การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่บาดเจ็บด้วยสารสกัดเมมเบรนบนชุดทดสอบกระดาษ

Growth Enhancement of Injured-*Listeria monocytogenes* by Membrane Fractions on Paper Test Kit

สุลาวดี เขียวชม[1]* ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์[1] และประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2]สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Sulawadee Keawchom[1]*, Kooranee Tuitemwong[1] and Pravate Tuitemwong[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University.

[2]Food Science and Technology Division, Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi.

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้สารสกัดเมมเบรนในชุดทดสอบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจนับจำนวนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารจำนวน 2 สูตร คือ LMS25 (7.5 กรัมต่อลิตร sodium pyruvate และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ceftazidime) และ LM30 (2.5 กรัมต่อลิตร sodium pyruvate 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ceftazidime) ต่อการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ในสภาวะปกติ บาดเจ็บจากความร้อนและจากการแช่แข็ง พบว่าชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 ร่วมกับสารสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* โดยสามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ปกติ (48 ชั่วโมง) ได้สูงกว่าอาหารมาตรฐาน PALCAM agar (Polymyxin Acriflavin Lithium-Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Agar, Merck) ($p \leq 0.05$) และสามารถตรวจนับจำนวนเซลล์บาดเจ็บได้ไม่แตกต่างจากอาหารมาตรฐาน ($p > 0.05$) จำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* จากการตรวจนับด้วยชุดทดสอบกระดาษ LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรนและ PALCAM agar บ่มนาน 40 และ 48 ชั่วโมง มีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมาก ($r = 0.90\text{-}1.00$) นอกจากนี้ชุดทดสอบกระดาษยังมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารพร้อมบริโภคได้สูงถึง 3-9 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : *Listeria monocytogenes* สารสกัดเมมเบรน ชุดทดสอบกระดาษ อาหารมาตรฐาน PALCAM agar

***Corresponding author.** E-mail: maemod_b@hotmail.com

Abstract

The application of using membrane fractions in the paper test kit developed in our labolatory for enumeration of *Listeria monocytogenes* in food products (LMS25 with 7.5 g/l sodium pyruvate and 25 µg/ml ceftazidime and LM30 with 2.5 g/l sodium pyruvate and 30 µg/ml ceftazidime) were evaluated for its stimulation of growth of *L. monocytogenes* for normal and (heat and freeze) injured *L. monocytogenes* cells. Results indicated that LMS25 with membrane fraction 1.0 unit/ml enhanced the growth of both injured and normal cells. For normal cells of *L. monocytogenes*, LMS25 gave a greater numbers of cells than that of PALCAM agar (Polymyxin Acriflavin Lithium-Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Agar, Merck) ($p \leq 0.05$) after 48 hours incubation. But the sub-lethally injured cells were recovered at the comparable amounts with that of PALCAM agar ($p > 0.05$) at 48 hours. Results of LMS25 paper test kit with membrane fractions showed strong correlation (r of 0.90-1.00) with cell counts from the PALCAM at 40 and 48 hours incubation. In addition, the developed paper test kit exhibited good growth inhibition of non-*Listeria* contaminants in ready to eat foods up to as high as 3-9 Log CFU/ml levels. LMS25 appears to be applicable for *L. monocytogenes* testing in small laboratory and field application.

Keywords : *Listeria monocytogenes*, membrane fractions, paper test kit, PALCAM agar

บทนำ

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงจึงมีความสำคัญต่อความปลอดภัยด้านอาหารและสุขภาพของผู้บริโภค กระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อน การแช่แข็งการทำแห้ง หรือสารฆ่าเชื้อ (sanitizing compounds) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เซลล์ *L. monocytogenes* เกิดการบาดเจ็บซึ่งเซลล์เหล่านั้นสามารถอยู่รอดได้ในผลิตภัณฑ์อาหารและกลับมามีศักยภาพในการก่อโรคได้อีกครั้งแต่สูญเสียสมบัติเด่นบางประการ เช่น มีระยะ lag phase นานกว่าเซลล์ปกติ ต้องการสารอาหารจำเพาะในการเจริญ มีความไวต่อสภาวะการเจริญที่ไม่เหมาะสม หรือสามารถเจริญได้ในอาหาร non selective media แต่ไม่เจริญในอาหาร selective media (Busta, 1976; Hartsell, 1951) ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานเกิดความผิดพลาด ดังนั้นกระบวนการตรวจวิเคราะห์เซลล์บาดเจ็บ (sublethally injured pathogens) ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งจำเป็น

สารสกัดเมมเบรนหรือชื่อทางการค้าคือ Oxyrase™ เป็นสารกำจัดออกซิเจน (oxygen scavenger) ชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าถูกนำมาใช้ในขั้นตอน enrichment สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *L. monocytogenes* มีจุดประสงค์เพื่อส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บจากความร้อนในตัวอย่างอาหารซึ่งพบว่าจำนวนเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (Pate & Beuchat, 1995; Tuitemwong *et al*., 1994b) และยังมีรายงานการนำมาใช้กับการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารอื่นๆ เช่น *Salmonella, Campylobacter* และ *Escherichia coli* O157:H7 (Niroomand & Fung, 1992, 1994; Yu & Fung, 1991; Phebus *et al*., 1993) สารสกัดเมมเบรนเป็น membrane bound enzyme ของ oxidative bacteria เช่น *E. coli, Gluconobacter oxydans, Azotobacter vinlandii* หรือ *Acetobacter* spp. มีสมบัติเปลี่ยนรูปออกซิเจนละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อให้กลายเป็นน้ำ (Adler & Crow, 1981; Tuitemwong *et al*., 1994a) และสามารถลดค่า redox potential ลง -200 ถึง -300 มิลลิโวลต์ สร้างสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างสมบูรณ์ภายใน 1 นาที ส่งผลกระตุ้นการเจริญของเชื้อก่อโรคในกลุ่ม facultative anaerobes และเซลล์จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บจากความร้อน ความเย็น สารเคมี และการฉายรังสี (Wu, 2008) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บ *L. monocytogenes* ด้วยสารสกัดเมมเบรนบนชุดทดสอบกระดาษที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ชุดทดสอบกระดาษสำหรับการตรวจนับจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes*

เตรียมสูตรอาหาร 2 สูตร คือ LMS25 และ LM30 ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารหลักในปริมาณเท่ากันคือ peptone, yeast extract, starch, NaCl, KCl, LiCl, glucose, $MgSO_4$, esculin, ferric ammonium (III) citrate, egg yolk emulsion, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, agar, polymyxin B และ acriflavine ค่าพีเอชอาหารเท่ากับ 7.6 โดยสูตรอาหาร LMS25 มีสาร sodium pyruvate (7.5 กรัมต่อลิตร) และ LM30 (2.5 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้สูตรอาหาร LMS25 และ LM30 มี ceftazidime 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเคลือบลงบนกระดาษกรองชนิดพิเศษขนาด 4x5 เซนติเมตร (Merck) และ ทำให้แห้งสนิทด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (ปัทมา และคณะ, 2554)

2. การสกัดเมมเบรนจากเซลล์ *Escherichia coli*

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ *Escherichia coli* ATCC 11775 ในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยง (Centrifuge รุ่น Sorvall®RC26plus:Rotor ss-34, England) เพื่อแยกเซลล์ที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 จำนวน 2 ครั้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (Sigma Chemicals, USA) เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์ 0.4 กรัมต่อ HEPES 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง French pressure cell (SLM AMINCO®, Canada) ที่อัดความดันให้เพิ่มขึ้นเป็น 10,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ก่อนลดความดันลงเพื่อให้เซลล์แตก จำนวน 4 รอบ แยกเศษเซลล์ออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองสารสกัดเมมเบรนที่ได้ด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่ม dehydrogenase และ oxidase ด้วยวิธี polarographic oxygen probe method (Chunhachart, 2002) ปรับความเข้มข้นเป็น 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Tuitemwong *et al*., 1994a) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การส่งเสริมการเจริญของเซลล์ *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษด้วยสารสกัดเมมเบรน

วัสดุและอุปกรณ์: ชุดทดสอบกระดาษ LMS25 และ LM30, อาหาร PALCAM agar (Merck) สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85, สารละลาย peptone water เข้มข้นร้อยละ 0.1,

microtube 1.5 มิลลิลิตร, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath), ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, เทอร์โมมิเตอร์, น้ำแข็ง, สารสกัดเมมเบรนจากข้อ 2

3.1 การส่งเสริมการเจริญของเซลล์ปกติ *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษด้วยสารสกัดเมมเบรน

เจือจางเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร TSBYE อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี ดูดเซลล์ซัสเพนชันที่ได้ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนชุดทดสอบกระดาษจะได้ชุดทดสอบกระดาษที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน ส่วนชุดทดสอบที่เติมสารสกัดเมมเบรน ให้ดูดเซลล์ซัสเพนชันที่ได้อีก 0.7 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร เติมสารสกัดเมมเบรนในอัตราส่วน 120 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของปริมาตรเซลล์ซัสเพนชันที่ใช้ (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายบนชุดทดสอบกระดาษเท่ากับ 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นจึงถ่ายลงบนชุดทดสอบกระดาษ ส่วนอาหาร PALCAM agar (Merck) ใช้เทคนิค spread plate ด้วยเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำชุดทดสอบกระดาษและอาหาร PALCAM agar บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 40 และ 48 ชั่วโมง บนอาหาร PALCAM agar นับจำนวนโคโลนีขนาด 1.5-2 มิลลิเมตร สีเขียวมะกอกล้อมรอบด้วยโซนสีดำและมีรอยบุ๋มตรงกลางโคโลนี ส่วนชุดทดสอบกระดาษทั้ง 2 สูตร โคโลนีมีลักษณะเป็นจุดสีแดงล้อมรอบด้วยโซนสีดำ

3.2. การส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บจากความร้อน *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษด้วยสารสกัดเมมเบรน

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในอาหาร TSBYE บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (McFarland 0.5) จากนั้นนำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 60±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเมื่อครบเวลาแช่น้ำแข็งทันที (Mackey *et al*., 1994) เจือจางเซลล์บาดเจ็บจากความร้อนที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี ดูดเซลล์ซัสเพนชันลงบนชุดทดสอบกระดาษทั้ง 2 สภาวะ และนับจำนวนโคโลนีบนชุดทดสอบกระดาษและอาหาร PALCAM agar โดยวิธีเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1

3.3. การส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็ง *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษด้วยสารสกัดเมมเบรน

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในอาหาร TSBYE อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (McFarland 0.5) เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน peptone water เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ใช้วิธีการ freeze and thaw เพื่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ (Wu *et al*., 2001) โดยนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และละลายที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ Freeze injured cell ที่ได้ มาเพาะบนชุดทดสอบกระดาษและอาหาร PALCAM agar โดยวิธีเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1

4. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มักพบปนเปื้อนในอาหารพร้อมบริโภค (ready to eat food) ของชุดทดสอบกระดาษที่เติมสารสกัดเมมเบรน

เชื้อบริสุทธิ์ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes* DMKU, *Shigella flexneri, Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *S. Enteritidis* DMST 15676, *Proteus mirabilis, Bacillus cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. licheniformis, Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis* TISTR 459, *Micrococcus luteus* DMKU เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้เซลล์มีความเข้มข้นต่างกัน 1 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร จนถึง 3 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ลงในหลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ และถ่ายเซลล์ซัสเพนชันลงบนชุดทดสอบกระดาษบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 40 และ 48 ชั่วโมง ตรวจผลการทดลองโดยสังเกตจำนวนโคโลนีที่มีและไม่มีจุดสีแดงหรือจุดสีแดงล้อมรอบด้วยโซนสีดำบนชุดทดสอบกระดาษที่ความเข้มข้นเซลล์เท่าใด แสดงว่าชุดทดสอบกระดาษสามารถยับยั้งการเจริญของ Non-*Listeria* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์นั้น

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่ได้บนชุดทดสอบกระดาษและอาหารมาตรฐานที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมงวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มด้วย General Linear Model เปรียบเทียบความ

แตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Least Significant Difference (LSD) และหาความสัมพันธ์ระหว่างชุดทดสอบกระดาษกับอาหารมาตรฐานด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) โดยใช้โปรแกรม SPSS for window version 11.5

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลของสารสกัดเมมเบรนต่อการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ปกติ *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษ

จากภาพที่ 1 เซลล์ปกติเมื่อเจริญบนชุดทดสอบกระดาษ LMS25 และ LM30 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะเป็นจุดสีแดงไม่มีโซนสีดำล้อมรอบ ซึ่งเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นเป็น 40 และ 48 ชั่วโมง โคโลนีจะปรากฏลักษณะของจุดสีแดงที่มีโซนสีดำล้อมรอบในทุกโคโลนี เนื่องจากสาร 2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์รีดักเตสจากเซลล์ *L. monocytogenes* เปลี่ยนเป็นสารสีแดงที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า triphenylformazan ส่งผลให้โคโลนีของ *L. monocytogenes* มีสีแดง และโซนสีดำเกิดจากปฏิกิริยาย่อยสลาย esculin ของเชื้อ *L. monocytogenes* เปลี่ยนเป็น esculetin จากนั้นทำปฏิกิริยากับไอออน Fe^{3+} จาก ferric ammonium (III) citrate ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ตะกอนสีดำ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี *L. monocytogenes* DMST 17303 ในสภาวะเซลล์ปกติและเซลล์บาดเจ็บบนชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 และ LM30 บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

L. monocytogenes	อาหาร	ค่าเฉลี่ย Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
		24 ชั่วโมง	40 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
เซลล์ปกติ	LMS25	7.00 ± 0.30^{c}	8.28 ± 0.03^{a}	8.31 ± 0.03^{a}
	LMS25+ Mb	7.44 ± 0.21^{b}	8.29 ± 0.04^{a}	8.32 ± 0.04^{a}
	PALCAM agar	8.17 ± 0.01^{a}	8.23 ± 0.01^{a}	8.23 ± 0.01^{b}
	LM30	7.18 ± 0.36^{b}	8.44 ± 0.04^{a}	8.47 ± 0.01^{a}
	LM30+Mb	6.93 ± 0.17^{b}	8.38 ± 0.02^{a}	8.40 ± 0.02^{a}
	PALCAM agar	7.96 ± 0.02^{a}	8.44 ± 0.06^{a}	8.44 ± 0.06^{a}
เซลล์บาดเจ็บจากความร้อน	LMS25	3.58 ± 0.22^{b}	4.27 ± 0.06^{b}	4.34 ± 0.02^{a}
	LMS25+Mb	3.76 ± 0.08^{b}	4.30 ± 0.01^{ab}	4.37 ± 0.01^{a}
	PALCAM agar	4.27 ± 0.03^{a}	4.38 ± 0.04^{a}	4.38 ± 0.04^{a}
	LM30	3.33 ± 0.46^{a}	4.16 ± 0.08^{c}	4.24 ± 0.04^{c}
	LM30+Mb	3.77 ± 0.27^{a}	4.36 ± 0.02^{b}	4.37 ± 0.01^{b}
	PALCAM agar	3.67 ± 0.09^{a}	4.70 ± 0.04^{a}	4.70 ± 0.04^{a}
เซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็ง	LMS25	3.43 ± 0.08^{c}	4.41 ± 0.01^{b}	4.44 ± 0.01^{b}
	LMS25+Mb	3.91 ± 0.09^{b}	4.46 ± 0.02^{a}	4.49 ± 0.02^{a}
	PALCAM agar	4.43 ± 0.07^{a}	4.48 ± 0.04^{a}	4.48 ± 0.04^{a}
	LM30	2.89 ± 0.36^{c}	4.07 ± 0.03^{b}	4.10 ± 0.01^{b}
	LM30+Mb	3.26 ± 0.06^{b}	4.09 ± 0.03^{b}	4.09 ± 0.03^{b}
	PALCAM agar	4.18 ± 0.05^{a}	4.19 ± 0.04^{a}	4.19 ± 0.04^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ, - ไม่พบการเจริญ, SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Mb หมายถึงเติมสารสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
ตัวอักษร a, b, c ที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

จากตารางที่ 1 ในสภาวะเซลล์ปกติบนชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 สารสกัดเมมเบรนมีผลสนับสนุนการเจริญของเชื้อโดยให้ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีสูงที่สุดและสูงกว่าอาหารมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ 48 ชั่วโมง ส่วนชุดทดสอบกระดาษสูตร LM30 ซึ่งมีปริมาณยาปฏิชีวนะ ceftazidime สูง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเติมสารสกัดเมมเบรนไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เจริญบนชุดทดสอบกระดาษที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนมีค่าไม่แตกต่างจากอาหารมาตรฐานทั้งที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง เมื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างชุดทดสอบกระดาษกับวิธีมาตรฐานพบว่าชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สูงถึง 0.95-1.00 ทั้งที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดทดสอบกระดาษสูตร LM30 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ต่ำอยู่ระหว่าง 0.79-0.99 ในชุดทดสอบกระดาษที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดเมมเบรนมีผลให้ชุดทดสอบกระดาษทั้งสองสูตรมีความสัมพันธ์กับวิธีมาตรฐานในระดับสูงขึ้น (ค่า r มีค่าเท่ากับ 0.98-1.00)

Adler & Spady (1997) รายงานว่าสารสกัดเมมเบรนจากเซลล์ *E. coli* ถูกนำมาใช้ในการสร้างและรักษาสภาวะไร้ออกซิเจนทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ปกติโดยกระตุ้นอัตราการเจริญในระยะ log phase ของเซลล์ โดยนำมาใช้กับแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria* spp., *L. monocytogenes, E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* และ *S. faecalis* และสามารถส่งเสริมการฟื้นตัวของ facultative *Listeria* spp. จากเซลล์เริ่มต้นน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตรอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Tuitemwong *et al*., 1994b)

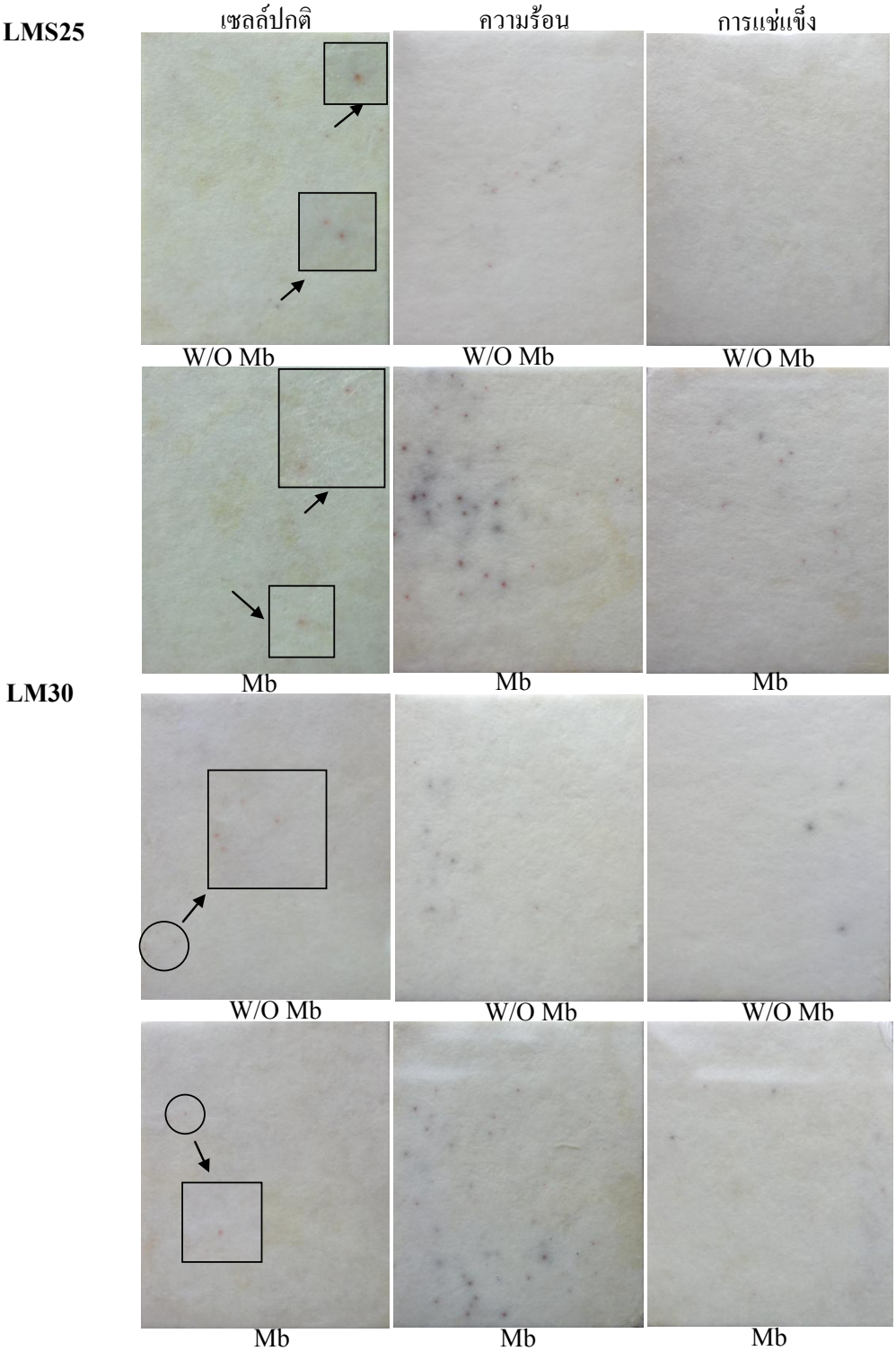
2. ผลของสารสกัดเมมเบรนต่อการส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บจากความร้อน *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษ

จากตารางที่ 1 และภาพที่ 1 สารสกัดเมมเบรนมีประสิทธิภาพส่งเสริมการฟื้นตัวของเซลล์บาดเจ็บจากความร้อนโดยเฉพาะช่วงแรกของการบ่มคือชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากจำนวนโคโลนีที่นับได้บนชุดทดสอบกระดาษ LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรนมีค่า 3.76 ± 0.08 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร สูงกว่าชุดทดสอบกระดาษ LMS25 ที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน (3.58 ± 0.22 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร) และในสูตรอาหาร LM30 ที่เติมสารสกัดเมมเบรนนับจำนวนเซลล์ได้ (3.77 ± 0.27 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าอาหารมาตรฐาน (3.67 ± 0.09 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร) และชุดทดสอบกระดาษ LM30 ที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน (3.33 ± 0.46 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตามโคโลนีที่ปรากฏในช่วง 18-24 ชั่วโมง บางโคโลนีปรากฏเพียงจุดสีแดงอย่างเดียวไม่มีโซนสีดำจึงทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *L. monocytogenes*

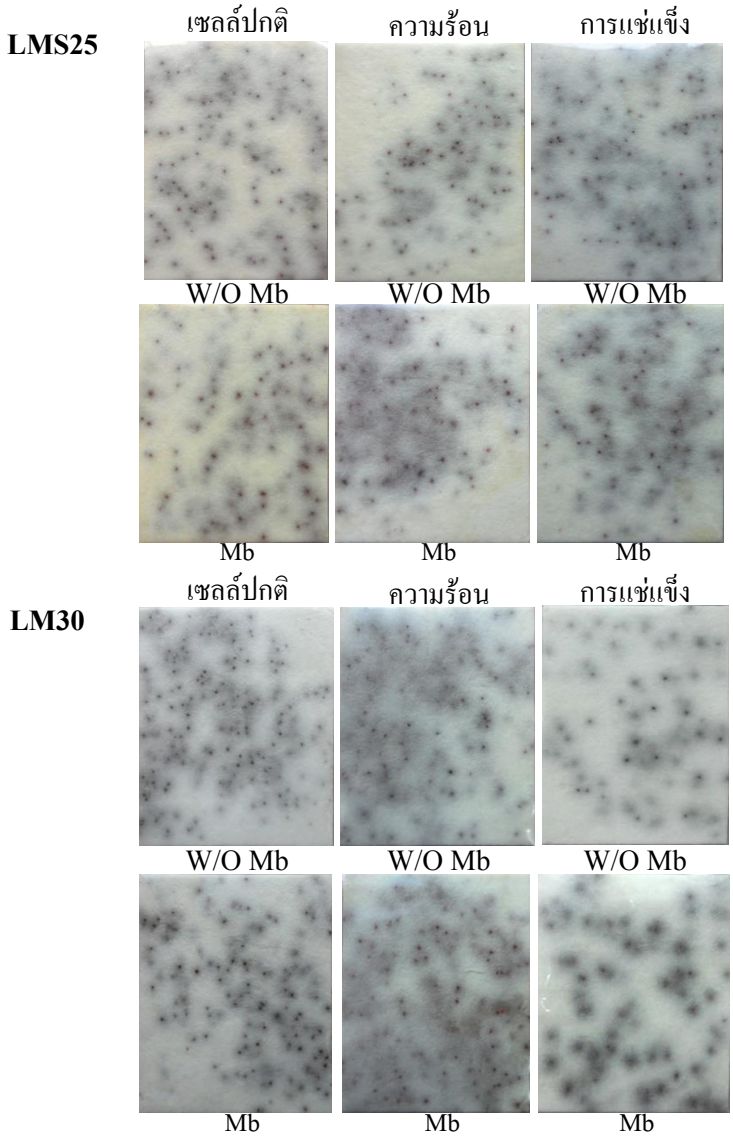
การใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในการทดลองเป็นอุณหภูมิที่ใช้เป็นตัวแทนการทำให้เซลล์บาดเจ็บในลักษณะที่เกิดจากการใช้ความร้อนจากกระบวนการในอุตสาหกรรม Mackey *et al*. (1994) รายงานว่าเมื่อเซลล์ *L. monocytogenes* Scott A ถูกให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 นาที และนำเข้าสู่ขั้นตอนการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร blood agar และ TSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีเซลล์ *L. monocytogenes* Scott A จำนวนหนึ่งเกิดการบาดเจ็บจากความร้อน โดยเซลล์เมื่อเจริญบนอาหาร nonselective media 2 ชนิด ซึ่งไม่มีสารยับยั้งการเจริญของเซลล์กลับนับจำนวนเซลล์ได้แตกต่างกันดังนั้นผลต่างของจำนวนเซลล์ที่นับได้นั้นจึงเป็นเซลล์บาดเจ็บที่เกิดจากการให้ความร้อนจนไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (blood agar มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.18 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ TSA มีค่าเท่ากับ 4.83 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร)

Dallimer & Martin (1988) รายงานว่าเซลล์บาดเจ็บจากความร้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และ superoxide dismutase ลดลงทำให้เซลล์มีความไวต่อสารเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide และ superoxide) ในรูปอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์ การเติมสารสกัดเมมเบรนจึงเป็นการทดแทนกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูญเสียไป โดยไปกำจัดออกซิเจนและลดสารเปอร์ออกไซด์ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ จึงกระตุ้นให้เซลล์เจริญได้ดีขึ้นส่งผลให้ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้สารสกัดเมมเบรนมีผลทำให้ระยะ lag phase และ generation time ของเซลล์บาดเจ็บสั้นลง (Alder & Crow, 1981) และยังส่งผลให้จุดสีแดงของโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นพร้อมทั้งโซนสีดำที่กว้างกว่าทำให้สังเกตเห็นโคโลนีได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบกระดาษที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน

และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิตพบว่าชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนสามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีของเซลล์บาดเจ็บจากความร้อน *L. monocytogenes* ได้ไม่แตกต่างจากอาหารมาตรฐาน PALCAM agar ($p > 0.05$) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในชุดทดสอบกระดาษสูตร LM30 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนให้ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้มีค่าแตกต่างจากอาหารมาตรฐาน PALCAM agar



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนี *L. monocytogenes* DMST 17303 ในสภาวะเซลล์ปกติ เซลล์บาดเจ็บจากความร้อนและเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งบนชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 และ LM30 ที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน (W/O Mb) และเติมสารสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Mb) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนี *L. monocytogenes* DMST 17303 ในสภาวะเซลล์ปกติ เซลล์บาดเจ็บจากความร้อนและเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งบนชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 และ LM30 ที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน (W/O Mb) และเติมสารสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Mb) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส ที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง (ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏให้ผลไม่แตกต่างกันที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง)

อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามชุดทดสอบกระดาษที่เติมสารสกัดเมมเบรนยังมีค่าเฉลี่ยโคโลนีใกล้เคียงกับอาหารมาตรฐานมากกว่าชุดทดสอบกระดาษที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน ซึ่งปรากฏในชุดทดสอบกระดาษทั้ง 2 สูตร ผลจากชุดทดสอบกระดาษ LMS25 มีความสัมพันธ์กับวิธีมาตรฐานในระดับสูงเมื่อตรวจนับจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ที่บาดเจ็บจากความร้อนโดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) อยู่ระหว่าง 0.82-0.87 และการเติมสารสกัดเมมเบรนส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์มีค่าสูงขึ้นคือ 0.90-1.00 ในขณะที่ชุดทดสอบกระดาษ LM30 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) อยู่ระหว่าง 0.80-1.00 และเมื่อเติมสารสกัดเมมเบรนส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์มีค่าต่ำลงคือ 0.71-0.88 ที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง

3. ผลของสารสกัดเมมเบรนต่อการส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็ง *L. monocytogenes* บนชุดทดสอบกระดาษ

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 ชุดทดสอบกระดาษสูตร

LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรนสามารถตรวจนับจำนวนเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งได้ไม่แตกต่างจากอาหารมาตรฐาน ($p>0.05$) ที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อไม่เติมสารสกัดเมมเบรนชุดทดสอบกระดาษ LMS25 ตรวจนับจำนวนเซลล์บาดเจ็บได้ต่ำที่สุดซึ่งค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่ได้มีค่าแตกต่างจากอาหารมาตรฐาน ($p\leq0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมมเบรนช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์บาดเจ็บได้และเห็นได้ชัดเจนที่สุดที่ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบกระดาษที่ไม่เติมสารสกัดเมมเบรน ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 1 โดยสารสกัดเมมแบรนจะช่วยลดระยะเวลาในช่วง lag phase ให้สั้นลง เนื่องจากเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งของแบคทีเรียจะมีระยะ lag phase นานขึ้น (Flanders & Donnelly, 1994) ส่วนลักษณะโคโลนีของเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งเมื่อเจริญบนชุดทดสอบกระดาษ LMS25 โคโลนีมีจุดสีแดงและโซนสีดำล้อมรอบมากกว่าในชุดทดสอบกระดาษ LM30 ที่โคโลนีส่วนใหญ่มีเพียงจุดสีแดงแต่ไม่มีโซนสีดำดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากนี้ชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรนยังมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สูงถึง 0.98-1.00 ในขณะที่ชุดทดสอบกระดาษสูตร LM30 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดเมมเบรนมีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีแตกต่างจากอาหารมาตรฐาน PALCAM agar ($p\leq0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ต่ำกว่าคือ 0.79-0.97 แสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดเมมเบรนกับองค์ประกอบอาหารในชุดทดสอบกระดาษสูตร LM30 ไม่สนับสนุนการเจริญของเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งเนื่องจากสูตรอาหารมีความ selective มากเกินไปโดยมีปริมาณยาปฏิชีวนะ ceftazidime สูงกว่า LMS25 ทำให้เซลล์บาดเจ็บบางเซลล์ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญช้ากว่าปกติส่งผลให้เกิดการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นผลลบเท็จเพราะเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งของแบคทีเรียจะมีความไวต่อสาร selective agent ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น (Oscroft *et al*., 1987) ซึ่งสูตรอาหาร LMS25 มีปริมาณสาร selective agent ที่เหมาะสมเซลล์บาดเจ็บสามารถเจริญได้ทำให้โอกาสการเกิดผลลบเท็จน้อยลงหรือหมดไปได้

การทดลองนี้ทำให้เซลล์บาดเจ็บโดยวิธีแช่แข็งแบบ slow freezing and thaw ซึ่งอ้างอิงจากวิธีของ Wu *et al*. (2001) โดยวิธีการนี้จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเซลล์บาดเจ็บจากกระบวนการในอุตสาหกรรม โดย Wu *et al*. (2001) รายงานว่าเซลล์ *L. monocytogenes* ATCC 43256 เมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร recovery medium 2 ชนิด คือ MOX agar และ TAL (Thin Agar Layer) พบว่าอาหารทั้ง 2 ชนิดนับจำนวนเซลล์ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งได้แตกต่างกันโดยอาหาร MOX agar นับจำนวนเซลล์

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) ของชุดทดสอบกระดาษเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐาน PALCAM agar

สถานะเซลล์	ชุดทดสอบกระดาษ	ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r)	
		40 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
เซลล์ปกติ	LMS 25	0.98	0.95
	LMS 25+Mb	1.00	1.00
	LM 30	0.89	0.79
	LM 30+Mb	0.99	0.98
เซลล์บาดเจ็บจากความร้อน	LMS 25	0.87	0.82
	LMS 25+Mb	1.00	0.90
	LM 30	1.00	0.80
	LM 30+Mb	0.71	0.88
เซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็ง	LMS 25	0.82	1.00
	LMS 25+Mb	1.00	0.98
	LM 30	0.97	0.93
	LM 30+Mb	0.79	0.79

หมายเหตุ Mb หมายถึงเติมสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ได้เท่ากับ 4 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหาร TAL นับจำนวนเซลล์ได้ 5 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลต่างจำนวนเซลล์ที่เกิดนั้นคือจำนวนเซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บจากการแช่แข็งแบบ slow freezing and thaw ซึ่งไม่สามารถเจริญบนสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้

4. การยับยั้งแบคทีเรียที่มักพบปนเปื้อนในอาหารประเภทพร้อมบริโภค (ready to eat food) ของชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรน

ชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 ร่วมกับการเติมสารสกัดเมมเบรนมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ความเข้มข้นเซลล์ตั้งแต่ 3-9 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 7-9 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทผักสลัดพบการปนเปื้อนของ coliforms และ *E. coli* เพียง 5-6 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Christison *et al*., 2008)

Wei *et al*. (2006) รายงานการปนเปื้อนของ coliform ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ 2-5.75 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร 1.30-7.28 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในอาหารทะเลและ 2-5.74 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในอาหารประเภทผัก และพบการปนเปื้อนของ *E. coli* 2-4.20 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในอาหารทะเล ส่วนอาหารพร้อมบริโภคแบบแช่เย็น 18 องศาเซลเซียส พบการปนเปื้อนของ coliforms 2-3 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ *E. coli* 4-5 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร และตรวจพบ *Pseudomonas* spp. ในช่วง 2-5 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Fang *et al*, 2003) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นเซลล์ 3-9 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทผักสลัดพบการปนเปื้อนของ *B. cereus* และ *S. aureus* เพียง 2 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Christison *et al*., 2008) และในอาหารพร้อมบริโภคแบบแช่เย็น 18 องศาเซลเซียส พบการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในช่วง 2-5 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยพบการปนเปื้อนเกิน 5 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 1.3 (B. cereus) และร้อยละ 0.7 (*S. aureus*) (Fang *et al*, 2003) ในผลิตภัณฑ์จากไก่พบการปนเปื้อน *B. cereus* เพียง 4 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Zahran *et al*., 2008) ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์พบการปนเปื้อน *S. aureus* 1.60-5.81 Log

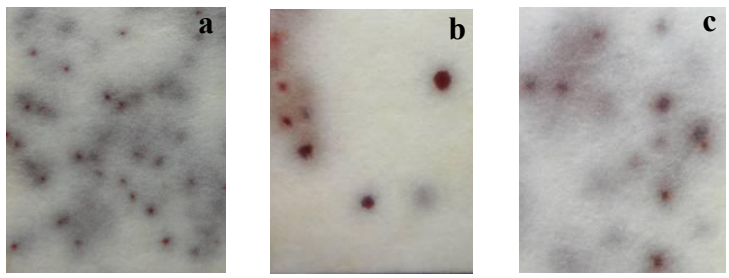
ตารางที่ 3 ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่มักพบปนเปื้อนในอาหารประเภทพร้อมบริโภคของชุดทดสอบกระดาษ LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรน

เชื้อทดสอบ	Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร	
	เซลล์เริ่มต้น	ถูกยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นเซลล์
P. aeruginosa ATCC 27853	9.16 ± 0.06	7
C. freundii	8.55 ± 0.06	7
K. pneumoniae	9.23 ± 0.02	8
E. aerogenes DMKU	9.13 ± 0.04	8
S. flexneri	8.70 ± 0.05	8
S.Typhimurium DMST 16809	10.00 ± 0.01	9
S. Enteritidis DMST 15676	10.02 ± 0.03	9
P. mirabilis	10.41 ± 0.09	9
B. cereus ATCC 11778	8.86 ± 0.21	6
B. subtilis ATCC 6633	8.21 ± 0.03	8
B. licheniformis	11.11 ± 0.10	3
S. aureus ATCC 25923	10.25 ± 0.00	9
S. faecalis TISTR 459	9.32 ± 0.06	8
M. luteus DMKU	9.43 ± 0.01	7

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

โคโลนีต่อมิลลิลิตร อาหารทะเล 2.00-7.48 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร และอาหารประเภทผัก 2.00-6.05 Log โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Wei *et al*., 2006)

อย่างไรก็ตามโคโลนีของ *B. licheniformis* และ *B. cereus* เมื่อไม่ถูกยับยั้งจะมีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ *L. monocytogenes* โดยเชื้อ *B. licheniformis* ที่เวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีมีจุดสีแดงขนาดเล็กล้อมรอบด้วยโซนสีดำคล้ายกับเชื้อ *L. monocytogenes* แต่เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นเป็น 40 และ 48 ชั่วโมง จุดโคโลนีจะมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เวลาเดียวกัน และมีจุดสีแดงล้อมรอบด้วยโซนสีน้ำตาลเข้ม-สีดำ ส่วนเชื้อ *B. cereus* ที่เวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีมีเพียงจุดสีแดงไม่มีโซนดำ และมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อ *L. monocytogenes* อย่างชัดเจนที่เวลา 40 และ 48 ชั่วโมง พร้อมทั้งมีโซนสีน้ำตาลเข้ม-สีดำล้อมรอบโคโลนี จึงทำให้แยกความแตกต่างจากเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 ที่เติมสารสกัดเมมเบรนของเชื้อ *L. monocytogenes* (a), *B. cerues* ATCC 11778 (b) และ *B. licheniformis* (C) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

ชุดทดสอบกระดาษสูตร LMS25 เติมสารสกัดเมมเบรน 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจนับจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในสภาวะเซลล์ปกติ เซลล์บาดเจ็บจากความร้อน และเซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็ง เมื่อบ่มที่เวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากมีสาร selective agent (ceftazidime) ในปริมาณเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์มากกว่า LM30 รวมทั้งการเพิ่มปริมาณ sodium pyruvate ในสูตรอาหาร LMS25 ยังช่วยส่งเสริมการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บให้เจริญได้ดียิ่งขึ้น และมีความสัมพันธ์กับวิธีมาตรฐานในการตรวจนับจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในระดับสูงมาก (r=0.90-1.00)

นอกจากนี้ selective agent ที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่ปนเปื้อนร่วมกับ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารได้เป็นอย่างดี และสามารถลดผลวิเคราะห์ที่เป็นผลลบเท็จ กรณีที่มีเซลล์ *L. monocytogenes* อยู่ในสภาวะบาดเจ็บจากความร้อนหรือการแช่แข็งจากการผลิต รวมทั้งชุดทดสอบกระดาษที่พัฒนาขึ้นยังมีราคาต่ำกว่าอาหารมาตรฐานที่เป็นการค้า ใช้ง่ายในปริมาณน้อยกว่าเดิมมากและสะดวก ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ทดแทนอาหารมาตรฐาน ในแลปขนาดเล็กหรือการทำงานในภาคสนาม

เอกสารอ้างอิง

ปัทมา ไชยเวช ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์ และประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์. (2554). *การพัฒนาชุดทดสอบกระดาษอย่างรวดเร็วสำหรับตรวจนับจำนวนเชื้อ Bacillus cereus ในอาหาร*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adler, H.I. & W.D. Crow. (1981). A novel approach to the growth of anaerobic microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering Symposium, 11*, 533-540.

Adler, H. and G. Spady. (1997). The use of microbial membranes. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 5*, 1-12.

Busta, F.F. (1976). Practical implications of injured microorganisms in food. *Journal of Milk Food Technology, 39*, 138-145.

Christison, C.A., D. Lindsay & A. von Holy. (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Journal of Food Control, 19*, 727-733.

Chunhacchart, O. (2002). *Characterization of food grade membrane fractions from acetic acid bacteria to use as growth stimulating agents*. MS. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Dallimer, A. W. & S. E. Martin. (1988). Catalase and superoxide dismutase activities after heat-injury of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology, 54*, 581-582.

Fang, T. J., Q. K., Wei, C. W. Liao, M. J. Hung & T. H. Wang. (2003). Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. International *Journal of Food Microbiology, 80*, 241-250.

Flanders, K. J. & C. W. Donnelly. (1994). Injured, resuscitation and detection of Listeria spp. from frozen environments. *Journal of Food Microbiology, 11*, 473-480.

Hartsell, S.E. (1951). The longevity and behavior of pathogenic bacteria in frozen food: the influence of plating media. *American Journal of Public Health, 41*, 1072-1077.

Mackey, B. M., E. Boogard, C. M. Hayes & J. Baranyi. (1994). Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes. Journal of Food Microbiology, 22*, 227-237.

Niroomand, F. & D.Y.C. Fung. (1992). Effect of oxyrase on growth of *Salmonella* spp. and *Listeria monocyrogenes* in the universal preenrichment medium. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2*, 24 1-247.

Niroomand, F. & D.Y.C. Fung. (1994). Effect of oxygen reducing membrane fragments on growth of *Campylobacter* spp. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2*, 247-277.

Oscroft, C. A., S. J. Alcockt & J. A. Clayden. (1987). Recovery of sub-lethally injured bacteria from frozen foods. *Journal of Food Microbiology, 4*, 257-268.

Patel, J.R. & L.R. Beuchat. (1995). Enrichment in fraser broth supplemented with catalase or oxyrases, combined with the microcolony immunoblot techniques, for detecting heat-injured *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology, 26*, 165-176.

Phebus, R. K., H. Thippareddi, K. Kone & D. Y. C. Fung. (1993). Use of oxyrase enzyme in enrichments to enhance the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from culture media and ground beef. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 1*, 249-260.

Tuitemwong, K., D. Y. C. Fung & P. Tuitemwong. (1994)a. Food grade oxygen reducing membrane bound enzymes. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 3*, 2-6.

Tuitemwong, K., D. Y. C. Fung & P. Tuitemwong. (1994) b. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using reflectance colorimetric method with membrane fractions from oxidative bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 3*(3), 185-202.

Yu, L.S.I. & D.Y.C. Fung. (1991). Effect of oxyrase enzyme on *Listeria monocytogenes* and other facultative anaerobes. *Journal of Food Safety, 11*, 163-175.

Wei, Q. K., S. L., Hwang & T. R., Chen. (2006). Microbiological quality of ready-to-eat food products in southern Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis, 14*(1), 68-73.

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

Wu, V. C. H., D. Y. C. Fung & D. H. Kang. (2001). Evalution of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 9*, 11-25.

Zahran, D. A., B. A. Hendy & H. N. E. Hifnawi. (2008). Incidence and radiation sensitivity of *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes* and their toxins in some chicken products. *World Applied Sciences Journal, 5*(2), 182-188.