20425

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

Antimicrobial properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extracts

โดย

นางสาวจุรารัตน์ สุรนันท์ รหัสนักศึกษา 44040120

นางสาวอมรรัตน์ อัคนิจ รหัสนักศึกษา 44040168

T096822

ปพ.
จ642ส
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96822
วัน.เดือน.ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาศาสตร์บัณฑิต

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2547

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

Antimicrobial properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extracts

จัดทำโดย

นางสาวจุรารัตน์ สุรนันท์	รหัสนักศึกษา 44040120
นางสาวอมรรัตน์ อัคนิจ	รหัสนักศึกษา 44040215

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.... 4 / พ.ย. / 2547 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

นางสาวจุรารัตน์ สุรนันท์ , นางสาวอมรรัตน์ อัดนิจ . 2547: สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (Antimicrobial properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extracts)
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , 39 หน้า

บทคัดย่อ

จากการทดสอบหาความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง 1 กรัมต่อปริมาตรเอทานอล 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดที่ได้จะมี pH อยู่ในช่วง 1.8–2.5 และแบ่งสารสกัดที่ได้มาปรับให้เป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มอล โดยให้มี pH อยู่ในช่วง 6.5-7.0 นำสารสกัดที่ได้มาเตรียมความเข้มข้นให้เป็น 2,4,6,8,10,12,14,16,18 และ 20 % w/v และทำการทดสอบหาความไวโดยใช้วิธี agar diffusion พบว่าสารสกัดที่ไม่ได้ปรับและปรับ pH ไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* แต่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *Escherichia coli, Listeria innocua, Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Anatum ได้ โดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Anatum มีความไวต่อการยับยั้งหรือฆ่าต่อสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมากที่สุด

ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้มาใช้ในการทดสอบหาคุณสมบัติของสารสกัดในการเป็นสารยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Anatum ไม่สามารถเจริญได้คือ 40 และ 50 ppm ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษแต่ไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก

จุรารัตน์ สุรนันท์	.....	4 พ.ย. 2547
อมรรัตน์ อัดนิจ		
ลายมือนักศึกษา	**ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา**	**วัน/เดือน/ปี**

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่างๆ และความคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยแก้ไขรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้เพื่อให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ อาจารย์ สร้อย สุดา พรภักดีวัฒนา ซึ่งเป็นอาจารย์คณะกรรมการปัญหาพิเศษ ที่ช่วยแนะนำ ให้คำปรึกษา และแก้ไขข้อผิดพลาดในการทดลองให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนด้านทุนทรัพย์ในการจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง และขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้คำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆและกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

นางสาวจุรารัตน์ สุรนันท์
นางสาวอมรรัตน์ อัคนิจ
23 ตุลาคม 2547

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	3
ลักษณะกระเจี๊ยบแดง	3
สรรพคุณทางยา	5
การนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร	6
แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ	7
แบคทีเรียกรดแลกติก	17
บทที่ 3 วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์และวิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	24
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก ก	34
ภาคผนวก ข	37
ประวัติผู้เขียน	39

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบคุณค่าทางอาหารของดอกกระเจี๊ยบแดง ต่อน้ำหนักดอกกระเจี๊ยบแดง 100 กรัม	5
2. ขนาดบริเวณใสเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดง (ไม่ปรับ pH)	25
3. ขนาดบริเวณใสเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดง (ปรับ pH)	25

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะต้นดอกกระเจี๊ยบแดงและดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง	4
2. ลักษณะของ clear zone ที่เกิด ของเชื้อ *S.* Anatum ที่สารสกัดดอกกระเจี๊ยบไม่ได้ปรับ pH เทียบกับ drug control	24
3. แสดงจำนวนเชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum ที่เจริญใน สารสกัดกระเจี๊ยบในแต่ละระดับความเข้มข้น	27
4. โคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum ที่เจริญบนอาหาร TSA	28
5. โคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum ที่นำมาตรวจสอบบน selective media	28

บทที่ 1

บทนำ

ดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่พบอยู่ทั่วไป มีราคาถูกและยังมีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น ช่วยลดความดันโลหิต ช่วยขับปัสสาวะ ช่วยย่อยอาหารประเภทไขมัน ช่วยขับเสมหะ เป็นต้น และยังสามารถนำมาสกัดสีเพื่อใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ และได้มีการศึกษาพบว่าดอกกระเจี๊ยบแดงเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ แอนโธไซยานิน เบต้าแคโรทีน กอสสิเพติน กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยที่กรดอินทรีย์ส่งผลให้ค่า pH ต่ำ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด

ดังนั้นจึงควรที่จะทำการศึกษาถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยผลที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษานี้คือสามารถนำสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมาใช้ทดแทนสารเคมีที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งเป็นอาหารหมักของประเทศไทย เพื่อยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีชี้คุณภาพทางด้านสุขาภิบาล และยังอาจใช้เป็นสารให้สีแก่ผลิตภัณฑ์ โดยจะไปลดการใช้สารเคมี เช่น ไนไตรท์-ไนเตรท ซึ่งสารเคมีนี้อาจก่อให้เกิดสารไนโตรซามีนที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งได้

วัตถุประสงค์

1. ทดสอบหาความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยวิธี Agar diffusion test
2. ทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง
3. หาความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ลักษณะของกระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดง เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae มีชื่อทางพฤกษศาสตร์คือ *Hibiscus sabdariffa, Linn.* กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชเส้นใยตระกูลเดียวกับปอแก้วไทย มีชื่อเรียกในประเทศไทยหรือชื่อท้องถิ่นหลายชื่อ เช่น ภาคกลางเรียกว่า กระเจี๊ยบเปรี้ยว กระเจี๊ยบแดง ส้มพอเหมาะ ทางเชียงใหม่เรียกว่า แกงแดง ทางตากเรียกว่า ส้มตะเลงเครง ทางอีสานเรียกว่า ส้มพอดี ทางเหนือเรียกว่า ส้มเก็งเค็ง ส้มพอเหมาะ ทางแม่ฮ่องสอนเรียกว่า ส้มปู่ ชาวมลายูเรียกว่า Asum susar (วีรดา, 2518) พันธุ์ที่นิยมเพาะปลูกในประเทศไทยในปัจจุบันมี 2 พันธุ์คือ พันธุ์ซูดานและพันธุ์บราซิล โดยเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศเยอรมันตะวันตก กระเจี๊ยบแดงชอบอากาศร้อนหรือค่อนข้างร้อน มีฝนตกชุ่มชื้นแต่ไม่มีน้ำขัง ขึ้นได้ทุกสภาพดินต้องการน้ำระยะแรก 1-2 เดือนหลังจากนั้นจะสามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี เกษตรกรนิยมปลูกกระเจี๊ยบแดงในช่วงกลางฤดูฝนคือในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน ในการเก็บเกี่ยวเกษตรกรจะต้องรีบแยกกลีบดอกให้เสร็จภายในวันนั้น ไม่ควรทิ้งค้างคืนเพราะจะทำให้กลีบดอกเน่าและเสื่อมคุณภาพลงได้ ในการทำดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งจะต้องใช้เวลาตากแดดประมาณ 3-4 วัน จึงจะแห้งสนิท โดยกลีบดอกสดประมาณ 8-10 กิโลกรัม จะได้ดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งประมาณ 1 กิโลกรัม (บริษัทการจัดการเกษตรและอุตสาหกรรม จำกัด, 2532)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชฤดูเดียว มีลักษณะลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งตั้งแต่ 3 ถึง 9 กิ่ง ความสูงประมาณ 1.50 ถึง 3.50 เมตร สีของต้นค่อนข้างเขียวเข้มถึงแดง ใบเกิดสลับตามข้อ หูใบยาว ใบเป็นลักษณะใบปาล์มมี 3 ถึง7 แฉก ขอบใบหยัก ดอกแดง-เหลือง ค่อนข้างใหญ่ ก้านดอกสั้น กระเปาะเมล็ดยาวประมาณ 5.0 เซนติเมตร กว้าง 5.0 ถึง 5.3 เซนติเมตร มีรากแก้วลึก เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตได้ในดินเกือบทุกชนิดเช่นเดียวกับปอแก้ว มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งไม่ชอบที่ลุ่มน้ำขัง และ ดินที่มีกรดหรือเบสจัด (ณรงค์ และ เนาวรัตน์, 2530) กลีบรองกลีบดอกและกลีบเลี้ยงคือส่วนที่นิยมนำไปทำดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง จึงมักเรียกส่วนดังกล่าวว่าดอกกระเจี๊ยบแดง มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ลดไขมันอุดตันผนังหลอดเลือด แก้ร้อนใน กระหายน้ำ ขับน้ำดี แก้นิ่ว เป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ และคลายกล้ามเนื้อมดลูก (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ม.ป.ป.; ประสิทธิ์, 2539) นิยมนำมาทำไวน์ แยม เยลลี่ น้ำกระเจี๊ยบ ชากระเจี๊ยบ

สีแดงของดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถใช้เป็นสีผสมอาหารและเครื่องดื่ม (Esselen และ Sammy, 1973; นัยวิท, 2538) และใช้แทนสีสังเคราะห์ในการย้อมทางชีววิทยาได้ โดยให้สีม่วงถึงสีน้ำเงินในการย้อมนิวเคลียสและย้อมผนังเซลลูโลส (สุดสนอง,2528) โดยลักษณะของต้นดอกกระเจี๊ยบแดง และดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง แสดงในภาพที่ 1

กระเจี๊ยบแดงเริ่มมีการปลูกในประเทศไทยตั้งแต่ พ.ศ. 2510 ที่ศูนย์สาธิตและฝึกอบรมไทย-เยอรมัน ในปัจจุบันพันธุ์กระเจี๊ยบแดงที่ปลูกเป็นพันธุ์กลีบดอกสีแดงถึงสีแดงเข้ม ได้แก่ พันธุ์ ซูดาน และ พันธุ์บราซิล ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศเยอรมันนีตะวันตก มีลักษณะของกลีบดอกโต สีแดงเข้ม กลีบดอกหนา (ภาพที่ 1-ก) ให้ผลผลิตค่อนข้างสูง โดยมีองค์ประกอบคุณค่าทางอาหารดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ S-2760 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ดอกค่อนข้างดกสีแดงแต่มีข้อเสียที่กลีบดอกค่อนข้างบาง เมื่อแยกกลีบดอกออกแล้วสามารถเอาเมล็ดในกระเปาะมาทำพันธุ์ได้ สำหรับกระเปาะเมล็ดเมื่อแห้งจะแตกออกเองได้ ส่วนฤดูกาลปลูก เนื่องจากกระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่มีการตอบสนองต่อช่วงแสง คือ จะออกดอกเมื่อมีช่วงแสงต่ำน้อยกว่า 12 ชั่วโมง ได้แก่ ประมาณเดือนตุลาคม ถึง พฤศจิกายน ดังนั้นกระเจี๊ยบแดงจึงมีการปลูกในช่วงกลางฤดูฝน ช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง สิงหาคม มีการเพาะปลูกมากบริเวณอำเภอพระพุทธบาท อำเภอพัฒนานิคม และ อำเภอลำนารายณ์ โดยมักปลูกกระเจี๊ยบแดงภายหลังจากการปลูกข้าวโพดรุ่นแรกแล้วประมาณ 1-2 เดือน กระเจี๊ยบแดงเริ่มเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุประมาณ 110 วัน หรือประมาณปลายตุลาคม ถึง พฤศจิกายน เนื่องจากกระเจี๊ยบแดงมีการใช้ประโยชน์จากกลีบเลี้ยงดอก (calyx) ที่เกิดจากการพัฒนาของฐานรองดอกที่เจริญห่อหุ้มกระเปาะเมล็ด ดังนั้นดอกกระเจี๊ยบแดงเมื่อเก็บเกี่ยวมาแล้วจะผ่านกระบวนการแปรรูปขั้นต้นโดยการกระทุ้งเอากระเปาะเมล็ดซึ่งอยู่บริเวณตรงกลางดอกออกก่อน แล้วนำไปตากแดด 3-5 วัน ให้แห้ง (ภาพที่ 1-ข) กลีบดอกกระเจี๊ยบแดงสดจำนวน 8-10 กิโลกรัม เมื่อตากแห้งแล้วก็จะได้กลีบดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งประมาณ 1 กิโลกรัม

(ก)

(ข)

ภาพที่ 1 (ก) ลักษณะต้นดอกกระเจี๊ยบแดง (ข) ดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง

ที่มา : ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (2543)

ตารางที่1 ส่วนประกอบคุณค่าทางอาหารของดอกกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำหนักดอกกระเจี๊ยบแดง 100 กรัม

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
ความชื้น	86.60 มิลลิกรัม
พลังงาน	460.00 มิลลิกรัม
ไขมัน	0.30 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	9.40 กรัม
เส้นใย	1.30 กรัม
โปรตีน	1.40 กรัม
แคลเซียม	151.00 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	59.00 มิลลิกรัม
เหล็ก	1.00 มิลลิกรัม
วิตามินบี 1	0.01 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2	0.24 มิลลิกรัม
ไนอาซีน	1.80 มิลลิกรัม
วิตามินซี	18.0 มิลลิกรัม
วิตามินเอ	10833 หน่วยสากล
pH	2.0-3.0
ความเป็นกรด (Acidity) (ร้อยละ)	0.5-1.2
เพคติน (Pectin) (ร้อยละ)	1.0-1.5

ที่มา : ประศาสตร์ และ พงษ์ศักดิ์ (2519)

สรรพคุณทางยา

1. ช่วยลดความดันโลหิต
2. ช่วยขับปัสสาวะ รักษานิ่ว และโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ
3. ช่วยย่อยอาหารประเภทไขมัน
4. ช่วยระบาย
5. มีฤทธิ์ทำให้การขับกรดยูริกลดลง
6. ช่วยรักษาและป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน
7. ช่วยลดอัตราการดูดซึมแอลกอฮอล์
8. ช่วยขับเสมหะ ด้วยกรดอินทรีย์ในใบอ่อน ยอดอ่อน กลีบเลี้ยงและกลีบประดับ

การนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร

1.1 ใช้ทำชากระเจี๊ยบ

ชากระเจี๊ยบเป็นเครื่องดื่มที่มีคุณสมบัติทางยา มีกลิ่นหอม และเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติไม่มีคาเฟอีน ไม่มีสารพิษ ชากระเจี๊ยบเตรียมได้โดยไม่ต้องใช้วิธีการทางเคมี และคัดเลือกเฉพาะกลีบเลี้ยงดอกที่สมบูรณ์เพื่อให้ได้ชาสมุนไพรที่มีคุณภาพดี กระบวนการนี้ทำให้ยังคงมีสารจากธรรมชาติ ปริมาณสารอาหาร รสชาติ กลิ่นหอม สีและคุณสมบัติของสารเคมีที่มีอยู่ในพืช ปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุในผลิตภัณฑ์ช่วยในด้านสุขภาพและทำให้มีชีวิตชีวา เมื่อดื่มเป็นประจำโดยใช้เพียง ¼ หรือ ½ ช้อนชา แล้วต้ม

1.2 น้ำกระเจี๊ยบเข้มข้น

สกัดมาจากกลีบดอกของกระเจี๊ยบ ซึ่งมีวิตามินและเกลือแร่สูง ซึ่งน้ำกระเจี๊ยบเข้มข้นนี้ได้สกัดผ่านกรรมวิธีที่มีการควบคุมสภาวะเพื่อที่จะให้เหลือความเป็นธรรมชาติมากที่สุด เช่น คุณค่า สี กลิ่น รสชาติและคุณค่าของสมุนไพร

1.3 น้ำกระเจี๊ยบพร้อมดื่ม

สกัดมาจากกลีบดอกของกระเจี๊ยบ ซึ่งมีวิตามินและเกลือแร่สูง ซึ่งน้ำกระเจี๊ยบเข้มข้นนี้ได้สกัดผ่านกรรมวิธีที่มีการควบคุมสภาวะเพื่อที่จะให้เหลือความเป็นธรรมชาติมากที่สุด เช่น คุณค่า สี กลิ่น รสชาติและคุณค่าของสมุนไพร

1.4 แยมกระเจี๊ยบ

ทำมาจากกลีบดอกกระเจี๊ยบหวาน มีวิตามิน เอ ซี แร่ธาตุอยู่สูง แยมกระเจี๊ยบนี้ใช้ทาขนมปัง บิสกิต และขนมคบเคี้ยวต่างๆ สามารถรับประทานได้ทุกเวลา เป็นมื้อเช้าหรือเป็นอาหารว่าง

1.5 Roselle Halva

มีลักษณะนุ่ม มีรสชาติหวานเปรี้ยว รสชาติเหมือนลูกพรุน ซึ่งเป็นขนมหวานหรือขนมขบเคี้ยวที่ดีเยี่ยม จะดีมากถ้ารับประทานตอนแช่เย็น ซึ่ง halva มี ไฟเบอร์และวิตามินอยู่สูง ซึ่งสารในผลิตภัณฑ์นี้จะทำให้สุขภาพดีเมื่อรับประทานอย่างเป็นประจำ

1.6 ใช้ในการทำสีผสมอาหาร

ควรให้มีการใช้สีผสมอาหารจากธรรมชาติมากกว่าการใช้สีสังเคราะห์ในอาหาร ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตสีแดงธรรมชาติจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง พบว่ากระบวนการผลิตที่เหมาะสมประกอบด้วยกระบวนการสกัดแอนโธไซยานินจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งโดยการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งแอนโธไซยานินมีการใช้เป็นสีผสมอาหารมานานแล้ว โดยแอนโธไซยานินเป็นตัวทำให้เกิดสีแดงในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น น้ำผลไม้ แยม ผลิตภัณฑ์ดองหรือเชื่อม ดังนั้นกระเจี๊ยบแดงจึงเป็นวัตถุดิบหนึ่งที่ใช้ทำสีสังเคราะห์เพราะว่าหาง่ายและราคาถูกในประเทศไทย

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

1. *Staphylococcus aureus*

เชื้อ*Staph. aureus*ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลม (cocci) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น จัดอยู่ในจำพวกแสตปฟิลโลคอกไคที่สร้างสารพิษซึ่งขับออกมานอกเซลล์ เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxins) ได้แก่ สารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหาร เป็นผลให้เกิดอาการท้องเดิน เชื้อนี้มีรายงานการศึกษาเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1894 โดย Dennys และต่อมาในปี ค.ศ. 1914 Barber ได้ทดลองความเป็นพิษของเชื้อนี้กับตนเองโดยบริโภคนมสดที่มีเชื้อ *Staph. aureus* เข้าไป และในปี ค.ศ. 1930 Dack และคณะ ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า *Staph. aureus* สามารถทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคของเหลวที่กรองได้จากเชื้อ *Staph. aureus* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเดินขึ้นสืบเนื่องจากแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. สร้างสารพิษชนิดใดชนิดหนึ่งหรือมากกว่า (อ้างโดยสุมณฑา, 2545) ในอดีตโรคอาหารเป็นพิษจำกัดอยู่เฉพาะสปีชีเดียว คือ *Staph. aureus* แต่ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อ *Staphylococcus* spp. อื่นก็สร้างสารพิษขึ้นด้วย แต่เนื่องจากการตรวจสอบเชื้อ *Staph. aureus* อาศัยสมบัติการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) และเทอร์โมนิวคลิเอส (thermonuclease เขียนย่อว่า TNase) ของแบคทีเรียเป็นสำคัญ เชื้อ *Staph. aureus* มีสมบัติดังกล่าวนี้ การใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์จึงมุ่งไปที่ *Staph. aureus* เพียงสปีชีเดียว หลังจากเทคนิคการตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหารได้พัฒนาขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อ *Staphylococcus* spp. อื่นที่สร้าง เอนเทอโรทอกซินด้วย แต่มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยกว่า *Staph. aureus* มาก

1.1 สปีชีของเชื้อที่พบในอาหาร

แบคทีเรียในจีนัส Staphylococcus มีมากกว่า 30 สปีชี แต่สปีชีที่พบในอาหารมีประมาณ 18 สปีชี ในจำนวนนี้มีเพียง 6 สปีชีที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส ส่วนมากสปีชีที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสจะสร้างเอนไซม์ TNase ด้วย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่ามีประมาณ 10 สปีชีที่ไม่สร้างเอนไซม์ทั้งสอง แต่สร้างเอนเทอโรทอกซิน เชื้อ *Staphylococcus* spp. สายพันธุ์ที่มีสมบัติดังกล่าวมีลักษณะพิเศษคือ จะไม่ทำให้เลือดตกตะกอนและไม่ใช้น้ำตาลแมนนิตอลโดยการหมัก ผลดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่ารายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staph. aureus* ในอดีตน่าจะต่ำกว่าที่เกิดขึ้นจริง เพราะการตรวจวิเคราะห์ *Staph. aureus* นั้นขึ้นอยู่กับสมบัติของเอนไซม์โคแอกกูเลสและ TNase เป็นสำคัญ

เชื้อ *Staphylococcus* spp.พวกที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase-negative strains) มีอย่างน้อย 10 สปีชีที่สร้างเอนเทอโรทอกซินในอาหารหนึ่งในสปีชีเหล่านั้น คือ *Staph. intermedius* เชื้อ *Staphylococcus* spp. นี้มีแหล่งกำเนิดในโพรงจมูกและผิวหนังของสัตว์กินเนื้อและม้า แต่ไม่ใคร่พบในมนุษย์ และรู้กันว่าเป็นเชื้อโรคของสุนัข นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อื่นๆอีก คือ *Staph. cohenii, Staph. epidermidis, Staph. haemolyticus* และ *Staph. xylosus* ซึ่งแยกได้จากนมแกะร่วมกับ *S. aureus* Bautista และคณะ(1988) พบว่า สมบัติการหมักแมนนิตอลมีประโยชน์ในการนำมาใช้

ทดสอบเชื้อ *Staphylococcus* spp.เพื่อจำแนกพวกที่สร้าง เอนเทอโรทอกซินออกจากพวกที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน Valle และคณะ (1990) ทำการศึกษาเชื้อ *Staphylococcus* spp.ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส 272 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากแพะที่มีสุขภาพดี พบว่าร้อยว่า 22 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่ไม่ให้เอนไซม์โคแอกกูเลสสามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

1.2 นิสัย การดำรงชีวิต และการแพร่กระจายของเชื้อ *Staphylococcus* spp.

เชื้อ *Staphylococcus* spp.เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ปรับตัวตามเจ้าบ้าน (host-adapted organism) ประมาณครึ่งหนึ่งเป็นสปีชีที่อาศัยมนุษย์เพียงอย่างเดียว (เช่น *Staph. cohnii* subsp. *cohnii*) และอาศัยมนุษย์กับสัตว์อื่น (เช่น *Staph. aureus*) บริเวณปลายเปิดของอวัยวะที่เป็นช่องทางติดต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกายของโฮสต์ มักพบเชื้อ *Staphylococcus* spp.เป็นจำนวนมาก และถ้าบริเวณนี้อับชื้นอาจพบ *Staph. aureus* ประมาณ 10^3-10^6/cm^2 แต่ถ้าบริเวณนี้แห้งอาจพบเชื้อในปริมาณ 10^1-10^3/cm^2 (Kloos และ Bennerman, 1994) จมูก มือ ซอกเล็บ แขน รวมทั้งส่วนอื่นๆของร่างกายของผู้เตรียมและจัดบริการอาหาร นับว่าเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เชื้อ *Staphylococcus* spp.แพร่กระจายไปในอาหาร

ในบรรดาแสตปฟิลโลคอกไคทั้งหลาย ปรากฏว่า *Staph. aureus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้นบ่อยที่สุด การศึกษาต่อไปนี้จึงมุ่งไปที่สปีชีนี้เป็นสำคัญ

ตามปกติ *Staph. aureus* คาดว่าจะมีอยู่ในอาหารเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะอาหารที่มีนมและเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ และอาหารที่ผ่านการสัมผัสและเคลื่อนย้ายด้วยมือมนุษย์ รวมทั้งอาหารที่ไม่ได้ทำให้สุกก่อนบริโภค ปัจจัยที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหารดังนี้

1.2.1 ความต้องการอาหารในการเจริญเติบโตและผลิตเอนเทอโรทอกซิน:เชื้อ *Staphylococcus* spp. เหมือนกับแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นๆ คือ ต้องการอาหารที่มีสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเป็นการเฉพาะ เช่น ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการวิตามินบีจากไธอามีนและกรดนิโคตินิก ในสภาวะไร้อากาศแบคทีเรียต้องการยูเรซิล (uracil) ด้วย

Miller และ Fung (1973) ได้ออกแบบอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรหนึ่งที่มีสารอาหารน้อยที่สุด เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus* spp.ในสภาวะที่มีอากาศ เพื่อให้เกิดเอนเทอโรทอกซินขึ้น ได้ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมทเป็นแหล่งธาตุ C, N และพลังงาน นอกจากเกลืออนินทรีย์แล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้มีกรดอะมิโนอีก 3 ชนิด คือ อาร์จินีน ซีสตีน และเฟนิลอลานิน และวิตามินอีก 4 ชนิด คือ แพนโทธิเนต ไบโอติน ไนอาซีน และไธอามีน Wu และ Bergdoll (1971) กล่าวว่า อาร์จินีนเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสร้างเอนเทอโรทอกซินชนิดบี (staphylococcal enterotoxin B เขียนย่อว่า SEB)

1.2.2 ช่วงอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโต : แม้ว่าเชื้อ *Staphylococcus* spp. จะเป็นแบคทีเรียจำพวกมีโซฟิลส์ แต่ปรากฏว่าบางสายพันธุ์ของ *Staph. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำที่ 6.7 องศาเซลเซียส (Angelotti และคณะ, 1961) ต่อมา Smith และคณะ (1983) พบว่า *Staph. aureus* 3 สาย

พันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้นในคัสตาร์ดซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการบ่มเพาะเชื้อน้อยลงเมื่อทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิสูงขึ้นเล็กน้อย (คืออุณหภูมิ 46.7-48.9 องศาเซลเซียส) และยังพบว่า *Staph. aureus* ซึ่งเจริญในชิกเก้นอลาคิง (Chicken a' la king) ที่อุณหภูมิ 44.4 องศาเซลเซียส กลับไม่เจริญในสลัดแฮมที่อุณหภูมิเดียวกัน กล่าวโดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่ *Staph. aureus* เจริญอยู่ระหว่าง 7-47.8 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิที่สร้างเอนเทอโรทอกซินอยู่ระหว่าง 10-46 องศาเซลเซียส แต่ที่เหมาะสมที่สุด คือ 40-45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะปกติ แต่ถ้ามีปัจจัยร่วมอื่นๆ อุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่ *Staph. aureus* จะเจริญและสร้างเอนเทอโรทอกซินอาจเปลี่ยนไป

1.3 ชนิดเอนเทอโรทอกซินที่ *Staph. aureus* สร้างในอาหาร

การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* spp. เป็นผลมาจากเอนเทอโรทอกซินหรือสารพิษที่ *Staph. aureus* ผลิตขึ้นและขับออกมาภายนอกเซลล์ สารพิษนี้ทนความร้อน ในปี ค.ศ. 1998 มีรายงานว่าแบคทีเรียจำพวกแตปฟิลโลคอกไคสร้างเอนเทอโรทอกซิน 10 ชนิด โดย 3 ชนิดเพิ่งค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ (SEG, SHE และ SEI) ในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษขึ้น ส่วนมากจะแยกได้เอนเทอโรทอกซินชนิด SEA (สุมณฑา และคณะ 2522; Sperber, 1977)

ชนิดเอนเทอโรทอกซินในอาหารจากแหล่งต่างๆมักจะแตกต่างกัน เช่น ในสหรัฐฯ พบว่ากว่าร้อยละ 50 ของเอนเทอโรทอกซินที่แยกได้จากคนเป็นชนิด SEA เพียงอย่างเดียว หรือ SEA ร่วมกับเอนเทอโรทอกซินชนิดอื่น แต่ในประเทศศรีลังกากลับพบว่า *Staph. aureus* ที่แยกได้จากคนเป็น SEA เพียงร้อยละ 7.8 เท่านั้น ในขณะที่พบ SEB มากกว่าชนิดอื่นๆ ซึ่งแตกต่างจากรายงานผลการศึกษาที่เคยมีมาก่อนหน้านี้ (Palasuntheram และ Beauchamp, 1982) *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารให้เอนเทอโรทอกซินที่ต่างกัน ผลการสำรวจอาหารพร้อมบริโภคจากไนจีเรียแยกได้ *Staph. aureus* ชนิดที่สร้างสารพิษจำนวน 248 สายพันธุ์ ร้อยละ 44 สร้าง SED (Adesiyun, 1984) จากการศึกษา *Staph. aureus* ที่ให้เอนไซม์โคแอกกูเลสจำนวน 449 ตัวอย่างที่แยกได้จากอาหารต่างๆของไนจีเรียเป็นสปีชีที่ให้สารพิษชนิด SEA, SEB, SED และ SEC คิดเป็นร้อยละ 57, 15,6 และ 5 ตามลำดับ (Sokari และ Anozie, 1990)

สุมณฑา และคณะ(2522) ได้ทำการศึกษาชนิดเอนเทอโรทอกซินจาก *Staph. aureus* ที่แยกได้จากอาหารในประเทศไทย 149 ไอโซเลทส์ และแยกได้จากอุจจาระคนไข้อีก 9 ไอโซเลทส์ รวมเป็น 158 ไอโซเลทส์ โดยใช้วิธี Optimum Sensitivity ปรากฏว่าเป็น SEA, SED, SEA+SED และ unidentified type ร้อยละ 33.5, 27.2, 9.5 และ 29.8 ตามลำดับ จากการสังเกตของนักวิจัยคณะนี้ พบว่า *Staph. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารที่ซื้อมาจากตลาดและตัวอย่างอาหารที่เหลือจากผู้ป่วยบริโภคแล้วเกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้น ส่วนมากสร้างเอนเทอโรทอกซินชนิด SEA ส่วนตัวอย่างอาหารแช่เย็นจากภัตตาคารอาหารส่งออก นมและไอศกรีม ส่วนมากเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินชนิด SED สำหรับอาหารปรุงสำเร็จจากภัตตาคารส่วนมากเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินทั้งชนิด SEA และ SED ส่วน *Staph. aureus* ที่แยกได้จากอาหารส่งออกที่ส่งตรวจเพื่อขอใบรับรองทางสาธารณสุขและบาง

สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ จำนวนหนึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดเอนเทอโรทอกซินได้ เนื่องจากในช่วงเวลานั้นมีการตรวจพบ เอนเทอโรทอกซินเพียงไม่กี่ชนิด สารที่ใช้จำแนกเอนเทอโรทอกซินมีจำกัด ดังนั้น จึงจัดสายพันธุ์เหล่านี้ไว้ในจำพวก unidentified enterotoxins

1.4 อาการของผู้ป่วย

อาการของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* spp. มักเกิดขึ้นประมาณ 4 ชั่วโมงหลังบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป แม้ว่าโดยทั่วไปรายงานการเกิดโรคจะเน้นที่การเกิดอาการภายใน 1-6 ชั่วโมงก็ตาม อาการของผู้ป่วย คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย เหงื่อแตก ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย และบางครั้งมีไข้ด้วย ตามปกติอาการจะทรงอยู่ราว 27-48 ชั่วโมง อัตราการตายต่ำมาก การบำบัดรักษาที่ดีที่สุดสำหรับคนปกติคือให้นอนพัก และให้บริโภคน้ำสะอาดผสมเกลือแร่ เหตุที่อาการของโรคเกิดจากเอนเทอโรทอกซินที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและขับออกมาในอาหาร จึงอาจตรวจไม่พบ *Staph. aureus* ในอุจจาระผู้ป่วย การพิสูจน์เพื่อหาสาเหตุของโรคที่เชื่อถือได้มากที่สุด คือ การนำอาหารที่เหลือและอุจจาระของผู้ป่วยไปตรวจหาเอนเทอโรทอกซิน ปริมาณเอนเทอโรทอกซิน ต่ำสุดที่จะก่อให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษอยู่ที่ 20 นาโนกรัม (Evenson และคณะ, 1988)

1.5 อาหารที่เป็นสื่อ

โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* spp. อาจเกิดในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารที่ผ่านการสัมผัสด้วยมือแล้วไม่ผ่านความร้อนอีก

1.6 แหล่งที่พบตามธรรมชาติและการป้องกัน

ตามปกติแบคทีเรียจำพวกแสตปฟิลโลคอกไคเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆได้ไม่ดีนัก โดยเฉพาะในสภาวะที่มีแบคทีเรียให้กรดแลคติกอยู่เป็นจำนวนมาก การเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ต้องการกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด ดังนั้น บ่อยครั้งจึงพบแบคทีเรียชนิดนี้ตามร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ วิธีป้องกันมิให้เชื้อแสตปที่อาจปนเปื้อนมากับอาหารเจริญได้ คือ เก็บรักษาอาหารไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4.4 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถึงเวลาบริโภค ระหว่างปี ค. ศ. 1961-1972 *Staph. aureus* ทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษขึ้นมากกว่า 700 ครั้ง (Bryan, 1988) จากการประมวลหาสาเหตุ Bryan รวบรวมได้ 16 สาเหตุ ทั้งนี้ 5 สาเหตุสำคัญเกิดจาก

- การใช้ความเย็นไม่เพียงพอในการเก็บรักษาอาหาร
- การเตรียมอาหารไว้ล่วงหน้านานเกินไป
- บุคลากรที่มีเชื้อ*Staphylococcus* spp.อยู่ตามร่างกาย หรือมีพฤติกรรมอนามัยไม่เหมาะสมทำหน้าที่สัมผัสกับอาหาร
- การใช้อุณหภูมิในการอุ่นอาหาร และการทำอาหารให้สุกไม่ถูกต้อง
- การทิ้งอาหารไว้บนเครื่องอุ่นอาหาร ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแสตปเป็นผลให้แบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น

20425

สุมณฑา และคณะ (2522) ได้ทำการสำรวจการแพร่กระจายของเชื้อ *Staph. aureus* ชนิดที่ให้เอนไซม์โคแอกกูเลส จำนวน 286 ตัวอย่าง พบอัตราการปนเปื้อนร้อยละ 23.4 ปริมาณของเชื้อที่พบอยู่ระหว่าง 10^2 -10^6 cfu/g (ในกรณีที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษพบปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $4.00x10^5$ – $4.55x10^5$ cfu/g) และในขนมไทยที่หาบเร่และวางขายตามตลาด พบอัตราการปนเปื้อนของ *Staph. aureus* ร้อยละ 60 แต่ปริมาณที่พบค่อนข้างต่ำ อยู่ระหว่าง 10^2-10^4 cfu/g

2. *Salmonella*

ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความรุนแรง นอกจากเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดสูงเป็นอันดับหนึ่งในสหรัฐฯ อังกฤษ และในอีกหลายๆประเทศแล้ว ยังทำให้ประชากรเสียชีวิตสูงสุดแบคทีเรียนี้อยู่ในตระกูลเอนเตอโรแบคเทอริซิอี(Family Enterobacteriaceae) เช่นเดียวกับแบคทีเรียพวกโคลิฟอร์มและ *E. coli* ดังนั้น จึงคาดเดาได้ว่าซัลโมเนลลาจะมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าที่ 37 องศาเซลเซียสจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่ที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้บ่มเพาะเชื้อในขั้นซีเลคทีฟเอนริชเมนต์ (Selective Enrichment) เพราะที่อุณหภูมินี้ เชื้อซัลโมเนลลาเจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่นๆได้ดีกว่า คนและสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแห่งแรก (primary habitat) ของเชื้อซัลโมเนลลา การเกิดโรคอาหารเป็นพิษสืบเนื่องมาจากการบริโภคอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางเดินอาหาร

ได้มีการปรับปรุงวิธีการจำแนกเชื้อซัลโมเนลลาครั้งใหญ่เมื่อไม่นานมานี้ ในอดีตการจำแนกเชื้อซัลโมเนลลาอาศัยชนิดของซีโรวาร์ (serovars) ที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางซีโรวิทยา (Serology) คือปฏิกิริยาการตกตะกอนของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่ผิว (somatic cells) และที่แซ่ (flagellar cells) ซึ่งมีความสัมพันธ์กันเป็นตัวกำหนดสปีชี แต่หลังจากเทคนิคอื่นที่ใช้จีนส์เป็นตัวทดสอบที่เรียกว่า DNA-DNA hybridization และ Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) typing ประสบความสำเร็จทำให้เชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมดถูกนำมาจัดใหม่เป็น 2 สปีชี คือ *Salmonella* Enterica และ *Salmonella* Bongori แต่ละสปีชีจำแนกออกเป็นอีกหลายสปีชีย่อย (subspecies) เชื้อซัลโมเนลลากว่า 2,000 ซีโรวาร์ถูกนำมาจัดอยู่ในสปีชี *Salmonella* Enterica ซึ่งจำแนกย่อยออกเป็น 5 กลุ่มหรือ subspecies ดังนี้

Group II : *S. Enterica subsp.* Salamae

Group III a : *S. Enterica subsp.* arizonae

Group III b : *S. Enterica subsp.* diarizonae

Group IV : *S. Enterica subsp.* houtenae

Group VI : *S. Enterica subsp.* indica

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

แบคทีเรียกลุ่ม V เดิมถูกยกฐานะขึ้นเป็นสปีชี คือ *Salmonella* Bongori (Reeves และคณะ, 1989) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนำไปสู่พัฒนาการของวิธีการเขียนชื่อแบคทีเรียใหม่ กล่าวคือ เดิมเคย เขียนว่า *Salmonella typhimurium* ต่อไปนี้จะต้องเขียนว่า *Salmonella enterica serovar* typhimurium (หรือเขียนย่อว่า*Salmonella* Typhimurium) โดยชื่อจีนัสใช้ตัวเอน ส่วนชื่อสปีชีย่อยใช้ตัวธรรมดา และตัวอักษรแรกให้เป็นตัวพิมพ์ใหญ่ หรือเขียนย่อว่า *S.* Typhimurium

ในทางระบาดวิทยา จำแนกเชื้อซัลโมเนลลาออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (สุมณฑา ,2545) คือ

1) เชื้อซัลโมเนลลาที่อาศัยคนเป็นโฮสต์เพียงอย่างเดียว : ประกอบด้วย *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi C เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์และไข้รากสาดน้อย จัดเป็นเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหลายเชื้อไข้ไทฟอยด์ใช้ระยะฟักตัวนานที่สุด ผู้ป่วยมักมีไข้ขึ้นสูงมาก อาจแยก *S.* Typhi ได้จากเลือด อุจจาระ และ/หรือปัสสาวะของผู้ป่วยได้ก่อนและหลังอาการไข้สูงขึ้น ส่วนไข้รากสาดน้อยมีอาการรุนแรงน้อยกว่าไข้ไทฟอยด์

2) เชื้อซัลโมเนลลาที่ปรับตัวตามโฮสต์ : (สามารถทำให้เกิดโรคกับคนโดยผ่านทางอาหาร) : ประกอบด้วย *S.* Enteritidis สายพันธุ์ PT4 , *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum อาศัยเป็ด-ไก่เป็นโฮสต์ประจำ *S.* Dublin อาศัยวัวเป็นโฮสต์ประจำ *S.* Abortusovis อาศัยแกะเป็นโฮสต์ประจำ และ *S.* Choleraesuis อาศัยห่านเป็นโฮสต์ประจำ

3) เชื้อซัลโมเนลลาที่ไม่จำกัดโฮสต์ : ได้แก่ เชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ ประกอบด้วยเชื้อซัลโมเนลลาที่เหลือทั้งหมดซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (salmonellosis)

2.1 การจำแนกเชื้อซัลโมเนลลาโดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยา : อาศัยสมบัติของโปรตีนที่มีความจำเพาะตามลักษณะทางพันธุกรรมที่ประยุกต์มาใช้ทดสอบสปีชีของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อซัลโมเนลลานั้น ในขั้นแรกจะทำการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่ผิวเซลล์ เรียกว่า somatic antigens (O-antigens) ก่อนโดยจำแนกซีโรวาร์ออกเป็นกลุ่มๆตามตัวอักษรอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ เช่น A, B, C เรื่อยไป ชื่อของซัลโมเนลลาเป็นข้อตกลงระหว่างประเทศ ซีโรวาร์ที่บ่งถึงสปีชีถูกตั้งขึ้นตามสถานที่ที่แยกเชื้อนั้นได้เป็นครั้งแรก เช่น *S.* London, *S.* Miami, *S.* Richmond, *S.* Bankok และ *S.* Rachaburi เป็นต้น ก่อนหน้านี้ ได้มีการตั้งชื่อเชื้อซัลโมเนลลาหลายแบบ ตัวอย่างเช่น *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ในหนูทดลอง

2.2 การแพร่กระจาย : แหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกของเชื้อซัลโมเนลลา คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลง แต่บางทีอาจพบเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ตามร่างกายของมนุษย์และสัตว์ก็เป็นได้ จากลำไส้แบคทีเรียออกมาทางอุจจาระ อาศัยสัตว์ แมลง และน้ำแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย วนเวียนเข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหารสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ วนเวียนเป็นวัฏจักร การขนส่งสัตว์และอาหารระหว่างประเทศทำให้เชื้อกระจายไปทั่วโลก

เชื้อซัลโมเนลลาแม้ว่าจะพบในสัตว์แทบทุกชนิด แต่บริเวณที่พบเชื้อนั้นอาจมากน้อยแตกต่างกัน เช่น บางครั้งอาจพบเชื้อในต่อมน้ำเหลืองมากกว่าในอุจจาระก็เป็นได้ การแพร่เชื้อซัลโมเนลลาจากสัตว์

ที่มีเชื้อไปยังสัตว์ที่ปลอดเชื้อมักเกิดขึ้นบ่อยๆ เพราะมนุษย์และสัตว์อาจเป็นพาหะ คือ มีเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ในร่างกายหรือในอุจจาระ แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมา อัตราของผู้เป็นพาหะเชื้อซัลโมเนลลาสูงสุดในหน้าร้อน (เดือนมีนาคม-พฤษภาคม)และต่ำสุดในหน้าฝน (สิงหาคม-กันยายน) (อรุณและคณะ, 2545)

ในผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อซัลโมเนลลาแพร่กระจายในอาหารหลายชนิดที่มี เนื้อ นม ไข่ และ ผักเป็นส่วนประกอบ สัตว์ปีกเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญ ได้มีการศึกษาการระบาดของเชื้อซัลโมเนลลาที่เกิดกับมนุษย์ 61 ครั้ง สรุปผลได้ดังนี้ (Steele และ Galton, 1967)

- ร้อยละ 23 มีสาเหตุมาจาก ไข่และผลิตภัณฑ์ไข่
- ร้อยละ 16 มีสาเหตุมาจาก ไก่และไก้งวง
- ร้อยละ 8 มีสาเหตุมาจาก เนื้อโคและเนื้อสุกร
- ร้อยละ 3 มีสาเหตุมาจาก ไอศกรีม
- ร้อยละ 2 มีสาเหตุมาจาก สลัดมันฝรั่ง
- ร้อยละ 9 มีสาเหตุมาจาก อาหารอื่นๆ

2.3 การเจริญเติบโต : เชื้อซัลโมเนลลาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดที่เลือกเฉพาะแกรมลบ ซึ่งใช้เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แม้ว่าการแข่งขันจะไม่ดีเท่าแบคทีเรียอื่นๆที่เป็นสมาชิกในตระกูลเดียวกันก็ตาม เชื้อซัลโมเนลลาส่วนมากไม่ใช้น้ำตาลสองชั้นโดยผ่านกระบวนการหมัก เช่น แลคโตส ซูโครส รวมทั้งซาลิซิน แต่สามารถหมักน้ำตาลชั้นเดียว เช่น น้ำตาลกลูโคส ให้ก๊าซ แม้ว่าเชื้อซัลโมเนลลาส่วนมากต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจน แต่ *S.* Typhimurium สามารถใช้ไนเตรท ไนไตรท์ และก๊าซแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนได้

เชื้อซัลโมเนลลาเจริญในช่วง pH เป็นกลาง ระหว่าง 4.0-9.0 ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อซัลโมเนลลาเจริญได้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่ใช้ปรับ ปัจจัยร่วมที่ประกอบด้วย pH, a_w, สารอาหาร และอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กัน และมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา เชื้อซัลโมเนลลาไม่ทนต่อแรงดันออสโมติกเหมือนกับเชื้อ *Staphylococcus* spp. เชื้อซัลโมเนลลาไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือแกงเข้มข้นร้อยละ 9 เกลือไนไตรท์มีประสิทธิผลยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีขึ้นในสภาวะที่มี pH ลดลง แสดงว่าการทำงานของไนไตรท์เกิดจากกรด HNO_2 ในสถานะที่เป็นโมเลกุล หรือกรดที่ไม่แตกตัวมากกว่าในสถานะที่แตกตัว

2.4 อาการของโรคอาหารเป็นพิษ ตามปกติเชื้อซัลโมเนลลาที่ไม่เลือกโฮสต์สามารถทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษได้ภายในเวลา 12-14 ชั่วโมงหลังบริโภคอาหาร ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง (อาการปวดท้องไม่รุนแรงเท่ากับอาการที่ได้รับเชื้อ *Staphylococcus* spp.) ปวดศีรษะ หนาวสั่น และท้องเดิน ตามด้วยอาการเหงื่อแตก อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ เป็นลม มีไข้ปานกลาง มีนงง อาการมักทรงอยู่ราว 2-3 วัน อัตราการตายเฉลี่ยร้อยละ 4.1 ทั้งนี้จะแตกต่างกันตามกลุ่มเสี่ยงคือ ทารกมีอัตราการตายประมาณร้อยละ 5.8 ผู้สูงอายุประมาณร้อยละ 15 และผู้อยู่ในวัยกลางคน

ประมาณร้อยละ 2 สปีชีที่เป็นสาเหตุให้มีอัตราการตายสูงสุดถึงร้อยละ 21 คือ *S.* choleraesuis หลังป่วยแล้วประมาณร้อยละ 5 ของผู้ติดเชื้อยังคงมีเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ในร่างกาย และกลายเป็นพาหะของเชื้อนี้ต่อไป

2.5 อาหารเป็นสื่อ หน่วยงานที่ทำหน้าที่ควบคุมและป้องกันโรคระบาดของสหรัฐฯ ที่เรียกว่า The Centers for Disease Control and Prevention เรียกย่อว่า CDC ระบุว่า แต่ละปีมีผู้ป่วยเฉลี่ยจากเชื้อซัลโมเนลลาประมาณ 40,000 ราย ตายประมาณ 500 ราย (Cohen และ Tauxe, 1986) โดยอาศัยสมมติฐานนี้ จึงประเมินได้ว่าจำนวนผู้ป่วยจริงในสหรัฐฯ ในปี ค.ศ. 1988 น่าจะอยู่ระหว่าง 840,000 ถึง 4 ล้านคน (Tauxe,1991) ส่วนใหญ่การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษสืบเนื่องจากการบริโภคอาหารที่จัดเลี้ยงแบบบุฟเฟ่ต์และอาหารในงานเลี้ยงแบบอื่นๆ

3. Escherichia coli

เอสเชอริเชีย โคไล เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วงในปี ค.ศ.1885 โดยนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันชื่อ ทีโอดอร์ เอสเชอริช (Theodor Escherich) (อ้างโดยสุมณฑา, 2545)ต่อมาได้รับการตั้งชื่อเป็น *Escheichia coli (E. coli)* ก่อนปี ค.ศ. 1982 ไม่ถือว่าเป็นแบคทีเรียที่มีอันตราย แม้ว่าจะเป็นที่เข้าใจกันว่า แบคทีเรียนี้มักจะทำให้เด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนาเกิดอาการท้องเดิน เหตุที่เป็นแบคทีเรียในลำไส้ จึงพบบ่อยในอุจจาระ ของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้ จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดัชนีชี้บ่งถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (index of faecal contamination) นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 เป็นต้นมา *E.coli* ได้รับการจัดไว้ในประเภท จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สืบเนื่องจากการระบาดที่มาจากเนยแข็งนำเข้าสหรัฐฯ

3.1 การจำแนกชนิดของ *E.coli* หลังการระบาดในปี ค.ศ. 1982 ได้มีการจำแนก *E.coli* ออกตามความรุนแรงของการเกิดโรค ลักษณะนิสัยในการเจริญเติบโต และลักษณะทางพันธุกรรมเป็นผลให้แบ่ง *E. coli* เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

(1) กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (Enteropathogenic E. coli) เขียนย่อว่า EPEC

(2) กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (Enteroinvasive E. coli) เขียนย่อว่า EIEC

(3) กลุ่มที่สร้างสารพิษในระบบทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic E. coli) เขียนย่อว่า ETEC

(4) กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhagic E. coli) เขียนย่อว่า EHEC

(5) กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์บุผนังลำไส้ (Enteroaggregative E.coli) เขียนย่อว่า EaggEC

E.coli สายพันธุ์ EPEC, EIEC และ ETEC แพร่กระจายอยู่ในน้ำและอาหาร *E.coli* เกือบทุกชนิดที่ปนเปื้อนมาจากอุจจาระ ส่วน EHEC มักเกี่ยวข้องกับอาหารที่มีเนื้อวัวเป็นส่วนประกอบโดยเฉพาะเนื้อ

บด แต่อาจมีข้อยกเว้นเพราะเกิดการปนเปื้อนข้ามได้ ความรุนแรงของเชื้อ *E.coli* แต่ละกลุ่มสรุปได้ดังนี้

EIEC ได้รับการยืนยันครั้งแรกว่าเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในปี ค.ศ. 1947 และเกิดระบาดเป็นครั้งแรกขึ้นในสหรัฐฯ ในปี ค.ศ. 1971

EPEC ได้รับการยืนยันเป็นครั้งแรกว่าเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในปี ค.ศ. 1961

ETEC ได้รับการยืนยันเป็นครั้งแรกว่าเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในปี ค.ศ. 1980

EHEC ได้รับการยืนยันเป็นครั้งแรกว่าเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในปี ค.ศ. 1982

สำหรับEaggEC เป็นสายพันธุ์ที่เพิ่งค้นพบใหม่ยังไม่ปรากฏความรุนแรงซึ่งจะต้องติดตามกันต่อไป

3.2 การเจริญและการสร้างเอนเทอโรทอกซินชนิดที่ทนความร้อน (Stx) *E.coli* O157 :H7 เจริญและสร้างสารพิษในเนื้อบดที่อุณหภูมิ 21°C หรือ 37°C ในเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนในนมและเนื้อสดที่บดใหม่ๆ *E.coli* สร้างเอนเทอโรทอกซินชนิด Stx_1 เพียงเล็กน้อย (Weeratna และ Doyle, 1991) นักวิจัยคณะนี้ยังพบว่าการสร้าง Stx_1 ระดับสูงสุดเกิดขึ้นในเนื้อสดที่บดใหม่ ส่วนในนมจะสร้างได้ต่ำกว่า สรุปได้ว่า *E.coli* O157 :H7 เจริญและสร้างสารพิษได้ดีในเนื้อสดบดมากกว่าในนม *E.coli* O157 :H7 สร้างสารพิษ Stx ทุกอุณหภูมิที่เอื้อต่อการเจริญเติบโต (Palumobo และคณะ, 1995) แต่ *E.coli* O157 :H7 ไม่เจริญใน EC broth ที่อุณหภูมิ 44.5 °C เหมือนกับ faecal *E.coli* อุณหภูมิสูงสุดที่ *E.coli* O157 :H7 เจริญใน EC broth อยู่ที่ 42 °C (Raghubeer และ Matches, 1990) *E.coli* O157 :H7 ไวต่อกรดโดยเฉพาะในกรณีที่ใช้กรดน้ำส้มหรือกรดแลคติกปรับ pH ช่วง pH ที่เหมาะสม คือ pH เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อย นอกจากนี้ *E.coli* O157 :H7 ยังไม่ทนต่อเกลือแกงสูงเหมือนเชื้อ *Staphylococcus* spp. และไม่ทนต่อความร้อนเหมือน *E.coli* สายพันธุ์อื่น

3.3 อาการของโรคในคนและการกระจาย อาการของโรคในคนที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้เกิดจากสายพันธุ์ *E.coli* O157 :H7 ซึ่งทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร สายพันธุ์ที่ให้ H7 แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1944 จากอุจจาระผู้ป่วยโรคท้องร่วง ส่วนสายพันธุ์ O157 แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระท่านที่เป็นโรคท้องร่วงและตั้งชื่อในปี ค.ศ. 1972 (Orskov และคณะ, 1977) แต่สายพันธุ์ O157 : H7 แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1975 จากคนไข้ที่ถ่ายเป็นเลือด *E.coli* สายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษ Stx ได้รับการจำแนกในปี ค.ศ. 1977 ในสหรัฐฯ (O'Brien และคณะ, 1977) และในแคนาดา (Konowalchuk และคณะ, 1977)

สารพิษ Stx ของ *E.coli* ทำให้คนเกิดอาการถ่ายปัสสาวะปนเลือดที่เรียกว่า Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS) ประกอบด้วยลักษณะอาการที่สำคัญ 3 ประการ คือ

- ไตล้มเหลวเฉียบพลัน
- โลหิตจาง (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง)
- เกร็ดเลือดลดลง (เลือดแข็งตัวช้า)

คาดว่าผู้ได้รับเชื้อ *E.coli* O157 :H7 ร้อยละ 2-7 จะเกิดอาการ HUS ขึ้น HUS เกี่ยวข้องกับ *E.coli* O157 :H7 ที่ผลิตสารพิษชนิด Stx_2 มากกว่าสายพันธุ์ที่ผลิต Stx_1 หรือสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษทั้งสองชนิด (Ostroff และคณะ, 1989)

4. Listeria monocytogenes

แม้ว่าลิสเตอเรียจะเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษไม่บ่อยเท่ากับเชื้อซัลโมเนลลาและแคมฟิลโลแบคเตอร์ แต่ก็ทำให้เกิดการเสียชีวิตในอัตราที่สูง รวมทั้งการตายของทารกแรกเกิดและการแท้ง แลคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 0-4 °C จึงเป็นปัญหากับอาหารที่เก็บในตู้เย็น จึงเป็นผลให้เชื้อนี้ได้รับความสนใจกันมาก การที่มีรายงานการระบาดจากลิสเตอเรียน้อยนั้น อาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียใช้ระยะเวลาฟักตัวนาน (1-90 วัน) กว่าที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการออกมา การสอบทวนหาสาเหตุจึงมีโอกาสผิดพลาดได้

4.1 ประวัติและลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ก่อนปี ค.ศ. 1940 ลิสเตอเรียถูกจัดไว้ในกลุ่ม Listerella ต่อมาได้รับการเปลี่ยนชื่อเป็น Listeria แบคทีเรียนี้มีลักษณะหลายอย่างคล้ายกับแบคทีเรียในจีนัส Brochothrix เช่น รูปร่าง การสร้างเอนไซม์คะทะเลส และการอยู่ร่วมกับแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสตามธรรมชาติ แบคทีเรียทั้งสามสปีชีส์ให้กรดแลคติกจากกลูโคสและใช้น้ำตาลอื่น ๆ โดยการหมัก (แต่แบคทีเรียจำพวกแลคโตบาซิไล ไม่สร้างเอนไซม์คะทะเลส) ครั้งหนึ่งเคยเข้าใจว่าลิสเตอเรียคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มคอรินิฟอร์ม (corymeform) จึงได้รับการจัดไว้ในตระกูลเดียวกัน คือตระกูลคอรินิแบคทีเรียซีอี (Family Corynebacteriaceae) แต่ในปัจจุบันเป็นที่แน่ชัดแล้วว่า ลิสเตอเรียคล้ายกับแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus, Lactobacillus* และ *Streptococcus*

ลิสเตอเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ผอมเล็ก ไม่สร้างสปอร์ และเจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) เมื่อย้อมสีแกรม บางครั้งจะเห็นแบคทีเรียปรากฏขึ้นมีลักษณะคล้ายเป็นอักษรจีน ลิสเตอเรียสร้างเอนไซม์คะทะเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์เอนไซม์ออกซิเดส เคลื่อนที่โดยมีแซ่รอบตัว (peritrichous flagella) ก่อนหน้านี้ รู้จักแบคทีเรียนี้ในฐานะที่ทำให้เกิดโรคระบาดในสัตว์ โดยทำให้สัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว แพะ แกะ เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ในปี ค.ศ. 1926 Murray และคณะ (1926)ได้กล่าวถึงแบคทีเรียนี้เป็นครั้งแรกในชื่อ *Bacterium monocytogenes* ว่าเป็นสาเหตุทำให้กระต่ายในห้องทดลองมีสัญญาณการถูกทำลายของเม็ดเลือดขาว เป็นผลให้แบคทีเรียนี้ได้รับการจัดกลุ่มที่ทำให้คนและสัตว์เป็นโรคนับแต่นั้นมา

การทดสอบทางซีโรวิทยา (Serology) จำแนกลิสเตอเรียออกเป็น 7 สปีชี และเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า *Listeria monocytogenes* เป็นสปีชีที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ แม้ว่าลิสเตอเรียสปีชีอื่น ได้แก่ *L. seeligeri, L.welshimeri* และ *L.iIvanovii* เคยพบว่าเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคลิสเตอริโอซีสในคนด้วยก็ตาม แต่ก็มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยกว่า *L. monocytogenes*

4.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย ลิสเตอเรียแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ อาจพบในผักเน่าเปื่อย ดิน มูลสัตว์ น้ำเสีย หญ้าหมัก และแหล่งน้ำ โดยทั่วไปที่ใดก็ตามที่พบแบคทีเรียแลคติก ย่อมมีโอกาสพบลิสเตอเรียด้วย โดยเฉพาะในน้ำนมดิบ และหญ้าหมัก รวมทั้งอุจจาระโค มีรายงานว่า *L. monocytogenes* รอดชีวิตอยู่ในดินชื้นถึง 295 วันหรือนานกว่า (Welshimer, 1960)

โรคลิสเตอริโอซีสที่เกิดกับคนแพร่มากับอาหาร ทั้งอาหารสดที่ได้จากพืชและสัตว์ เพราะ *L. monocytogenes* กระจายในสิ่งแวดล้อม ในอาหารพบมากในนมดิบ เนยแข็งแบบนิ่ม (soft cheese) เนื้อสดและเนื้อแช่แข็ง ผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ การที่เชื้อนี้อยู่ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม ทำให้เป็นที่สนใจกันมาก เพราะนมเป็นอาหารหลักอย่างหนึ่งของมนุษย์ แบคทีเรียจึงมีโอกาสมากที่จะแพร่มากับนมและติดต่อไปยังมนุษย์

4.3 การเจริญเติบโต *L. monocytogenes* เจริญในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 0 จนถึง 42 ℃ แต่ช่วงอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-35℃ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5℃ การเจริญของเชื้อนี้จะช้ามาก ต้องใช้เวลา 1-33 วันในระยะ lag phase และมีบันทึกว่าแบคทีเรียใช้เวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (generation times) ตั้งแต่ 13 ถึงมากกว่า 130 ชั่วโมง *L. monocytogenes* สายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเคยพบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดขึ้นกับนมพาสเจอไรซ์ ตามปกติลิสเตเรียทุกสปีชีถูกยับยั้งที่ pH ต่ำสุดที่แบคทีเรียเจริญได้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วมอื่น ๆ

4.4 อาการของโรค ความรุนแรงของโรคขึ้นกับพยาธิสภาพของผู้ได้รับเชื้อ ผู้ที่ไวต่อเชื้อหรือกลุ่มเสี่ยงมักมีอัตราการตายสูง ได้แก่ หญิงมีครรภ์ ผู้ที่เป็นเนื้องอก ผู้เป็นพิษสุราเรื้อรัง เบาหวาน (โดยเฉพาะ type I) ผู้เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Acquired Immunodeficiency syndrome- AIDS) ผู้เป็นโรคหัวใจ โรคไต และผู้ที่อยู่ระหว่างการบำบัดรักษาด้วยฮอร์โมนประเภทที่มีสเตอรอยด์ เป็นต้น บุคคลในกลุ่มเหล่านี้หากได้รับเชื้อมักเริ่มด้วยอาการของเยื่อหุ้ม สมองอักเสบและติดเชื้อ

แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria –LAB)

แบคทีเรียแลกติก (เขียนย่อว่า LAB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ ส่วนมากเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ใช้เอนไซม์คะทะเลสและออกซิเดส แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดได้ออกซิเจนโดยผ่านเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (flavoprotein oxidases) และใช้ออกซิเจนนี้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ/หรือใช้เพื่อรีออกซิไดซ์ NADH ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการดีไฮโดรจิเนชันของน้ำตาล

1. การหมักกรดแลคติก แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 วิถีทาง คือ วิธีทางที่ได้แลคเตทเพียงอย่างเดียว เรียกว่า โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ

96822

(homofermentative) และวิถีทางที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative)

ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคโตแบซิลไลออกเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ดังนี้

(ก) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟอย่างเดียว (obligate homofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมักได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, Lb. delbruckii* และ *Lb. helveticus*

(ข) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้งสองแบบ (facultative heterofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมักได้แก่ *Lb. plantarum, Lb.casei* และ *Lb. sake*

(ค) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lb. brevis, Lb.fermentum* และ *Lb.kefir*

สำหรับแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ ที่มิใช่แลคโตแบซิลไล ประกอบด้วย

- จีนัส ลิวโคนอสตอค (*Leuconostoc*) เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารจำแนกออกจากพวกแลคโตแบซิลไลได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดเมือก
- จีนัส เพดิโอคอกคัส (*Pediococcus*) เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกจัดไว้ในสปีชีใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*
- จีนัส เสตรปโตคอกคัส (*Streptococcus*) เป็นแบคทีเรียแบคติกอีกสปีชีหนึ่ง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเยในกลุ่มเสตรปโตคอกไคมีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม (จีนัส) คือ *Enterococci, Lactococcus* และ *Streptococcus*

2. กิจกรรมของแบคทีเรียแลคติกในอาหารที่น่าสนใจ

1. สมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก (LAB) ผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ได้จากการหมักกรดแลคติก เช่น นมเปรี้ยว ผัก-ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อ และอาหารทะเลหมัก สามารถเก็บไว้ได้นานและปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภค ทั้งนี้เป็นเพราะ LAB มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนี้

- ทำให้ pH ของอาหารลดลง
- เกิดกรดอินทรีย์
- เกิดแบคทีริโอซินส์ (bacteriocins)
- เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
- เกิดเอทธานอล
- ทำให้สารอาหารลดลง
- มี Eh ต่ำ

2. ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกในด้านการส่งเสริมสุขภาพ อาหารหมักได้ชื่อมานานแล้วว่ามีบางสิ่งบางอย่างที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ ในขณะที่อาหารปกติไม่มี Metchnikoff

ชาวรัสเซีย (อ้างโดยสุมณฑา ,2545) เจ้าของทฤษฎีว่าด้วยภูมิคุ้มกันที่เกิดจากทำลายเซลล์ จากการกินแบบที่เรียกว่า phagocytic immunity เช่น การกินแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว แนะนำให้บริโภคอาหารหมักถือได้ว่าเขาเป็นผู้ใช้วิธีธรรมชาติในการบำบัดความไม่สมดุลของร่างกาย เขาเชื่อว่าในลำไส้มนุษย์อาจเกิดความไม่สมดุลขึ้นได้ สืบเนื่องจากแบคทีเรียเจริญและสร้างสารพิษออกมาทำให้เกิดการเน่าเสียขึ้นในลำไส้ เป็นผลให้มนุษย์มีอายุสั้น

บทที่ 3

วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง จากตลาดหัวตะเข้

3.2 อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นแห้ง
2. Erlenmeyer flask
3. เครื่องเขย่า (GFL 3017)
4. ชุดกรองสุญญากาศ
5. กระดาษกรองเบอร์ 42
6. Rotary evaporator (Buchi R-114)
7. Freeze dryer (VIRTIS UNITOP 200SL)
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Chaus/ARC 120)
9. ชุดกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.22 ไมครอน
10. เครื่องวัด pH (WTW/InoLab Level 1)
11. Pipette
12. Micro pipette
13. Micropipette tip
14. แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)
15. Autoclave (TOMY SS-325)
16. Laminar air flow carbinet (ABS 1200)
17. ตู้บ่มเชื้อ (memmert/BKE 50)
18. Water bath (memmert/W 600)
19. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Jouan)
20. ตู้อบลมร้อน (LabQueen)
21. Microwave (National/NN 5656 F)

22. Vortex (vortex genie 2)
23. Flask
24. Loop
25. เข็มเขี่ยเชื้อ
26. จานเพาะเชื้อ
27. แท่งแก้วคน
28. แท่งแก้วรูปตัวแอล
29. กระบอกตวง
30. บีกเกอร์
31. ตะเกียงแอลกอฮอล์
32. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
33. ปากคีบ
34. Foggy
35. หลอดทดลอง
36. ไฟแช็ค
37. กระบอกน้ำกลั่น
38. ลูกยาง

3.3 สารเคมี

1. Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 80
2. NaOH ความเข้มข้น 5 Normality
3. น้ำกลั่น

3.4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (บริษัท Scharlan)
2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (บริษัท Scharlan)
3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ XLD (บริษัท Scharlan)
4. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ BP (บริษัท Himedia) + สารละลายไข่แดง 50%
5. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MH (บริษัท Merck)
6. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS (บริษัท Scharlan)

3.5 เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Listeria innocua*
4. *Salmonella* Anatum
5. *Lactobacillus plantarum*
6. *Pediococcus pentosaceus*

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. การสกัดสารจากดอกกระเจี๊ยบแดง (Chewonarin และคณะ , 1998)

1.1 นำดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นละเอียด

1.2 ชั่งดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งที่บดแล้ว 20 กรัม ใส่ใน Erlenmayer flask เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 80% จำนวน 200 มิลลิลิตร

1.3 นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่ 110 rpm

1.4 กรองโดยใช้ชุดกรองสุญญากาศและใช้กระดาษกรองเบอร์ 42 กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว

1.5 ส่วนที่เป็นกาก (residue) นำมาสกัดอีกครั้ง (re-extraction) โดยเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 80% จำนวน 200 มิลลิลิตร และนำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 คืน กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว

1.6 นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้ทั้งหมดไประเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ Rotary Evaporator จนตัวทำละลายหมด

1.7 นำตัวอย่างที่ได้ไปทำ Freeze dry ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส จนได้ตัวอย่างที่แห้งเป็นผง

1.8 เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. การทดสอบหาความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดง

2.1 เตรียมระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบ

2.1.1 นำสารสกัดดอกกระเจี๊ยบผงที่ผ่านการ Freeze dry มาละลายในน้ำกลั่น (เตรียมสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงมากๆ) แล้วทำการกรองให้ปลอดเชื้อผ่าน Filter 0.22 ไมครอน

2.1.2 เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงให้เป็น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20%

2.1.3 ปรับ pH ให้เป็นกลางให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0 และกลุ่มที่ไม่ได้ปรับ pH ซึ่งมี pH อยู่ในช่วง 1.8-2.5

2.1.4 ปิเปตสารสกัดที่แต่ละความเข้มข้น 20 ไมโครลิตร ลงบน Disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

2.2 เตรียม Drug control (Chloramphenical) และ Solvent control (80% Ethanol)ลงบน Disc

2.3 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทดสอบ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *E. coli, Staph. aureus, S.* Anatum , *Lis.innocua, L. plantarum* และ *P. pentosaceus*

2.3.1 ใช้ Loop เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บน Slant (Stock culture) จุ่มลงในหลอดที่บรรจุอาหารเหลว TSB และ MRS broth (ใช้เลี้ยง Lactic acid bacteria) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.3.2 ถ่ายเชื้อที่ได้โดยแตะ 1 loopful มาลงในอาหารเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.4 การศึกษา Sensitivity ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบ

2.4.1 ปิเปต suspension ของเชื้อแต่ละชนิดมา 10 ไมโครลิตร (10^6 เซลล์) ใส่ลงในหลอดที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSA และ MRS 5 มิลลิลิตร

2.4.2 ผสมโดยใช้ Vortex แล้วเททับลงบนอาหารแข็ง MH ที่เตรียมไว้

2.4.3 วาง Disc ที่เตรียมไว้ตามระดับความเข้มข้นต่างๆลงบน plate ที่เทเชื้อลงไปแล้ว

2.4.4 บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.4.5 ตรวจผลโดยวัดค่า inhibition zone ที่เกิดขึ้น

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

3.1 เตรียมความเข้มข้นของกระเจี๊ยบ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20% W/V ความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร

3.2 ปิเปตเชื้อ 20 ไมโครลิตร (10^6 เซลล์) ใส่ในแต่ละความเข้มข้น

3.3 บ่มหลอดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.4 ตรวจผลโดยหลอดที่ขุ่นแสดงว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต นำมา streak ใน selective media เฉพาะชนิดของเชื้อ เช่น Staph. aureus ใช้ BP, ซัลโมเนลลา ใช้ XLD เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันชนิดเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบว่ายังคงเป็นเชื้อชนิดนั้นๆอยู่ ไม่ใช่เชื้ออื่นที่ปนเปื้อนระหว่างการศึกษาส่วนหลอดที่ใสนำมาทำ dilution (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}) และนำมา spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญมาทดสอบยืนยันชนิดของเชื้อใน selective media เช่นกัน

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

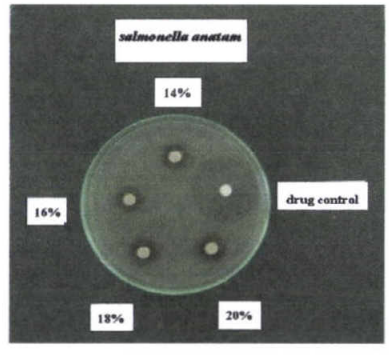
ใช้ระยะเวลาในการทดลอง โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2547 ถึงวันที่ 28 ตุลาคม 2547

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 2,4,6,8,10,12,14,16,18 และ 20 % w/v

จากการหาความไวของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar diffusion เมื่อใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่ปรับและไม่ได้ปรับ pH ปิเปตลงบนแผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดนี้ไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดเจริญอยู่ คือ *E. coli, Lis. innocua, Staph. aureus, S.* Anatum, *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* แล้วทำการตรวจสอบดูผลการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ โดยสังเกตจากลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้น พบว่า ที่สารสกัดของดอกกระเจี๊ยบแดงที่ปรับและไม่ได้ปรับ pH จะไม่มีลักษณะของ clear zone เกิดขึ้นที่เชื้อ *L. plantarum และ P. pentosaceus* แต่เชื้อ *E.coli, Lis. innocua, Staph. aureus, S.* Anatum จะมี clear zone เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 2 โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น clear zone จะมีขนาดใหญ่ขึ้นแสดงดังตารางที่ 2 ส่วนสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH อยู่ในช่วง 6.5-7.0) จะมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับสารสกัดที่ไม่ได้ปรับ pH แต่ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำที่สุดที่ยับยั้งได้คือ 12%w/v โดยขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้นแสดงดังตารางที่ 3



ภาพที่ 2 ลักษณะของ clear zone ที่เกิดของเชื้อ *S.* Anatum ที่สารสกัดดอกกระเจี๊ยบไม่ได้ปรับ pH เข้มข้น 14, 16, 18 และ 20 %w/v เทียบกับ Drug Control (Chloramphenical)

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของบริเวณใสเฉลี่ย (Clearzone = มม.) ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดง (ไม่ปรับ pH)

ความเข้มข้นของสารสกัด (%W/V)	pH	ขนาดของบริเวณใสเฉลี่ย (มม.) ที่ค่าความเข้มข้นเชื้อที่10^6 เซลล์					
		E. coli	*Lis.inonocua*	*Staph.. aureus*	*S.* Anatum	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
Drug	-	22.574	31.088	30.154	31.336	30.275	30.049
80%Ethanol	-	-	-	-	-	-	-
2	2.31	-	-	-	-	-	-
4	2.12	-	-	-	-	-	-
6	2.02	-	-	3.145	2.413	-	-
8	1.97	-	-	3.559	3.461	-	-
10	1.91	1.485	-	5.340	5.447	-	-
12	1.89	2.602	3.095	8.424	7.293	-	-
14	1.89	4.315	5.777	9.271	7.738	-	-
16	1.89	5.117	5.950	9.778	8.324	-	-
18	1.89	5.161	6.795	10.407	9.854	-	-
20	1.88	7.069	7.118	10.975	10.365	-	-

ตารางที่ 3 แสดงขนาดของบริเวณใสเฉลี่ย (Clearzone = มม.) ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดง (ปรับ pH)

ความเข้มข้นของสารสกัด (%W/V)	pH	ขนาดของบริเวณใสเฉลี่ย (มม.) ที่ค่าความเข้มข้นเชื้อที่10^6 เซลล์					
		E. coli	*Lis.inonocua*	*Staph. aureus*	*S.*Anatum	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
Drug	-	6.000	26.288	27.094	26.434	21.512	29.059
80%Ethanol	-	-	-	-	-	-	-
2	6.87	-	-	-	-	-	-
4	6.87	-	-	-	-	-	-
6	6.85	-	-	-	-	-	-
8	6.83	-	-	-	-	-	-
10	6.81	-	-	-	-	-	-
12	6.81	-	-	2.197	2.326	-	-
14	6.81	1.975	3.215	3.678	3.079	-	-
16	6.80	2.401	3.953	4.390	4.005	-	-
18	6.80	3.940	4.326	5.142	5.680	-	-
20	6.80	5.391	4.384	5.997	7.376	-	-

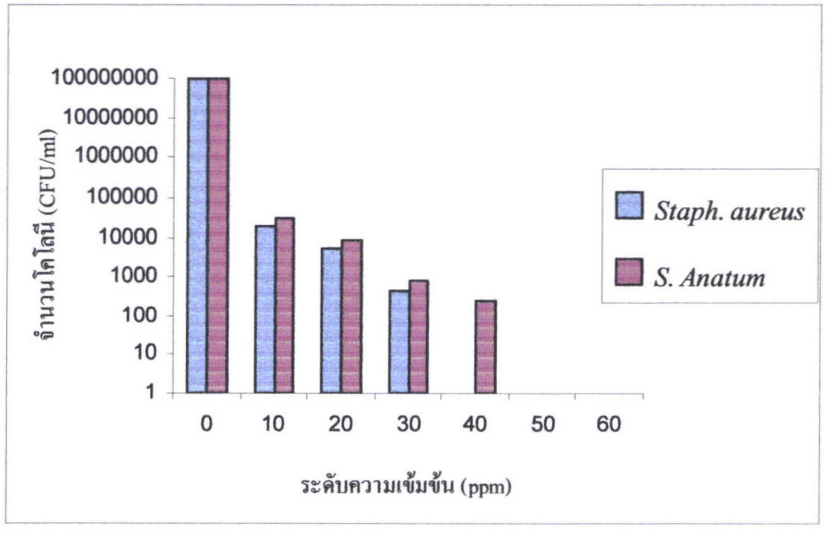
จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้ปรับ pH จะมีความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, Lis. Innocua, Staph. aureus* และ *S.* Anatum ต่ำกว่าสารสกัดที่ปรับ pH และมีขนาดของ clear zone ที่กว้างกว่าเนื่องจากปัจจัยของ pH ที่ต่ำและค่าความเป็นกรดที่สูงของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงนั่นเอง ถึงอย่างไรก็ตามสารสกัดที่ปรับ pH ให้เป็นกลางยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ แสดงว่าเอทานอลสามารถสกัดสารบางอย่างในดอกกระเจี๊ยบแดงที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่า

สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบทุกความเข้มข้นทั้งที่ปรับและไม่ปรับ pH ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อในกลุ่มแลคติก คือ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในกระบวนการหมักอาหารหมักหลายชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษา

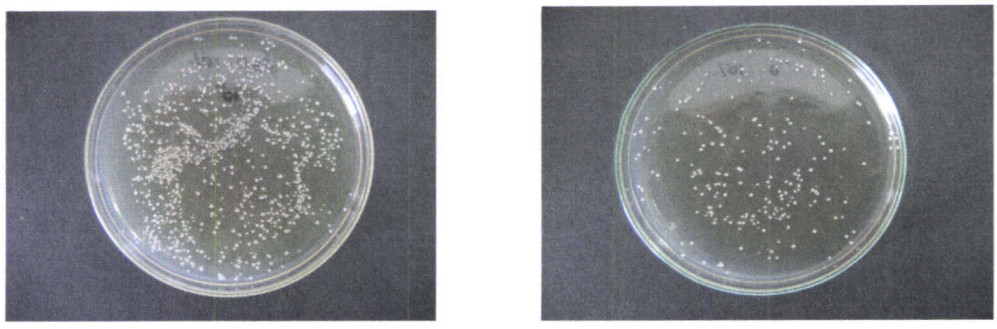
4.2 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 ได้ทำการเลือกเชื้อที่มีความไวต่อสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดงสูงที่สุดสองสายพันธุ์คือเชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum มาทำการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่อ โดยทำการปรับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ60 ppm แล้วนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ใส่ลงในสารสกัดแต่ละความเข้มข้นให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^6 CFU/ml และดูว่าสารสกัดจะสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่าใด โดยผลการทดลองจะแสดงจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSA ดังภาพที่ 3 ส่วนลักษณะของโคโลนีแสดงดังภาพที่ 4

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Staph. aureus* และเชื้อ *S.* Anatum ไม่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงตั้งแต่ 40 และ 50 ppm ตามลำดับเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงควรเลือกใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 50 ppm เพื่อช่วยในการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ



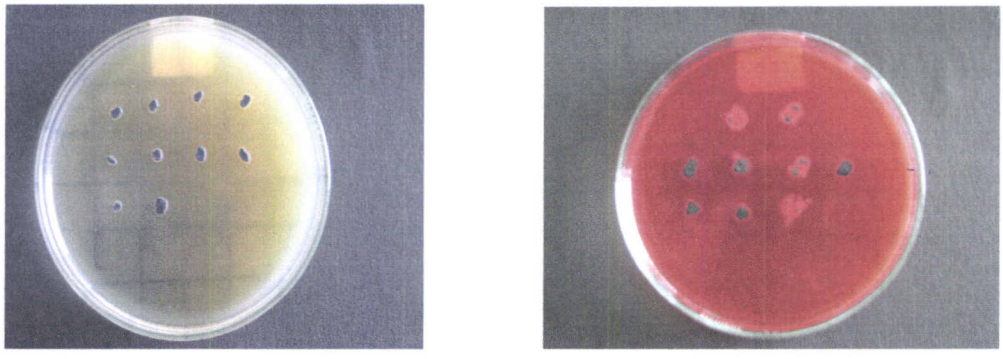
ภาพที่ 3 แสดงจำนวนเชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum ที่เจริญในสารสกัดกระเจี๊ยบในแต่ละระดับความเข้มข้น



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 โคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* (ก) และ *S.* Anatum (ข) ที่เจริญบนอาหาร TSA

ส่วนอาหาร TSA ที่มีเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เจริญนั้นต้องนำไปยืนยันชนิดเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบว่ายังคงเป็นเชื้อชนิดนั้นๆอยู่ ไม่ใช่เชื้อชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในระหว่างการศึกษา โดยนำโคโลนีที่ขึ้นไปทดสอบใน selective media ดังภาพที่ 5



(ก) (ข)

ภาพที่ 5 โคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* ที่นำมาตรวจสอบบนอาหาร BP (ก)
และโคโลนีของเชื้อ *S*.Anatum ที่นำมาตรวจสอบบนอาหาร XLD (ข)

โดยผลจากการทดลองนี้สามารถนำสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมาใช้ประโยชน์ในการเป็น food additive เติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อหรือผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ คือ ช่วยฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีชี้คุณภาพทางด้านสุขาภิบาล แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียกลุ่มแลคติก ทั้งนี้เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัย และยังอาจใช้ปรับปรุงคุณภาพสีของผลิตภัณฑ์ โดยจะต้องศึกษาถึงการยอมรับของผู้บริโภคต่อไป

บทที่5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบหาความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบ 6 สายพันธุ์ คือ *E. coli, Lis. innocua, Staph. aureus, S.* Anatum, *L. plantarum* และ*P. pentosaceus* ผลปรากฏว่า สารสกัดไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ได้ ซึ่งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อแบคที่เรียที่พบในอาหารหมัก ซึ่งจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะของอาหารหมักที่ดี แต่สารสกัดทั้งที่ปรับและไม่ได้ปรับ pH สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *E. coli, Lis. innocua, Staph. aureus* และ *S.* Anatum จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่ปรับ pH ให้เป็นกลาง สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ได้ แสดงว่ามีสารบางอย่างในกระเจี๊ยบแดงที่มีผลต่อการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อนอกเหนือไปจากปัจจัยของค่า pH โดยที่เชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum จะมีความไวต่อสารสกัดมากกว่าเชื้อตัวอื่น โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่ได้ปรับและปรับ pH ที่ต่ำที่สุดที่ใช้ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์คือ 6% และ 12% w/v ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้มาทดสอบหาคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้สารสกัดที่ไม่ได้ปรับ pH มาทำการทดลองต่อเนื่องจากยับยั้งเชื้อได้ดีกว่า จากการทดลองความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum มีค่าเท่ากับ 40 และ 50 ppm ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อ *Staph. aureus* มีความไวต่อสารสกัดมากกว่าเชื้อ *S.* Anatum จากการทดลองนี้จะพบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเสื่อมเสีย แต่ไม่ได้มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแลกติก ซึ่งการทดลองนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปใช้สำหรับเติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเช่นแหนมเพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารให้มีความปลอดภัยและยังอาจนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพสีของผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีการใช้ไนไตร์ท-ไนเตรทโดยจะลดการใช้สารเคมี เช่น ไนไตรท์-ไนเตรท ซึ่งสารเคมีนี้อาจก่อให้เกิดสารไนโตรซามีนที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ เหล่าโชติ และเนาวรัตน์ เสริมศรี. 2530. "การปลูกกระเจี๊ยบแดง". กสิกร 60(3): 221-224.

ประศาสตร์ ฟูตระกูล และพงษ์ศักดิ์ ลิ้มเจริญรัตน์. 2519. "การศึกษาเบื้องต้นในการทำกระเจี๊ยบผง". รายงานผลการวิจัย , 123.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

นัยวิท เฉลิมนนท์. 2538. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตและการใช้สีแดงธรรมชาติ จากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิรดา ดิษยมณฑล. 2518. กระเจี๊ยบแดงและผลิตภัณฑ์อาหารจากกระเจี๊ยบแดง. วิทยาศาสตร์การอาหาร 7 (2) : 34-42.

สุดสนอง ผาตินาวิน. 2528. สีธรรมชาติเพื่อการย้อมทางชีวภาพ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์, จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์ และธัญลักษณ์ นินบดี 2522. การศึกษา Enterotoxins ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 21 (4) : 258-270.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์,จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์ และธัญลักษณ์ นินบดี 2523ก. การแพร่กระจายของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 22 (4) : 193-208.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ม.ป.ป. ก้าวไปกับสมุนไพร. 2543. โครงการสมุนไพรไทยเพื่อการพึ่งพาตนเอง กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

บริษัทการจัดการเกษตรและอุตสาหกรรม จำกัด. 2532. "รายงานผลการศึกษาโครงการศึกษาวิจัยตลาดพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ", 43-48. กรุงเทพฯ: กระทรวงพาณิชย์.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, แพรวผกา ทองระอาด และมยุรา กุสุมส์ 2536. การปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อไก่สดแช่เย็งเพื่อการส่งออก. วารสารอาหาร 23 (4) : 231-236.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และคณะ 2545. " การสำรวจเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอุจจาระของพนักงานในโรงงานผลิตอาหารแช่แข็ง" บทคัดย่อ กรุงเทพมหานคร: เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 13 วันที่ 15-16 พฤษภาคม 2545 ณ โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น

Adesiyun, A.A. 1984. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Nigeian ready-to-eat foods. Journal of Food Protect. 47 : 438-440

Angelotti, R., M.J. Foter, and K.H. Lewis. 1961. Time-temperature effects on *salmonellae* and *staphylococci* in foods. Am. Journal of Public Health 51 :76-80.

"Antioxidant and antimicrobial properties of *Hibiscus sabdariffa* L. as affected by the presence of naturally occurring cofactors". [online]. Available: http: //www.fshn.ifas.ufl.edu/faculty/Stt Alcott/David.htm

Bautista, L., P. Gaya. M. Medina, et al., 1988. "A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci." Appl. Environ. Microbiol. 54: 566-569.

Bryan, F.L. 1988. Risks of Practices. Procedures and Processes that lead to outbreaks of foodborne disease. Journal of Food Protect. 48 : 743-755.

Chung, K.C. and J.M. Goepfert. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. Journal of Food Science. 35 : 326-328.

Cohen, M.L. and R.V. Tauxe. 1986. Drug-resistant *Salmonella* in the United States : An Epidemiologic perspective. Journal of Science. 153 : 964-969.

Dack, G.M., W.D. Cary and O. Woolpert, 1930. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic *staphylococcus*. Journal of Preview medical. 4 : 167-175.

Esselen, W.B. and G.M. Sammy. 1973. Roselle-A natural red colorant for foods. อ้างถึงใน นัยวิท เฉลิมนนท์. 2538. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตและการใช้สีแดงธรรมชาติจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Evenson, M.L., M.W. Hinds and R.S. Bernstein, 1988. Estimation of human dose of *staphylococci* enterotoxin A from large outbreak of *staphylococcal* food poisoning involving chocolate milk.Journal of Food microbial. 7 : 257-261.

Jay, J.M. 200. "Chapter 23 : *Staphylococcal* Gastroenteritis; Chapter 24 : Food poisoning Caused by Gram-positive Sporeforming Bateria" In : Modern Food Microbiology, pp. 441-459; pp. 461-484.

Kloos, W.E., and T.L. Bannerman. 1994. "update on clinical signifivance of coagulase-negative *staphylococci.*" Clin. Microbiol. 7: 117-140.

Konowalchuk, J., J.I. Speirs, and S. Stavric, 1977. "Vero response to a cytotoxin of *Escherichia colli,*" Infect, Immun. 18:775-779.

Miller, R.D., and D.T.C. Fung. 1973. "Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium." Appl. Microbiol. 25 : 800-806.

Murray, E.G.D., R.A. Webb, and M.B.R. Sswann. 1926. A disease of rabbits characterized by large monomuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed *bacillus Bacterium monocytogenes.* Journal of Pathol. Bacteriol. 29: 407-439.

O'Brien A.D., M.R. Thompson and J.R. Cantey. 1977. production of *Shigella dysenteriae* like toxins by pathogenic *Escherichia coli.* Abstract., Amer. Soc. Microbio., 32.

Orskov, I., F. Orskov and B.Jann, 1977. "Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escheichia coli.*" Bacteriol. Rev. 41 : 667-710.

Ostroff, S.M., P.I. Tarr and M.A. Neill, 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in Escherichia coli O157 : H7 infections. Journal of Infect. 160 : 994-998.

Palasuntheram, C., and M.S. Beauchamp. 1982. Enterotoxigenic staphylococci in Sri Lanka. Journal of Bacteriol. 52 : 39-44.

Palumbo, S.A., J.E. Call and F.J. Schultz, 1995. Mimimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of Escherichia coli. Journal of Food Protect. 58 : 352-356.

Raghubeer, E.V., and J.R. Matches. 1990. Temperature range for growth of Escherichia coli serotype O157 : H7 and selected coliforms in E.coli medium. Journal of Microbiol. 28 : 803-805.

Smith, J.L., R.L. Buchanan, and S.A. Palumbo. 1983. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis : A review. Journal of Food Protect. 46 : 545-555.

Sokari. T,G., and S.O. Anozie. 1990. Occurance of enterotoxin producing strains of staphylococcus aureus in meat and related samples from ttaditional markets in Nigeria. Journal of Food Protect. 53 : 1069-1070.

Sperber, W.H. 1977. "The identification of staphylococci in chemical and food microbiology laboratories." CRC Crit.Rev. Clin. Lab Sci. 7 : 121-184.

Steele, J.H., and M.M. Galton. 1967. "Epidermiology of foodborne salmonellosis." Health Lab. Sci. 4 : 207-212.

Tauxe, R.V. 1991. Salmonella : A postmodern pathogen. Journal of Food Protect. 54 : 563-568.

T. chewonarin, T.kinouchi, K.kataoka, H.arimochi, T.kuwahara, U.vinitketkumnuen and Y.ohinshi. 1999. Effects of Roselle (*Hibisus sabdariffa* Linn.), a Thai Medicinal Plant, on the Mutagenicity of Various Known Mutagens in *Salmonella thyphimurium* and on Formation of Aberrant Crypt Foci Induced by the Colon Carcinogens Azoxymethane and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine in F344 rats. Journal of Food and Chemical Toxicology . 37: 591-601.

Valle, J., E. Fomez-Lucia and S. Piriz, 1990. "Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats." Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1323-1326.

Weeratna, R.D., and M.P. Doyle. 1991. "Determination and production of verotoxin I in Eschrichia coli O157 : H7 in food." Appl. Environ. Microbial. 57 : 2951-2955.

Welshimer, H.J. 1960. Suvival of Listeria monocytogenes. in soil. Journal of Bacteriol. 80 : 316-320.

Wu, C.H., and M.S. Bergdoll. 1971. "Stimulation of enterotoxin B production." Infect. Immum. 58 : 784-792.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ BP (Baird- Parker Agar)

A: Basal Medium

Peptone	10.0	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Sodium pyruvate	10.0	กรัม
Glycine	12.0	กรัม
Lithium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

Final pH 6.2 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 940 ml โดยต้มในอ่างน้ำเดือดจนวุ้นละลายแล้วเข้า Autoclave

B: Egg-yolk tellurite emulsion

1. ล้างไข่ไก่สดในน้ำสะอาด ใช้ฟองน้ำถูเบาๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไข่ไก่แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 ชั่วโมง แยกไข่ขาวออกจากไข่แดงโดยใช้ aseptic technic ระวังอย่าให้ไข่แดงแตก ถ่ายฟองไข่แดงลงในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. ทำการผสมไข่แดงกับ normal saline อัตราส่วนไข่แดง 1 ส่วนต่อ normal saline 1 ส่วน โดยใช้ aseptic technic
3. นำไข่แดงที่ผสมแล้วมา 50 ml ผสมกับ 10 ml ของ 1% potassium tellurite ที่ทำไปลอดเชื้อโดยการกรองด้วย membrane filter เก็บไว้ในตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส
4. ผสม Egg-yolk tellurite emulsion (B) 60 ml กับ Basal medium (A) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-80 องศาเซลเซียส จนเข้ากันดีแล้วเท plate

อาหารเลี้ยงเชื้อ MH (Meuller Hinton Broth)

- Beef infusion form	300	กรัม
- Casamino acid	17.5	กรัม
- Starch	1.5	กรัม
- Agar	17	กรัม
- น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH 7.3 $\pm$ 0.2

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำและต้มพอเดือด 1 นาที ถ่ายเทอาหารลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

Peptone protease	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D(+) – Glucose	20.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Triammonium citrate	2.0	กรัม
Magnessium sulphate	0.2	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม

Final pH 6.2 $\pm$ 0.2

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำและต้มพอเดือด ถ่ายเทอาหารลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

Trypticase peptone	17	กรัม
NaCl	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Phytone peptone	3	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
D.W.	1	ลิตร

Final pH 7.3 $\pm$ 0.2

อุ่นละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์หรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ถ้าจะเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ให้เติม Agar เพิ่มลงไป 1% ส่วนขั้นตอนการเตรียมทำเช่นเดียวกันกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD

Yeast extract	3	กรัม
L-Lysine	5	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
D.W.	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดต้มพอเดือด ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (ไม่ควรเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้เกิน 1 วันหลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

ภาคผนวก ข

คำที่ใช้ในงานทดสอบ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (sensitivity test, antimicrobial susceptibility test) โดยทั่วไปจะหมายถึงการใช้เทคนิควิธีในหลอดทดลอง (in vitro) เพื่อตรวจสอบความไวหรือการดื้อของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพ

MIC (minimal inhibitory concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไปคือ มคก. (μg, mcg, microgram) ต่อ มล. (ml, milliliter) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อ มล. ค่า MIC นี้สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพหลายๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อยาหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยา หรือแปลผลของยาต่อเชื้อ

MLC (minimal lethal concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด) หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย อาจใช้คำเจาะจงกว่าคือ MBC (minimal bactericidal concentration) และถ้าเป็นรา อาจใช้คำว่า MFC (minimal fungicidal concentration) ยาต้านจุลชีพที่มีวิถีการออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลาย (microbicidal) จะมีค่า MIC และ MLC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน (ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น) ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดที่ถูกฆ่าทำลายยากเช่น enterococci ฯลฯ ซึ่งค่า MBC ที่ได้อาจสูงกว่า MIC มาก ส่วนยาที่มีวิถีการออกฤทธิ์เป็นชนิดยับยั้ง (microbiostatic) จะให้ค่า MLC สูงกว่า MIC หลายๆ ความเข้มข้น อย่างไรก็ดีอัตราส่วนของ MBC/MIC มักแปรผันตามชนิดของเชื้อทดสอบ

Clear zone (inhibition zone)

เป็นบริเวณใสที่ไม่มีเชื้อเจริญ การดูประสิทธิภาพของยาจะวัดจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น มีหน่วยเป็น มม. แล้วจึงเปรียบเทียบค่าที่ได้ในภายหลัง

วิธีทดสอบความไว

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีหลายวิธี หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและรา สามารถทำได้ทั้งสในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium)

โดยมีวิธีหลักอยู่ 3 รูปแบบคือ (1) broth dilution susceptibility test (2) agar dilution susceptibility test และ (3) agar diffusion test

Agar Diffusion Test

ในการทดสอบความไวของเชื้อด้วย dilution test ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องเจือจางยาแต่ละตัว ซึ่งจะเสียเวลามากทั้งยังเปลืองค่าใช้จ่าย ในการนี้อาจะเลือกใช้ agar diffusion test เพราะความแรงยาที่ใช้ทดสอบนั้นสามารถใช้เพียงความเข้มข้นเดียว อีกทั้งวิธีการอย่างหลังนี้ใช้ในกรณีที่ต้องการผลเร่งด่วนได้ เช่น สามารถทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจากคนไข้โดยตรง

วิธี agar diffusion test อาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่ยาต้านจุลชีพปริมาณหนึ่งไว้ในภาพชนะบรรจุ (reservoir) ซึ่งอยู่ใน/บน agar medium ที่ได้เพาะเชื้อไว้ ภายหลังการบ่มเพาะให้สังเกตดูว่ารอบบริเวณ reservoir ที่ตัวยาซึมไปนั้นจะมีบริเวณใสที่ไม่มีเชื้อเจริญเกิดขึ้นหรือไม่ วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบยาเพียงความเข้มข้นเดียวแล้วดูขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

สำหรับ reservoir ที่ใช้เมื่อดูจากพื้นผิวบน agar จะมีลักษณะเป็นวงกลม ซึ่งอาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar (well) ถ้วยทรงกระบอก (cylinder cup) เม็ดยา (tablet) หรือกระดาษซับวงกลม (filter paper disc) แต่เนื่องจาก reservoir สามแบบแรกยุ่งยากในการใช้ทำและผลที่ได้แปรผันมาก ในปัจจุบันจึงนิยมใช้ reservoir แบบหลัง ในที่นี้จึงขอเน้นกล่าวถึง paper disc diffusion test หรืออาจเรียก disc sensitivity test เพื่อเป็นตัวแทนของการทดสอบชนิด agar diffusion test

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจุรารัตน์ สุรนันท์ เกิดเมื่อวันที่ 28 กันยายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลายจากโรงเรียนสุรนารีวิทยา ปี พ.ศ. 2543 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี พ.ศ. 2547

นางสาวอมรรัตน์ อัคนิจ เกิดเมื่อวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลายจากโรงเรียนสตรีราชินูทิศ ปี พ.ศ. 2543 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี พ.ศ. 2547