



การแยกเชื้อ *Clostridium botulinum* จากตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium botulinum* isolation (CBI) Agar

กนกวรรณ แก้วกัญญา, กาญจนา สุนทรโรจน์, อรุณลักษณ์ ลุตตานนท์, อรุณนิ สังกา,
นิชา เจริญศรี, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์

บทคัดย่อ

Clostridium botulinum เป็นเชื้อแอนแอโรบที่สามารพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน แหล่งน้ำ มูลสัตว์ต่างๆ เป็นต้น สามารถสร้างสารพิษ Botulinum toxin (Botox) ซึ่งมีผลก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ เรียกว่า botulism ปัจจุบันได้มีการนำสาร Botox นี้มาใช้ประโยชน์ทั้งในวงการแพทย์และวิทยาการความงามอย่างกว้างขวาง และเนื่องจากในประเทศไทย ยังไม่มีรายงานการแยกเชื้อนี้ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นสำหรับการแยกเชื้อ *Clostridium botulinum* คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ CBI ที่มี Cycloserine 250 มิลลิกรัมต่อลิตร Sulfamethoxazole 76 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Trimetoprim 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น antibiotic ที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาแยกเชื้อนี้ จากตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เก็บในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 จำนวน 100 ตัวอย่างจาก 15 จังหวัด ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CBI แล้วพิสูจน์ชนิดเชื้อด้วยชุดทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆรวมทั้งการทดสอบเอนไซม์ lipase, lecithinase และผลการย้อมสีแกรม สามารถแยกเชื้อได้ 144 isolates พบเชื้อที่มีโอกาสเป็น *Clostridium botulinum* หรือ *Clostridium sporogenes* รวม 50 isolates คิดเป็นร้อยละ 34.7 จำนวน 43 isolates เป็น *Clostridium* สปีชีส์อื่นรวม 14 สปีชีส์ และจำนวน isolates ที่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็น *Clostridium* สปีชีส์ใดอีก 51 isolates คิดเป็นร้อยละ 35.4 จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีโอกาสที่จะพบเชื้อ *Clostridium* หลายๆ สปีชีส์ร่วมกับมีโอกาสพบเชื้อ *Clostridium botulinum* อยู่ร้อยละ 43 (43 ตัวอย่างจาก 100 ตัวอย่าง) เชื้อที่คาดว่าเป็น *Clostridium botulinum* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินได้ส่งต่อเพื่อทดสอบการสร้าง toxin A toxin B และ ตรวจหาลำดับเบสบน 16S rRNA ของเชื้อต่อไป

คำห้ส: *Clostridium botulinum* • CBI Agar

บทนำ

Clostridium มาจากคำว่า closter ในภาษากรีกซึ่งแปลว่า เส้นใย ส่วนคำว่า *botulinum* มาจากคำว่า *botulism* ซึ่งคนในสมัยก่อนใช้เป็นคำเรียกชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่ง *botulus* แปลว่า sausage เพราะพบเชื้อในไส้กรอก เมื่อบริโภคเข้าไปจะทำให้เสียชีวิตได้⁽¹⁾ ในปี ค.ศ. 1896 วอน เออร์เมนเจน (Van Ermengen)

นักจุลชีววิทยาแห่งมหาวิทยาลัยเกนท์ (Ghent) ได้อธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับเชื้อ *botulism* นี้เกี่ยวกับการเสียชีวิตเนื่องจากการบริโภคแฮมดิบ ว่าเป็นสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษได้ และเจริญในภาวะไร้อากาศ มีรูปร่างเป็นท่อน ในสภาวะที่มีเกลือแคงจะไม่สร้างสารพิษและทนต่อสารเคมีได้ปานกลาง เขาตั้งชื่อเชื้อ *botulism* นี้ว่า *Bacillus botulism*

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



Isolation of *Clostridium botulinum* from soil samples in Northeastern Thailand by *Clostridium botulinum* isolation (CBI) Agar

Kanokwan Kaewkanya, Kanjana Soontarote, Aroonlug Lulitanond, Arunnee Sangka, Nicha Charoensri, Pipat Sribenjalux

Abstract

Clostridium botulinum is an anaerobic bacteria that produce neurotoxin affect to both human and animal called “Botulism”. The bacteria and it’s spore can be commonly found in natural sources such as soil, water, animal feces. In Thailand there is no report of *Clostridium botulinum* isolation by CBI agar, so we conducted a study of isolation and identification of this bacterium from soil samples collected from the Northeastern of Thailand by CBI agar, containing antimicrobial solution; 250 mg/l of cycloserine, 76 mg/l sulfamethoxazole and 4 mg/l trimethoprim to inhibit Gram negative bacterial growth on the media. A hundred samples were collected from December 2004 to February 2005. 144 isolates of anaerobic gram positive bacilli with spore forming were isolated and identified by 7 biochemical characterizations. The results reviewed that 50 isolates (34.7 %) were *C. botulinum* or *C. sporogenes*, 43 isolates (29.8%) were another 14 *Clostridium* species (not botulinum) and 51 isolates (35.4%) cannot be specified in which species. From 100 soil samples there were 43 samples (43%) that we could isolate 50 *C. botulinum* like isolates. However, they need more biochemical tests or other specific method such as toxin A or toxin B and 16S rRNA base sequencing to confirm these isolates.

Key word: *Clostridium botulinum* • CBI Agar

แต่ได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Clostridium botulinum* ในปี ค.ศ. 1923⁽²⁾ จัสตินเนียส เคิร์นเนอร์ (Justinus Kerner) ได้บันทึกไว้ว่าการให้ความร้อนและการทำให้มีฟองอากาศสามารถทำให้ความเป็นพิษในอาหารลดลงได้⁽¹⁾ *C. botulinum* เป็นเชื้อแบคทีเรียแอนแอโรบส์ ที่สามารถสร้างสปอร์และสารพิษ (toxin) ได้^(3,4,5) พบว่าเชื้อย้อมติดสีแกรมบวกมีลักษณะเป็นแท่ง มีสปอร์รูปรีกึ่งกลมอยู่ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ การเจริญของเชื้อไม่ต้องการออกซิเจน (strict anaerobe)^(1,2,3) สปอร์

ของเชื้อสามารถทนความร้อนได้มากกว่าแบคทีเรียแอนแอโรบส์อื่นๆ คือ ที่อุณหภูมิ 100 °C สปอร์ยังสามารถอยู่ได้ นาน 5-9 ชั่วโมง⁽³⁾ และที่อุณหภูมิ 120 °C อยู่ได้นานถึง 10 นาที นอกจากนี้สปอร์ยังสามารถทนต่อการถูกทำลายด้วยรังสีแกมมา⁽⁶⁾ *C. botulinum* สามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่เป็น neurotoxin ได้ แต่การสร้างสารพิษของเชื้อจะแตกต่างกันจึงทำให้มีการแบ่งชนิดของเชื้อออกเป็น 7 ชนิด (type) คือ A, B, C, D, E, F และ G และสารพิษของเชื้อในกลุ่ม *C. botulinum* ยังแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ย่อยโปรตีน

Center for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

(proteolytic toxin) และประเภทที่ไม่ย่อยโปรตีน (non-proteolytic toxin) สารพิษ type A, B, E และ F สามารถทำให้เกิดโรค botulism ในคน แต่ส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A, B และ E ทокซิน type A เป็นสารพิษกลุ่ม proteolytic ส่วน type E เป็น non-proteolytic toxin และ type B และ F มีทั้งกลุ่ม proteolytic toxin และ non-proteolytic toxin⁽²⁾ โดยปกติในสายพันธุ์หนึ่งจะสร้างหรือผลิตสารพิษเพียงชนิดเดียว แต่ก็อาจสร้างหรือหลั่งสารพิษเช่นเดียวกับสายพันธุ์ที่ต่างออกไปได้⁽⁷⁾ *C. botulinum* ที่พบตามธรรมชาติ เช่นตามแหล่งน้ำมีโอกาพบ *C. botulinum* type E ได้มากกว่า type อื่นๆ ส่วนสปอร์ของเชื้อพบได้ในดิน ปุ๋ยและสามารถพบได้หลายชนิดทั้ง A, B, C, D, E, F และ G นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ของสัตว์เลื้อยคลานและนก มีรายงานการแยกเชื้อ *C. botulinum* type G ได้จากดินและจาก autopsy^(8,9) การเกิดโรค botulism เป็นผลมาจากการกินอาหารที่มีเชื้อและทอกซินของเชื้อปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจะไม่ปรากฏร่องรอยของการหมักย่อยหรือมีรสชาติเปลี่ยนไป อาหารที่พบบ่อยได้แก่ หมูแฮม และอาหารกระป๋องที่มีสภาพเป็นด่าง ในสภาพไร้ออกซิเจน สปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* จะเจริญเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อคนรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไป กรดหรือเอนไซม์ในกระเพาะและลำไส้ส่วนบนไม่สามารถทำลายสารพิษได้ ดังนั้นถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตกระจายไปสู่เซลล์ของระบบประสาท ยับยั้งการหลั่งสาร acetylcholine มีผลทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง ไม่ทำงาน เกิดเป็นอัมพาตและตายได้ (flaccid paralysis) ส่วนกลไกของ infant botulism เกิดการติดเชื้อได้ โดยทารกได้รับน้ำนม หรืออาหารที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งหรือน้ำหวานที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อเมื่อสปอร์ผ่านลงไปสู่ระบบทางเดินอาหารของเด็ก สปอร์จะเจริญเติบโตและสร้างสารพิษและมีผลต่อระบบประสาทแล้วก่อโรค

การแยกเชื้อจากดินโดยอาศัย selective medium คือ *Clostridium botulinum* isolation (CBI) agar ที่ช่วยการเจริญของเชื้อ *C. botulinum* ได้ดี ซึ่งส่วน

ประกอบสำคัญคือ antimicrobial agents 3 ชนิด ได้แก่ Cycloserine, Sulfamethoxazole และ Trimethoprim ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ bacteria อื่นๆได้ โคโลนีของ *C. botulinum* ที่เจริญบน CBI agar มักจะให้ลักษณะที่มี lipase zone แพร่รอบๆโคโลนี และไม่พบว่ามีรอยขุ่นของโคโลนีจากการใช้ lecithinase แต่ในบางครั้งอาจพบรอยขุ่นได้บ้างแล้วแต่ชนิด (type) ของเชื้อ⁽¹⁰⁾ ในขณะที่ *C. botulinum* type G ให้ผล lecithinase และ lipase เป็นลบ⁽¹¹⁾ จากรายงานการวิจัยของ Dezfulian และคณะกล่าวว่า antimicrobial agents ทั้ง 3 ชนิดที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ CBI จะมีผลช่วยในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้ แต่สำหรับ *Clostridium* จะดื้อต่อยากลุ่มนี้ จึงสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CBI (12) โดย Cycloserine จะยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ส่วน Sulfamethoxazole และ Trimethoprim จะยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมลบรูปแท่ง โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยาทั้งสองชนิดคือรบกวนการสร้างกรดโฟลิก ของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้⁽¹³⁾

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างดินที่ใช้ศึกษา

เป็นตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 15 จังหวัดรวม 100 ตัวอย่าง (ตามรายละเอียดในตารางที่ 1) โดยขุดเปิดหน้าดินประมาณ 5 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินที่ลึกจากหน้าดิน 5 เซนติเมตร ประมาณ 5 กรัมใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงให้สนิทส่งห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

Anaerobic chamber (Thermo forma USA)

CBI Agar (Oxiod)

3. วิธีการศึกษา

นำตัวอย่างดิน 1 กรัมเจือจางใน 0.1% peptone water 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้า anaerobic

chamber (Forma USA) ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงใช้ loop ถ่ายเชื้อ streak ลงใน CBI agar (Oxoid) จากนั้นเพาะบ่มที่สภาวะไร้ออกซิเจน ใน anaerobic chamber อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมงอ่านผล lecithinase และ lipase ของเชื้อที่เจริญบน CBI agar แล้วนำไปย้อมสี แกรมและลงใน Blood agar นำไปเพาะบ่มในบรรยากาศปกติที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง กรณีที่ไม่มีเชื้อเจริญบน CBI agar ใน 48 ชั่วโมง นำไปเพาะบ่มซ้ำอีก 5 วันเลือกโคโลนีที่ไม่เจริญที่บรรยากาศปกติ และมีลักษณะเป็นแกรมบวก รูปแท่ง สร้างสปอร์แบบ oval subterminal spore^(10,12) ไปทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย การทดสอบดังนี้ acid from sugar ซึ่งประกอบด้วย Glucose, Sucrose, Lactose และ Maltose, Gelatinase, Motile/Indole, Milk digestion, Lecithinase/Lipase⁽¹¹⁾

ผลการศึกษา

ผลการแยกเชื้อ *Clostridium botulinum* จากดิน 100 ตัวอย่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CBI ตัวอย่างทั้งหมดเก็บ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือน

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 รวม 15 จังหวัด จากบริเวณต่างๆ ได้แก่ บริเวณทุ่งนา 47 ตัวอย่าง บ้าน 29 ตัวอย่าง ริมถนน 9 ตัวอย่าง บริเวณแหล่งน้ำ 8 ตัวอย่าง แปลงเกษตร 3 ตัวอย่าง โรงเรียน 1 ตัวอย่าง สนามหญ้า 1 ตัวอย่าง ไร่ 1 ตัวอย่าง และ ป่า 1 ตัวอย่าง (แสดงในตารางที่ 1) พบเชื้อเจริญภายใน 2-5 วันและพบโคโลนีหลายลักษณะทั้งที่ให้ลักษณะ Lipase zone และ Lecithinase และไม่ให้ทั้ง Lipase zone และ Lecithinase หรือให้ลักษณะ Lipase zone หรือ Lecithinase อย่างใดอย่างหนึ่ง เมื่อนำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CBI จำนวน 267 isolates จากดิน 100 ตัวอย่าง ไปทดสอบการเจริญบน Blood agar ในสภาวะที่มีออกซิเจน ให้ผล No growth จำนวน 178 isolates โดยมีจำนวน 144 isolates ที่ให้ผลการย้อมแกรมเป็น Gram positive bacilli with spore forming และไม่เจริญบน Blood agar ในสภาวะที่มีออกซิเจน เมื่อนำ 144 isolates นี้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 7 การทดสอบ พบเชื้อที่พิสูจน์ได้ว่าเป็น *Clostridium* สายพันธุ์ต่างๆได้ จำนวน 93 isolates (ร้อยละ 64.6) ดังนี้ เชื้อ

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างดินจากบริเวณต่างๆ

บริเวณ	ตัวอย่างดินจากจังหวัด (ตัวอย่าง)															รวม จำนวนตัว อย่าง
	กาฬสินธุ์	ขอนแก่น	นครราชสีมา	มหาสารคาม	อำนาจเจริญ	อุบลราชธานี	ชัยภูมิ	ยโสธร	ร้อยเอ็ด	บุรีรัมย์	ศรีสะเกษ	อุดรธานี	สุรินทร์	สกลนคร	เลย	
ทุ่งนา	3	2	0	14	8	0	0	11	8	0	0	1	0	0	0	47
บ้าน	0	13	2	2	0	2	3	0	1	1	0	2	1	1	1	29
ริมถนน	0	2	0	1	0	0	0	1	2	0	1	2	0	0	0	9
แหล่งน้ำ	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	8
แปลงเกษตร	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3
โรงเรียน	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
สนามหญ้า	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไร่	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ป่า	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
รวม	3	27	3	18	8	2	3	12	11	1	1	8	1	1	1	100

ที่มีโอกาสเป็น *C. botulinum* type C, D จำนวน 34 isolates (ร้อยละ 36.5) *C. botulinum* type A, B, F หรือ *C. sporogenes* จำนวน 14 isolates (ร้อยละ 15.1) *C. botulinum* type B, E, F จำนวน 1 isolates (ร้อยละ 1.07) *C. botulinum* type G จำนวน 1 isolates (ร้อยละ 1.07) รวมเชื้อที่มีโอกาสจะเป็น *C. botulinum*

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อ Clostridium ที่พิสูจน์ได้จากเชื้อที่แยกได้

จังหวัด	จำนวน isolates ที่พิสูจน์ได้																	รวม(a)	
	<i>C. botulinum</i> type A,B,F or <i>C. sporogenes</i>	<i>C. botulinum</i> type B,E,F	<i>C. botulinum</i> type C,D	<i>C. botulinum</i> type G	<i>C. cadaveris</i>	<i>C. bifermentans</i> / <i>C. sordellii</i> (b)	<i>C. sordellii</i>	<i>C. felsineum</i>	<i>C. lentoputrescens</i>	<i>C. sphenoides</i> / <i>C. indolis</i>	<i>C. sartagoformum</i>	<i>C. oceanicum</i>	<i>C. sardinienensis</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. tetani</i>	<i>C. putrificum</i>	<i>C. hasiforme</i>		<i>C. novyi B</i>
กาฬสินธุ์	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2 (1)
ขอนแก่น	6	0	4	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	17 (10)
มหาสารคาม	3	0	6	0	0	2	3	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	1	19 (9)
ร้อยเอ็ด	3	0	8	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	15 (11)
บุรีรัมย์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0)
ศรีสะเกษ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1)
ชัยภูมิ	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (2)
สกลนคร	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
ยโสธร	1	0	6	0	0	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	14 (7)
อำนาจเจริญ	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	7 (3)
อุบลราชธานี	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (0)
นครราชสีมา	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4 (0)
อุดรธานี	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8 (6)
เลย	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0)
สุรินทร์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
รวม	14	1	34	1	1	14	8	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	93 (50)

(a) หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีโอกาสเป็น *C. botulinum* ต่อจำนวนเชื้อที่พิสูจน์ทั้งหมดจากตัวอย่างดินในแต่ละจังหวัด

(b) ไม่ได้ทำการทดสอบแยกระหว่าง *C. bifermentans* และ *C. sordellii*

จำนวน 50 isolates (ร้อยละ 34.7) และ *Clostridium* สายพันธุ์อื่นๆที่ไม่ใช่ *C. botulinum* อีกจำนวน 43 isolates (ร้อยละ 29.8) และมีเชื้อที่ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็น *Clostridium* สายพันธุ์ใดจำนวน 51 isolates (ร้อยละ 35.4) จำนวนเชื้อที่ให้ผลทดสอบว่ามีโอกาส

ที่จะเป็นเชื้อ *C. botulinum* จากดินในจังหวัดต่างๆ พบว่าแตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 2) เชื้อที่อาจจะเป็น *C. botulinum* ต่อจำนวนเชื้อที่พิสูจน์ทั้งหมดในแต่ละจังหวัด ดังนี้ กาฬสินธุ์ 1/2, ขอนแก่น 10/17, มหาสารคาม 9/19, ร้อยเอ็ด 11/15, ศรีสะเกษ 1/1,

ตารางที่ 3 จำนวน isolates ที่พิสูจน์ได้แยกเป็นบริเวณต่างๆ

เชื้อที่พบ	จำนวนที่พบ	บริเวณที่พบ								
		ทุ่งนา	บ้าน	ริมถนน	แหล่งน้ำ	แปลงเกษตร	โรงเรียน	สนามหญ้า	ไร่	ป่า
<i>C. botulinum</i> type A,B,F or <i>C. sporogenes</i>	14	7	1	2	2	1	0	0	0	1
<i>C. botulinum</i> type B,E,F	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. botulinum</i> type C,D	34	17	7	4	5	1	0	0	0	0
<i>C. botulinum</i> type G	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. cadaveris</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. bifermentans</i> or <i>C. sordellii</i>	14	8	1	3	2	0	0	0	0	0
<i>C. sordellii</i>	8	1	5	1	1	0	0	0	0	0
<i>C. felsineum</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. lentoputrescens</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. sphenoides/C. indolis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. sartagoformum</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. oceanicum</i>	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. sardiniensis</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. septicum</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. tetani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>C. putrificum</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. hastiforme</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>C. novyi B</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
รวม	93	47	19	10	12	2	1	0	1	1
ร้อยละ ^(b)	53.8	53.2	42.1	60.0	66.7	100	0	0	0	100

(b) = ร้อยละของเชื้อที่มีโอกาสเป็น *C. botulinum* (แถวที่ 1-4) ต่อเชื้อที่พิสูจน์ทั้งหมดของแต่ละบริเวณ

6/8 ส่วนในจังหวัด บุรีรัมย์ อุบลราชธานี นครราชสีมา และเลย ไม่พบเชื้อที่มีโอกาสเป็น *C. botulinum* ส่วนจังหวัดสกลนครและสุรินทร์ไม่พบ *Clostridium* จากตัวอย่างดินที่นำมาศึกษา เชื้อทั้ง 50 isolates ที่อาจจะ เป็น *C. botulinum* ที่แยกได้พบว่าแยกได้จาก ตัวอย่างดิน 43 จาก 100 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43 ส่วนจำนวนเชื้อที่พิสูจน์ได้ว่ามีโอกาสที่จะเป็น *Clostridium* สายพันธุ์ต่างๆทั้งหมดในแต่ละบริเวณ คือ พุงนา, บ้าน, ริมถนน, แหล่งน้ำ, แปลงเกษตรและป่า คิดเป็นร้อยละ 53.2, 42.1, 60.0, 66.7, 100 และ 100 ตามลำดับ บริเวณโรงเรียนและไร่ไม่พบเชื้อที่อาจจะเป็น *C. botulinum* ส่วนบริเวณสนามหญ้า ไม่พบเชื้อ *Clostridium* ชนิดใดเลยจากการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 3)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาแยกเชื้อ *Clostridium botulinum* โดยวิธี selective medium เป็นการแยกเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร CBI ที่มีสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นทำให้เห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยจะพบโคโลนีของเชื้อ *C. botulinum* มีลักษณะสร้าง lipase zone รอบๆโคโลนี ส่วนการสร้าง lecithinase นั้นจะพบได้บ้างในบาง type แต่ส่วนใหญ่ไม่มีการสร้าง lecithinase ในเชื้อกลุ่ม *C. botulinum*⁽¹²⁾

ผลการศึกษาในดิน 100 ตัวอย่างพบว่าสามารถแยกเชื้อและพิสูจน์ว่าเป็น *C. botulinum* ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี 7 การทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 25 (36/144) ของจำนวนเชื้อ *Clostridium* ที่นำมาทดสอบทั้งหมด และร้อยละของ *C. botulinum* ที่ยังไม่ทดสอบแยกจาก *C. sporogenes* เท่ากับร้อยละ 10.4 (14/144) *Clostridium* สปีชีส์อื่นคิดเป็นร้อยละ 29.8 (43/144) ส่วน isolates ที่ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็น *Clostridium spp* คิดเป็นร้อยละ 35.4 (51/144) ของจำนวน isolates ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ โดยทั้ง 50 isolates ที่อาจเป็น *C. botulinum* แยกได้จากตัวอย่างดิน

การศึกษาของ WF. Sonnabend และคณะที่รายงานผลการศึกษาการแยกเชื้อ *C. botulinum* จากดินในประเทศสวิตเซอร์แลนด์ พบ *C. botulinum* ถึงร้อยละ 43.9 ได้แก่ *C. botulinum* type A, B, C, F และ G ส่วนใหญ่เป็น *C. botulinum* type B ส่วน *C. botulinum* type A นั้นพบในบริเวณที่เป็นดินมีหญ้าขึ้นปกคลุม มักพบร่วมกับ type B *C. botulinum* type C พบร่วมกับ type B และ G ในตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณคลองระบายน้ำทิ้ง และ *C. botulinum* type G สามารถแยกได้จากดินแต่มีเชื้อจำนวนไม่มากนัก⁽⁸⁾

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่พบว่าเป็น *Clostridium spp.* ต่างๆนั้นเนื่องจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้มีจำกัดหากต้องการยืนยันชนิดของเชื้อควรมีการทดสอบอื่นๆเพิ่มเติม เช่นการทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆของเชื้อนอกเหนือจากในการศึกษานี้ เช่น arabinose, mannose, xylose ฯลฯ อีกทั้งการทดสอบการสร้าง neurotoxin ของเชื้อด้วยวิธี mouse bioassay⁽³⁾ และการทำ DNA sequencing จากยีนใน 16s rRNA จากเทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและมีความไวเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน

จากการศึกษา ของ Dixit A. และคณะ พบเชื้อ *Clostridium sp.* RKD มีลักษณะต่างๆและคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้าย *C. botulinum* อาจทำให้เข้าใจผิดได้ว่าเป็นเชื้อเดียวกันเพราะสามารถสร้างทอกซินที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทได้เช่นเดียวกันดังนั้นการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดนี้จึงต้องใช้ความแตกต่างกันของยีน 16s rRNA⁽⁷⁾

การศึกษาค้นคว้าให้ผลการแยกเชื้อ *C. botulinum* จากตัวอย่างดิน 100 ตัวอย่างได้ในจำนวนที่แตกต่างกันหรือมีบางแห่งไม่พบเชื้อ อาจเป็นเพราะตัวอย่างดินที่ได้รับมาทำการทดลองแยกเชื้อนั้นมีจำนวนตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ที่น้อยแตกต่างกันด้วย หากต้องการศึกษาถึงอัตราความชุกของเชื้อในดินในพื้นที่ต่างๆควรมีการเก็บตัวอย่างให้เหมาะสม ซึ่งในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพียงเพื่อแยกเชื้อ *C. botulinum* จากดิน จึงไม่ได้รายงานการ

เปรียบเทียบจำนวนของเชื้อที่พบในแต่ละพื้นที่ จากการ
 ตอนการเตรียมที่ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากส่วนผสมที่ใช้
 มีหลายรายการ โดยเฉพาะการเตรียม antimicrobial
 solution แม้ว่าวิธีการเตรียม CBI agar มีขั้นตอนมาก
 แต่ข้อดีคือประสิทธิภาพในการใช้เพาะแยกเชื้อ *C.*
botulinum ดีกว่า Egg yolk agar เพราะสามารถยับยั้ง
 เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติ
 ต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *C. botulinum* จาก
 ผลการศึกษาของ DC.Mills และคณะ⁽¹⁵⁾ ระหว่าง CBI
 agar และ BSM (botulinum selective medium) พบ
 ว่า BSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยเสริมการเจริญให้กับ
C. botulinum ได้ดีกว่า CBI agar เพราะจำนวนโคโลนี
 ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM มีมากกว่า CBI
 agar แต่เนื่องจากส่วนผสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
 BSM ต้องใช้ heart infusion กับ Mc Clung-Toabe
 agar medium ซึ่งหายาก ดังนั้นจึงใช้ CBI agar แยก
 เชื้อ *C. botulinum* ออกจากตัวอย่างดินในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- บุษกร อุดรภิชิต. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่
 1. สงขลา: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ; 2545: 16.
- สุมนทรา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์
 ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย
 ธรรมศาสตร์; 2545: 16.
- สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูลศิริ. แบคทีเรียแอนแอโรบัส.
 พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัย
 ขอนแก่น; 2546: 98-100.
- พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์, อรุณลักษณ์ ลูติตานนท์.
 แบคทีเรียวิทยาคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น:
 โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2547: 16-40.
- Finegold S, Baron E, Wexler H. A clinical
 guide to anaerobic infections. Belmont: STAR
 Publishing Company; 1992.
- จริยา ชมวารินทร์, กิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นเรศ
 วโรภาสตระกูล. แบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์.
 พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย
 ขอนแก่น; 2542: 103.
- Dixit A, Dhaked RK, Alam SI, Singh L.
 producing botulinum-like neurotoxin. Syst
 Appl Microbiol 2005; 28: 405-14.
- Sonnabend WF, Sonnabend UP, Krech T.
 Isolation of Clostridium botulinum type G
 form Swiss soil specimens by using sequential
 steps in an identification scheme. Appl Environ
 Microbiol 1989; 53(8): 1880-4.
- Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Wexler
 H, Finegold SM, Gharbia SE, Shah HN.
 Clostridium. In: Murray PR, Baron EJ,
 Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover
 RH. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington
 DC. ASM Press; 1999: p.654-71.
- Dezfulian M, Bartlett JG. Selective isolation
 and rapid identification of Clostridium
 botulinum type A and B by toxin detection.
 J Clin Microbiol 1985; 21(2): 231-33.
- Holdeman LV, Moore WEC. Anaerobes
 Laboratory manual. 3rd ed. Virginia: 1975; 8:
 67-77, 121-27.
- Dezfulian M, McCroskey LM, Hatheway CL,
 Dowell VR. Selective medium for isolation
 of Clostridium botulinum from human feces.
 J Clin Microbiol 1981; 13: 526-31.
- Charles L, Pharm D, Lora L, Naomi B. Lexi-
 comp's clinical reference library; Drug
 Information Handbook 1997-98 หน้า 2
- Solomon HM, Johnson EA, Bernard DT,
 Aron SS, Ferreira JL. Clostridium botulinum.
 In: Downes FP, Ito K, editors. Compendium
 of methods for microbiological examination
 of foods. Washing: APHA, 2001. หน้า 2
- Mills DC, Midura TF, Aron SS. Improved
 selective medium for the isolation of lipase-
 positive Clostridium botulinum from feces of
 human infants. J Clin Microbiol 1985; 21:
 947-950.