอาหารทะเลทั้งหมดไปให้ความร้อนที่ ระดับอุณหภูมิที่ต้องการหาค่า *D* เช่น ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยจะวัดอุณหภูมิที่กึ่งกลางของ อาหารในหลอดควบคุมอุณหภูมิด้วย Thermocouple type T (testo 926) เมื่ออุณหภูมิที่กึ่งกลาง อาหารถึงอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสก็เริ่มจับเวลา เมื่อครบ 30 วินาที เก็บตัวอย่างออกมา 1 หลอด จากนั้นเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกัน ทุก ๆ 30 วินาที จนครบ 150 วินาที (หลอดที่ไม่ผ่านความร้อน เป็นหลอดที่จะให้หาปริมาณเชื้อเริ่มต้น) สำหรับการหาค่า *D* ที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ก็ทำเช่นเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 วินาที และที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 วินาที

นำหลอดตัวอย่างอาหารที่ให้ความร้อนในแต่ละระดับอุณหภูมิที่เวลาต่าง ๆ ไปตรวจหา จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิต โดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหาร TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 คำนวณหาค่า *D* value โดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อน (log CFU ต่อมิลลิลิตร) กับเวลา แล้วหาสมการ เส้นตรงเพื่อนำมาคำนวณหาค่า *D* โดยค่า *D* เท่ากับ $-1/\text{slope}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.4 การหาค่า Z

นำค่า D ที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า D กับอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อน แล้วหาสมการเส้นตรงเพื่อนำมาคำนวณหาค่า Z โดยค่า Z เท่ากับ $-1/\text{slope}$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ในการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียก่อโรคสกุล *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดจำนวน 5 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่ จากผลการวิเคราะห์โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ปรากฏว่าพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปริมาณค่อนข้างมากในอาหารทะเลทุกชนิดที่วิเคราะห์ ซึ่งปริมาณเชื้อที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPNต่อกรัม (ตารางที่ 6) ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 40 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง โดยพบในปลา หอยนางรม และหอยแมลงภู่มากที่สุดคือพบชนิดละ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 90) รองลงมาคือ ปลาหมึกพบ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) และพบในกุ้งน้อยที่สุดคือ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) จากนั้นจึงได้แยกเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลทุกชนิด ได้เชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 14 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อจากปลาและหอยแมลงภู่มากที่สุด คืออย่างละ 4 ไอโซเลต และเป็นเชื้อจากหอยนางรม ปลาหมึก และกุ้งจำนวน 3, 2 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ เพื่อนำมาจำแนกชนิดในขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่พบ *Vibrio parahaemolyticus*

ชนิดของตัวอย่างอาหารทะเล	จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์	จำนวนตัวอย่างที่พบ	ร้อยละของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่พบ	MPN ต่อกรัม	จำนวนไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็น <i>V. parahaemolyticus</i>
กุ้ง	10	5	50	24 ->11,000	1
ปลา	10	9	90	11,000 ->11,000	4
ปลาหมึก	10	8	80	750 ->11,000	2
หอยนางรม	10	9	90	24 ->11,000	3
หอยแมลงภู่	10	9	90	>11,000	4
รวม	50	40	80	24 ->11,000	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 ผลการจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลสด

จากการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่คาดว่าจะเป็ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 14 ไอโซเลต ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 โดยพบว่าเชื้อทุกไอโซเลตที่แยกได้ทั้งหมดนั้นเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันคือ โคโลนี สีเขียว มีลักษณะกลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 เซนติเมตร เซลล์มีรูปท่อนโค้ง และ เซลล์เรียงตัวเดี่ยว

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารทะเล

ไอโซเลตของแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ <i>V. parahaemolyticus</i>	ตัวอย่างที่มาของแบคทีเรียที่แยกได้	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะโคโลนีบน TCBS agar	ผลการข้อมแกรม	ลักษณะรูปร่างเซลล์และการเรียงตัว
SH 1	กุ้งแช่บ๊วย	Banana Shrimp	<i>Penaeus merguensis</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
GS 1	ปลากระพงขาว	Barramundi Giant Seaperch	<i>Lates calcarifer</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
BS 1	ปลาทรายแดง	Threadfin Bream (Itoyoi)	<i>Nemipterus spp.</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
SP 1	ปลาจาระเม็ด	Silver pomfret	<i>Pampus argenteus</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
SP 2	ปลาจาระเม็ด	Silver pomfret	<i>Pampus argenteus</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
MS 1	ปลาหมึกกล้วย	Splendid Squid	<i>Loligo formosana</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
MS 2	ปลาหมึกกล้วย	Splendid Squid	<i>Loligo formosana</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
OY 1	หอยนางรม	Oyster	<i>Saccostrea cucullata</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
OY 2	หอยนางรม	Oyster	<i>Saccostrea cucullata</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
OY 3	หอยนางรม	Oyster	<i>Saccostrea cucullata</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
GM 1	หอยแมลงงู	Green mussel	<i>Perna viridis</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
GM 2	หอยแมลงงู	Green mussel	<i>Perna viridis</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
GM 3	หอยแมลงงู	Green mussel	<i>Perna viridis</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว
GM 4	หอยแมลงงู	Green mussel	<i>Perna viridis</i>	สีเขียว กลม ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ซม.	คิดติแกรมลบ	รูปท่อนโค้ง เซลล์เรียงตัวเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าจะเป็ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 14 ไอโซเลต ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลตมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกันคือ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3, 6 และ 8 แต่ไม่เจริญในสภาพที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ และสภาพที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึง ร้อยละ 10 สำหรับการเจริญในอาหาร TSI ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 พบว่าส่วนของบริเวณลาดเอียง (Slant) ของหลอดอาหาร TSI มีสีแฉง (Alkaline) และส่วนของก้นหลอดอาหาร (Butt) มีสีเหลือง (Acid) ไม่มีการสร้างแก๊ส และไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สำหรับผลของไลซีน (Lysine) อินโดล (Indole) และการเคลื่อนที่ (Motility) ในอาหาร LIM ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 2 นั้นมีผลเป็นบวกทั้งหมด สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลสได้ แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส นอกจากนี้ยังสามารถหมักแลคโตสได้ และสามารถเจริญได้ที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าผลที่ได้ทั้งหมดตรงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* (Colakoglu และคณะ, 2005) ตามภาคผนวก ๑

เมื่อนำแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็ *V. parahaemolyticus* มาทดสอบโดยใช้ ชุดทดสอบ API 20E ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 9 และได้แปลผลการทดสอบโดยใช้โปรแกรม การจำแนกชนิด (APIWEB STAND ALONE V 1.1.0 ของบริษัท bioMérieux) พบว่าเชื้อทุก ไอโซเลตเป็ *V. parahaemolyticus* โดยไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด คือ ไอโซเลต SH1 ซึ่งแยกได้จากกุ้ง โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่ทดสอบคล้ายคลึง กับคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* สูงสุดคือร้อยละ 99.9 โดยจะสามารถสร้าง เอนไซม์ออร์นิตินดีคาร์บอกซิเลส เอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส เอนไซม์ออกซิเดส และ เอนไซม์เจลาติเนส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อาร์จินีนไลโซโคโรเลส เอนไซม์ยูรีเอส เอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซเดส และเอนไซม์ทริปโตเฟนดีอะมิเนส นอกจากนี้ยังพบว่าจะเกิดการหมัก น้ำตาลดี-กลูโคส ดี-แมนนิทอล และแอล-อะราบิโนส แต่ไม่หมักน้ำตาลดี-ซูโครส อิโนซิทอล ดี-ซอร์บิทอล แอล-แรมโนส ดี-เมลิไบโอส และอะไมคาลิน และพบว่าจะมีการสร้างอินโดล แต่ไม่มีการใช้ซิทราท ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไม่เกิดการคกรจาก Voges-Proskauer

ส่วนไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์ของความคล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลต GS1 ที่แยกได้จากปลากะพงขาว ไอโซเลต SP1 และ SP2 ที่แยกได้จาก ปลาจาระเม็ด ไอโซเลต MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึกกล้วย ไอโซเลต OY1 และ OY3 ที่แยก ได้จากหอยนางรม และไอโซเลต GM3 ที่แยกได้จากหอยแมลงภู่ โดยมีความน่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 99.8 ส่วนไอโซเลต GM4 น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 99.6 ไอโซเลต BS1 น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 98.8 ไอโซเลต GM2 น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 98.4 ไอโซเลต MS1 และ OY2 น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 92.8 และไอโซเลต GM1 น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 86.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 คุณสมบัติทางชีวเคมีขั้นต้นของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกจากอาหารทะเล

ชนิดของการทดสอบทางชีวเคมี	ไฮโดรไลสของเมกทีเรียที่แยกได้													
	SH1	GS1	BS1	SP1	SP2	MS1	MS2	OY1	OY2	OY3	GM1	GM2	GM3	GM4
การหมักแลคโตส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญในสภาพที่มี NaCl ร้อยละ 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญในสภาพที่มี NaCl ร้อยละ 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญในสภาพที่มี NaCl ร้อยละ 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญในสภาพที่มี NaCl ร้อยละ 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญในสภาพที่มี NaCl ร้อยละ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญใน TSI + 2% NaCl	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)	K/A, Gas(-), H ₂ S(-)
การเคลื่อนที่	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน LIM + 2% NaCl	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)	LDC(+) IND(+) MO(+)
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

LDC หมายถึง การสร้างเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส

IND หมายถึง การสร้างอินโดล

MO หมายถึง การเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล โดยใช้ ชุดทดสอบ API 20 E

ชนิดของการทดสอบทางชีวเคมี	ไอโซลของแบคทีเรียที่แยกได้													
	SH1	GS1	BS1	SP1	SP2	MS1	MS2	OY1	OY2	OY3	GM1	GM2	GM3	GM4
การสร้างออร์นิทีนดีคาร์บอกซิเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
การสร้างไลซีนดีคาร์บอกซิเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การสร้างฮาร์จินีนไดไฮโดรเลส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การสร้างออกซิเดส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การสร้างเซลลูเลส	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
การสร้างซูริเอส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การสร้างบิวทาเนกไดไฮดรอลเอส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การสร้างทริปโตเฟนดีอะมิเนส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักกรดจาก Voges-Proskauer	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
การสร้างอินโดล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การใช้ซิเตรท	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักกลี-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การหมักกลี-ซูโครส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักกลี-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การหมักกลี-อินซูลอส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักกลี-ซอร์บิทอล	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักกลี-เรมโนส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักกลี-มิลิโบส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักอะไมลาซิน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การหมักแอล-อะราบีโนส	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
เปอร์เซ็นต์ที่คาดว่าจะเป็น <i>V. parahaemolyticus</i>	99.9%	99.8%	98.8%	99.8%	99.8%	92.8%	99.8%	99.8%	92.8%	99.8%	86.6%	98.4%	99.8%	99.6%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียก่อโรคสกุล *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด พบว่าในอาหารทะเลสดนั้นมี *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนในปริมาณสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wong และคณะ (1999) ซึ่งได้แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลที่นำเข้าจากประเทศฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม โดยพบเชื้อทั้งหมด 315 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 686 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 45.9 ซึ่งการพบในประเทศฮ่องกงและไทยสูงกว่าในประเทศอินโดนีเซียและเวียดนาม โดยอาหารทะเลที่นำเข้าจากประเทศนั้นพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในร้อยละ 81.3 และพบในกุ้งร้อยละ 75.8 Jakšić และคณะ (2002) ได้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลา กุ้ง และหอยสองฝาจาก Adriatic Sea ประเทศโครเอเชียจำนวน 11 ตัวอย่างจากทั้งหมด 117 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.40 เช่นเดียวกับ Bilung และคณะ (2005) ได้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยแครงโดยวิธี Most Probable Number ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบว่า 62 ตัวอย่างมีค่า MPN > 1,100 MPNต่อกรัม Ottaviani และคณะ (2005) ได้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่จากแถบชายฝั่งทะเล Adriatic Sea ประเทศอิตาลี จำนวน 35 ตัวอย่างจากทั้งหมด 144 ตัวอย่าง นอกจากนี้ Lhafi และคณะ (2007) ยังได้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่จากทะเล German Wadden ประเทศเยอรมนีจำนวน 90 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 228 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.5

การที่ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ปริมาณสูงในอาหารทะเลสดนั้น เนื่องจากเชื่อนี้มีถิ่นอาศัยอยู่ในชายฝั่งทะเลแถบร้อนและในเขตร้อน (Matsumoto และคณะ, 2000) โดยจะอยู่ในแพลงตอน เมื่อสัตว์ทะเลกินแพลงตอนที่มีเชื้อเข้าไปจึงทำให้เชื้อแพร่เข้าสู่สัตว์นั้นด้วย นอกจากนี้เชื้อยังอาจจะปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของแพลงตอน ทำให้เชื้อแพร่กระจายอยู่ในน้ำทะเล ซึ่งเป็นไปได้ที่เชื้อจะแพร่เข้าไปสู่อาหารทะเลได้ เนื่องจากอาหารทะเลต่าง ๆ มีความเป็นกรดต่ำ จึงเป็นสาเหตุให้ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเจริญได้ที่ช่วงพีเอช 4.8-11.0 เติบโตได้ดีในอาหารทะเลอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่า การตรวจพบเชื่อนี้จะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำทะเล บางครั้งจะพบในน้ำทะเลที่อุณหภูมิต่ำกว่า 13-15 องศาเซลเซียส (Normanno และคณะ, 2006) โดยทั่วไปจะไม่ตรวจพบเชื่อนี้จนกว่าอุณหภูมิของน้ำทะเลจะสูงขึ้นถึงประมาณ 19-20 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lhafi และ Kühne (2007) ได้พบ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่จากทะเล German Wadden Sea จำนวน 36 ตัวอย่างจากทั้งหมด 90 ตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่จะพบที่อุณหภูมิ 15.3-20.0 องศาเซลเซียส และจากรายงานของ Cheng และคณะ (2004) ได้รายงานว่า จะไม่พบ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Lhafi และ Kühne (2007) ที่พบ *V. parahaemolyticus* ในน้ำที่อุณหภูมิต่ำถึง 4.3 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่า *V. parahaemolyticus* น่าจะสามารถปรับตัวให้อยู่ได้ในทะเล German Wadden Sea ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นจึงมักแยก *V. parahaemolyticus* ได้จากสิ่งแวดล้อมในทะเลแถบอบอุ่น เช่น สัตว์ทะเล แพลงตอน ตะกอนในทะเลและน้ำชายฝั่งทะเล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คามปกติจะพบเชื้อนี้ตามปากแม่น้ำและชายทะเลแถบอบอุ่น เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม (halophile) โดยที่ความเข้มข้นของเกลือที่เจริญได้คือร้อยละ 1-8 และสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ที่อุณหภูมิ 25 – 44 องศาเซลเซียส ซึ่งการแพร่กระจายของเชื้อมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยในช่วงฤดูหนาวอุณหภูมิของน้ำจะต่ำลง เชื้อสามารถอาศัยตะกอนใต้พื้นน้ำ เมื่อถึงฤดูร้อนอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น เชื้อจากตะกอนใต้พื้นน้ำจึงแพร่กระจายอยู่ในน้ำทะเล ดังเช่นการทดลองของ Normanno และคณะ (2006) ได้ศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่ที่จำหน่ายในอิตาลี โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม ปี 2001 ถึงมกราคม ปี 2003 โดยในเดือนมกราคมพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* 1 ตัวอย่างจาก 21 ตัวอย่าง ส่วนในเดือนพฤษภาคมพบเชื้อ 11 ตัวอย่างจาก 76 ตัวอย่าง

การที่พบ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลปริมาณสูง ผู้บริโภคจึงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการบริโภคอาหารทะเล โดยพบว่าการติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อได้รับเชื้อมากกว่า 10^6 เซลล์ (DePaolo และคณะ, 2003) และเนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้เร็วมาก ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าสั้นมากเพียง 8-9 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ซึ่ง *V. parahaemolyticus* สามารถก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารจากการรับประทานอาหารทะเล เมื่อได้รับเชื้อเข้าไปจะทำให้ท้องเสียออกมาเป็นน้ำหรือเลือด ปวดเกร็งที่ท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดหัวและมีไข้ต่ำ มีระยะพักตัวเฉลี่ย 15 ชั่วโมง คือระหว่าง 4-96 ชั่วโมง ถึงแม้ว่ากลไกการเกิดโรคของ *V. parahaemolyticus* จะยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่คาดว่าเกิดจาก hemolysin 2 ชนิดคือ Thermostable direct hemolysin (Tdh) และ Tdh-related hemolysin (Tth) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรค การติดเชื้อจะเกิดมากในช่วงฤดูร้อน โดยมีรายงานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไต้หวันและญี่ปุ่นนั้นเกิดมากในช่วงฤดูร้อน และแหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อคือ อาหารทะเลดิบ อาหารที่ปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อน และอาหารทะเลที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ (Daniels และ Shafaie, 2000)

การระบาดของโรคทางเดินอาหารส่วนใหญ่จะพบมากในแถบเอเชีย และอเมริกา (Wong และคณะ, 1999; Lozano-Leon และคณะ, 2003) ในปี 1997 มีรายงานการระบาดของโรคทางเดินอาหารในอเมริกาเหนือซึ่งเกิดจากการรับประทานหอยนางรมดิบที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยพบว่าผู้ป่วยทั้งหมด 209 ราย และเสียชีวิต 1 ราย นอกจากนี้ในปี 1999 พบว่ามีกการระบาดของโรคทางเดินอาหารจากการรับประทานหอยเป่าสีที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไต้หวัน (Cheng และคณะ, 2004) ในปี 2003-2004 พบว่ามีกการระบาดของโรคทางเดินอาหารจากการรับประทานหอยนางรมในสิงคโปร์จำนวนทั้งสิ้น 305 ราย (Ng และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในปี 2003 ที่ประเทศอินเดียเกิดการระบาดของโรคอุจจาระร่วงจากการรับประทานหอยที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนเข้าไปอีกด้วย (Sen และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คั้งนั้นการรับประทานอาหารทะเลสด หรืออาหารทะเลที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ จึงมีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* เข้าไปในร่างกาย (Daniels และคณะ, 2000) มีรายงานว่าในประเทศญี่ปุ่นนั้นพบว่าร้อยละ 50 ถึง 70 ของการเกิดโรคทางเดินอาหารเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรืออาหารที่ไม่ผ่านความร้อนอย่างเพียงพอที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนอยู่ (Montville และคณะ, 2005) คั้งนั้นการให้ความร้อนอย่างเพียงพอในการประกอบอาหารจะทำให้ปลอดภัยจากการเกิดโรคที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* ได้

4.2 ผลการศึกษาการต้านทานความร้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าค่า D จะมีการลดลงตามอุณหภูมิของการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้น โดยค่า $D_{65^{\circ}\text{C}}$ ของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ในตัวอย่างกุ้ง ปลา และปลาหมึกสูงกว่าค่า D ที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 10) โดยค่า $D_{65^{\circ}\text{C}}$ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ในตัวอย่างกุ้ง ปลา และปลาหมึก มีค่าใกล้เคียงกันโดยมีค่า 44.01, 42.26 และ 44.08 วินาที ตามลำดับ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นถึง 75 องศาเซลเซียส พบว่าค่า D ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยค่า D ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* SH1 ในกุ้งมีค่าลดลง 17.79 วินาที ส่วนค่า $D_{75^{\circ}\text{C}}$ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* GS1 ในปลา และ *V. parahaemolyticus* MS2 ในปลาหมึกมีค่าลดลง 17.07 และ 16.61 วินาที ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของการให้ความร้อนขึ้นอีก 10 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาในการทำให้เซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ลดลง 1 log cycle นั้นลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งจะเห็นได้จากค่า $D_{85^{\circ}\text{C}}$ ของตัวอย่างกุ้ง ปลา และปลาหมึกมีค่าต่ำกว่าค่า $D_{75^{\circ}\text{C}}$ เพียงเล็กน้อย และเมื่อให้ความร้อนถึง 95 องศาเซลเซียส พบว่าค่า D ลดลงอย่างรวดเร็วจากค่า $D_{85^{\circ}\text{C}}$ โดยค่า $D_{95^{\circ}\text{C}}$ ของ *V. parahaemolyticus* SH1 ในกุ้ง *V. parahaemolyticus* GS1 ในปลา และ *V. parahaemolyticus* MS2 ในปลาหมึก มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าอยู่ในช่วง 16.13-16.52 วินาที และเมื่อเปรียบเทียบค่า D ของ *V. parahaemolyticus* ที่แต่ละอุณหภูมิในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด พบว่า ค่า D ของ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกมีค่าสูงกว่าค่า D ในกุ้ง และปลา ที่อุณหภูมิของการให้ความร้อนส่วนใหญ่ เช่นที่อุณหภูมิ 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 10 ค่า Decimal reduction time (*D* value) ของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

อุณหภูมิ (°C)	ชนิดของอาหารทะเล	สายพันธุ์จุลินทรีย์	R ² ^a	<i>D</i> -value (วินาที) ^c ± SD
65	กุ้ง	<i>V. parahaemolyticus</i> SH1	0.9785	44.01 ± 1.26
75	กุ้ง	<i>V. parahaemolyticus</i> SH1	0.9735	26.22 ± 0.48
85	กุ้ง	<i>V. parahaemolyticus</i> SH1	0.9837	24.79 ± 0.16
95	กุ้ง	<i>V. parahaemolyticus</i> SH1	0.9942	16.48 ± 0.07
65	ปลา	<i>V. parahaemolyticus</i> GS1	0.9828	42.26 ± 0.42
75	ปลา	<i>V. parahaemolyticus</i> GS1	0.9332	25.19 ± 0.49
85	ปลา	<i>V. parahaemolyticus</i> GS1	0.9834	24.41 ± 0.24
95	ปลา	<i>V. parahaemolyticus</i> GS1	0.9893	16.52 ± 0.38
65	ปลาหมึก	<i>V. parahaemolyticus</i> MS2	0.9823	44.08 ± 1.46
75	ปลาหมึก	<i>V. parahaemolyticus</i> MS2	0.971	27.47 ± 0.35
85	ปลาหมึก	<i>V. parahaemolyticus</i> MS2	0.9923	27.05 ± 0.04
95	ปลาหมึก	<i>V. parahaemolyticus</i> MS2	0.9916	16.13 ± 0.18

^a ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ

เมื่อนำค่า *D* ที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า *D* (วินาที) กับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ที่ใช้ในการให้ความร้อนเพื่อหาค่า *Z* ผลปรากฏว่าค่า *Z* ของ *V. parahaemolyticus* SH1 ในกุ้ง *V. parahaemolyticus* GS1 ในปลา และ *V. parahaemolyticus* MS2 ในปลาหมึกมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่า 1.14, 1.16 และ 1.12 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่า *Z* หมายถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อน (องศาเซลเซียส) ซึ่งทำให้ค่า *D* ลดลง 1 log cycle ค่า *Z* เป็นค่าที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการต้านทานของจุลินทรีย์ต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนในระดับต่าง ๆ กัน ซึ่งสามารถใช้ในการคำนวณค่าที่ใช้ในการให้ความร้อนในระดับเดียวกันที่อุณหภูมิแตกต่างกันเช่น ถ้าให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาฟาเรนไฮด์เป็นเวลา 3.5 นาที เป็นการให้ความร้อนที่เหมาะสม โดยมีค่า *Z* เท่ากับ 8.0 องศาเซลเซียส ดังนั้นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 148 องศาฟาเรนไฮด์ เป็นเวลา 0.35 นาที และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 132 องศาฟาเรนไฮด์ เป็นเวลา 35 นาที จะถือว่าเป็นการให้ความร้อนที่ระดับเดียวกัน (Jay และคณะ, 2005) จากผลการทดลองถ้าให้ความร้อนแก่เชื้อ *V. parahaemolyticus* SH1 ในกุ้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 44.01 วินาที จะทำให้จำนวนเซลล์ลดลงร้อยละ 90 เมื่อค่า *Z* เท่ากับ 1.14 องศาเซลเซียส ดังนั้นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 66.14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4.401 วินาที และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63.86 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 440.1 วินาที (7.335 นาที) จะถือว่าเป็น

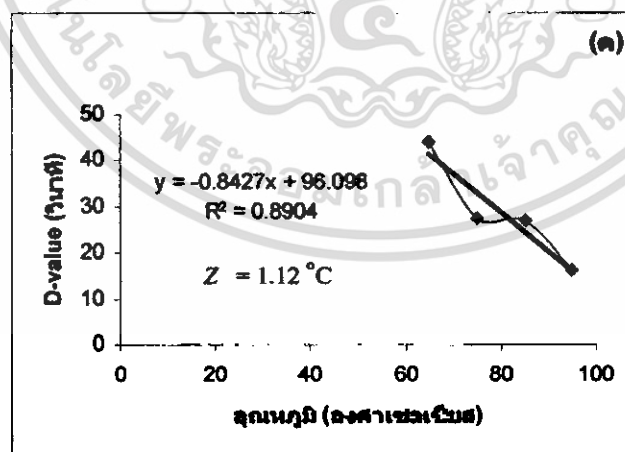
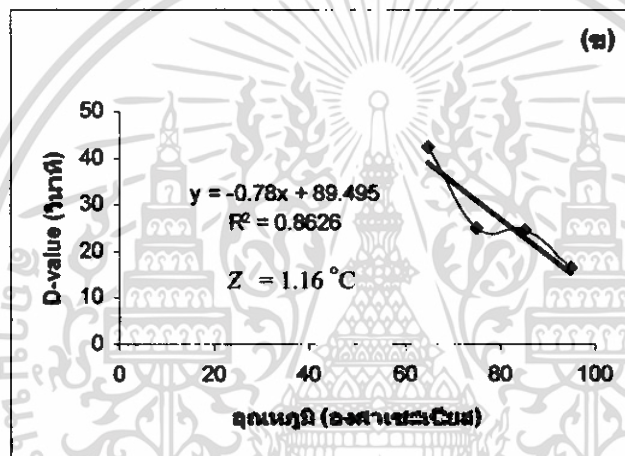
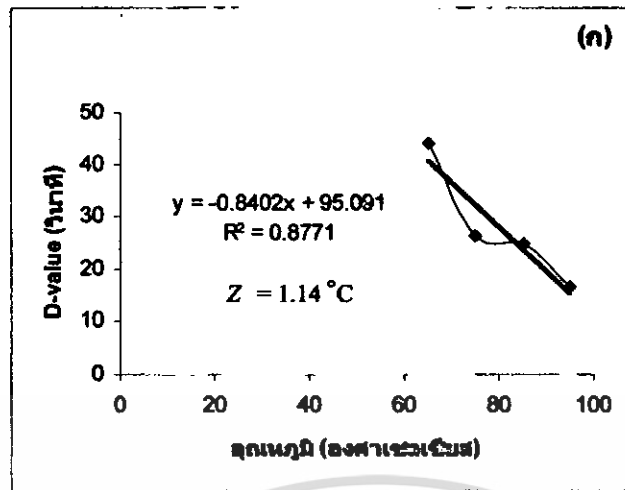
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การให้ความร้อนที่ระดับเดียวกัน เช่นเดียวกันกับการให้ความร้อนแก่เชื้อ *V. parahaemolyticus* GS1 ในปลา และ *V. parahaemolyticus* MS2 ในปลาหมึก โดยพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 ไอโซเลตมีการต้านทานความร้อนไม่สูงพอ และมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.12-1.16 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถ้าให้ความร้อนแก่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 ไอโซเลตในระดับอุณหภูมิที่ไม่สูงนักก็สามารถทำลายเชื้อนี้ได้

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อให้ความร้อนสูงขึ้น จะทำให้ใช้เวลาในการทำลายจุลินทรีย์ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความร้อนจะทำให้เกิดการเสียสภาพและเกิดการแตกกะออนของโปรตีน นอกจากนี้ยังทำให้ฮีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเสียหาย (Banwart, 1989) มีรายงานว่าการให้ความร้อนมีผลทำให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในของเซลล์แบคทีเรีย (Russell และ Harries, 1967) เช่นเดียวกันการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบเซลล์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำให้เสียหาย และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเซลล์จะตายก่อนที่จะเกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ (Banwart, 1989) Scheie และ Ehrenspeck (1973) ได้เสนอว่าความร้อนจะเป็นสาเหตุทำให้โปรตีนในผนังเซลล์ของ *E. coli* เกิดการเสียสภาพ ซึ่งเป็นผลจากการทำลายชั้นเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan layer) ทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน เช่นเดียวกันกับ Jay และคณะ (2005) พบว่าความร้อนจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ไวต่อความร้อน หรือโรโบไซม์ที่ไวต่อความร้อน ซึ่งมีจำนวนมากในเซลล์

การหาค่า *D* สามารถบ่งบอกถึงการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ปัจจัยดังกล่าวได้แก่ ปริมาณน้ำ ไขมัน เกลือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน จำนวนจุลินทรีย์ อายุของเซลล์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ ธารยับยั้งการเจริญ เวลาและอุณหภูมิ ผลของอุตราวิเคมีส์ ชนิดของเซลล์จุลินทรีย์ และการเจริญในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ (Jay และคณะ, 2005; Banwart, 1989) ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกมีค่า *D* ที่แต่ละอุณหภูมิของการให้ความร้อนสูงสุดรองลงมาคือ กุ้ง และปลา ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกมีการต้านทานความร้อนดีที่สุด ทั้งนี้คาดว่าอาจจะเนื่องมาจากสาเหตุต่าง ๆ ได้แก่ พิเอช โดยมีรายงานว่าถ้ามีพิเอชต่ำจะทำให้จุลินทรีย์มีการต้านทานความร้อนได้ดี และพบว่า *V. parahaemolyticus* ทนต่อความร้อนที่พิเอช 5.5-6.5 ได้ดีกว่าพิเอช 7.0-8.0 (Jay และคณะ, 2005) โดยทั่วไปปลาหมึกมีพิเอชอยู่ในช่วง 4.8-6.5 ซึ่งต่ำกว่ากุ้งและปลาที่มีพิเอชอยู่ในช่วง 6.8-7.0 และ 6.6-6.8 ตามลำดับ (Jay และคณะ, 2005; พูลทรัพย์และคณะ, 2533) ดังนั้น *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกจึงมีการต้านทานความร้อนได้ดีกว่ากุ้งและปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 กราฟ Thermal death time ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต SH1 ในกุ้ง (ภาพ ก) *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต GS1 ในปลา (ภาพ ข) และ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต MS2 ในปลาหมึก (ภาพ ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทะเลแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการต้านทานความร้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตสูงจะช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (Jay และคณะ, 2005) โดยโมเลกุลของสารอาหารเหล่านั้นจะช่วยลดการถ่ายเทความร้อนภายในระบบ จึงช่วยให้การต้านทานความร้อนดีขึ้น (Gabriel และ Azanza, 2004) นอกจากนี้ในเนื้อปลาหมึกประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูงกว่าในกุ้งและในปลา โดยในปลาหมึกมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 0.9 ซึ่งสูงกว่ากุ้งและปลาที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 0.8 และ 0 ตามลำดับ (เวียง, 2542; Rajkumar และ Kumaraguru vasagam, 2006) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่คาร์โบไฮเดรตในปลาหมึกจะช่วยให้ *V. parahaemolyticus* ต้านทานความร้อนได้ดี อย่างไรก็ตามสำหรับปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันนั้นพบว่าในปลาหมึกมีทั้งปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันต่ำกว่าในปลาและกุ้ง โดยในปลาหมึกมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 15.32 ขณะที่ปลาและกุ้งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 20.4 และ 19.7 ตามลำดับ และปลาหมึกมีปริมาณไขมันร้อยละ 0.4 แต่ในปลาและกุ้งมีปริมาณไขมันร้อยละ 4.4 และ 0.95 ตามลำดับ (เวียง, 2542; พูลทรัพย์และคณะ, 2533; Rajkumar และ Kumaraguru vasagam, 2006)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาค่า *D* value ของ *V. parahaemolyticus* ในหอยกาบคดที่อุณหภูมิ 49-55 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ช่วงของค่า *D* value อยู่ระหว่าง 0.03 ถึง 0.21 นาที และพบว่าเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* จะทนความร้อนได้สูงสุดเมื่อเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง และมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 จากผลการทดลองพบว่าค่า *Z* อยู่ในช่วง 1.12 - 1.16 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงว่า *V. parahaemolyticus* มีการต้านทานความร้อนไม่คืทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโคชธรรมชาติของ *V. parahaemolyticus* แล้วเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อความร้อน นอกจากนี้ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนด้วย (Kraft, 1992) Asselt และ Zwietering (2006) ได้รายงานว่าค่า *Z* value ของ *V. parahaemolyticus* เป็น 8.5 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Schultz และ Smith (1994) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ มี *Z* value อยู่ที่ 5.5-12.4 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส ถึง 55 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการศึกษาวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ แยกเชื้อ และจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดทั้ง 5 ชนิดคือ กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่ จากตลาดในกรุงเทพมหานคร พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* อยู่ในปริมาณสูงมีค่าอยู่ในช่วง 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPNต่อกรัม โดยตรวจพบในอาหารทะเลจำนวน 40 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) ซึ่งเป็นการพบในปลา หอยนางรมและหอยแมลงภู่มากที่สุด เมื่อนำเชื้อที่คาดว่าจะ เป็น *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 14 ไอโซเลตมาแยกให้บริสุทธิ์พบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* จึงได้นำมาจำแนกชนิดโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยมีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* เป็นร้อยละ 86.6 ถึง 99.9 ซึ่งเชื้อที่แยกได้จากกุ้ง ไอโซเลต SH1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 99.9 จึงได้คัดเลือกไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์ที่คาดว่าจะ เป็น *V. parahaemolyticus* สูงสุดมา 3 ไอโซเลต ได้แก่ *V. parahaemolyticus* SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง (ร้อยละ 99.9) *V. parahaemolyticus* GS1 (ร้อยละ 99.8) และ *V. parahaemolyticus* MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก (ร้อยละ 99.8) มาใช้ในการศึกษา ขึ้นต่อไป

เนื่องจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร จึงได้ทำการศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 ไอโซเลต มีค่า D ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า $D_{65^{\circ}\text{C}}$ ถึง $D_{95^{\circ}\text{C}}$ อยู่ในช่วง 44.08 ถึง 16.13 วินาที ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ค่า D ลดลง ดังนั้นที่อุณหภูมิสูงจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า D (วินาที) กับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ที่ใช้ในการให้ความร้อนจะได้ค่า Z ซึ่งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 ไอโซเลตมีค่า Z ไม่แตกต่างกันมากนักอยู่ในช่วง 1.12 ถึง 1.16 องศาเซลเซียส ซึ่งค่า Z ของ *V. parahaemolyticus* ที่ได้จากการทดลองนั้นมีค่าต่ำ จึงให้เห็นว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการต้านทานต่อความร้อนได้ไม่สูงพอ

การทดลองนี้เป็นเพียงการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ แยกเชื้อ และจำแนกชนิดของ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างอาหารทะเลในเขตกรุงเทพมหานครเท่านั้น จึงควรมีการศึกษาจากอาหารทะเลแหล่งอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แน่ชัด นอกจากนี้ข้อมูลในส่วนของการให้ความร้อนและเวลาที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* นั้นเป็นเพียงการทำลายเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเลให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่งยังไม่ได้คำนึงถึงลักษณะเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของผลิตภัณฑ์ภายหลังการให้ความร้อน จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการยอมรับจากผู้บริโภค นอกจากนี้อาหารทะเลที่นำมาแปรรูป เช่น อาหารทะเลที่มีการเติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสต่าง ๆ ซึ่งเจือปนในอาหารนี้ ทำให้เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น จึงควรศึกษาในส่วนของคุณค่า *D* เกี่ยวกับอาหารแปรรูปเพิ่มเติม เพื่อหาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 . แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพมหานคร: โนเบิล พรินท์. พิมพ์ครั้งที่ 3.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547 . จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน จำกัด. พิมพ์ครั้งที่ 4.
- นันทนา อรุณฤกษ์ และสุนทรีชา วยเจริญ. 2535. ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อต่อการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ proteinase ของ *Vibrio parahaemolyticus*. ชลบุรี: โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุษกร อุดรภิกษาคติ. 2547. จุลชีววิทยาทางอาหาร. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. พิมพ์ครั้งที่ 2.
- ประเวทย์ ดุษฎีเมศวร์, ชรณี ดุษฎีเมศวร์. 2536. Rapid method and automation สำหรับจุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.
- พลทรัพย์ วิรุฬหกฤต, วราทิพย์ สมบุญอุฎฺธธิ์, อรวรรณ คงพันธุ์ และสุวิมล กิรติวิยาภรณ์. 2533. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาหมึกก๊วยตและแช่แข็งระหว่างการเก็บรักษา. กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1.
- ลัดดาวัลย์ รัศมีทัต. 2536. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรียรรณา หัตยานนท์. 2548. สารานุกรมเกี่ยวกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*. ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. กรุงเทพมหานคร: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข.
- สัญญาชัย จตุรสิทธา. 2543. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. กรุงเทพมหานคร: ชนบรรณการพิมพ์.
- ศุภมาลา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- ศุมาลี เหลืองสกุล. 2541. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. พิมพ์ครั้งที่ 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุริย์ นานาสมบัติ. 2549. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. ลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร.

เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ : เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์แบคทีเรีย. นครปฐม: โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน. มหาวิทยาลัยมหิดล.

Andrews, L.S., Park. D.L., Chen, Y.P., 2000. Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shellstock oysters. *Food Additives and Contaminants*. 17:787-791.

Andrews, L., Jahncke, M., Mallikarjunan, K., 2003. Low dose gamma irradiation to reduce pathogenic *Vibrio* in live oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Protection*. 12: 71-82.

Arrus, K. M., Holley, R. A., Ominski, K. H., Tenuta, M. and Blank, G. 2006. Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livestock Science*. 102: 226-236.

Asselt, E. D. V., Zwietering, M. H. 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Food Microbiology*. 107: 73-82.

Baffone, W., Vittoria, E., Campana, R., Citterio, B., Casaroli, A. and Pierfelici, L. 2005. Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. in in vitro and in vivo systems. *Food Control*. 16: 451-457.

Bag, P.K., Nandi S., Bhadra, R.K., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Nishibuchi, M., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, Nair, G.B., 1999. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2354-2357.

Banwart, G. J. 1989. *Basic Food Microbiology*. 2 nd edition. Van Nostrand Reinhold, USA.

Baumann, P., and R.H.W. Schubert. 1984. Family II. *Vibrionaceae*, p. 516-550. In N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Co, Baltimore.

Bilung, L. M., Radu, S., Bahaman, A. R., Rahim, R. A., Napis, S., Clemente, M. W., Tanil, G. B., Nishibuchi, M. 2005. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. *Food Microbiology*. 252: 85-88.

Boyd R. F. and Hoerl, B. G. 1991. *Basic Medical Microbiology*. Boston. Little Brown and Company.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Byrne, B., Dunne, G. and Bolton, D. J. 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. Food Microbiology. 23: 803-808.
- Cai, J., Han, Y. and Wang Zhi. 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*haliotis diversicolou supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. Aquaculture. 257: 161-166.
- Calik, H., Morrissey, M.T., Reno, P.W., An, H., 2002. Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters. Journal of Food Science. 67: 1506-1510.
- CDC. 1998. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oyster oyster--Pacific Northwest, 1997. MMWR. 47: 457-462.
- CDC. 1999. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from long Island South, Connecticut, New Jersey and New York, 1998. MMWR.
- CDC. 2006. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw shellfish --Three States, 2006. MMWR. 55: 854-856.
- Cheng, W., Hsiao, I. S., Hsu, C. H. and Chen, J. C. 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 17: 235-243.
- Colakoglu, F. A., Samasik, A., Koseoglu, B. 2006. Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. In shellfish harvested off Dardanelles cost of Turkey. Food Control. 17: 648-652.
- Cook, D.W., 2003. Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate-buffered saline and in oysters to high-pressure processing. Journal of Food Protection. 66: 2276-2282.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., 2002. Effects of depuration of Molluacs experimentally contaminated with *E. coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Applied Microbiology. 92: 460-465.
- Daniels, N.S., Shafaie, A., 2000. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicals. Infections in Medicine. 17: 665-685.
- Davis, B. D. 1980. Microbiology. Philadelphia. J. B. Lippincott Company.

- DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., Cook, D.W., 2000. Environmental investigations of *V. parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washiton, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4649-4654.
- Eyles, M.J., Davey, G.R., 1984. Microbiology of commercial depuration of the Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. *Journal of Food Protection*. 47: 703-706.
- Gabriel, A. A. and Azanna, M. P. V. 2004. Heat resistance of *Acanthamoeba* sp. cysts in green mussel broth and phosphate-buffered saline. *Food Science and Technology Research*. 10: 320-323.
- Gabriel, A. A., Ubana, M. A. 2006. Decimal reduction times of *Salmonella Typhimurium* in *guinataang kuhol*: An indigenous Filipino dish. *LWT*.
- Gil, A. I., Miranda, H., Lanata, C. F., Prada, A., Hall, E. R., Barreno, C. M., Nursin, S., Bhuiyan, N. A., Sack, D. A. and Nair, G. B. 2007. O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *International Journal of Infectious Disease*. xx: xxx-xxx.
- Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. And Karunasagar, I. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 151-159.
- Griffiths, M. 2005. *Understanding Pathogen Behaviour. Vitulence, Stress Response and Resistance*. CRC Press, USA.
- He, H., Adams, R.M., Farkas, D.F., Morrissey, M.T., 2002. Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. *Journal of Food Science*. 67: 640-644.
- Heitman, I., Jofre, L., Hormazabal, J. C., Olea, A., Vallebuona, C. and Valdesh, C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectologia*. 22: 131-140.
- Hosseini, H., Cheraghali, A. M., Yalfani, R. and Razavilar, V. 2004. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control*. 187-190.
- Jakšić, S., Uhtil, S., Petrak, T., Baz'ulic' and Karolyi, L. G. 2002. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve mollusks harvested from Adriatic sea. *Food Control*. 13: 491-493.
- Jay, J. M., Loessner, M.J., and Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*, 7 th edition. Springer Science. Business Media. Inc, USA.

- Köse, S., Quantick, P., Hall, G. 2003. Changes in the levels of histamine during processing and storage of fish meal. *Animal Feed Science and Technology*. 107: 161-172.
- Kraft, A. A. 1992. Psychrotropic bacteria in foods: disease and spoilage. CRC press, USA.
- Lee, K. K., Liu, P. C., Chen, Y. C. and Huang, C. Y. 2001. The implication of ambient temperature with outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology*. 26: 585-587.
- Lee, K. K., Liu, P. C. And Huang, C.Y. 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes and Infection*. 5: 481-485.
- Lemoine, T., Germanetto, P., Giraud, P., 1999. Toxi-infection alimentaire collective a *Vibrio parahaemolyticus*. *Behavioral Sciences*. 10: 37-38.
- Lhafi, S. K. and Kiihne, M. 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *International Journal of Food Microbiology*. xx: xxx – xxx.
- Liew, W. S., Leisner, J. J., Rusul, G., Radu, S. and Rassip, A. 1998. Survival of *Vibrio* sp. including inoculated *V. cholera* 0139 during heat-treatment of cockles (*Anadara granosa*). *International Journal of Food Microbiology*. 42: 167-173.
- Lin, Y. T., Labbe, R. G. and Shetty, K. 2005. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 6: 453-458.
- Lozano-Leon, A., Torres, J., Osorio, C.R., Martinez-Urtaza, J. 2003. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*. 226: 281-284.
- Mahmud, Z. H., Kassu, A., Mohammad, A., Yamoto, M., Bhuiyan, N. A., Nair, G. B. and Ota, F. 2006. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. *Microbiological Research*. 161: 25-37.
- Mañas, P., Pagan, R., Raso, J. and Condón, S. 2003. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 45-53.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Ramamurthy, T. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrariness primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 578-585.

- Miles, D. W., Ross, T., Olley, J. and McMeekin, T. A. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*. 38: 133-142.
- Montville, T. J. and Matthews, K.R. 2005. *Food Microbiology an Introduction*. ASM Press, USA.
- Muntada-Garriga, J.M., Rodriguez-Jerez, J.J., Lopez-Sabater, E.I., Mora-Ventura, H.T. 1995. Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Letters in Applied Microbiology*. 20: 225-227.
- Nester, E. W. 1983. *Microbiology*. Philadelphia. Saunders College Publishing.
- Ng, T. L., Chan, P. P., Phua, T. H., Loh, J. P., Yip, R., Wong, C., Liaw, C. W., Tan, B. H., Chiew, K. T., Chua, S. B., Lim, S., Ooi, P. L., Chew, S. K. and Goh, K. T. 2005. Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore. *Journal of Infection*. 51: 413-418.
- Nordstrom, J.L., Kaysner, C.A., Blackstone, G.M., Vickery, M.C.L., Bowers, J.C., DePaola, A. 2004. Effect of intertidal exposure on *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific Northwest oysters. *Journal of Food Protection*. 67: 2178-2182.
- Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N. C., Dambrosio, A., Montagna, C., Chiocco, D. 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International Journal of Food Microbiology*. 106: 219-222.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 3150-3155.
- Opstal, I. V., Vanmuysen, C. M., Wuytack, E. Y., Masschalck, B. and Michiels, C. W. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 179-191.
- Ottaviani, D., Santarelli, S., Bacchiocchi, S., Masini, L., Ghittino, C., Bacchiocchi, I. 2005. Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. *Food Microbiology*. 22: 585-590.

- Panagou, E. Z., Katsaboxakis, C. Z. and Nychas, G. J. 2002. Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. *International Journal of Food Microbiology*. 76: 11-18.
- Penna, T. C. V. and Moraes, D. A. 2002. The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. 65: 415-418.
- Powsey, R. K. 2002. Case studies in food microbiology for food safety and quality. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Rahman, M. S., Guizani, N. and Al-Rezeiki, M. H. 2004. D- and Z-value of microflora in tuna mince during moist- and dry- heating. *Lebensmittel Wissenschaft Und-Technologie*. 37: 93-98.
- Rajkumar, M. and Kumaraguru vasagam, K. P. 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 261: 649-658.
- Ren, T., Su, Y.-C. 2006. Effects to electrolyzed oxidizing water treatment on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in raw oysters. *Journal of Food Protection*. 69: 1829-1834.
- Russell, A. D., Harries, D. 1967. Some Aspects of Thermal Injury in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 15(2): 407-410.
- Russell, A. D., Harries, D. 1968. Damage to *Escherichia coli* on Exposure to Moist Heat. *Applied and Environmental Microbiology*. 16(9): 1394-1399.
- Scheie, P., Ehrenspeck, S. 1973. Large Surface Blebs on *Escherichia coli* Heated to Inactivating Temperatures. *Bacteriology*. 114(2): 814-818.
- Schultz, F. J., Smith, J. L. 1994. *Foodborne Disease Handbook Volume 1*. Marcel Dekker. Inc. New York.
- Sen, B., Dutta, B., Chatterjee, S., Bhattacharya, S. K. and Ramamurthy, T. 2005. The first outbreak of acute diarrhea due to a pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Kolkata, India. *National Institute of Cholera and Enteric Diseases, India*.
- Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., Nishibuchi, M. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*. 58: 3568-3573.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Silva, F. M., Gibbs, P., Vieira, M. C. and Silva C. L. M. 199. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology*. 51: 95-103.
- Sofos, J. N. 2005. Improving the safety of fresh meat. CRC Press, USA.
- Su, Y. C. and Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*. xx: xxx-xxx.
- Sumner, J. and Ross, T. 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*. 77: 55-59.
- Stickney, R. R. 1994. Principles of aquaculture. Acid Free Paper, USA.
- Tchango, J. T., Tailliez, R., Eb, P., Njine, T. and Hornez, J. P. 1997. Heat resistance of the spoilage yeasts *Candida pelliculosa* and *Kloeckera apis* and pasteurization values for some tropical fruit juices and nectars. *Food Microbiology*. 14: 93-99.
- Thompson, C.A., Vanderzant, C. 1976. Effect of processing, distribution and storage on *Vibrio parahaemolyticus* and bacterial counts of oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science*. 41: 123-127.
- Urano, H., Ishikawa, H. and Fukuzaki, S. 2006. Involvement of radical species in inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in saline solutions by Direct-Current Electric Treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102: 457-463.
- Vuddhakul, V., Bhoopong, P., Hayeebilan, F., Subhadhirasakul, S. 2006. Inhibition activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*. 24: 413-418.
- Wong, H. C., Chen, M. C., Liu, S. H. and Liu, D. P. 1999. Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *International Journal of Food Microbiology*. 52: 181-188.
- Wong, H. C., Wang, P., Chen, S. Y. and Chiu, S. W. 2004. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiology Letters*. 233: 269-275.
- Yamazaki, M., Inuzuka, K., Matsumoto, M., Miwa, Y., Hiramatsu, R. and Matsui, H. 2000. Epidemiological study of outbreaks and sporadic cases due to *Vibrio parahaemolyticus* –serotype O3:K6 in Aichi Prefecture, during 1988 and 2001. *Kansenshogaku Zasshi*. 21:71-78.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 6-11.

Zaika, L. L. and Phillips, J. G. 2005. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of *Shigella flexneri* strain 5348 under aerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 101: 179-187.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และวิธีเตรียม

Alkaline Peptone Water (APW)

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Alkaline Peptone Water

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเพื่อให้ได้พีเอช 8.5 ± 0.2 หลังฆ่าเชื้อแบ่งอาหารใส่หลอดฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

LIM Medium

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Pancreatic digest of casein	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
L-lysine HCL	10	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Ferric Amonium Citrate	0.5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
วุ้น	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม LIM Medium

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 6.6 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7.4

ส่วนประกอบ

NaCl	7.650	กรัม
Na ₂ HPO ₄ , anhydrous	0.724	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.210	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Phosphate-Buffered Saline (PBS)

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar

ส่วนประกอบ

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Sodium thiosulfate.5H ₂ O	10	กรัม
Sodium citrate.2H ₂ O	10	กรัม
Sodium cholate	3	กรัม
Oxgall	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Ferric citrate	1	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar

เตรียมในฟลาสก์ปริมาตรอย่างน้อย 3 เท่าของปริมาตรที่ต้องการใช้ เติมส่วนผสมลงในน้ำกลั่นที่อุ่น ให้ความร้อนจนละลาย ต้มจนเดือดด้วยกลดงทันที อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เย็นถึง 50 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Triple Sugar Iron (TSI) Agar

ส่วนประกอบ

Medium 1

Polypeptone	20	กรัม
NaCl	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Glucose	1	กรัม
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.2	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
วุ้น	13	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Medium 2

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Proteose peptone	5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
FeSO_4	0.2	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
วุ้น	12	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Triple Sugar Iron (TSI) Agar (อาจใช้สูตรของ medium 1 หรือ medium 2 ในการเตรียม)

ผสมส่วนผสมของ medium 1 ลงในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนเป็นครั้งคราว คัมมาน 1 นาที เพื่อละลายส่วนผสมเติมลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตรประมาณ 1/3 ของปริมาตรหลอด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่เฮซสุคท้าย 7.3 ± 0.2 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับ medium 2 เตรียมทำนองเดียวกับ medium 1 แต่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พีเอชสุดท้าย 7.4 ± 0.2 ก่อนอาหารแข็งตัวนำหลอดมาเอียงให้มีความยาวของส่วน slant 4-5 เซนติเมตร 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 แบ่งใส่ขวดนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 7.3 ± 0.2 (หมายเหตุ: ถ้าใช้กับ *Vibrio* spp. ซึ่งชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 2-3)

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 , 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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 7.2 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Urea Broth

ส่วนประกอบ

Urea	20	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Na ₂ HPO ₄	9.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	9.1	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Urea Broth

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น หรือนำไปให้ความร้อน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูบนแผ่นกรองเท่ากับ 0.45 ไมครอน ปิดเปิดอาหาร 1.5-3.0 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในหลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร พิเศษสุดท้ายเท่ากับ 6.8±0.2

Stock VC Medium

ส่วนประกอบ

Poly peptone	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Beef extract	3	กรัม
NaCl	20	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2	กรัม
Agar	8	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Stock VC Medium

ชั่งส่วนผสมยกเว้น Agar ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 แล้วใส่ Agar คัมให้ Agar ละลาย เค็มลงในหลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ทดสอบ (reagent)

Oxidase reagent

ส่วนประกอบ

N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine·2HCl	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Oxidase reagent

ละลาย N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine·2HCl ในน้ำกลั่น ควรเก็บไว้ในขวดแก้วทึบแสงและเก็บไว้ในตู้เย็น จะสามารถเก็บได้ถึง 7 วัน
(หมายเหตุ: อาจใช้ 1% N,N-dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride แทน)

Kovacs' Reagent

ส่วนประกอบ

<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Amyl alcohol (normal)	75	มิลลิลิตร
HCl (เข้มข้น)	25	กรัม

วิธีเตรียม Kovacs' Reagent

ละลาย *p*-Dimethylaminobenzaldehyde 5 กรัมในเอมีลแอลกอฮอล์ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก (เข้มข้น) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

วิธีการทดสอบ

การวิเคราะห์จำนวน การแยกเชื้อและการจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด

1. การตรวจหาปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลด้วยวิธี MPN

- 1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารทะเล (ตัวอย่างปลาให้ใช้ส่วนของเนื้อเยื่อที่ผิว เหงือกและทางเดินอาหารของปลา สำหรับกุ้งถ้าเป็นไปได้ให้ใช้ทั้งตัว ถ้าใหญ่เกินไปให้เลือกส่วนกลางของตัวสัตว์ ซึ่งรวมเหงือกและทางเดินอาหาร) 50 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นอาหารนาน 90 วินาที โดยใช้ความเร็วสูง (สำหรับตัวอย่างหอยให้ใช้ทั้งหมด 12 ตัว รวมเนื้อในและของเหลว ตีปั่นด้วยความเร็วสูง 90 วินาที ชั่ง 50 กรัม สำหรับวิเคราะห์)
- 1.2 เติม PBS ปริมาตร 450 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจาง 10^{-1}) ตีปั่นอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางต่อไปใน PBS จนถึง 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} หรืออาจเจือจางที่ระดับความเจือจางสูงขึ้นถ้าจำเป็น
- 1.3 ปิเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดอาหาร Alkaline Peptone Water (APW) ความเข้มข้น 2 เท่าของสูตรปกติจำนวน 3 หลอด ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร แต่ละหลอดจะมีปริมาณตัวอย่างอาหาร 1 กรัม จากนั้นปิเปิดตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร APW ตามสูตรปกติปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 3 หลอด ซึ่งจะมีปริมาณตัวอย่างอาหาร 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 กรัมต่อหลอดที่แต่ละระดับความเจือจางตามลำดับ
- 1.4 นำหลอด APW ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.5 บันทึกรายการจำนวนหลอดและระดับความเจือจางที่เกิดความขุ่น นำข้อมูลที่ได้เปิดตารางค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้อาหารเหลว 3 หลอด (ภาคผนวก ง)

2. การแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ให้บริสุทธิ์

- 2.1 เชื้อเชื้อจากหลอด APW ที่ 3 ระดับความเจือจางสูงสุดที่มีการเจริญ (เกิดความขุ่น) โดยเชื้อเชื้อจากอาหาร APW ที่ผิวด้านบนตกลงมาประมาณ 1 เซนติเมตร (อย่าเขย่าหลอด) ลากลงบนผิวหน้าอาหาร TCBS ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เขียนระดับความเจือจางของหลอดที่นำมาบนจานอาหาร TCBS ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 นำอาหาร TCBS ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคลนิจของ *V. parahaemolyticus* จะมีลักษณะกลม สีเขียวหรือน้ำเงินเขียว ทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร

3. การจำแนกชนิดของ *V. parahaemolyticus*

เชื้อเชื้อจากโคลนที่สงสัยว่าเป็นโคลนิจของ *V. parahaemolyticus* จำนวน ≥ 2 โคลนิจลากลงบนผิวหน้าของอาหารในหลอด TSA slant ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการย้อมแกรมและการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

3.1 การย้อมแกรม

- 3.1.1 เชื้อเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 เติมน้ำเกลือเป็นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์ ทิ้งให้แห้งในอากาศ ครึ่งเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
- 3.1.2 หยด crystal violet-ammonium oxalate ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
- 3.1.3 เปิดก๊อกน้ำให้ไหลเบา ๆ ล้างรอยสเมียร์ด้วยน้ำนาน 5 วินาที
- 3.1.4 ล้างรอยสเมียร์ด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram's iodine) เทส่วนเกินทิ้งไป แล้วเทน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์อีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 นาที
- 3.1.5 ล้างด้วยน้ำอีกครั้งเช่นเดียวกับข้อ 3
- 3.1.6 หยดสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 นาน 30 วินาทีสำหรับชะล้างสเมียร์
- 3.1.7 ล้างด้วยน้ำอีกครั้งเช่นเดียวกับข้อ 3
- 3.1.8 หยด safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
- 3.1.9 ล้างด้วยน้ำอีกครั้งเช่นเดียวกับข้อ 3
- 3.1.10 ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ ต่อดูดด้วยกึ่งหลอดจุกทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- 3.1.11 ตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างและลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ โดยเซลล์ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีหลายรูปร่าง (pleomorphic) เป็นท่อน โค้งหรือท่อนตรงมีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์

3.2 การทดสอบทางชีวเคมี

3.2.1 การเจริญในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ถ่ายเชื้อที่เจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 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) นำไปบ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญโดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 0 และ 10

3.2.2 การเจริญในอาหาร TSI และ LIM ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 ถ่ายเชื้อลงอาหาร TSI โดยการลากที่ผิวหน้าของ slant และแทงลงไปจนถึงก้นหลอด จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร LIM ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 เช่นเดียวกันโดยแทงลงไปตรง ๆ ให้ถึงก้นหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *V. parahaemolyticus* จะทำให้ส่วนของบริเวณที่ลาดเอียง (Slant) ของอาหาร TSI มีสีแดง (Alkaline) และส่วนของก้นหลอดอาหาร (Butt) มีสีเหลือง (Acid) ไม่มีการสร้างแก๊ส และไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ไม่เกิดสีดำ) สำหรับในอาหาร LIM เชื้อชนิดนี้จะให้ผลของไลซีน (Lysine) อินโดล (Indole) และการเคลื่อนที่ (Motility) เป็นบวกทั้งหมด

3.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

ใช้เชื้อที่เจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 สำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส วิธีการทดสอบทำได้โดย ปิเปิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเชื้อที่ขึ้นในหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 สังเกตการเกิดแก๊ส ถ้าเกิดแก๊สแสดงว่าให้ผลบวก หรืออีกวิธีหนึ่ง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 หนึ่งหยดลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อมา 1 ลูป กวนให้เข้ากัน ถ้าเกิดแก๊สทันทีแสดงว่าให้ผลบวก

3.2.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)

เตรียมเชื้อที่เจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 หยด oxidase reagent (N,N,N',N' -Tetramethyl-p-phenylenediamine-2HCl) ลงไปในหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 โดยตรง ถ้าเกิดสีชมพูจนถึงสีม่วงเข้ม แสดงว่าให้ผลบวก

3.2.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease test)

เขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากหลอดอาหาร TSA slant ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 ลงในอาหาร Urea Broth ที่เติมโซเดียมกลูโคไรด์ร้อยละ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ อาหารจะเป็นสีชมพู (ด่าง) เชื้อที่ให้ผลลบควรบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เพราะอาจเป็นสายพันธุ์ที่สร้างยูรีเอสได้ช้า

3.3 การทดสอบยืนยันโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 E

3.3.1 การเตรียมชุดทดสอบ

- เตรียมกล่องสำหรับบ่ม (ถาดและฝาปิด) เติมน้ำกลั่น (หรือน้ำที่ปราศจากแร่ธาตุ หรือน้ำที่ปราศจากสารพิษหรือสารเคมีที่ปล่อยก๊าซออกมา เช่น Cl_2 , CO_2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในถาดเพื่อให้ในบรรยากาศมีความชื้น
- บันทึกลายพินิจของเชื้อที่ทดสอบลงในถาด
- นำชุดทดสอบออกจากหีบบรรจุ ไปวางบนกล่องสำหรับบ่มที่เตรียมไว้

3.3.2 การเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus*

- เชื้อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล ลงในอาหาร TSA slant ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- เชื้อเชื้อจากหลอดอาหาร TSA slant ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ลงในหลอดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland Standard เบอร์ 3
- สารแขวนลอยของเชื้อที่เตรียมได้ควรนำไปใช้ทันที

3.3.3 การเติมสารแขวนลอยของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงบนชุดทดสอบ

- ใช้พาสเจอร์ปีเปิดเติมสารแขวนลอยของเซลล์ที่เตรียมไว้ลงในหลอด **CIT**, **VP** และ **GEL** โดยเติมให้เต็มทั้งในส่วนของ tube และ cupule ที่บรรจุสารทั้ง 3 นี้
- ส่วนสารอื่น ๆ ให้เติมเฉพาะในส่วนของ tube เท่านั้น
- ทำให้เกิดสภาพไร้อากาศในการทดสอบกับสาร **ADH**, **LDC**, **ODC**, **H₂S** และ **URE** โดยเติม mineral oil ปิดทับเพื่อไม่ให้อากาศเข้า
- ปิดฝากล่อง (incubation box)
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3.3 การอ่านผล

- หลังจากบ่มครบตามระยะเวลาแล้ว ให้ทำการอ่านผลโดยอ้างอิงจาก “The Reading Table”
- ถ้าในช่องของสารที่ทดสอบให้ผลบวก 3 ช่องหรือมากกว่า (GLU test + หรือ -) ให้บันทึกผลที่เกิดขึ้นในตารางผลการทดลอง ซึ่งแสดงว่าต้องเติมสารที่ใช้ทดสอบ (reagents) เพิ่มขึ้น ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- TDA test

เติม TDA reagent 1 หยดลงไป ถ้าให้ผลสีน้ำตาลแดงแสดงว่าเกิดผลบวก ให้บันทึกลงในตารางผลการทดลอง

- IND test

เติม JAMES reagent 1 หยดลงไป ถ้าให้ผลสีชมพูทั้งช่องแสดงว่าเกิดผลบวก

- VP test

เติม VP1 และ VP2 reagent อย่างละ 1 หยดลงไป ทั้งไว้อย่างน้อย 10 นาที ถ้าให้ผลสีชมพูหรือแดงแสดงว่าเกิดผลบวก แต่ถ้าหลังจาก 10 นาที ให้ผลสีชมพูอ่อนแสดงว่าเกิดผลลบ บันทึกลงในตารางผลการทดลอง

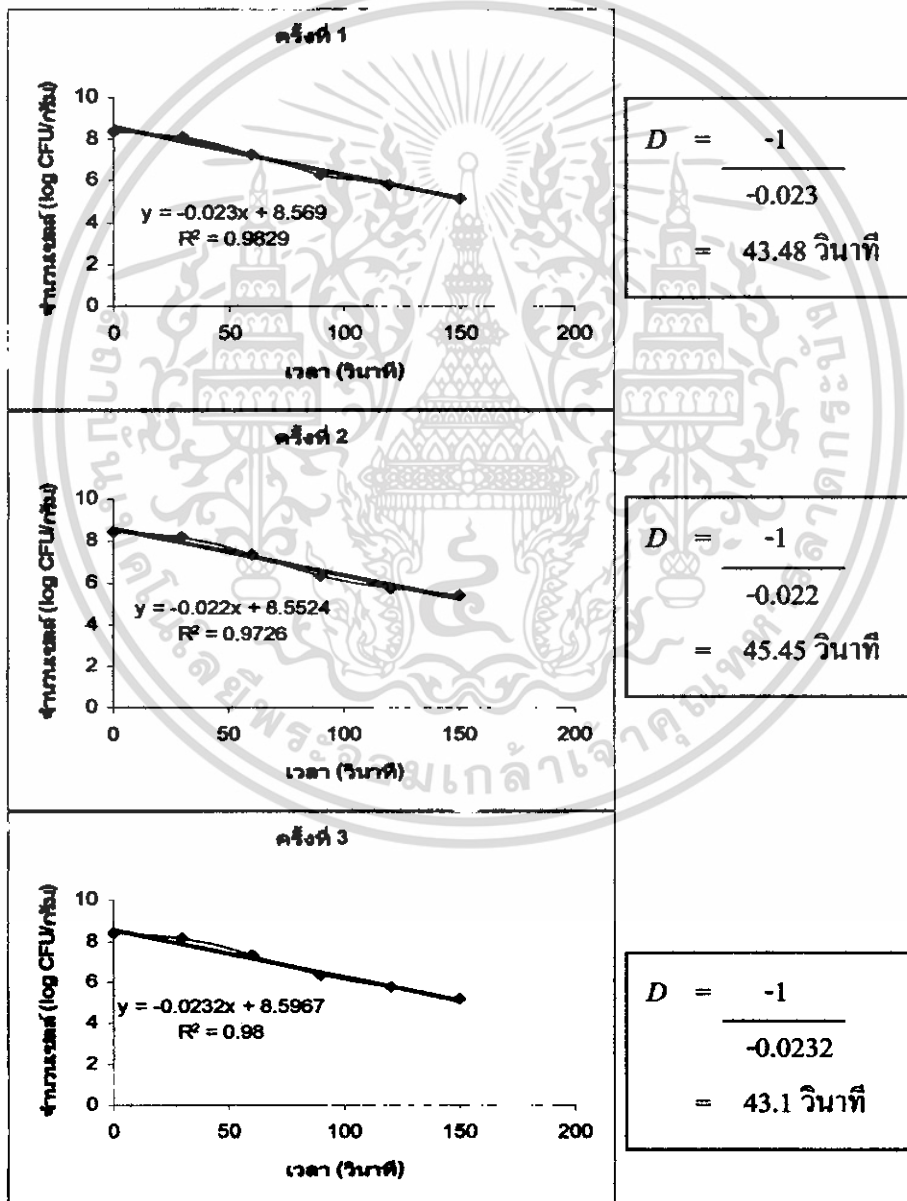
- ถ้าจำนวนช่องที่ให้ผลบวก (ซึ่งรวมทั้งในช่อง GLU test) ก่อนที่จะเติมสารทดสอบลงไปน้อยกว่า 3 ช่อง ให้นำไปบ่มต่ออีก 24 ± 2 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติมสารทดสอบลงไป

ภาคผนวก ง

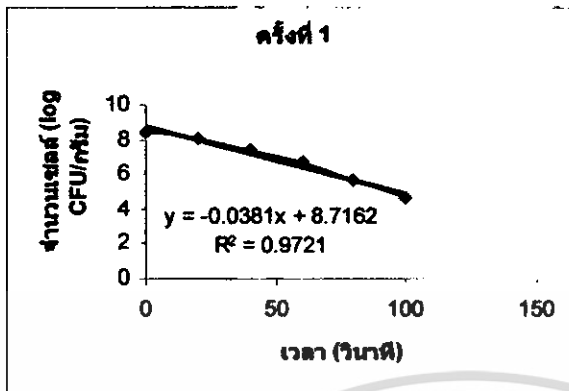
การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการต้านทานต่อความร้อนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกจากอาหารทะเล

1.1 ค่า Decimal reduction time (*D* value) ที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียสของเชื้อ *V. parahaemolyticus* SH1 ที่แยกจากกุ้ง

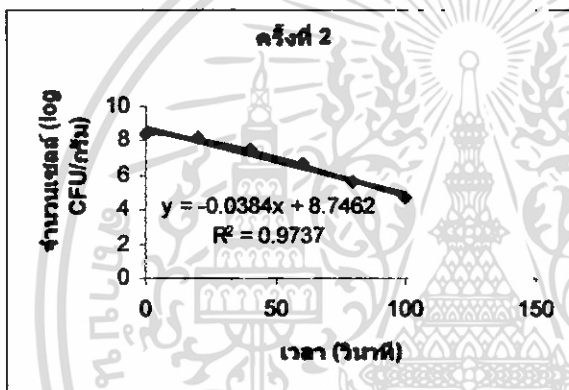


รูปที่ 7 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า *D* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ที่อุณหภูมิ 65 °C ($D_{65^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า *D* value เฉลี่ยเท่ากับ 44.01 วินาที
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดเบี่ยงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



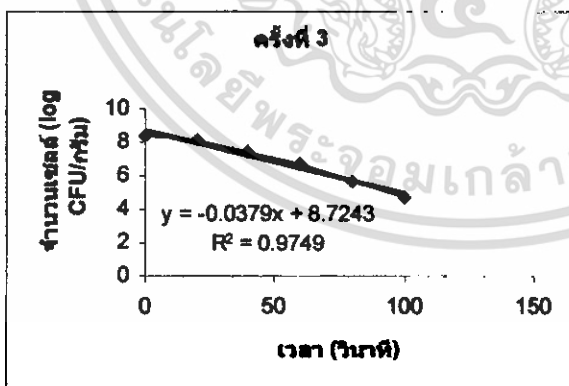
$$D = \frac{-1}{-0.0381}$$

$$= 26.25 \text{ วินาที}$$



$$D = \frac{-1}{-0.0384}$$

$$= 26.04 \text{ วินาที}$$

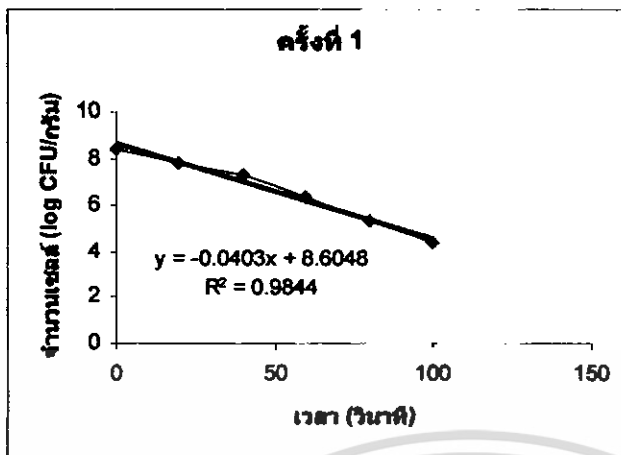


$$D = \frac{-1}{-0.0379}$$

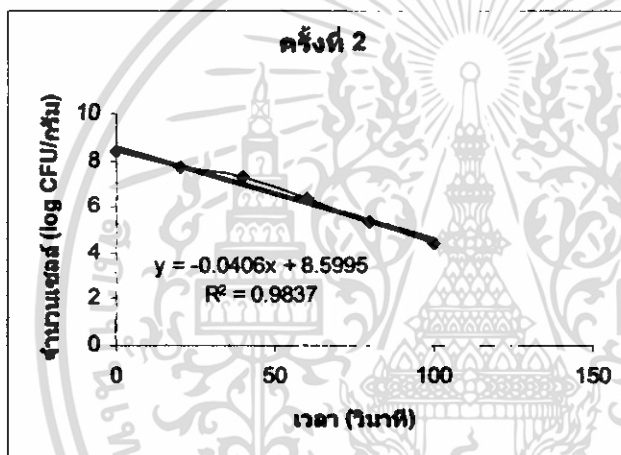
$$= 26.38 \text{ วินาที}$$

รูปที่ 8 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 75°C ($D_{75^\circ\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 26.22 วินาที

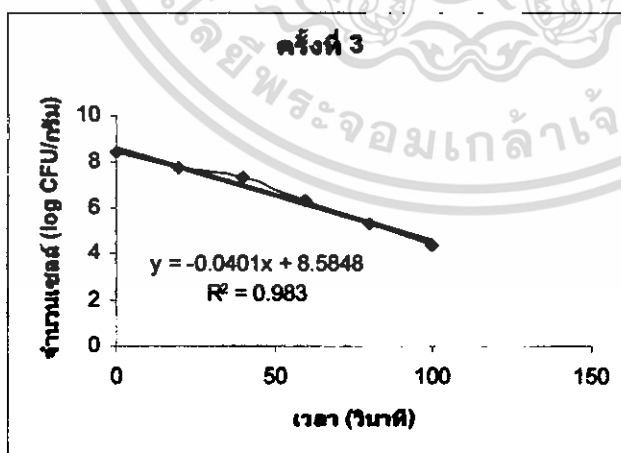
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



$$D = \frac{-1}{-0.0403} = 24.81 \text{ วินาที}$$



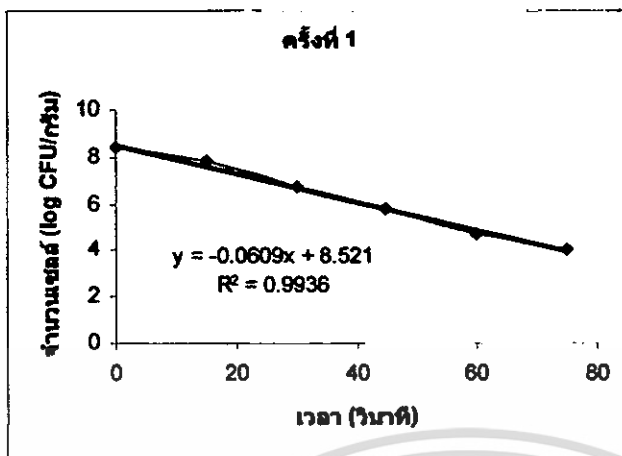
$$D = \frac{-1}{-0.0406} = 24.63 \text{ วินาที}$$



$$D = \frac{-1}{-0.0401} = 24.94 \text{ วินาที}$$

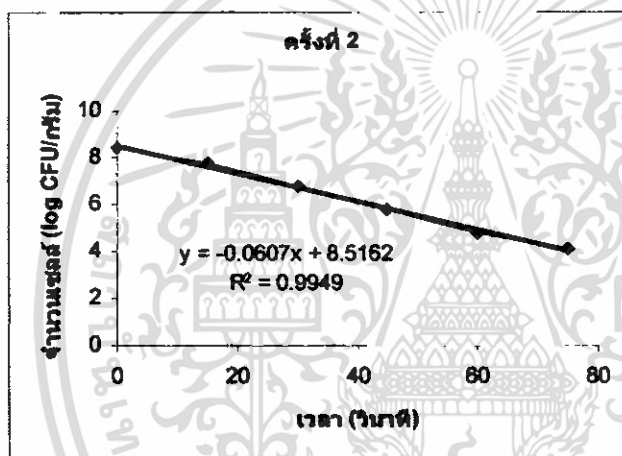
รูปที่ 9 กราฟการยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 85 °C ($D_{85^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 24.79 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



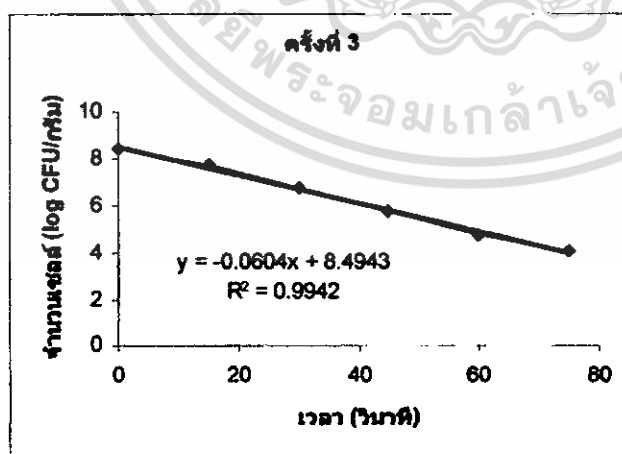
$$D = \frac{-1}{-0.0609}$$

$$= 16.42 \text{ วินาที}$$



$$D = \frac{-1}{-0.0607}$$

$$= 16.47 \text{ วินาที}$$



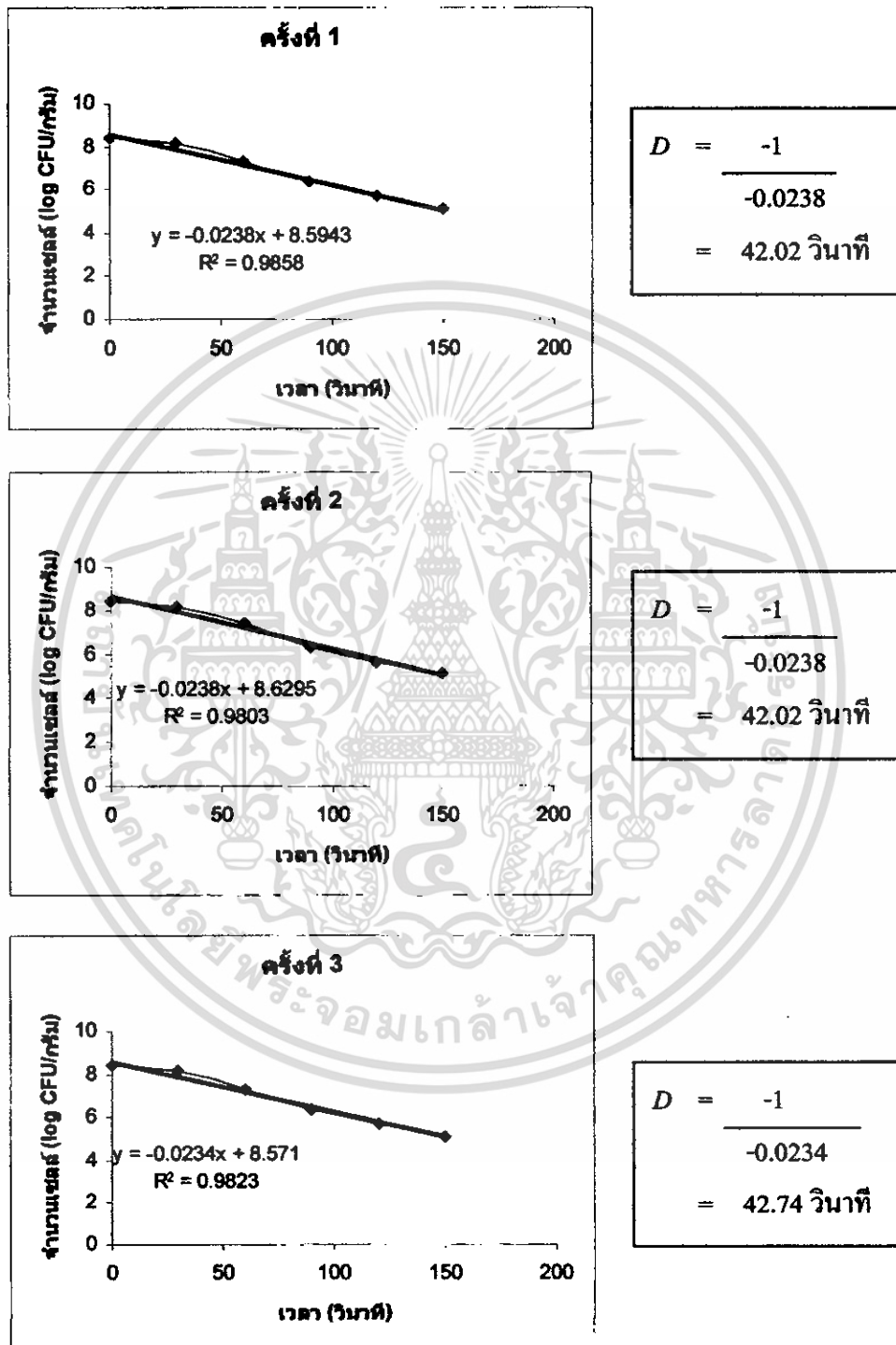
$$D = \frac{-1}{-0.0604}$$

$$= 16.56 \text{ วินาที}$$

รูปที่ 10 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* SH1 ที่แยกได้จากกุ้ง และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 95 °C ($D_{95, \text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 16.48 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ค่า Decimal reduction time (D value) ที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* GS1 ที่แยกจากปลา

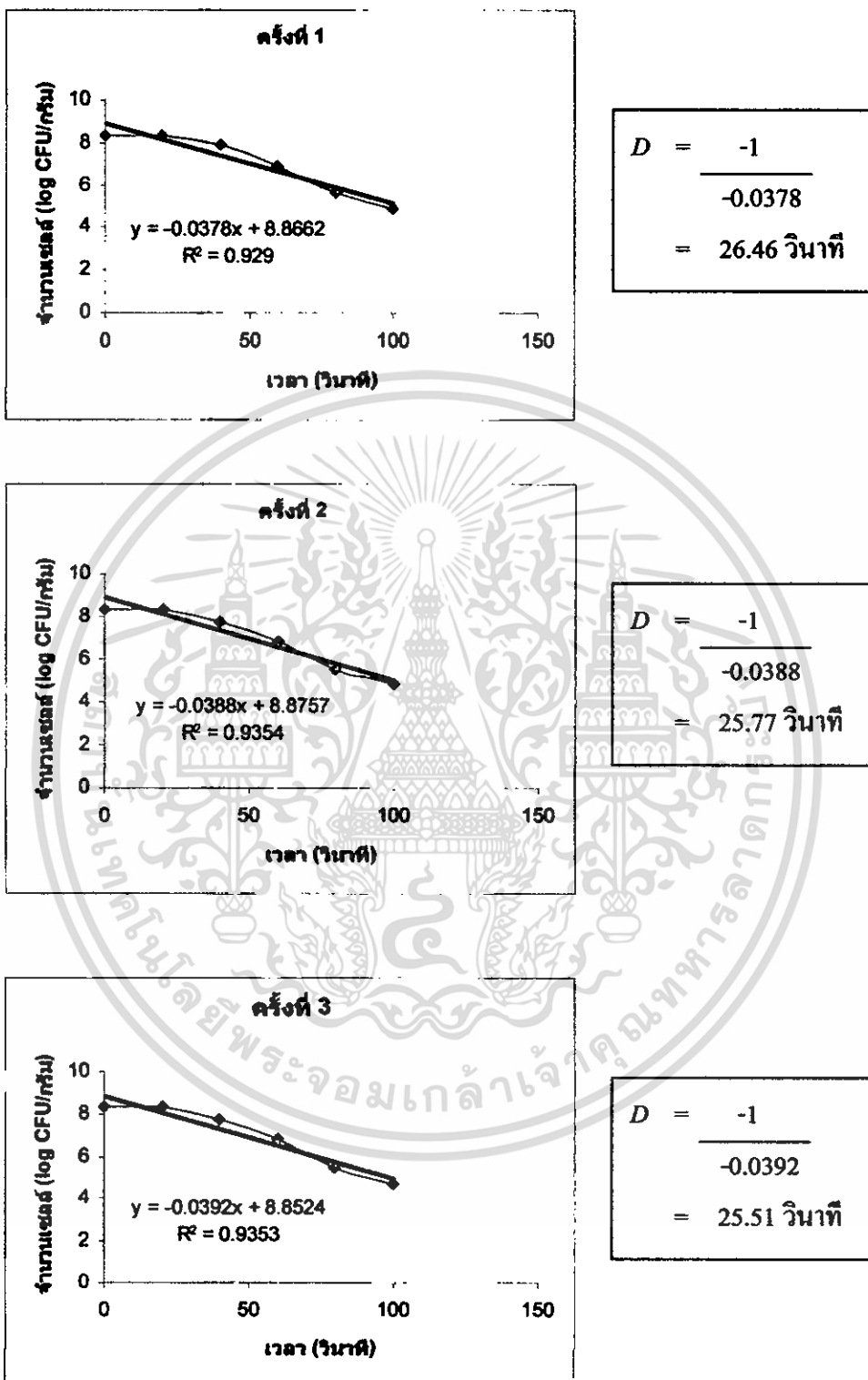


รูปที่ 11 กราฟการย่อยของ *V. parahaemolyticus* GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D

ที่อุณหภูมิ 65 °C ($D_{65^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 42.26 วินาที

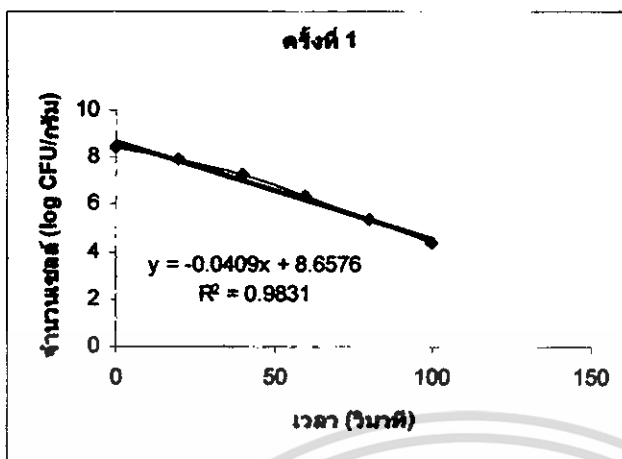
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



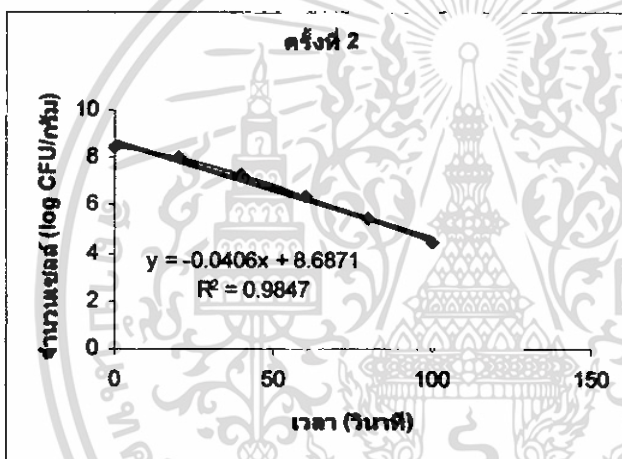
รูปที่ 12 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 75 °C ($D_{75^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 25.91 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



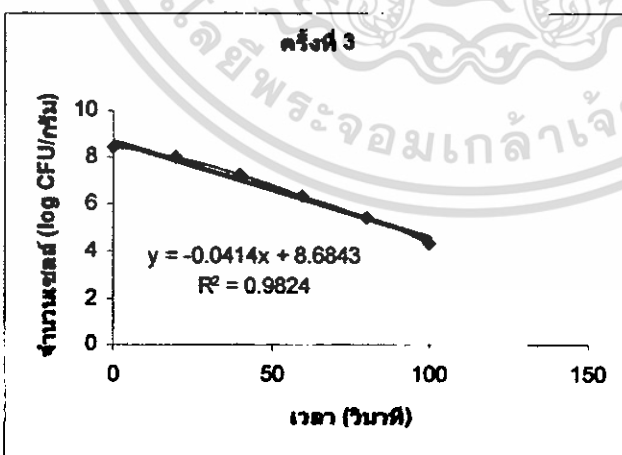
$$D = \frac{-1}{-0.0409}$$

$$= 24.45 \text{ วินาที}$$



$$D = \frac{-1}{-0.0406}$$

$$= 24.63 \text{ วินาที}$$

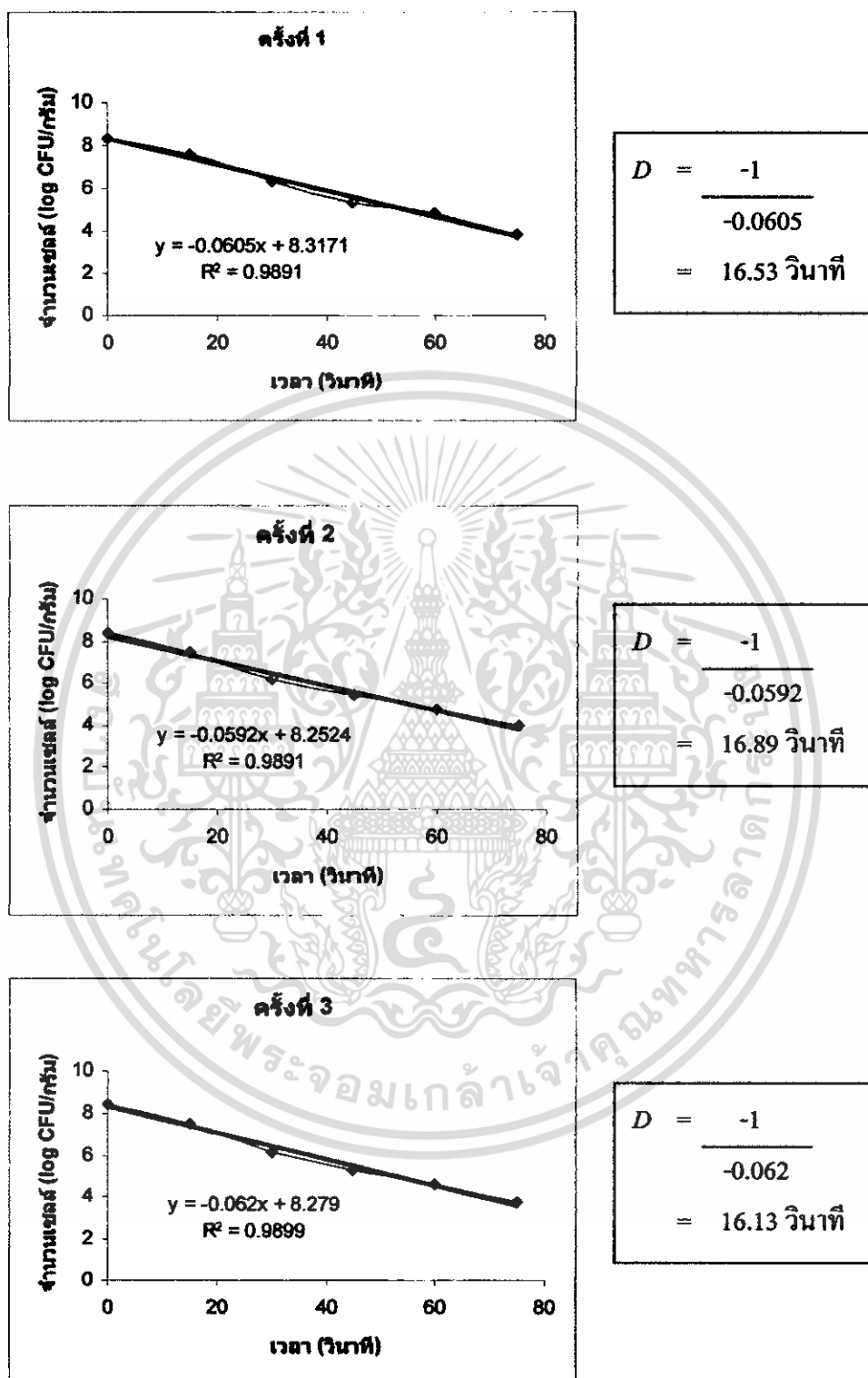


$$D = \frac{-1}{-0.0414}$$

$$= 24.15 \text{ วินาที}$$

รูปที่ 13 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* GS1 ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 85 °C ($D_{85^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 24.41 วินาที

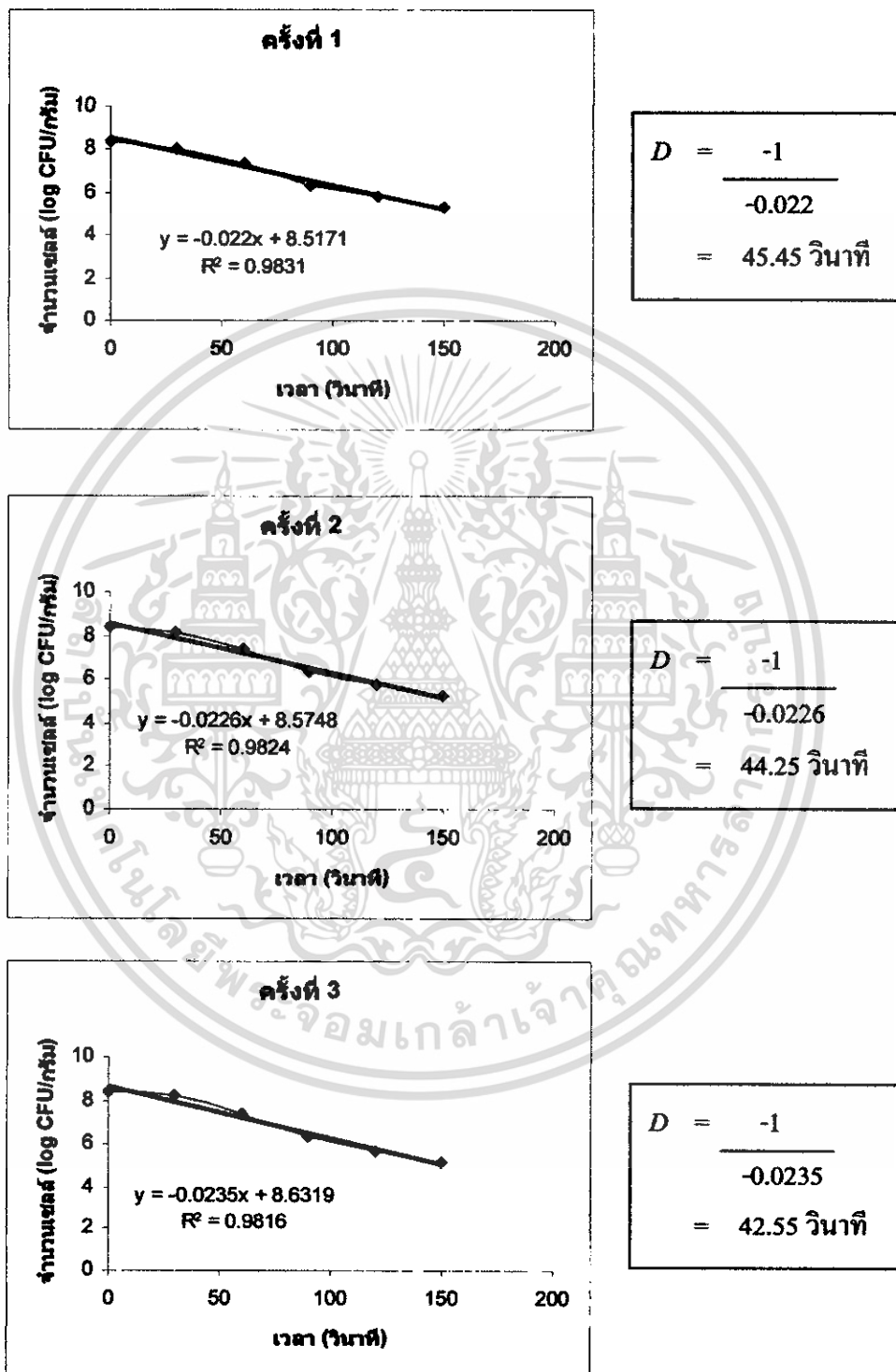
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 กราฟการย่อยของ *V. parahaemolyticus* GSI ที่แยกได้จากปลา และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 95 °C ($D_{95^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 16.52 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

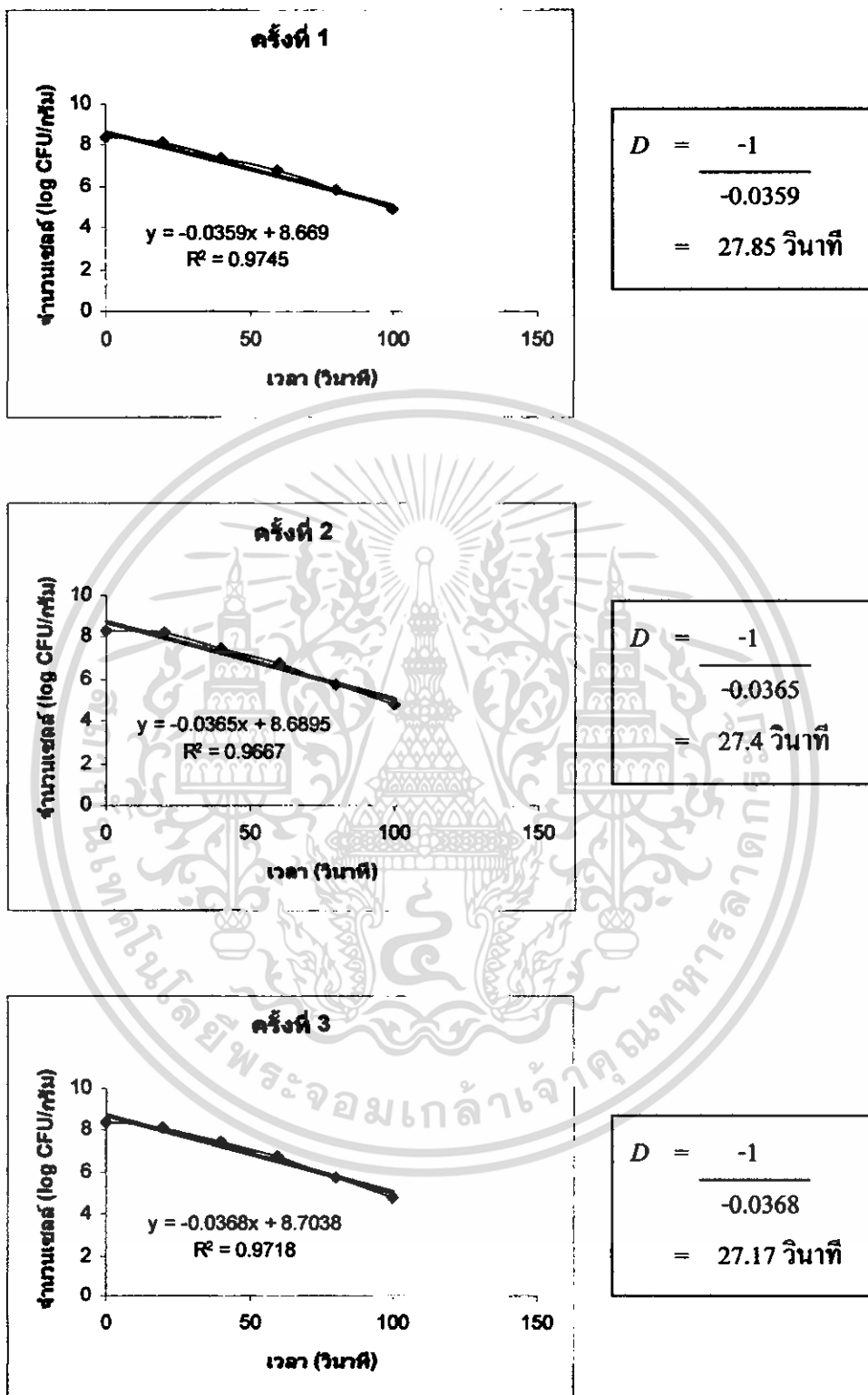
1.3 ค่า Decimal reduction time (D value) ที่อุณหภูมิ 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* MS2 ที่แยกจากปลาหมึก



รูปที่ 15 กราฟการยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหา ค่า

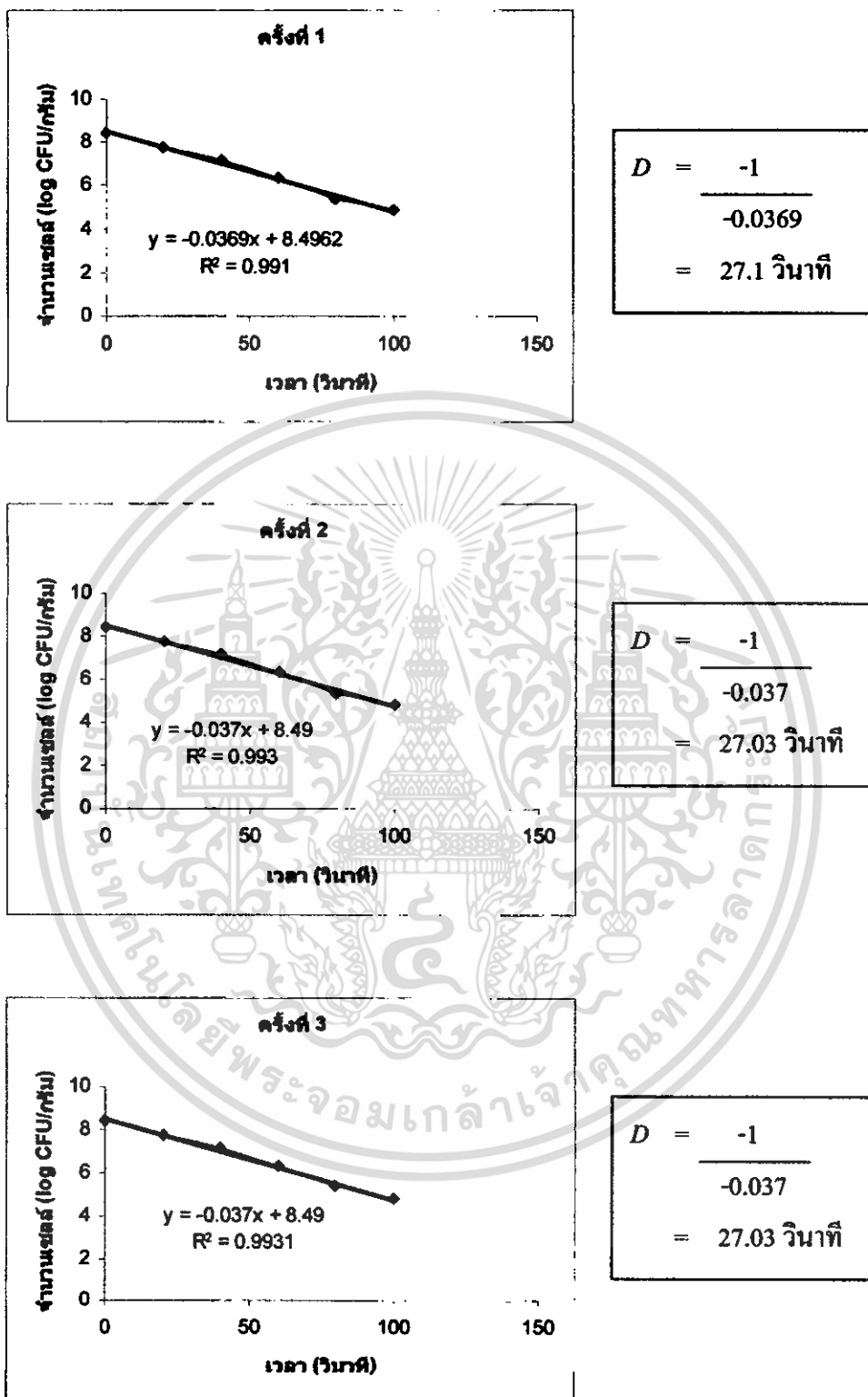
D ที่อุณหภูมิ 65 °C ($D_{65^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 44.08 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



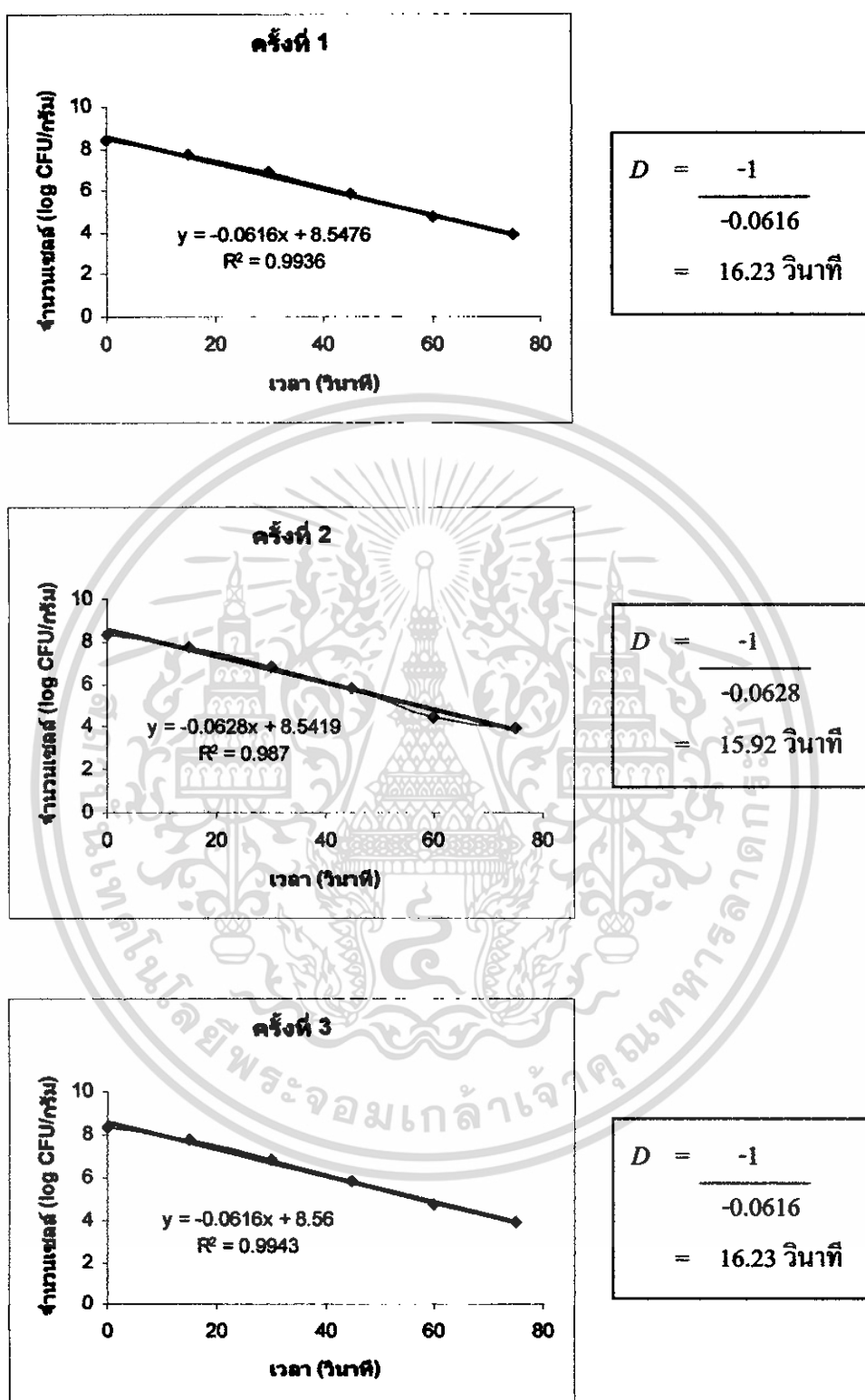
รูปที่ 16 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหา ค่า D ที่อุณหภูมิ 75°C ($D_{75^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 27.47 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหา ค่า D ที่อุณหภูมิ 85 °C ($D_{85^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 27.05 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 กราฟการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึก และการหาค่า D ที่อุณหภูมิ 95 °C ($D_{95^{\circ}\text{C}}$): จากภาพค่า D value เฉลี่ยเท่ากับ 16.13 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางอ่านผลการวิเคราะห์

ตารางที่ 11 ค่า MPN ต่อกรัมของตัวอย่างและค่า Confidence intervals ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้อาหารเหลว 3 หลอด ที่แต่ละระดับความเจือจางซึ่งมี ปริมาณตัวอย่าง 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	--

ที่มา: สุริย์, 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Vibrio parahaemolyticus*

ชนิดของการทดสอบทางชีวเคมี	<i>V. parahaemolyticus</i>
การเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3	+
การเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6	+
การเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8	+
การเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 °C	+
การเคลื่อนที่	+
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	+
การสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส	-
การสร้างเอนไซม์อาร์จินินไดไฮโดรเลส	-
การสร้างเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส	+
การสร้างเอนไซม์ออร์นิตินดีคาร์บอกซิเลส	+
การใช้ซิเตรท	+
การสร้างไฮโครเจนซัลไฟด์	-
การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	-
การสร้างเอนไซม์ทริปโตเฟนคิอะมิเนส	-
การสร้างอินโดล	+
การเกิดกรดจาก Voges-Proskauer	-
การสร้างเอนไซม์เจลาติเนส	+
การหมักข่อยดี-กลูโคส	+
การหมักข่อยดี-แมนนิทอล	+
การหมักข่อยดี-อินซิทอล	-
การหมักข่อยดี-ซอร์บิทอล	-
การหมักข่อยแอล-แรมโนส	-
การหมักข่อยซูโครส	-
การหมักข่อยเมลลิไบโอส	-
การหมักข่อยอะไมคาลิน	-
การหมักข่อยแอล-อะราบีโนส	+
การหมักข่อยแลคโตส	-

ที่มา: www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ตารางอ่านผลสำหรับชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 E

Test	Active Ingredients	QTY (mg/cup.)	Reactions/Enzymes	Results	
				Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl- βD-galactopyranoside)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red/orange(2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red/orange(2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red/orange(2)
CIT	Trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green/yellow	blue-green/blue
H ₂ S	Sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless/greyish	black deposit/ thin line
URE	Urea	0.76	UREase	yellow	red/orange(2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate	
				yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate	
				colorless/pale green / yellow	pink
VP	Sodium pyruvate	1.9	Acetoin production (Voges Proskauer)	VP1 + VP 2/ 10 min	
				colorless	pink/red(5)
GEL	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation/oxidation (GLUcose)(4)	blue/blue-green	yellow/ greyishyellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation/oxidation (MANnitol)(4)	blue/blue-green	yellow
INO	Inositol	1.9	fermentation/oxidation (INOsitol)(4)	blue/blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation/oxidation (SORbitol)(4)	blue/blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation/oxidation (RHAmmose)(4)	blue/blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation/oxidation (SACcharose)(4)	blue/blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation/oxidation (MELibiose)(4)	blue/blue-green	yellow
AMY	Amygdalin	0.57	fermentation/oxidation (AMYgdalin)(4)	blue/blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation/oxidation (ARAbinose)(4)	blue/blue-green	yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ตารางอ่านผลสำหรับชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 E (ต่อ)

Test	Active Ingredients	QTY (mg/cup.)	Reactions/Enzymes	Results	
				Negative	Positive
OX	(see oxidase test package insert)		Cytochrome-Oxidase	(see oxidase test package insert)	
Nitrate reduction GLU tube	Potassium nitrate	0.076	NO ₂ production	NIT 1 + NIT 2/2-5 min	
			Reduction to N ₂ gas	yellow	red
				Zn/5 min	
				orange-red	yellow
MOB	API M Medium or microscope	-	motility	non-motile	motile
McC	MacConkey medium	-	growth	absence	presence
OF-F	glucose (API OF Medium)	-	fermentation : under mineral oil	green	yellow
OF-O		-	oxidation : exposed to the air	green	yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้