



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาภาพรวมของชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็ว  
ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก

Development of rapid detection protocol to assess *Listeria* contamination in export for Thai food industry

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080005

สัญญาเลขที่ 24/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาภาพรวมของชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็ว  
ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก

Development of rapid detection protocol to assess Listeria contamination in export for Thai food industry

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2560

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่ สัณญา 24/2561

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

### (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อภิลักษณ์ ทิพย์รัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาภาพรวมของชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก (ภาษาอังกฤษ) Development of rapid detection protocol to assess Listeria contamination in export for Thai food industry รหัสโครงการ 256101A1080005 / สัญญาเลขที่ 24/2561 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,020,000 บาท (หนึ่งล้านสองหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 6 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2560 – วันที่ 31 มีนาคม 2562) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้ทำการบูรณาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือกของเชื้อแอลดีโนโคคั่วมักกับการศึกษาผลของสารยับยั้งสำหรับการตรวจพบเชื้อแอลดีโนโคคั่วมและการศึกษาลักษณะของเชื้อลิสทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะเพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของสารอาหาร สารชีวะคและสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อลิสทีเรีย ทั้งนี้ความเข้าใจที่มีต่อกลไกภายในของแต่ละองค์ประกอบจะนำไปสู่ความสามารถในการบ่งชี้เชื้อลิสทีเรีย และการปรับปรุงการตรวจหาเชื้อ ซึ่งจะนำไปสู่การลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์เชื้อและทำให้ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลิสทีเรียโดยทั่วไป ได้แก่ NGFIS, IDF, US FDA, NMKL, ISO, AOAC, และ USDA-FSIS โดยขั้นตอนหลักประกอบไปด้วยการเพิ่มจำนวนในอาหารไม่จำเพาะ ตามด้วยการแยกเชื้อเป้าหมายด้วยอาหารแข็ง ทั้งนี้เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกันและลดการใช้อาหารเหลวที่มีราคาแพง ทางคณะวิจัยจึงได้พัฒนารูปแบบวิเคราะห์ทั้งในส่วนของการเพิ่มจำนวนเชื้อลิสทีเรียในอาหารเหลวและการคัดแยกเชื้อ โดยอาหารแข็ง ผลจากการดำเนินงานวิจัยทำให้ได้รูปแบบการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพให้ผลถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือ ลดผลการวิเคราะห์ที่ให้ false positive ที่เกิดจากอาหารเหลวเพิ่มจำนวนมีปริมาณของตัวยับยั้งมากเกินไป ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ รูปแบบการวิเคราะห์ลิสทีเรียที่นำเสนอจะมีต้นทุนการดำเนินงานต่ำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในผลิตภัณฑ์อาหารของโรงงานอุตสาหกรรม ที่มีตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนมาก

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและการคัดเลือกเชื้อ ลิสทีเรีย อินโนคัว ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบคัดเลือกและไม่คัดเลือก เพื่อสร้างความรู้พื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับขั้นตอนการตรวจเชื้อลิสทีเรีย ทั้งนี้ใช้ เชื้อ แอล อินโนคัว ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค เป็นเชื้อทดสอบ เนื่องจากเชื้อ แอล อินโนคัว มีลักษณะทางสรีรวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อ ลิสทีเรีย โมโนไซโตจีนเนส สำหรับการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ แอล อินโนคัว บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้กันอยู่ทั่วไป ได้แก่ เอ็นบี แอล บี และทีเอสบี และบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อ ลิสทีเรียโดยเฉพาะ โดยไม่มีการใส่สารยับยั้งในสูตร ได้แก่ บีแอลอีบี เอฟบี และพีบี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 35, 37, และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดซิกมอยด์ในการอธิบายลักษณะการเจริญโดยคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือก จากลักษณะการเจริญและพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้พบว่าอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแอล อินโนคัว เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส โดยเป็นสภาวะที่ค่า  $\mu_{max}$  และความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายสูงที่สุด นอกจากนี้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือก ยังได้เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทีเอสบี มาใช้กับเชื้อ แอล อินโนคัว ด้วย สำหรับการศึกษาผลของสารยับยั้งสำหรับการตรวจพบเชื้อลิสทีเรีย ใช้สารยับยั้งที่แนะนำให้ใช้ในการตรวจเชื้อตามวิธีมาตรฐานทั่วไป ได้แก่ เอ็นจีเอฟ ไอเอส ไอดีเอฟ ยูเอส เอฟดีเอ เอ็นเอ็มเคแอล ไอเอสไอ เอไอเอซี และยูเอสดีเอ-เอฟเอสไอเอส ทำการทดลองโดยเติมสารคัดเลือกสำหรับเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทีเอสบี เพื่อศึกษาการเจริญและการคัดเลือกเชื้อลิสทีเรีย จากกราฟการเจริญของเชื้อ พบว่าคริปลาวิน มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอย่างเห็นได้ชัด และประเด็นที่น่าสนใจคือ เชื้อแอลอินโนคัว สามารถทนต่อคริปลาวิน ได้น้อยกว่าเชื้อสแตปฟีโลค็อกคัส ออเรียส ในทางตรงกันข้าม โพลีมัยซิน บี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวก แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้น้อยกว่า โดยโพลีมัยซิน บี ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดในการศึกษา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ อี โคลไล จาก 6 ลีอก ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ให้ลดลงเหลือน้อยกว่า 2 ลีอก ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ภายในระยะเวลาการบ่ม 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ากรดนาดีคิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น และมีประสิทธิภาพน้อยกว่า โพลีมัยซิน บี ในกรณีของ ลิเธียม คลอไรด์ ถึงแม้จะไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ

ในส่วนของการคัดเลือกเชื้อลิสทีเรียในอาหารแข็ง เพื่อความสะดวกในงานวิจัยได้มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาคร่วมกับการถ่ายภาพแบบดิจิทัลเข้ามาช่วย ด้วยวิธีดังกล่าวทำให้ได้ข้อมูลจำนวนมากและลดปริมาณสารที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อลิสทีเรีย โดยพบว่าการใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นร่วมกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมทำให้สามารถเปรียบเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับค่าแสงให้เหมาะสมจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของภาพถ่ายแบบดิจิทัลได้ สำหรับการศึกษาลักษณะการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxoid Chromogenic *Listeria* agar (OCLA) โดยใช้แรงเสียดทานสูงร่วมกับการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้ไมโครเวฟพบว่ากลุ่มเชื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น จากผลการวิเคราะห์พบว่า แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดลอจิสติกสามารถใช้แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของกลุ่มเชื้อลิสทีเรียอิวานอวิและลิสทีเรียอินโนคัวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ อ็อกซฟอร์ด พาลคาม และ โอซีแอลเอได้ดี อย่างไรก็ตามจลนพลศาสตร์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยเชื้อลิสทีเรียอิวานอวิสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะได้น้อยกว่าเชื้อลิสทีเรียอินโนคัว จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 2.00 เท่า พบว่าการลดปริมาณสารยับยั้งช่วยให้การเจริญเติบโตของกลุ่มเชื้อลิสทีเรียดีขึ้นอีกทั้งช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ลงได้ นอกจากนี้การแทนที่ชุดสารยับยั้งเดิมด้วยชุดสารยับยั้งของอาหารอ็อกซฟอร์ดแสดงให้เห็นว่า การแทนที่ด้วยชุดสารยับยั้งของอาหารอ็อกซฟอร์ดที่เหมาะสมสามารถเพิ่มความเร็วในการขยายขนาดของกลุ่มเชื้อลิสทีเรียอินโนคัวได้

**คำสำคัญ:** การคัดเลือกเชื้อลิสทีเรีย/ การเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือก/ การศึกษาจลนพลศาสตร์/ ลิสทีเรียอินโนคัว/ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด/ ขนาดกลุ่มตัวอย่าง/ จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต/ การวิเคราะห์ภาพถ่าย/ เชื้อลิสทีเรีย/ การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งจำเพาะ

## Abstract

*Listeria innocua* growth and selectivity during non-selective enrichment and selective enrichment steps were studied to formulate fundamental knowledge to enhance *Listeria* spp. detection protocol. *L. innocua* was utilized as a non-pathogenic *Listeria* model because it shares similar physiological traits with *Listeria monocytogenes*. The growth of *L. innocua* was compared on three conventional non-selective media. (i.e., NB, LB, and TSB) and three *Listeria* enrichment broth bases from which selective agents were intentionally removed (i.e., BLEB, FB, and PB). The incubation conditions were varied at different temperatures (i.e., 30, 35, 37, and 40°C). Sigmoidal-type mathematical model was applied to capture the growth characteristics during batch cultivation and to extract key kinetic parameters (i.e., maximum specific growth rate;  $\mu_{\max}$ ) used to investigate the optimum non-selective enrichment protocol. The growth characteristics and the estimated kinetic parameters ( $\mu_{\max}$ ) indicated that the optimal incubation temperature for *L. innocua* growth was 35°C where the growth profile showed the highest  $\mu_{\max}$  and high final cell density. TSB, as an effective non-selective enrichment medium, was selected to multiply *L. innocua* in the non-selective enrichment step. The effects of conventional inhibitors were studied by using common selective inhibitors suggested in most global microbiological detection standards (i.e., NGFIS, IDF, USFDA, NMKL, ISO, AOAC, and USDA-FSIS). The TSB broth base was modified by adding selected conventional selective agents to study the growth and selectivity of *Listeria* spp. The growth profiles showed that acriflavine significantly affected the growth of Gram-positive bacteria. Interestingly, *L. innocua* has less resistant to acriflavine than *Staphylococcus aureus*. Polymyxin B inhibited Gram-negative bacteria as well as Gram-positive bacteria but to a lesser extent. As low as 10 mg/L of Polymyxin enabled effective reduction of *E. coli* from 6 to less than 2 log CFU/mL within 2 h of incubation. Nalidixic acid only suppressed Gram-negative bacteria and was not as effective as Polymyxin B. Although lithium chloride did not significantly affect the inhibition of any target microorganisms, it was included in the optimization experiment to find an effective selective enrichment combination. Using the response surface analysis the optimum selective composition to isolate *E. coli* and *S. aureus* from *L. innocua* includes 5.7 mg/L of acriflavine, 10.0 mg/L of Polymyxin B and 20.7 g/L of lithium chloride. This new media formula was proved to isolate *E. coli* and *S. aureus* from *L. innocua*. For convenience in the selective agar, this study was facilitated by the use of micro-inoculation

technology in combination with the application of digital image acquisition. The scheme allowed high throughput and use of miniaturized supplies and reagents for *Listeria* detection. The developed protocol, applied along with an appropriate mathematical model (i.e., logistic expression), was able to contrast a wealth of meaningful kinetic parameters. The study of proper light setting improved the quality of digital image. The Oxoid Chromogenic *Listeria* agar (OCLA) prepared using the alternative high shear mixing and microwave pasteurization protocols resulted in enlargement of the final colony size. The logistic model showed well fit and was able to represent colony growth characteristics of both *L. ivanovii* and *L. innocua* on three common selective agar cultures (i.e., Oxford, PALCAM, and OCLA); however, the kinetics of each strain showed rather differentiable qualities. *L. ivanovii* grew less on the selective agar substrate than *L. innocua*. Variation of the inhibitor concentration from 0.25X to 2.00X strength suggested that the compromise of inhibitory effect was able to effectively promote the growth of *Listeria* colonies and shorten the analytical time. Replacement of the original inhibitory system by the Oxford alternative was demonstrated. A proper use of the Oxford replacement enabled an improvement of the speed of *L. innocua* colony expansion.

**Keywords:** Growth Kinetics/ *Listeria innocua*/ *Listeria* Selectivity/ Maximum Specific Growth Rate/  
Non Selective Enrichment/ Colony Size/ Growth Kinetics/ Image Analysis/ *Listeria*/  
Selective Plating



## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	III
สารบัญเรื่อง	VII
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	8
3 วัตถุประสงค์และการดำเนินงานวิจัย	27
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	38
5 สรุปผลการทดลอง	103
ผลผลิต (output)	107
เอกสารอ้างอิง	108
ประวัติคณะผู้วิจัย	113

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Listeria</i> spp.	10
2.2	การเปรียบเทียบ <i>L. monocytogenes</i> กับแบคทีเรียอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน	11
2.3	รายชื่อของสารเคมียับยั้งที่ใช้ในอาหารแข็งจำเพาะ <i>Listeria</i> spp.	21
2.4	องค์ประกอบของ Peptone	22
3.1	สูตรอาหารไม่จำเพาะ	30
4.1	ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐาน	68
4.2	ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐาน	71
4.3	ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน	75

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีลิสทีเรีย	1
1.2	แหล่งของอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อ <i>Listeria</i> spp. เช่น เนื้อสัตว์ นม โคนม และผลิตภัณฑ์จากนมโค อาหารทะเลและผักบางชนิด	1
1.3	การติดเชื้อ <i>Listeria</i> spp. ทำให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีผลกระทบต่อหญิงมีครรภ์ทำให้เกิดการแท้งและในเด็กที่เกิดใหม่มีอาการระบบหายใจติดขัด หายใจไม่สะดวก หัวใจล้มเหลว ตัวซีด ขาดน้ำ อาเจียน ชักกระตุก	2
1.4	ลักษณะโคโลนีของลิสทีเรียซึ่งมีขนาดเล็ก ยากแก่การตรวจ detect หรือตรวจนับ	5
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.2	Growth Curve	24
3.1	96-deep well	31
3.2	กล้องถ่ายภาพดิจิทัล	33
3.3	กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล	33
4.1	ผลของอุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกันในการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>L. innocua</i> ในอาหารเหลวไม่จำเพาะที่แตกต่างกัน a) nutrient broth (NB), b) Lactose broth (LB) c) Tryptic soy broth (TSB), d) Buffered Listeria Enrichment Broth base (BLEB), e) Fraser broth (FB) และ f) Palcam broth (PB)	40
4.2	ผลของการเจริญเติบโตของ <i>L. innocua</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิการบ่ม a) 30°C b) 35°C c) 37°C d) 40°C	41
4.3	ผลของอาหารเหลวเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะชนิดต่างๆ และอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>L. innocua</i> ที่มีต่อค่า $\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	43
4.4	ผลของอาหารเหลวเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะชนิดต่างๆ และอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>L. innocua</i>	43
4.5	กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ที่มีต่ออคริฟลาวิน; (●) อคริฟลาวิน 5 mg/mL, (●) อคริฟลาวิน 10 mg/mL, (▲) อคริฟลาวิน 20 mg/mL, และ (▲) อคริฟลาวิน 40 mg/mL	45
4.6	กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ (a) <i>L. innocua</i> (b) <i>E. coli</i> และ (c) <i>S. aureus</i> ที่มีต่อ Polymyxin B; (●) Polymyxin B 10 mg/L, (●) Polymyxin B 20 mg/L, (▲) Polymyxin B 50 mg/L และ (▲) Polymyxin B 100 mg/L	48

รูปที่	หน้า
4.7 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ (a) <i>L. innocua</i> , (b) <i>E. coli</i> และ (c) <i>S. aureus</i> ที่มีต่อ nalidixic; (●) nalidixic 10 mg/L, (●) nalidixic 20 mg/L, (▲) nalidixic 50 mg/L และ (▲) acriflavine 100 mg/L	51
4.8 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ (a) <i>L. innocua</i> (b) <i>E. coli</i> and (c) <i>S. aureus</i> ที่มีสารตัวยับยั้งลิเทียมคลอไรด์ (●) ลิเทียมคลอไรด์ 5 g/L, (●) ลิเทียมคลอไรด์ 10 g/L, (▲) ลิเทียมคลอไรด์ 15 g/L และ (▲) ลิเทียมคลอไรด์ 20 g/L	52
4.9 แผ่นแสดงระยะหน่วยมิลลิเมตร	53
4.10 รูปถ่ายโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะใน 24 micro-well plate จากกล้องถ่ายภาพดิจิทัล	54
4.11 รูปถ่ายโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะในจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. จากกล้องถ่ายภาพดิจิทัล	54
4.12 ผลจากการตั้งค่า USB bandwidth ในการถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM	55
4.13 ผลจากการตั้งค่า USB bandwidth ในการถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA	56
4.14 พื้นหลังแบบต่างๆ ที่ใช้ในการถ่ายภาพ	56
4.15 การใช้พื้นหลังแบบต่างๆ ในการถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM	57
4.16 การใช้พื้นหลังแบบต่างๆ ในการถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA	57
4.17 การเปรียบเทียบขนาดโคโลนี (mm <sup>2</sup> ) ของเชื้อ <i>L. innocua</i> ที่เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำเกลือ (■) และ TSB (■) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ก) TSA, (ข) Oxford, (ค) PALCAM, และ (ง) OCLA	59
4.18 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) ระหว่างการใช้น้ำเกลือ (■) และ TSB (■) เป็นสารละลายเจือจางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA, Oxford, PALCAM, และ OCLA ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	59

รูปที่	หน้า
4.19 การเปรียบเทียบขนาดโคโลนี (mm <sup>2</sup> ) ของเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA ซึ่งเตรียมจากวิธีการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (■) และไมโครเวฟ (■)	61
4.20 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA	61
4.21 โคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> ที่ระยะเวลาการบ่ม 84 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สูตรมาตรฐาน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลูกศร OCLA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน	63
4.22 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สูตรมาตรฐานและ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลูกศร OCLA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ	63
4.23 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลูกศร OCLA 100% และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน	64
4.24 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สูตรมาตรฐาน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลูกศร OCLA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน	65
4.25 โคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 40 ถึง 96 ชั่วโมง	66
4.26 โคโลนีเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง	67
4.27 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐาน	68
4.28 โคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 40 ถึง 96 ชั่วโมง	70
4.29 โคโลนีเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง	71

รูปที่	หน้า
4.30 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐาน	71
4.31 โคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิ การบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง	73
4.32 โคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิ การบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง	74
4.33 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน	74
4.34 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน	76
4.35 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>L. ivanovii</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็ง TSA, Oxford, PALCAM, และ OCLA	76
4.36 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. ivanovii</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน	77
4.37 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน	78
4.38 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็ง TSA, Oxford, PALCAM, และ OCLA	79
4.39 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน	80
4.40 โคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง	81
4.41 การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสม สารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ	82
4.42 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสาร	83

รูปที่	หน้า
	คัดเลือกลูกศร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.43	83
	การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกศร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.44	84
	ร้อยละของจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกศร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.45	85
	โคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกศร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง
4.46	85
	การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกศร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.47	86
	การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกศร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
4.48	87
	การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกศร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.49	87
	ร้อยละของจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกศร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
4.50	88
	โคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูกศร OCLA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง
4.51	89
	การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูกศร OCLA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่		หน้า
4.52	การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	90
4.53	การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	90
4.54	ร้อยละของจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	91
4.55	โคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง	92
4.56	การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	92
4.57	การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	93
4.58	การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	94
4.59	ร้อยละของจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	94
4.60	โคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง	95
4.61	การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสม	96



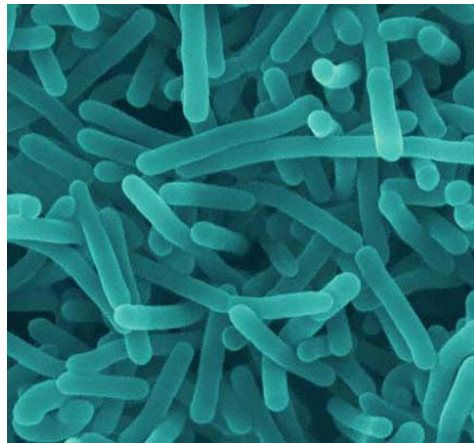
รูปที่	หน้า
	สารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.62	97
	การเปรียบเทียบตัวแปรทางจุลชีวศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.63	97
	การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.64	98
	ร้อยละของจำนวนโคโลนี <i>L. innocua</i> ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.65	100
	การเปรียบเทียบตัวแปรทางจุลชีวศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM และ OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ
4.66	101
	การเปรียบเทียบตัวแปรทางจุลชีวศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี <i>L. innocua</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐานกับสารคัดเลือกสูตรต่างๆ และที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

*Listeria* spp. เป็นเชื้อโรคทางเดินอาหารชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหารที่มักพบในอาหารที่มาจากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ นม โคนผลิตภัณฑ์จากนมโค อาหารทะเลและผักบางชนิด โดยมีผลต่อทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ซึ่งแต่เดิมเชื่อว่าทำให้เกิดโรกับสัตว์ เชื่อกันว่าสามารถแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติอาจจะพบในผักเน่าเปื่อย มูลสัตว์ น้ำเสียและแหล่งน้ำอื่นๆ โดยทั่วไปที่ใดที่พบแบคทีเรียแลคติก ย่อมมีโอกาสพบ *Listeria* spp. ด้วย (Welshimer, 1981) โดยเฉพาะในน้ำนมดิบและหญ้าหมัก *Listeria* spp. เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 0 จนถึง 42°C แต่ช่วงอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 30 – 35°C ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°C การเจริญของเชื้อจะช้ามาก ต้องใช้เวลา 1 – 33 วัน ในระยะ lag phase (สุนทนา, 2545)



รูปที่ 1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนิลิสทีเรีย



**รูปที่ 1.2** แหล่งของอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อ *Listeria* spp. เช่น เนื้อสัตว์ นม โคนและผลิตภัณฑ์จากนม โคน อาหารทะเลและผักบางชนิด

แหล่งที่มา: <http://parasites.czu.cz/food/parasite.php?idParasite=59>

ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนมาในอาหาร การเก็บรักษาในตู้เย็นจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* spp. ได้ โดยสามารถเจริญและสร้างสารพิษประเภท Enterotoxin ที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค Listeriosis จะมีอาการกับระบบอื่นของร่างกายมากกว่าระบบทางเดินอาหาร ลักษณะของอาการแตกต่างกันตามสถานะของผู้ติดเชื้อ เช่น โลหิตเป็นพิษ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ฝีเย็บ สตรีชะ ปวดศีรษะ เป็นไข้และอาเจียน ทำให้เกิดการแท้งในหญิงมีครรภ์และในเด็กที่เกิดใหม่มีอาการระบบหายใจติดขัด หายใจไม่สะดวก หัวใจล้มเหลว ตัวช็อค ขาดน้ำ อาเจียน ชักกระตุก นอกจากนี้เชืื่อนี้ทำให้เกิดโรคลำไส้หลายชนิด รวมทั้งเป็ด ไก่ ปลา และสัตว์ทะเล (McLauchlin, 1987) ปี ค.ศ. 1926 ในประเทศอังกฤษพบครั้งแรกในกระต่ายและในปี ค.ศ. 1929 มีรายงานการระบาดครั้งแรกในมนุษย์ที่ประเทศอังกฤษและประเทศฝรั่งเศส นับจากนั้นเชื้อมีแพร่กระจายไปทั่วโลก *Listeria* spp. ร้อยละ 98 ก่อให้เกิดโรคลำไส้และร้อยละ 85 เกิดกับสัตว์ (McLauchlin, 1987)



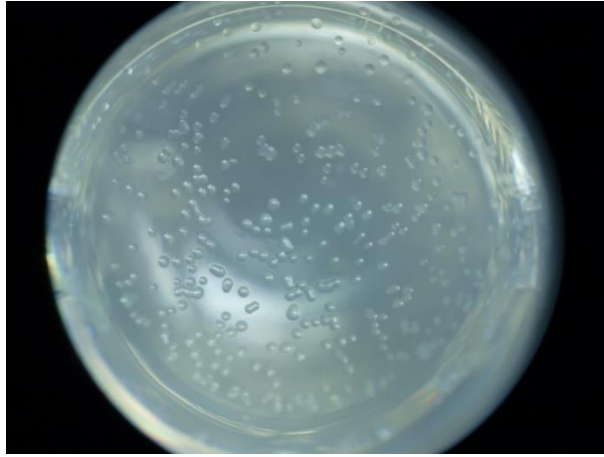
**รูปที่ 1.3** การติดเชื้อ *Listeria* spp. ทำให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีผลกระทบต่อหญิงมีครรภ์ทำให้เกิดการแท้งและในเด็กที่เกิดใหม่มีอาการระบบหายใจติดขัด หายใจไม่สะดวก หัวใจล้มเหลว ตัวช็อค ขาดน้ำ อาเจียน ชักกระตุก

สำหรับในประเทศไทย องค์การอาหารและยา (U.S. Food and Drug Administration, USFDA) ได้สั่งจดหมายเตือนโดยมีการแจ้งข่าวว่าได้ทำการเรียกคืนสินค้าของบริษัท Bidart Bros ซึ่งเป็นแอปเปิ้ลพันธุ์กาล่า ภายใต้เครื่องหมายการค้า “Big B” และแอปเปิ้ลพันธุ์แกรนนี่สมิธ ภายใต้เครื่องหมายการค้า

“Granny’s Best” จากการจำหน่ายในตลาดสหรัฐฯ เนื่องจากสินค้าทั้ง 2 รายการมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาดของโรค Listeriosis การใช้หรือสัมผัสกับสินค้าดังกล่าวอาจเกิดผลกระทบร้ายแรงต่อสุขภาพหรืออันตรายถึงขั้นเสียชีวิตได้ เพื่อเป็นการเตรียมตัวรับมือกับโรคนี้ในด้านการป้องกันและวินิจฉัยถึงสาเหตุของโรคอย่างถูกต้องรวดเร็ว

ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญมากในการตรวจสอบและป้องกันปัญหาดังกล่าวก็คือ การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria spp.* ในอาหารอย่างรวดเร็วและแม่นยำก่อนอาหารจะถูกส่งไปยังผู้บริโภคเป็นวิธีการป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของลิสทีเรียได้ดีที่สุด ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามในการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจสอบลิสทีเรียในตัวอย่างอาหารให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งในปัจจุบันจะมีวิธีทดสอบที่รวดเร็ว (rapid test) สำหรับแบคทีเรียลิสทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารหลายวิธี อย่างไรก็ตามแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีแบคทีเรียลิสทีเรียความเข้มข้น  $10^4 - 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก นอกจากนี้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียลิสทีเรียซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียลิสทีเรียที่เคยมีรายงานมาจะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้นและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากชุดทดสอบนี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง โดย 1 ชุด สามารถวิเคราะห์ได้ 20 ตัวอย่าง ราคาประมาณ 10,000 บาท (ตัวอย่างละ 500) เป็นต้น ซึ่งชุดตรวจสอบ 1 ชุด จะสามารถตรวจสอบเชื้อได้ชนิดเดียว หากต้องการตรวจสอบเชื้อชนิดอื่นจะต้องซื้อชุดตรวจสอบสำหรับเชื้อนั้น ๆ ใหม่ ในขณะที่วิธีการตรวจสอบลิสทีเรียในตัวอย่างอาหารที่อาศัยหลักการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture-based method) จัดว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและได้รับการรับรองจากหน่วยงานอาหารสากลต่างๆ อาทิเช่น องค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International standard organization, ISO) องค์กรอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US.FDA), กระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (US.DA) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น ยังมีข้อเสียคือใช้เวลาในการอ่านผลเบื้องต้นนานถึง 3 วัน ทำให้ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจสอบอาหารที่มีอายุการเก็บรักษาสั้น (Mcpherson et. al., 1991) หรืออาหารที่ต้องการทราบผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว นอกจากนี้ด้วยความที่มีความหลากหลายของวิธีการวิเคราะห์ทำให้การเลือกใช้ protocol ที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของผลวิเคราะห์ที่ได้ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาขั้นตอนในการวิเคราะห์เชื้อลิสทีเรีย ประกอบไปด้วย การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ จากนั้นในขั้นตอนที่สอง นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะซึ่งมีสารยับยั้งหรือลดจำนวนจุลินทรีย์

อื่นๆ ที่ไม่ใช่ลิสทีเรีย แต่ในขณะเดียวกันก็เพิ่มจำนวนลิสทีเรีย และในขั้นตอนที่สามคือ นำไปคัดแยกบนอาหารแข็งจำเพาะโดยโคโลนิของลิสทีเรียจะให้สีจำเพาะแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น จาก protocol วิธีการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 ขั้นตอนมีความสำคัญเป็นอย่างมากที่มีผลต่อผลวิเคราะห์ที่ได้ แต่เมื่อพิจารณา protocol การวิเคราะห์ *Listeria* spp. จากหน่วยงานอาหารสากลต่างๆ พบว่ามีความหลากหลายในการใช้ media ดังนั้นเพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกันและเป็น protocol ที่เหมาะสมช่วยแก้ปัญหาการวิเคราะห์ดังกล่าวเบื้องต้น ผู้วิจัยจึงได้บูรณาการภาพรวมของชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็วโดยให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำเมื่อเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน โดยกรอบของแนวทางการศึกษาจะเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวไม่จำเพาะ (Pre-enrichment หรือ non-selective enrichment) เพื่อเพิ่มจำนวนลิสทีเรียทั้งที่ได้รับบาดเจ็บและไม่บาดเจ็บ เนื่องจากในธรรมชาติสามารถพบลิสทีเรียปนเปื้อนอยู่ในปริมาณน้อยมาก อีกทั้งอาจเกิดการบาดเจ็บจากการผ่านกระบวนการการผลิต ดังนั้นขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะจะสามารถเพิ่มโอกาสในการตรวจพบในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจะทำให้ลดความผิดพลาดจากการอ่านผลการวิเคราะห์เป็นผลลบต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนของลิสทีเรียอยู่ (False-negative results) ซึ่งจะเกิดผลเสียเป็นอย่างมาก (Baylis et. al., 2000) ในปัจจุบันอาหารเหลวไม่จำเพาะมาตรฐานสำหรับเพิ่มจำนวนลิสทีเรียที่ได้รับการรับรองจากหน่วยงานอาหารสากลต่างๆ มีหลากหลายชนิด เช่น อาหาร Nutrient broth (NB), Lactose broth (LB), Trypticase soy broth (TSB) เป็นต้น ซึ่งเลือกใช้ตามชนิดของตัวอย่างอาหารและสายพันธุ์ลิสทีเรียที่ปนเปื้อน ในขณะที่ขั้นตอนที่สอง โดยปัจจุบันอาหารเหลวจำเพาะในขั้นตอนนี้ มีประสิทธิภาพและความแม่นยำแตกต่างกันเนื่องจากมีความหลากหลายในการใช้ selective agents (i.e., อคริฟลาวิน, โพลีมัยซิน บี, นาลิซิดิก, ลิเรียมคลอไรด์) ซึ่งถ้าเลือกชนิดของอาหารเหลวจำเพาะ (selective broth) ที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้ได้ผลผิดพลาดได้เนื่องจากผลของเชื้อแข่งขัน หลังจากใช้อาหารคัดเลือกจำเพาะดังกล่าวแล้วการอ่านผลการทดสอบยังคงต้องนำไปคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ เช่น Oxford, PALCAM, และ OCLA agar และใช้เวลาอ่านผลเป็นเวลาเพิ่มเติมอีก 1 วัน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาลักษณะโคโลนิบนอาหารสูตรจำเพาะต่างๆ พบว่า โคโลนิที่ได้มีขนาดเล็กยากแก่การบ่งชี้หรือตรวจนับ (รูปที่ 1.4)



รูปที่ 1.4 ลักษณะ โคลโลนีของลิสทีเรียซึ่งมีขนาดเล็ก ขากแก่การตรวจ detect หรือตรวจนับ

ดังนั้นการใช้เครื่องมือในการตรวจติดตามโคลโลนีลิสทีเรียและการเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญที่มีผลต่อการบ่งชี้และคัดแยกโคลโลนีที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้เลย ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าด้วยข้อจำกัดที่เกิดขึ้นในวิธีการวิเคราะห์จะส่งผลกระทบต่อความแม่นยำและความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Listeria spp.* ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการระบาดของ การติดเชื้อและส่งผลกระทบต่อภาพรวมของเศรษฐกิจที่มีการตีกลับของสินค้าเนื่องจากการตรวจพบเชื้อที่ปลายทางของผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวและอาหารแข็งจำเพาะที่มีประสิทธิภาพร่วมกับการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแข่งขัน เพื่อเพิ่มความจำเพาะของอาหารต่อการตรวจสอบ ลิสทีเรียและนำเสนอ protocol ของการตรวจติดตามการเจริญเติบโตของโคลโลนีด้วยกล้องจุลทรรศน์แมชชีนวิชันกำลังขยายสูงในขั้นตอนการคัดแยกบนอาหารแข็งจำเพาะ ซึ่งนวัตกรรมดังกล่าวจะเป็นนวัตกรรมใหม่ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ สามารถใช้งานได้สะดวก รวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำสูง ลดการนำเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อและชุดตรวจสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการบูรณาการปัจจัยภาพรวมที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวและอาหารแข็งจำเพาะที่สามารถบ่งชี้การปนเปื้อนของลิสทีเรีย ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ รวมทั้งมีประสิทธิภาพใกล้เคียง เท่ากับหรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน (conventional method) หรือวิธีการที่รวดเร็วซึ่งอาศัยหลักการอื่น นับเป็นวิธีการที่จะปฏิรูปการวิเคราะห์ *Listeria spp.* ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคได้เป็นอย่างดี ความสำเร็จที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Frozen ready-to-eat products) โรงงานไก่แปรรูป (Chicken Further Factory) และอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากนม ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาก่อนส่งจำหน่าย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ที่ละหลายตัวอย่างใน

เวลาเดียวกัน สุดท้ายคือความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มศักยภาพในการประกันความปลอดภัยของอาหารส่งออก

## 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและนำเสนอทางเลือกสูตรอาหารเหลวไม่จำเพาะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มจำนวนลิสทีเรีย
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลิสทีเรีย สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment)
- 1.2.3 ปรับปรุงวิธีการและเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดแยกและตรวจสอบเชื้อลิสทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
- 1.2.4 เพื่อให้ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อลิสทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งง่ายขึ้นและหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะเพื่อการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว
- 1.2.5 เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น
- 1.2.6 เพื่อพัฒนาวิธีการที่มีความรวดเร็วและถูกต้องในการตรวจสอบกลุ่มเชื้อลิสทีเรียโดยใช้หลักการวิเคราะห์และเพาะเชื้อระดับจุลภาคที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตรวจนับการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและต้นทุนต่ำ
- 1.2.7 เพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทยมาประยุกต์ใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายทั้งในประเทศและส่งออกต่างประเทศ
- 1.2.8 ผลวิจัยที่ได้สามารถนำมาเป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับการประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อลิสทีเรียในอาหารเหลวไม่จำเพาะมาตรฐานชนิดต่างๆ
- 1.3.2 ศึกษาผลของชนิดสารยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันของเชื้อลิสทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารคัดเลือกจำเพาะ เพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เหมาะสม ที่สามารถจำแนกเชื้อลิสทีเรียและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ได้ โดยอาศัยการตรวจนับจำนวน โคโลนี

- 1.3.3 ตรวจสอบจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและปัจจัยเฉพาะในสภาพแวดล้อมของการเพาะเชื้อระดับจุลภาค เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและประสิทธิภาพในขั้นตอนการคัดแยกเชื้อจำเพาะของลิสทีเรีย
- 1.3.4 ศึกษาเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายขนาดของกลุ่มเชื้อในการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง และเพิ่มความเร็ว และความจำเพาะของเชื้อลิสทีเรียในการเพาะเลี้ยงเชื้อบนวุ้น
- 1.3.5 พัฒนาวิธีการและเสนอแบบแผนที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อลิสทีเรียในตัวอย่างอาหาร โดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเชื้อระดับจุลภาคและสอบเทียบกับกรรมวิธีปกติ
- 1.3.6 นำเสนอรูปแบบวิธีการวิเคราะห์เชื้อลิสทีเรีย (protocol) ตั้งแต่ต้นกระบวนการน้ำ เพื่อให้เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ครอบคลุมทั้งกระบวนการผลิต เพื่อลด โอกาสการปนเปื้อนของเชื้อลิสทีเรีย



## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

#### 2.1 *Listeria monocytogenes*

##### 2.1.1 ประวัติความเป็นมา

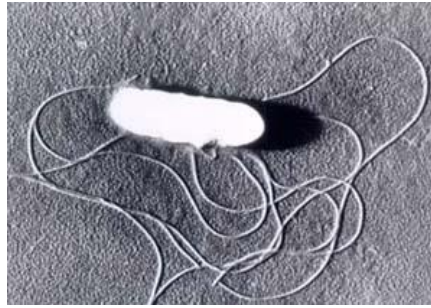
ในปี ค.ศ.1891 พบการติดเชื้อแบบ Listeriosis type Infection ทำให้เกิดโรค Listeric-like disease ต่อมาในปี ค.ศ. 1911 Hulphers นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ได้แยกเชื้อจาก Necrotic Foci ของตับกระต่าย เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง ประกอบกับอาการของโรคพบว่าเป็นแบคทีเรียและตั้งชื่อให้ว่า *Bacillus hepatic* (ต่อมาพบว่ามิลักษณะใกล้เคียงกับ *L. monocytogenes*) ในปี ค.ศ. 1915 และ 1919 Atkinson และ Dick ได้รายงานว่าแยกเชื้อ *L. monocytogenes* จากผู้ป่วยโรค Meningitis และต่อมาในปี ค.ศ.1918 Dumont และ Contini แยกเชื้อ Diphtheroid จาก Cerebrospinal fluid และต่อมาได้มอบเชื้อให้กับ Pasteur Institute ในกรุงปารีส ซึ่งภายหลัง Paterson ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่าเป็น *L. monocytogenes* ต่อมาในปี ค.ศ. 1924 Murray และคณะ แยกแบคทีเรียดิสแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น ขนาดเล็ก จากโรคเลือดเป็นพิษของกระต่ายและหนูตะเภาที่ติดเชื้อ ได้ทำการตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacterium monocytogenes* (Murray et al., 1926) และปี ค.ศ.1927 Pirie สามารถแยกเชื้อได้จากตับของตัว Gerbilles (African jumping mouse) จึงได้ชื่อว่า *Listerella hepatolytica* หลังจากที่ได้ทำการศึกษาพบว่า *Bacterium monocytogenes* และ *Listeria hepatolytica* เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันจึงตั้งชื่อใหม่ว่า *Listerella monocytogenes* และใช้ชื่อนี้มาเป็นระยะเวลา 12 ปี จนในปี ค.ศ.1939 มีผู้ค้นพบว่า *Listerella* เป็นชื่อกลุ่มของ Slime molds ก่อนแล้ว ดังนั้นในปี ค.ศ.1940 Pirie ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Listeria monocytogenes* และใช้ชื่อนี้จนถึงปัจจุบัน โดยเริ่มใช้อย่างเป็นทางการใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (6<sup>th</sup> ed., 1948) และมีการยอมรับจาก Judicial Commission on Bacteriological Nomenclature Taxonomy ในปี ค.ศ.1954

##### 2.1.2 ลักษณะรูปร่างของเซลล์และโคโลนี

*L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียดิสแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีขนาดเล็ก โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.5 ไมครอน และยาวประมาณ 0.5-2.0 ไมครอน รูปร่างท่อนสั้นหรืออาจมีรูปร่างกลม โดยมีปลายกลมมนดังรูปที่ 2.1 การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ รูปลูกบาศก์หรือเป็นสายสั้นๆ เรียงเป็นรูปตัว V หรือ ตัว Y หรืออาจพบเป็นกลุ่มก้อนโดยเซลล์เรียงแผ่ขนานกันอยู่ก็ได้ เซลล์ที่มีอายุน้อยอาจมีรูปร่าง Diplococci หรือ Cocci เซลล์ที่มีอายุมาก (มากกว่า)24 ชั่วโมงอาจติด (สี

แกรม variable และอาจเห็นเซลล์เป็นเส้นยาว )Filamentous) ถ้าเลี้ยงเซลล์นานเกิน 3-5 วัน อาจพบเซลล์ ยาวขนาด 6-20 ไมครอน (Seeliger และ Jones, 1986)

*Listeria* spp. เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe หรือ Microaerophile เคลื่อนไหวได้โดยใช้ Peritrichous flagella ที่มีอยู่รอบเซลล์โบกพัดให้เซลล์กลิ้ง หรือเคลื่อนตัวกลับไปกลับมาได้ ที่อุณหภูมิ 20-25 °C ในอาหารเหลว เช่น Trypticase soy broth เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่โดย stab ลง Semisolid motility medium แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20-25 °C จะเห็นการเคลื่อนที่แบบร่ม (Umbrella-like) โดยเห็นเป็นรัศมีแผ่ออก รอบๆ รอย stab คล้ายร่มกาง ซึ่งจะอยู่ต่ำกว่าผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แต่ที่อุณหภูมิ 37 °C การพัฒนา flagella ไม่ค่อยดี มีการเปลี่ยนจาก Peritrichous มาเป็น Single flagella หรือที่อุณหภูมิสูงไปจะทำลาย flagella ให้มีปริมาณน้อยลง ทำให้ไม่เห็นการเคลื่อนที่อย่างชัดเจน ลักษณะโคโลนีของเชื้อบน Nutrient agar เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีมีขนาดเล็กมาก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-1.5 มิลลิเมตร ลักษณะกลมใสคล้ายหยดน้ำ โคโลนีโค้งมนเล็กน้อย มีขอบเรียบ เนื้อบนผิวโคโลนีละเอียดและไม่แห้ง มีสีฟ้าอมเทา โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้นถ้าเลี้ยงใน Trypticase soy agar ที่เติม 0.6% Yeast extract เมื่อส่องดูโคโลนีผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีของ Henry's illumination technique จะเห็นสีฟ้าอมเขียว มีผิวหน้าเรียบละเอียด Henry ได้ใช้วิธีนี้ช่วยแยกโคโลนีของ *Listeria* spp. ออกจากแบคทีเรียอื่นๆ โคโลนีของเชื้อที่มีอายุมากกว่า 3 วัน จะเหนียว ขอบไม่เรียบ และตรงกลางโคโลนีจะบวมลงไป เมื่อเชื้อมีอายุ 5-10 วัน โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ 3-5 มิลลิเมตร ถ้าทำการถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง ลักษณะโคโลนีอาจเปลี่ยนไป เช่น ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าหยาบ และอาจสูญเสียคุณสมบัติที่ก่อให้เกิดโรคไปด้วย ใน 5% Sheep blood agar หลังจากเช็ยเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-1.5 มิลลิเมตร และมีโซนใสแคบๆของ  $\beta$ -hemolysis ล้อมรอบโซนนี้อาจเกิดขึ้นน้อยมากจนต้องเช็ยโคโลนีขึ้นก่อนจึงสังเกตเห็น ถ้ายังบ่มไว้หลายวันเท่าใดก็ยิ่งเห็นโซนใสชัดขึ้นเท่านั้น ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เช่น Nutrient broth หรือ Tryptose broth จะเห็นอาหารขุ่นชัดเจนหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญในบริเวณที่ต่ำกว่าผิวหน้าของอาหารลงมาเล็กน้อย เป็นการแสดงให้เห็นว่า *Listeria* spp. เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำกว่าในสภาพบรรยากาศทั่วไป การเจริญจะดียิ่งขึ้นเมื่อเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป ในอาหารหรือนำเชื้อไปบ่มที่ Modified atmosphere อย่างไรก็ตามเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในสภาพไร้ออกซิเจนอย่างสมบูรณ์



รูปที่ 2.1 *Listeria monocytogenes*

### 2.1.3 การจัดจำแนกและลักษณะทางชีวเคมีที่สำคัญ

คุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้จำแนก *L. monocytogenes* ออกจากสปีชีส์ อื่นๆ ของ *Listeria* spp. แสดงในตารางที่ 2.1 และลักษณะเด่นที่ใช้จำแนก *L. monocytogenes* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Listeria* spp.

<i>Listeria</i> spp.	$\beta$ -hemolysis	Acid production			CAMP reaction		Virulence
		Mannitol	Rhamnose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	±	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	-	+	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	±	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	+	-	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* (online), 2011

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบ *L. monocytogenes* กับแบคทีเรียอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน

Organisms	Characteristics						
	Cell morpho.	Oxygen required	Motil. 22°C	Hemo. Prod.	Cata. lase	Sali. ferm.	Treh. ferm.
<i>L. monocytogenes</i>	coccoid short rod short chain filament	Facult.	+	beta	+	+	+
<i>Erysipelothrix</i>	slender rod filament	Facult.	-	alpha	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	straight rod	Facult.	-	alpha	-	-/+	
<i>Corynebacterium</i>	pleomorp.	Facult.	-	-/+	-/+	-	-/+
<i>Kurthia</i>	rod cocci	Aerobe	+	-	+	-	-
<i>Streptococcus</i>	cocci	Facult.	-	-/+	-	+	-/+
<i>Brochothix</i>	slender rod filament	Facult.	-	-	+	+	+
<i>Caryphanon</i>	rod	Aerobe	+		+		
<i>Renibacterium</i>	short rod	Aerobe	-		+		

หมายเหตุ : Motil. = Motility, Hemo. = Hemolysis, Cata.Prod. = Catalase production,

Sali. Ferm. = Salicin fermentation, Treh. Ferm. = Trehalose fermentation,

Pleomorp. = Pleomorphic, Facult. = Facultative

+ = Positive, - = Negative

ที่มา : Seeliger และ Jones (1986)

#### 2.1.4 การทดสอบทางซีโรวิทยา (Serology)

การทดสอบทางซีโรวิทยา (Serology) จำแนก *Listeria* spp. ออกเป็น 7 สายพันธุ์และเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า *L. monocytogenes* เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็น

Invasive intracellular pathogen แม้ว่า *Listeria* spp. ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* เคยเกี่ยวข้องกับทำให้เกิดโรค Listeriosis ในคนด้วยก็ตาม แต่โอกาสเกิดน้อยกว่า *Listeria monocytogenes* ลักษณะการเกิดพิษของ *Listeria* spp. ยังไม่เป็นที่แน่ชัด เพราะข้อมูลได้มาจากการศึกษาในหนูทดลองและไม่แน่ว่าจะเกิดขึ้นกับมนุษย์ในลักษณะเดียวกันด้วยหรือไม่ การเกิดพิษของ *Listeria* spp. ในคนเชื่อว่าแบคทีเรียผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารโดยผ่านทางลำไส้เล็ก เมื่อไปถึงตับและม้ามจะถูกจำกัดโดยเซลล์คุ้มกันร่างกายคือ Phagocytic cell ได้แก่ Macrophages และ Monocytes ภายในเวลาเพียง 10 นาที โดย Phagocytic cell จะสร้าง Superoxide anion ( $O_2^-$ ) และ Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) เพื่อทำลายแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียจับสารบางชนิดที่เป็นโปรตีน เช่น Superoxide dismutase และ Catalase เอนไซม์ดังกล่าวนี้จะกลับไปทำลาย  $O_2^-$  และ  $H_2O_2$  มีสมบัติป้องกันจากการทำลายของเม็ดเลือดขาว โดยอาศัยกลไกช่วยหลีกเลี่ยงจากสารพิษ คือ  $\beta$ -Haemolysin ที่เรียกว่า Listeriolysin O เรียกย่อๆว่า LLO ทำให้แบคทีเรียเข้ามาอยู่ในแวกิวโอล แต่การที่แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนขึ้นภายในเซลล์ของเจ้าบ้านได้นั้นแบคทีเรียต้องออกจากแวกิวโอล เพราะเม็ดเลือดขาวจะกำจัดจำนวนแวกิวโอลโดยการกินแบบ Phagocytosis แบคทีเรียที่ออกมาจากแวกิวโอลจะเข้าไปในส่วนอื่นๆ ของเซลล์และสามารถเดินทางจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ พร้อมกับทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองเข้าทำลายมดลูก ต่อม้ำเหลือง ทารกในครรภ์ และก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต จึงเป็นผลให้มีอัตราการตายสูง จากการศึกษาคาดว่าพลาสมิด (Plasmid) อย่างน้อย 4 ชนิดในแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียมีความรุนแรงและมีความสามารถต้านทานต่อภาวะที่ไม่เหมาะสม ทำให้อยู่รอดได้ในธรรมชาติได้ดี *Listeria* spp. ทุกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคมีความสามารถในการผลิต Listeriolysin O ซึ่งเป็นสาร โพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 58-60 กิโลดาลตัน และมีคุณสมบัติทำลายเม็ดเลือด

### 2.1.5 แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

*Listeria* แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ อาจพบในผักเน่าเปื่อย ดิน มูลสัตว์ น้ำเสีย หญ้าหมัก และแหล่งน้ำ โดยทั่วไปที่ใดก็พบตามแบคทีเรียแลคติก ย่อมมีโอกาสพบ *Listeria* ด้วย โดยเฉพาะในน้ำนมดิบ และหญ้าหมัก รวมทั้งอุจจาระโค มีรายงานว่า *L. monocytogenes* รอดชีวิตอยู่ในดินขึ้นถึง 295 วันหรือนานกว่า (Welshimer, 1960)

โรคลิสเตอริโอซิส (Listeriosis) ที่เกิดกับคนแพร่มาทั้งกับอาหาร ทั้งอาหารสดที่ได้จากพืชและสัตว์ เพราะ *L. monocytogenes* กระจายในสิ่งแวดล้อม ในอาหารพบมากในน้ำนมดิบ เนยแข็งแบบนุ่ม (soft cheese) เนื้อ

สดและเนื้อแช่แข็ง ผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ การที่เชื้อนี้อยู่ในนมและผลิตภัณฑ์นม ทำให้เป็นที่สนใจกันมาก เพราะนมเป็นอาหารหลักอย่างหนึ่งของมนุษย์ แบคทีเรียจึงมีโอกาสมากที่จะแพร่มาที่นมและติดต่อไปยังมนุษย์ ในปี ค.ศ.1983 ได้เกิดระบาดขึ้นกับนมพาสเจอร์ไรซ์ ในมลรัฐแมสซาชูเซตส์ของสหรัฐฯ ทำให้ผู้ใหญ่ 42 คน และหญิงมีครรภ์ 7 คนล้มป่วยลง เป็นผลให้มีอัตราการตายร้อยละ 29 จากการทวนสอบหาสาเหตุ ปรากฏว่าในระหว่างที่เกิดการระบาดขึ้นกับนมพาสเจอร์ไรซ์นั้น ได้เกิดโรค listeria โอลิซิสขึ้นกับวัวในฟาร์มอันเป็นแหล่งที่มาของน้ำนมดิบ วิธีการพาสเจอร์ไรซ์น้ำนมไม่มีสัญญาณใดบ่งบอกว่าน้ำนมผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ไม่ถูกต้อง ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะศึกษาทบทวนค่า D-value ที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรซ์น้ำนมกันใหม่ (Bradshaw et. al., 1985; Faber et. al., 1991; Lovet et. al., 1990) แมคเคย์และแบรทเชลล์สรุปว่าวิธีการพาสเจอร์ไรซ์แบบปกติสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ได้ แต่เพื่อความมั่นใจในความปลอดภัยควรให้ความร้อนเกินกว่าปกติเล็กน้อย เพื่อเป็นหลักประกันความปลอดภัย (margin of safety) ส่วนการพาสเจอร์ไรซ์น้ำนมที่บรรจุมาในถังขนาดใหญ่ (vat protocol) โดยการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT (Long Time Low Temperature) นั้นจำเป็นจะต้องเผื่อไว้ให้มากกว่าการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST (High Temperature Short Time) จากการคำนวณค่า D ปรากฏว่าการพาสเจอร์ไรซ์แบบบรรจุถังต้องใช้ 39D ในขณะที่การพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ใช้เพียง 5.2 D เท่านั้น (Mackey และ Bratchell, 1989) แคมเพลมัคเคอร์ และ แวน นูเบิล แจนเซน พบว่า ปกติอุจจาระโคในเนเธอร์แลนด์จะมีเชื้อ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนราวร้อยละ 10 ส่วนอุจจาระของผู้ทำงานในโรงฆ่าวัวในประเทศเดนมาร์คจะมีเชื้อ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนราวร้อยละ 5 (Kampelmacher และ Van Nooble Jansen, 1969) เขาจึงสรุปว่าคนและสัตว์มีโอกาสสูงที่จะเป็นพาหะของเชื้อ *L. monocytogenes*

### 2.1.5 การเจริญเติบโต

*L. monocytogenes* เจริญในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 0 จนถึง 42 °C แต่ช่วงอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 30 – 35 °C ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C การเจริญของเชื้อนี้จะช้ามาก ต้องใช้เวลา 1 – 33 วันในระยะ lag phase และมีบันทึกว่าแบคทีเรียใช้เวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (generation times) ตั้งแต่ 13 ถึงมากกว่า 130 ชั่วโมง *L. monocytogenes* สายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเคยพบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดขึ้นจากนมพาสเจอร์ไรซ์ ตามปกติ *Listeria* ทุกสปีชีส์ถูกยับยั้งที่ pH 5.5 อย่างไรก็ตาม pH ต่ำสุดที่แบคทีเรียเจริญได้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วมอื่นๆ ด้วย อาทิ

- ชนิดของกรดที่ใช้ปรับ pH (แบคทีเรียนี้ไวต่อกรดน้ำส้มและกรดแลคติกมากกว่ากรดเกลือ)
- การมี/ไม่มีเกลือแกงในอาหาร (ถ้าหากมีเกลือแกงอยู่ด้วยที่ pH และอุณหภูมิเดียวกัน แบคทีเรียจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตมากขึ้น สำหรับ *L. monocytogenes* ทนต่อแรงดันออสโมติก เช่น ทนต่อ

สภาวะที่มีเกลือแกงร้อยละ 10 และมีรายงานว่าแบคทีเรียนี้รอดชีวิตในอาหารที่มีเกลือแกงร้อยละ 16 ที่ pH 6.0)

- *L. monocytogenes* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำดังได้กล่าวมาแล้ว
- $a_w$  ต่ำสุดที่แบคทีเรียเจริญได้ขึ้นกับชนิดของสารชีวเมคแทนท์ที่ใช้ปรับ  $a_w$  เช่น ถ้าใช้กลีเซอรอลปรับค่า  $a_w$  ต่ำสุดอยู่ที่ 0.90 แต่ถ้าใช้น้ำตาลซูโครสหรือเกลือแกงปรับค่า  $a_w$  ต่ำสุดอยู่ที่ 0.93 และ 0.92 ตามลำดับ

กล่าวโดยสรุป *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี  $a_w$  ต่ำสุดเป็นสองรองจาก *S. aureus* ( $a_w$  ต่ำสุดของ *S. aureus* ประมาณ 0.85 ส่วนของ *L. monocytogenes* ประมาณ 0.93) *L. monocytogenes* ต้องการสารอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อนเหมือนกับแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหลาย และมีรายงานว่า *L. monocytogenes* ต้องการวิตามินอย่างน้อย 4 ชนิด คือ ไบโอติน ไรโบฟลาวิน ไธโอมีน และกรดไธออคติก (thiotic acid) ส่วนกรดอะมิโนที่แบคทีเรียต้องการ ได้แก่ ซีสตีอีน กลูตามีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และวาเลีน

### 2.1.7 อาการของโรค

ความรุนแรงของโรคขึ้นกับพยาธิสภาพของผู้ได้รับเชื้อ ผู้ที่ไวต่อเชื้อหรือกลุ่มเสี่ยงมักมีอัตราการตายสูง ได้แก่ หญิงมีครรภ์ ผู้ที่เป็นเนื้องอก ผู้เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง เบาหวาน (โดยเฉพาะ type I) ผู้เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Acquired Immunodeficiency syndrome – AIDS) ผู้เป็นโรคหัวใจ โรคไต และผู้ที่อยู่ระหว่างการบำบัดรักษาด้วยฮอร์โมนประเภทที่มีสเตอรอยด์ เป็นต้น บุคคลในกลุ่มเหล่านี้หากได้รับเชื้อ มักเริ่มด้วยอาการของเยื่อหุ้มสมองอักเสบและติดเชื้อ จากผู้ป่วย 641 ราย ปรากฏว่าร้อยละ 73 มีอาการของเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบ ในผู้ใหญ่มักมีอาการต่อมมดลูกอักเสบ ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ และมีการทำลายของเม็ดเลือดขาว ส่วนหญิงมีครรภ์มักแท้งบุตร หรือบุตรตายในท้องหรือตายตอนเกิด ทั้งนี้แม้อาจไม่แสดงอาการของโรคมามาก่อนก็เป็นไปได้ แต่ถ้าแม่เกิดอาการ ก็จะมีอาการคล้ายกับอาการของไข้หวัดใหญ่ ในกรณีของเด็กเกิดใหม่ ถ้าได้รับเชื้อลิสเทอริโอซิสในขณะคลอด มักจะเกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบขึ้น 1-4 สัปดาห์หลังคลอด แม้ว่าจะระยะฟักตัวของเชื้อในผู้ใหญ่ใช้เวลา 1 สัปดาห์ถึงหลายๆ สัปดาห์ก็ตาม การระบาดในบอสตัน มีผู้ป่วยจำนวน 20 ราย เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดขึ้น 18 ราย มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 8 ราย และ 13 รายมีอาการคลื่นไส้ ปวดท้องและท้องเดินอยู่นาน 72 ชั่วโมง ก่อนเกิดอาการอื่นๆ ตามมาอีก การบำบัดรักษาด้วยยาปฏิชีวนะใช้ คูเมอร์มัซซิน ไรแฟมปีซินและแอมพิ

ซัลลิน หรือแอมพิซิลินร่วมกับยาปฏิชีวนะประเภทอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) ซึ่งเอสพาส และเรนาวด์กล่าวว่าเป็นผลดีที่สุด (Espaze และ Reynaud, 1988)

### 2.1.8 ประวัติการระบาด

เนื่องจากเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคกับสัตว์หลายชนิด รวมทั้งเป็ด ไก่ ปลา หมัด และสัตว์ทะเลจำพวกครัสเตเชีย ในปี ค.ศ.1929 มีรายงานการระบาดครั้งแรกในคน นับจากนั้นเชื้อได้แพร่กระจายไปทั่วโลก *L. monocytogenes* ร้อยละ 98 เกิดกับคน และร้อยละ 85 เกิดกับสัตว์ (McLauchlin, 1987) นอกจากนี้ลิสทีเรีย สปีชีส์อื่นก็ทำให้เกิดโรคกับคนได้ คือ *L. ivanovii* ทำให้เกิดโรคกับคนขึ้นอย่างน้อย 3 ราย และ *L. seeligeri* อย่างน้อย 1 ราย โรคลิสเตอริโอซิสที่เกิดกับแกะในประเทศอังกฤษได้เพิ่มขึ้นในปี ค.ศ.1979 จาก 86 รายเป็น 423 รายในปี ค.ศ.1988 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปรับเปลี่ยนเทคนิคการทำหญ้าหมักเป็นแบบก้อนขนาดใหญ่ วิธีการนี้กระทำโดยบรรจุหญ้าในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ ปิดปากถุงไม่แน่น เป็นเหตุให้เชื้อราเจริญ ปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นไม่มากพอที่จะมีผลให้ pH ต่ำจน *L. monocytogenes* หยุดเจริญ ในปี ค.ศ.1981 *Listeria* ทำให้เกิดโรคขึ้นกับคนในประเทศอังกฤษประมาณ 60 ราย และในปี ค.ศ. 1985 เพิ่มขึ้นเป็น 140 ราย รวมทั้งการทำให้สัตว์เป็นโรคเพิ่มขึ้นด้วย ระหว่างปี ค.ศ.1986 – 1988 เกิดโรคลิสเตอริโอซิสของคนในอังกฤษและเวลส์เพิ่มขึ้นร้อยละ 150 รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของซัลโมเนลโลซิสร้อยละ 100 มีอัตราการตายทั้งหมดในอังกฤษร้อยละ 46 จากผู้ป่วย 558 ราย จำแนกออกเป็นหญิงมีครรภ์ร้อยละ 51 และผู้ใหญ่ทั่วไปร้อยละ 44 ระหว่างปี ค.ศ.1983 – 1987 มีรายงานว่าผู้ป่วย 775 รายในเกาะอังกฤษ ตาย 219 ราย คิดเป็นร้อยละ 28 ทั้งนี้ไม่รวมการแท้งบุตรจำนวน 44 ราย แต่ถ้ารวมด้วยอัตราการตายจะสูงเป็นร้อยละ 34 ก่อนปี ค.ศ.1974 มีรายงานที่ปรากฏเป็นเอกสารว่ามีผู้ป่วยในแถบตะวันตกของประเทศฝรั่งเศสปีละ 15 ราย แต่ในปี ค.ศ.1975 และ ค.ศ.1976 ปรากฏว่ามีผู้ป่วย 115 และ 54 ราย ตามลำดับ (Carbonnelle et. al., 1978) หลายปีที่ผ่านมานี้มีคำเตือนให้ระวังเกี่ยวกับโรคลิสเตอริโอซิสมากขึ้น นับตั้งแต่ต้นถึงกลางทศวรรษที่ 1990 ประมาณว่ามีผู้ป่วยจากลิสเตอริโอซิสต่อประชากร 1 ล้านคนในประเทศต่างๆ ดังนี้

ออสเตรเลีย (1992)	2	ราย ประชากร/1 ล้านคน
แคนาดา	2-4	ราย ประชากร/1 ล้านคน
เดนมาร์ก	4-5	ราย ประชากร/1 ล้านคน
อังกฤษ	2-3	ราย ประชากร/1 ล้านคน
สหรัฐอเมริกา	~4	ราย ประชากร/1 ล้านคน



ประมาณปี ค.ศ.1993 คาดว่าจะมีผู้ป่วยในสหรัฐฯ จำนวน 1,092 ราย ตาย 248 ราย แต่สาเหตุมิใช่ว่าจะมาจากอาหารทั้งหมด จากการศึกษาเพื่อจัดการความเสี่ยงเมื่อไม่นานมานี้ ประมาณว่าคนทั่วไปมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียนี้จากอาหารต่อปีที่ระดับ  $5.0 \log_{10}$  เฉลี่ย 3.8 เท่า และที่ระดับ  $>10^6 \log_{10}$  เฉลี่ย 0.8 เท่า โดยประมาณว่าจะเกิดลิสเตอริโอซิสเฉลี่ย 5-7 รายต่อปี (Notermans et. al., 1998)

### 2.1.9 มาตรการควบคุม

สืบเนื่องจาก *L. monocytogenes* มีอันตรายสูง บางประเทศจึงออกกฎหมายมาควบคุมความปลอดภัยของอาหารที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อนี้ โดยเฉพาะอาหารพร้อมบริโภค แต่บางประเทศได้จัดทำแนวปฏิบัติ (guidelines) หรือเกณฑ์ (criteria) ขึ้นใช้ก่อนที่จะออกเป็นกฎหมายต่อไป

- 1) ประเทศสหรัฐอเมริกา : ประเทศสหรัฐอเมริกาคือว่าอาหารที่มี *L. monocytogenes* ปนเปื้อน เป็นอาหารที่ไม่บริสุทธิ์ (adulterant) และอาจถูกเรียกกลับคืน (recall) หรือถูกจับ (seizure) โดยถือหลักว่า จะต้องไม่พบ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างอาหาร 50 กรัม ส่วนเกณฑ์เท่ากับศูนย์ (Zero tolerance) โดยทั่วไปหมายถึง ไม่พบจุลินทรีย์ในตัวอย่าง 25 กรัม จากการใช้แผนการชักตัวอย่าง  $n=5, c=0$  (ตรวจ 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 25 กรัม และไม่มีตัวอย่างใดพบ *L. monocytogenes*)
- 2) กลุ่มประเทศสหภาพยุโรป : มุ่งไปที่นมและผลิตภัณฑ์นมที่นำมาผลิตเป็นเนยแข็งแบบนึ่ง ทั้งนี้จะต้องไม่พบ *L. monocytogenes* ในอาหาร 1 กรัม

แนวปฏิบัติของประเทศอังกฤษกับอาหารพร้อมบริโภคได้จำแนกตามลักษณะการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 พอใจ : ได้แก่ อาหารที่ตรวจไม่พบ *L. monocytogenes* ในตัวอย่าง 25 กรัม
- กลุ่มที่ 2 พอใจพอควร : ได้แก่ อาหารที่ตรวจพบ *L. monocytogenes* ไม่เกิน 100 ในตัวอย่าง 25 กรัม
- กลุ่มที่ 3 ไม่พอใจ : ได้แก่ อาหารที่ตรวจพบ *L. monocytogenes* ระหว่าง 100-1,000 ในตัวอย่าง 25 กรัม
- กลุ่มที่ 4 ไม่ยอมรับ : ได้แก่ อาหารที่ตรวจพบ *L. monocytogenes* มากกว่า 1,000 ในตัวอย่าง 25 กรัม

3) ประเทศแคนาดา : ในปี ค.ศ.1993 ประเทศแคนาดาได้เสนอเกณฑ์การปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมบริโภค โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

- ประเภทที่ 1 : อาหารที่เชื่อมโยงกับการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ
- ประเภทที่ 2 : อาหารที่มีอายุการเก็บรักษามากกว่า 10 วัน

ประเภทที่ 3 : อาหารที่เอื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียที่มีอายุการเก็บรักษา 10 วัน หรือต่ำกว่า หรืออาหารที่ไม่เอื้อต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งมีสมบัติต่อไปนี้

- มี pH 5.0-5.5 และ  $a_w < 0.95$
- มี pH < 5.0 โดยไม่คำนึงถึง  $a_w$
- มี  $a_w \geq 0.92$  โดยไม่คำนึงถึง pH
- อาหารแช่เยือกแข็ง

สำหรับอาหารประเภทที่ 3 ถ้าพบ *L. monocytogenes* เกิน 100 ต่อกรัมจะถูกเรียกกลับคืน (recall)

**4) ประเทศเยอรมนี :** ถือว่าการกำหนด Zero tolerance ไม่สามารถปฏิบัติได้ ดังนั้นจึงจำแนกอาหารออกเป็น 4 กลุ่มเสี่ยงคล้ายกับของประเทศแคนาดา ผลิตภัณฑ์ที่พบ *L. monocytogenes* เกิน  $10^4/g$  จะถูกเรียกกลับคืน

**5) ประเทศออสเตรเลีย :** กำหนดเกณฑ์สำหรับเนยแข็งว่าต้องไม่พบ *L. monocytogenes* ใน 25 กรัมจากการชักตัวอย่างมาตรวจ 5 ครั้ง ( $n=5, c=0$ )

สมัชชานานาชาติว่าด้วยเกณฑ์จุลินทรีย์ในอาหาร (The international Commission on Microbiological Specification for Foods) หรือเรียกย่อว่า ICMSF ได้สรุปว่า ถ้า *L. monocytogenes* ไม่พบในอาหารเกิน 100/g ณ จุดบริโภค ให้ถือว่าอาหารนั้นมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภคที่มีสุขภาพรุ่มเสี่ยง นอกจากนี้สมัชชา ICMSF ยังแนะนำให้ใช้ระบบ HACCP ในการผลิตและจัดบริการอาหารด้วย

## 2.2 วิธีการแยกและตรวจหา *L. monocytogenes*

การตรวจวิเคราะห์ *L. monocytogenes* จากสิ่งส่งตรวจพวกเลือด น้ำในสมองและไขสันหลัง น้ำคร่ำจากผู้ป่วยสามารถแยก *L. monocytogenes* ได้บริสุทธิ์มากกว่าการแยกตรวจวิเคราะห์ในอาหารเนื่องจากในอาหารส่วนใหญ่มี *L. monocytogenes* ปนเปื้อนในปริมาณต่ำและมีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นๆ ควรนำสิ่งที่ตรวจได้ลงใน Trypticase soy broth หรือ Tryptose broth ในสัดส่วนสิ่งตรวจต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:9 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาหลายวันถึงประมาณ 2 เดือน หลังจากนั้นนำมาบ่มเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็งเป็นช่วงๆ ซึ่งควรทำบ่อยครั้งจนกว่าจะพบเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกชนิดอาจใช้ Sheep blood (Trypticase soy) agar และ Columbia base Colistin nalidixic acid agar (CNA) เมื่อบ่มเพาะเชื้อบนอาหารแข็งเช่น Sheep blood agar หรือ CAN agar แล้วควรบ่มไว้ที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ Sheep blood agar ต้องบ่มในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5-10 % หรือในสภาพที่

ไม่มีอากาศ โคโลนีที่ขึ้นมีขนาดเล็ก แสงผ่านได้ และมีสีเทา สายพันธุ์ส่วนใหญ่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแบบ  $\beta$ -haemolysis เมื่อเห็นโคโลนีแล้วนำมาข้อมสีแกรมโดยเฉพาะสังตรวจที่ได้จากน้ำไขสันหลังเลือด หรือของเหลวจากช่องคลอดโดย *L. monocytogenes* ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงแบบ  $\alpha$ -hemolysis และไม่มีโคโลนีสีขาว จากคุณสมบัตินี้ทำให้สามารถแยกออกจากแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อนอื่นๆ ได้ดีโดยคุณสมบัติที่ใช้จำแนก *L. monocytogenes* มีดังนี้

- ผลิตเอนไซม์ Catalase
- เคลื่อนที่ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 °C
- เพิ่มจำนวนได้ดีที่ 4 °C
- บริเวณของการทำลายเม็ดเลือดแดงแบบ  $\beta$ -haemolysis แคบ
- สามารถหมักย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส Trehalose และ Salicin
- สามารถย่อยสลาย Esculin
- ไม่ให้ H<sub>2</sub>S

สำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาตาเลสทำได้โดยการหยด H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีที่เจริญบน Brain - Heart Infusion agar สำหรับ *L. monocytogenes* ให้ผลบวกแต่ Streptococci และ Lactobacilli ให้ผลลบ

สำหรับการเคลื่อนที่สามารถดูภายใต้กล้องเช่น การทำ Wet mouth สังเกตการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลวกึ่งแข็ง สำหรับการทำให้ Wet mouth ทำได้โดยนำเซลล์แบคทีเรีย *L. monocytogenes* บ่มเพาะไว้ใน Broth culture เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่ 25 °C ก่อน แล้วจึงนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เห็นการเคลื่อนที่แบบกลิ้งไปมา ซึ่งเป็นลักษณะปลายข้างหนึ่งของเซลล์แกว่งไปมา ถ้าใช้ Phase-Contrast Microscope จะเห็นการเคลื่อนที่ได้ชัดเจนยิ่งขึ้นสำหรับการเคลื่อนที่จากการบ่มเพาะเชื้อลงใน Semisolid medium ควรบ่มไว้ที่ 25 °C โดยสังเกตเห็นการเคลื่อนที่มีลักษณะคล้ายร่มอยู่ในบริเวณใต้ผิวหน้าวุ้นลงไปประมาณ 2-5 มิลลิเมตร แต่ถ้านำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C อาจจะไม่เห็นการเคลื่อนที่เลยก็ได้ การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค ทดสอบโดยการหยดเชื้อที่บ่มในอาหารเหลวไว้แล้ว 24 ชั่วโมง ลงบนตาข้างหนึ่งของกระต่าย ถ้าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีความสามารถก่อโรคที่ตาดังกล่าวจะเกิดตาอักเสบที่เรียกว่า Conjunctivitis ภายใน 24-36 ชั่วโมง *L. monocytogenes* มีความไวต่อยา Tetracycline, Ampicillin, และ Penicillin โดยยาปฏิชีวนะเหล่านี้ควรนำมารักษาตั้งแต่แรกจึงจะได้ผลดี

## 2.2.1 การวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

2.2.1.1 ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ สิ่งส่งตรวจพวกเลือด น้ำในสมองและไขสันหลัง น้ำคั่งในเยื่อหุ้มสมอง การย้อมแกรมจะพบเชื้อลักษณะเป็นค็อกโคบาซิลไล แกรมบวก ซึ่งมีลักษณะคล้าย *Corynebacteria*, *Streptococcus pneumonia*, หรือ *Haemophilus*

2.2.1.2 การเพาะเชื้อ *Listeria* spp. สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด เช่น Tryptose agar เมื่อบ่มเชื้อไว้ 1-2 วันในอาหารวุ้นบนโคโลนิลักษณะกลม ขนาดเล็ก นอกจากนี้การใช้อาหารคัดเลือก และการเก็บไว้ในที่เย็นช่วยในการตรวจหาเชื้อตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยเชื้ออื่นที่เจริญเร็วกว่าช่วยในการจำแนกเชื้อในการเกิด  $\beta$ -hemolysis บนอาหารผสมเลือดและ ช่วยการแยก *Listeria* spp. ออกจากแบคทีเรียอื่นที่มีรูปร่างคล้ายกัน แต่ hemolysis อาจเกิดขึ้นบ้าง และสังเกตได้ยากในตอนแรก การเคลื่อนที่ของอาหารมักมีลักษณะกลิ้งไป และในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เชื้อจะมารวมกลุ่มกันคล้ายรูปร่ม ซึ่งช่วยในการจำแนกเชื้อได้

การตรวจวิเคราะห์นิยมใช้วิธี Detection มากกว่า Enumeration วิธี Detection แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ Conventional methods และ Rapid methods วิธีการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Conventional methods มีอยู่หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีแตกต่างกันในขั้นตอน Enrichment และ Plating วิธีที่เป็นมาตรฐานและนิยมใช้มี 4 วิธีคือ

- U.S. Food and Drug (US.FDA) วิธีใช้ตรวจ *Listeria* ในอาหารชนิดต่างๆ ยกเว้นเนื้อสัตว์
- U.S. Department of Agriculture (US.DA) วิธีใช้ตรวจ *Listeria* ในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์
- International Dairy Federation (IDF) วิธีใช้ตรวจ *Listeria* ในนมและผลิตภัณฑ์
- International Organization for Standardization (ISO)

การใช้ Conventional methods คือ ให้ผลแน่นอนและราคาถูก ส่วนข้อเสียคือ ต้องใช้เวลานานและ ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญจึงทำได้ถูกต้อง ส่วน Rapid methods ที่ใช้ในการวิเคราะห์มี 2 วิธีใหญ่ๆ คือ ทาง Immunological และ Genetic วิธีทาง Immunological ที่ใช้มีวิธี Monoclonal antibodies และ Polyclonal antibodies ส่วนวิธีทาง Genetic ใช้วิธี DNA probes และ Polymerase Chain Reaction แต่ละวิธีนี้พบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจหา *Listeria* spp. ที่ต่างกัน บางวิธีตรวจได้เฉพาะ *Listeria* spp. ไม่สามารถระบุได้แต่บางวิธีตรวจได้ว่ามี *L. monocytogenes* โดยไม่สนใจชนิดอื่นๆ

การตรวจแบคทีเรียโดยการเพาะเลี้ยงแบบไม่นับจำนวน (Detection Methods) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่มีอันตรายรุนแรง แม้ว่าแบคทีเรียประเภทนี้จะมียูในอาหารเป็นจำนวนน้อย แต่ก็อาจทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วยได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อซัลโมเนลลา เชื้อบิด และเชื้อฮิวาต์ เป็นต้น การถนอมอาหาร เช่น การใช้ความร้อน ความเย็น ความดัน รังสี สารเคมี ฯลฯ สามารถทำลายแบคทีเรียได้จำนวนหนึ่ง ส่วนแบคทีเรียที่รอดชีวิตมาได้อาจบาดเจ็บ หรืออ่อนเพลีย ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบซีเลกทิฟ (selective media) ซึ่งปกติจะเติมสารที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ ไว้ในสูตรอาหารด้วยนั้น อาจเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่บาดเจ็บ เพราะสารยับยั้งนี้มิได้ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียอื่นๆ เท่านั้น สารยับยั้งยังสามารถออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วย แต่ผลที่เกิดขึ้นอาจจะอ่อนกว่าแบคทีเรียอื่นๆ ที่ต้องการยับยั้ง ด้วยเหตุนี้ในทางปฏิบัติจึงนิยมเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่บาดเจ็บด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารอาหารเจือจางและไม่มีสารยับยั้งใดๆ เสียก่อน หลังจากแบคทีเรียบาดเจ็บแข็งแรงดีแล้ว จึงเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบซีเลกทิฟที่เติมสารยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดเพื่อเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการ ส่วนแบคทีเรียอื่นเจริญได้ไม่ดีเท่า

ยังมีอาหารเลี้ยงเชื้ออีกแบบหนึ่ง จัดอยู่ในประเภทอิลเล็กทิฟ มีเดีย (elective media) คือเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้รับการออกแบบมาโดยไม่มีสารยับยั้งใดๆ แต่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมให้จุลินทรีย์เพียงสปีชีส์เดียวหรือกลุ่มเดียวเจริญได้เร็ว ความแตกต่างระหว่าง selective และ elective media ต้องดูที่จุลินทรีย์ซึ่งต้องการตรวจวิเคราะห์ ถ้าจัดสถานะให้แก่จุลินทรีย์สปีชีส์หรือกลุ่มเดียวและสถานะนั้นไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ ให้ถือว่าเป็น elective media ปัญหาของการใช้ elective media คือสารเมตาบอไลต์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในขณะเจริญเติบโตใน elective media อาจปรับเปลี่ยนสถานะของสิ่งแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นผลให้จุลินทรีย์อื่นๆ สามารถเจริญได้ดี ส่วน selective media นั้น มีข้อได้เปรียบตรงที่มีสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ เป็นตัวควบคุมไว้ แต่ถ้าหากสารยับยั้งนั้นถูกทำลายด้วยสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น แสดงว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ออกแบบมานั้นยังไม่ดีนัก

ตารางที่ 2.3 รายชื่อของสารเคมียับยั้งที่ใช้ในอาหารแข็งจำเพาะ *Listeria* spp.

สารเคมี	ความเข้มข้น/L	เชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้ง
Acriflavine	10 mg	Gram-positives including <i>Lactobacillus bulgaricus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>
Bacitracin	5000 IU	Gram-positives
Cefotetan	4 – 8 mg	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ceftazidime	50 mg	Broad spectrum
Colistin	20 mg	Gram-negatives
Cycloheximide	50 mg	Fungi
Fosfomycin	64 -512 mg	Broad spectrum including <i>Staphylococcus aureus</i>
Furacin	10 mg	<i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus</i> spp.
Laxamoxef	4 mg	<i>Staphylococcus aureus</i>
Lithium chloride	0.5 mg	Gram-negatives, except <i>Pseudomonas</i> spp.
Moxalactam	20 mg	Broad spectrum
Nalidixic acid		Gram-negatives, except <i>Pseudomonas</i> and <i>Proteus</i> spp.
Oxolinic acid	15 – 20 mg	Broad spectrum
Phenylethanol	2.5 ml	Gram-negative and <i>Proteus</i> spp.
Polymyxin B	16,000 IU	Gram-negative, including <i>Pseudomonas</i> spp., some Gram-positive
Potassium tellurite	0.5 g	Gram-negatives
Potassium thiocyanate	3.75 g	Most Gram-negatives, also <i>Bacillus</i> spp. and Corryneforms
Propolis	15 mg	Gram-positives including <i>Staphylococcus</i> and <i>Streptococcus</i>
	25 mg	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> and <i>Pseudomonas</i> spp.
Rivanol	0.2 g	Gram-negatives
Thallos acetate	40 mg	Gram-positive cocci
Trypaflavine		

ที่มา : Ryser and Marth (1989)

## 2.3 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื่อนับว่าเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแบ่งตามลักษณะของเนื้อสัมผัส เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (Biosci Register, 2010) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการได้แก่ ออกซิเจน น้ำ แหล่งของไนโตรเจน-คาร์บอน พลังงาน แร่ธาตุ วิตามิน (Richard, 2010)

### 2.3.1 ส่วนประกอบหลัก

#### ● น้ำ

แบคทีเรียทุกชนิดต้องการน้ำเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย บางอย่างที่มีการปนเปื้อนก็จะสามารถจัดออกด้วยน้ำ แบคทีเรียบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในเกลือหรือที่มีความชื้นในขณะทำอาหารแห้งจะไม่มีแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ได้ (Eddleman, 1999)

#### ● ไขมัน

ไขมันถูกนำมาใช้ผสมในอาหารเหลวเพื่อทำ slant โดยที่การซึมผ่านของออกซิเจนจะเป็นไปได้ยากในช่วงล่างของ slant ไขมันจัดเป็น โพลีเมอร์ที่สร้างจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสและยังเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของสาหร่ายสีแดงบางสายพันธุ์ (Science Buddies, 2010)

#### ● แหล่งของคาร์บอน

คาร์บอนเป็นสิ่งจำเป็นพื้นฐานที่ใช้ในการสร้างบล็อกของสารประกอบอินทรีย์ทุกชนิด ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต กลูโคส โปรตีนและไขมัน (Harold et. al, 1999)

#### ● แหล่งของไนโตรเจน

แบคทีเรียต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก สายพันธุ์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียทำให้มีความต้องการไนโตรเจนที่แตกต่างกันด้วย มีเพียงแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถใช้โมเลกุลอิสระของไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น Peptone เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในสูตรอาหาร (Harold et. al, 1999)

### ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของ Peptone

แหล่งที่มา	DIFCO	BBL	GIBCO	OXOID
Casein acid hydrolysis	Casamino Acids	Acidicase	Peptone 5	L41

Same extra soluble	Paptamin	-	Peptone 20	-
Casein acid hydrolysis	Peptinase	-	Peptone 50	-
Lactalbumin enzymic digest	Lactaltone	Lactalysate	Peptone 60	Lactalbumin hydrolsate
Meat enzymic digest	Proteose/Peptone	Thiotone	Peptone 100	Peptone P
Soymeal enzymic digest	Soytone	Phytone	Peptone 110	Soya Peptone
Casein trypsin digest	Tryptone/Casitone	Trypticase	Peptone 140	Tryptone
Animal casein polypeptone	Proteose Peptone #2, #3/ Tryptose	Polypeptone	Peptone 180	Tryplose
Gelatin pancreatic digest	Peptone	Gelysate	Peptone 190	Peptone
Yeast casein polypeptone	Bitone	Biosate	Peptone 220	-

ที่มา: Harold Eddleman, Indiana Biolab (1999)

### 2.3.2 สารยับยั้ง

#### ● Lithium Chloride/Phenyl ethanol

การใช้ phenyl ethanol ร่วมกับ lithium chloride เป็นการช่วยเพิ่มจำนวนของ *L. monocytogenes* ซึ่งถือเป็นสารที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* McBride *Listeria* agar (MLA) (Ryser และ Marth, 1989)

#### ● Nalidixic Acid

Beerens และ Tahon-Castel (1966) เป็นนักวิทยาศาสตร์สองท่านแรกที่รายงานถึงคุณสมบัติของ nalidixic acid ในการแยกเชื้อ *L. monocytogenes* ออกจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยที่การใช้ nalidixic acid จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ (Ralovich, 1971)

#### ● Polymyxin B

Polymyxin B เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการต่อต้านการติดเชื้อของแบคทีเรียแกรมลบ Polymyxin B ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus polymyxa* โดยกลไกการทำลายแบคทีเรียของ Polymyxin จะเกิดจากการจับกัน



ของ Polymyxin กับเชื้อหุ้มเซลล์แล้วทำให้เกิดเป็นรูซึ่งจะทำให้แบคทีเรียสูญเสียน้ำในเซลล์ (Cardoso et. al., 2007)

#### ● Cefazidime

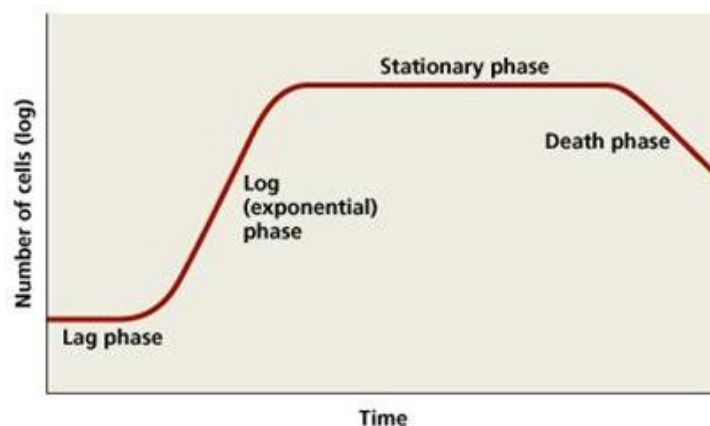
Ceftazidime เป็นรุ่นที่สามของยาปฏิชีวนะ cephalosporin โดยที่มีช่วงกว้างในการต่อต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ในทางการตลาด Ceftazidime pentahydrate มีชื่อเรียกหลายชื่อประกอบด้วย Cefzim (Pharco B International), Fortum (GSK), และ Fortaz (White, 2003)

#### ● Cycloheximide

Cycloheximide เป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตที่สร้างจาก *Streptomyces griseus* Cycloheximide ถูกใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยด้านชีวการแพทย์เพื่อที่จะยับยั้งการสร้างโปรตีนในเซลล์ยูคาริโอต (Lin และ Hsu, 2000)

### 2.4 รูปแบบการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

รูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแสดงได้จากเส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log จำนวนแบคทีเรียกับระยะเวลา ของการเจริญเติบโต ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง เรียกว่า โกรทเคิร์ฟ (เป็นนาที) (Growth Curve) ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.2 แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ



รูปที่ 2.2 Growth Curve

#### ระยะเริ่มต้น

เป็นระยะที่แบคทีเรียปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม จึงใช้ระยะเวลาในการแบ่งตัว ซึ่งเรียกว่า generation time นาน ระยะนี้ เรียกว่า แลคเฟส (Lag phase)

### ระยะที่สอง

หลังจากแบคทีเรียปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี แบคทีเรียจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เส้นการเจริญมีลักษณะชัน (Exponential growth) ระยะนี้ เรียกว่า ลอจเฟส (Log phase)

### ระยะที่สาม

เป็นระยะหลังจากที่แบคทีเรียเจริญเต็มที่แล้ว ปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นทำให้อาหารร่อยหรือลง จำนวนแบคทีเรียจะคงที่ ระยะนี้ เรียกว่า สเตชันนารีเฟส (Stationary phase)

### ระยะที่สี่

อาหารที่ร่อยหรือลง ในขณะที่แบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก อีกทั้งอาจเกิดสารพิษที่ (ระยะสุดท้าย) เป็นผลพลอยได้จากการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียด้วย สารพิษเหล่านี้อาจเป็นอันตรายต่อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียค่อยๆ ตายลง เส้นแสดงการเจริญเติบโตจึงมีลักษณะ โค้งต่ำลง ระยะนี้เป็นระยะที่แบคทีเรียตาย เรียกว่า เดดเฟส (Dead phase)

ปัจจุบันได้มีความสนใจการทำนายการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารระหว่างการเก็บรักษามากขึ้น หากวิธีการนี้สามารถพัฒนาให้การคาดการณ์ที่สมจริงได้จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบอาหารในห้องปฏิบัติการ ได้มาก (Baranyi และ Roberts, 1994) หลักวิธีการทำนายทุกวิธีต้องใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้งบางส่วนหรือเต็มส่วนของ Growth Curve ของเชื้อจุลินทรีย์ที่สนใจ ในช่วงสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในปี ค.ศ.1990 Zwietering และคณะได้ตรวจสอบสมการแสดงการเจริญเติบโตที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ สมการ Gompertz, Logistic และสมการที่แก้ตัวแปรบางส่วนของ Gompertz และ Logistic เพื่อให้ความหมายทางกายภาพกับตัวแปรต่างๆ ต่อมาในปี 1994 Baranyi และคณะได้เสนอแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ โดยแบบจำลอง Gompertz และ Logistic นั้นมีลักษณะคล้ายรูปอักษรเอส (Sigmoid shape) กับจุด inflection ที่ชัดเจน ในขณะที่แบบจำลอง Baranyi นั้นมีลักษณะที่แตกต่างเพราะแสดงส่วนกึ่งเชิงเส้น (quasi-linear segment) ระหว่างช่วง exponential

การเลือกแบบจำลองการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุดมักจะเป็นเรื่องของการลองผิดลองถูก นอกจากนี้หลักเกณฑ์ในการพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองนั้นแตกต่างกันไป บางครั้งได้อาศัยมาตรการทางคณิตศาสตร์โดยพิจารณาจากความเข้ากันดีระหว่างสมการกับผลการทดลอง (Buchanan et. al., 1997) ในขณะที่บางครั้งเน้นการเปรียบเทียบค่าตัวแปรเฉพาะที่แสดงการเจริญเติบโตโดยตรงซึ่งได้จากการทำนายในแบบจำลองหลายแบบ (Membre' et. al., 1999)

อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้ใช้แบบจำลอง Logistic แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* ด้วยการวัดขนาดของโคโลนีซึ่งเคยใช้ในงานของ Saeung และคณะ, 2009 โดยสมการ Logistic แสดงดังสมการที่ 2.1

$$A = \frac{A_{max}}{1+e^{-2\mu_{max}(t-t_i)}} \quad (2.1)$$

โดยที่ A คือ ขนาดพื้นที่ผิวของโคโลนี (mm<sup>2</sup>)

$A_{max}$  คือ ขนาดพื้นที่ผิวที่ใหญ่ที่สุดของโคโลนี (mm<sup>2</sup>)

t คือ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (h)

$t_i$  คือ ระยะเวลาที่จุด inflection ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีมีค่าสูงสุด (h)

$\mu_{max}$  คือ ค่าสูงสุดของอัตราการเจริญจำเพาะ หรือ ค่า tangent ของ growth curve ที่จุด inflection (h<sup>-1</sup>)

นอกจากนี้จากสมการที่ 2.1 จะพบว่าขนาดพื้นที่ผิวของโคโลนีที่เวลา  $t_i$  จะเป็นครึ่งหนึ่งของขนาดพื้นที่ผิวที่ใหญ่ที่สุดของโคโลนี ( $A_{max}$ )

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยการพัฒนาภาพรวมของชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก โดยในการพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์จะพัฒนาในส่วนของการเพิ่มจำนวน (enrichment broth) และอาหารแข็ง (selective agar) โดยวัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานในแต่ละส่วนประกอบไปด้วยรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 3.1 อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้

- 3.1.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow cabinet DWYER Series 0325, USA)
- 3.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (MEMMERT Model ULM500 Series TS8000, Germany)
- 3.1.3 ตู้เย็น (Sanyo, Japan)
- 3.1.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (BECTHAI and HIRAYAMA Model HA300D, Japan)
- 3.1.5 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer, Scientific industries Model genie 2, USA)
- 3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Bench Top Centrifuge, HITACHI himac Model CT6D, Japan)
- 3.1.7 เครื่องเขย่าพร้อมระบบควบคุมอุณหภูมิ (NEW BRUNWICK SCIENTIFIC, USA)
- 3.1.8 งานเพาะเชื้อพลาสติกขนาด 15x60 มม. (Griner, the Netherland)
- 3.1.9 Auto pipette ปริมาตร 20 มล. (Autopipette, USA)
- 3.1.10 Auto pipette ปริมาตร 200 มล. (Autopipette, USA)
- 3.1.11 Auto pipette ปริมาตร 1,000 มล. (Autopipette, USA)
- 3.1.12 เครื่องชั่งละเอียด 0.0001 กรัม (Mettler Toledo Model AG204, Switzerland)
- 3.1.13 เครื่องชั่งละเอียด กรัม 0.01 (Mettler Toledo Model GG-4002S, Switzerland)
- 3.1.14 กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล (Dino-Lite Model AM413ZT, Taiwan)
- 3.1.15 กล้องถ่ายภาพรูปดิจิทัล (Olympus SP 570 UZ, Indonesia)
- 3.1.16 24-microwell plate (Costar, USA)
- 3.1.17 96-microwell plate (Costar, USA)

#### 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco, France)
- 3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, France)
- 3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactose Broth (LB), Hi-media, India

- 3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Listeria* selective agar base (Oxford formulation) (Oxoid, England)
- 3.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) (Oxoid, England)
- 3.2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB), Scharlau Chemis, Spain
- 3.2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM medium base (Difco, France)
- 3.2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic *Listeria* agar (ISO) (Oxoid, England)
- 3.2.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia agar (Difco, France)
- 3.2.10 Yeast extract (Himedia Laboratories, India)
- 3.2.11 Lab Lemco Powder (Oxoid, England)
- 3.2.12 Peptone A (US Biological, USA)
- 3.2.13 Proteose (US Biological, USA)
- 3.2.14 Tryptose (US Biologicals, USA)
- 3.2.15 Lactose (ACROS organics, USA)
- 3.2.16 Esculin hydrate 97% (ACROS organics, USA)
- 3.2.17 Ammonium ferric citrate (Fisher Chemical, USA)
- 3.2.18 Lithium chloride (US Biological, USA)
- 3.2.19 D-mannitol (US Biological, USA)
- 3.2.20 Phenol red (ACROS organics, USA)
- 3.2.21 Modified *Listeria* selective supplement (Oxford, England)
- 3.2.22 OCLA (ISO) selective supplement (Oxoid, England)
- 3.2.23 Amphotericin B (Fisher bio reagents, China)
- 3.2.24 Colistin sulphate (US Biological, USA)
- 3.2.25 Acriflavine (ACROS organics, USA)
- 3.2.26 Cefotetan (ACROS organics, USA)
- 3.2.27 Phosphomycin disodium salt (MP Biomedicals, France)
- 3.2.28 Polymycin B (US Biological, USA)
- 3.2.29 Ceftazidime (Difco, France)
- 3.2.30 Nalidixic acid (ACROS organics, USA)
- 3.2.31 Lithium chloride (US Biological, USA)
- 3.2.32 Sodium Chloride (NaCl) (UNIVAR, New Zealand)
- 3.2.33 D-glucose (UNIVAR, New Zealand)
- 3.2.34 Glycerol (UNIVAR, New Zealand)
- 3.2.35 Ethanol (CARLO ERBA Reagent, France)

### 3.3 เชื้อจุลินทรีย์

*Listeria ivanovii* จากอุตสาหกรรม Golden Line Business

*Listeria innocua* DMST 9011 กองชีววัตถุ, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข

*Escherichia coli* DMST 4609 กองชีววัตถุ, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข

*Staphylococcus aureus* TISTR 808 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

### 3.4 การทดลองศึกษาอาหารเหลวเพิ่มจำนวนที่เหมาะสม

#### 3.4.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

- *L. innocua*

ในการศึกษาใช้เชื้อ *L. innocua* ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค เป็นเชื้อทดสอบ เนื่องจากเชื้อ *L. innocua* มีลักษณะทางสรีรวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อ *L. monocytogenes* และเชื้อทั้งคู่ดังกล่าวสามารถที่จะเกิดในตัวอย่างอาหารเดียวกัน (Cornu et. al., 2002) โคโลนีเดี่ยวของ *L. innocua* ถูกลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 mL นำเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- *E. coli*

โคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ถูกลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 mL นำเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

- *S. aureus*

โคโลนีเดี่ยวของ *S. aureus* ถูกลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 mL นำเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Yamaki et. al., 2011) เชื้อทั้งหมดถูกบ่มจนได้ปริมาณเชื้อประมาณ  $10^9 - 10^{10}$  CFU/mL ที่ปริมาณเชื้อดังกล่าวจะเป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบผลของสารยับยั้งร่วมกันที่มีต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการคัดแยกเชื้อ *Listeria* spp. สำหรับการศึกษาศักยภาพความสามารถในการเพิ่มจำนวนในอาหารไม่จำเพาะ เชื้อทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบจะถูกเตรียมที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 2-3 log CFU/mL และใช้ที่ปริมาณเชื้อดังกล่าวในการทดลอง

### 3.4.2 การเตรียมอาหาร

#### 3.4.2.1 การศึกษาประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารไม่จำเพาะ

อาหารเหลวที่ใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตประกอบด้วย Nutrient Broth (NB), Lactose Broth (LB), Tryptic Soy Broth (TSB), Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB), Fraser Broth (FB), และ PALCAM Broth base (PB) ซึ่งถูกเตรียมตามสูตรอาหารที่โรงงานใช้ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยสูตรดังกล่าวถูกใช้ในการศึกษาผลของอาหารเหลวไม่จำเพาะในการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย 200  $\mu$ L ของเชื้อลิสทีเลียที่ความเข้มข้นที่ต้องการถูกปิเปตลงใน 20 mL ของอาหารเหลวไม่จำเพาะในแต่ละเงื่อนไขการทดลอง ตัวอย่างถูกวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, และ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารไม่จำเพาะ

Function	NB		LB		TSB		BLEB		FB		PB	
	Component	Conc. (g/L)	Component	Conc. (g/L)	Component	Conc. (g/L)	Component	Conc. (g/L)	Component	Conc. (g/L)	Component	Conc. (g/L)
C source			Lactose	5	Dextrose	2.5					D-Mannitol	5
	Beef extract	3	Beef extract	3	Pancreatic digest of casein	17	Yeast extract	6	Lab-Lemco powder	5	Peptone	23
	Peptone	5	Peptone	5	Papaic digest of soybean meal	3			Proteose peptone	5	Yeast extract	
									Tryptone	5		
									Yeast extract	5		
Buffer					Dipotassium phosphate	2.5	Potassium dihydrogen orthophosphate	1.35	Di-sodium hydrogen phosphate	12		
							Disodium hydrogen orthophosphate	9.6	Potassium dihydrogen phosphate	1.35		
Salt					Sodium chloride	5			Sodium chloride	20		
Neutralizer											Polysorbate 80	2
											Soya lecithin	5

### 3.4.3 การทดสอบผลของการใช้สารตัวยับยั้งร่วมกันที่มีต่อความสามารถในการเจริญเติบโตและการคัดแยกเชื้อ *Listeria spp.*

หลังจากผลของอาหารเหลวไม่เพิ่มจำนวนที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ถูกมีการศึกษา อาหารเหลวดังกล่าวได้ถูกคัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้านี้ และถูกนำมาเพิ่มสารยับยั้ง โดยการใช้สารยับยั้งต่างชนิดกันด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน 120  $\mu\text{L}$  ปริมาตรของเชื้อ *L. innocua*, *E. coli* และ *S. aureus* ถูกปีเปตลงใน 1.2 mL ของอาหารในแต่ละการทดลองโดยการใช้ภาชนะบรรจุเพลท 96-deep well (รูปที่ 3.1) ทำการผสมตัวอย่างด้วยการใช้ auto ปีเปต ตัวอย่างเหล่านี้ถูกวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, และ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 96-deep well

### 3.4.4 การนับปริมาณเซลล์

ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในแต่ละการทดลองได้ถูกทำการวัด วิธีการนับจำนวนเซลล์ใช้วิธี Standard Plate Count (SPC) โดยตัวอย่างที่ความเจือจาง  $10^2$  และ  $10^3$  ปริมาตร 5  $\mu\text{L}$  ถูกนำไป drop บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA) ที่บรรจุอยู่ในภาชนะ 96-micro plate จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.4.5 การศึกษาคุณลักษณะการเจริญเติบโตโดยการใช้ Sigmoidal Function

ขั้นตอนการคำนวณถูกแสดงดังสมการที่ 3.2 ข้อมูลจากการทดลองถูก save เป็น text file จากนั้นเปิดข้อมูลดังกล่าวด้วยการใช้โปรแกรม Microsoft excel 2007 ข้อมูลถูกเก็บในแผ่นงานและ sorted by เงื่อนไขการเพาะเลี้ยง (e.g., ชนิดของอาหาร) ข้อมูลเวลาในการเพาะเลี้ยงและข้อมูลความหนาแน่นในการเจริญเติบโตของลิสทีเรียได้ถูกนำไปวิเคราะห์โดยการใช้โปรแกรม SigmaPlot 10.0 เพื่อที่จะ



ประมาณค่า  $\mu_{\max}$  อัตราการเจริญเติบโตถูก created และการ fitting curve ได้ถูก applied ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดถูก fixed เข้าไปใน Sigmoid 4 พารามิเตอร์ ดังแสดงในสมการ 3.1

$$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x - x_0)}{b}}} \quad (3.1)$$

$y_0$  = the amount of initial inoculation of *Listeria*

$x_0$  = the first derivative maximum of the function

$a$  = maximum value of *Listeria* growth

$b$  = slope of curve

$\mu_{\max}$  = maximum specific growth rate,  $1/b$  ( $h^{-1}$ )

ความชันของกราฟที่ fit ถูกดำเนินการโดยสมการทางคณิตศาสตร์โดยการใช้ข้อมูลจริงที่เก็บได้ เพื่อให้ได้ค่า  $1/b$  ( $\mu_{\max}$ ) ที่อาจแสดงถึงผลค่าจริงในการสะท้อนผลการทดลอง

เจียเชื้อ *L. innocua* และ *L. ivanovii* บริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) 50 mL แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คูดเชื้อใน TSB 500  $\mu\text{L}$  ลงในสารละลายกลีเซอรอล 20% ปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากันในเอพเพนดอร์ฟเก็บรักษาเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ  $-18^{\circ}\text{C}$  ก่อนนำมาใช้ในการทดลองจึงคูด stock culture 100  $\mu\text{L}$  ลงใน TSB 100 mL แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ  $10^9$  CFU/mL

### 3.5 การทดลองศึกษาสภาวะการแยกเชื้อบนอาหารแข็งที่เหมาะสม

#### 3.5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

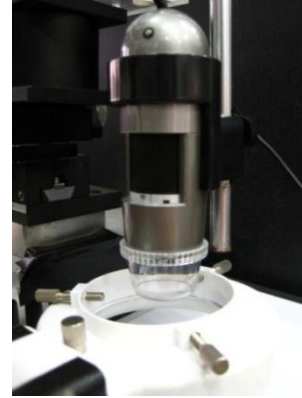
เจียเชื้อ *L. innocua* และ *L. ivanovii* บริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) 50 mL แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 h คูดเชื้อใน TSB 500  $\mu\text{L}$  ลงในสารละลายกลีเซอรอล 20% ปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากันในเอพเพนดอร์ฟ เก็บรักษาเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ  $-18^{\circ}\text{C}$  ก่อนนำมาใช้ในการทดลองจึงคูด stock culture 100  $\mu\text{L}$  ลงใน TSB 100 mL แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 h จำนวนเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ  $10^9$  CFU/mL

### 3.5.2 การถ่ายรูป

การศึกษารูปร่างของเชื้อ *Listeria* ใช้อุปกรณ์การถ่ายรูป 2 แบบ แบบแรกเป็นกล้องถ่ายภาพดิจิทัลทั่วไปดังแสดงในรูปที่ 3.1 ซึ่งใช้ถ่ายรูปของงานเพาะเชื้อทั้งงาน และอีกแบบเป็นกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลดังแสดงในรูปที่ 3.2 ซึ่งใช้ถ่ายรูปเฉพาะส่วนในงานเพาะเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต



รูปที่ 3.2 กล้องถ่ายรูปดิจิทัล



รูปที่ 3.3 กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล

### 3.5.3 ขั้นตอนการทดลอง

การทดลองนี้สามารถแบ่งได้เป็น 5 ส่วนหลัก โดยขั้นตอนการทดลองนั้นแตกต่างกันในแต่ละหัวข้อ

#### 3.5.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการทดลอง

##### 3.5.3.1.1 การประยุกต์ใช้ 24-microwell plate และงานเพาะเชื้อพลาสติก

ในการศึกษาน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อถูกทดลองใน 24 micro-well plates และงานเพาะเชื้อพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 cm. โดยนำมาเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของแต่ละภาชนะและเลือกภาชนะใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในแต่ละการทดลอง เพื่อให้ได้รูปถ่ายที่ชัดเจนและสามารถนำไปวิเคราะห์ลักษณะของโคโลนีได้

##### 3.5.3.1.2 การตั้งค่า USB bandwidth ของกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล

การตั้งค่า USB bandwidth ของกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลสามารถตั้งค่าได้จาก 1 ถึง 8 และเพื่อให้ได้ภาพที่คมชัดที่สุดจึงต้องเลือกค่าที่เหมาะสมในแต่ละการทดลอง ในการทดลองนี้ใช้ *L. innocua* เป็นตัวแทนของ *Listeria* โดยเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oxford agar, PALCAM agar, และ OCLA ในงานเพาะเชื้อพลาสติก

### 3.5.3.1.3 การเปรียบเทียบพื้นหลังของรูปถ่าย

ในการทำงานเกี่ยวกับการตั้งค่า USB bandwidth การแทรกพื้นหลังโดยการนำแผ่นใสหรือกระดาษสีต่างๆ วางใต้จานเพาะเชื้อในขณะที่ถ่ายรูปจะทำให้รูปของโคโลนีคมชัดมากขึ้นและช่วยในขั้นตอนการวิเคราะห์ผล การศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบพื้นหลังในแบบต่างๆ ได้แก่ แผ่นใสสีฟ้า แผ่นใสสีชมพูเข้ม แผ่นใสสีชมพูอ่อน แผ่นใสสีส้ม กระดาษสีดำ และกระดาษสีขาว

### 3.5.3.2 การทำ Serial dilution เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

การทดลองนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของ *L. innocua* โดยสารละลายที่ใช้ในการเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น Serial dilution มีสองชนิดเพื่อนำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ 0.85% NaCl และ TSB ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ spread plate ประมาณ  $10^3$  CFU/mL ปริมาตร 20  $\mu$ L บนอาหาร TSA, Oxford agar, PALCAM agar, และ OCLA ในจานเพาะเชื้อพลาสติก หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.5.3.3 การศึกษาผลของการเสื่อมสภาพเนื่องจากความร้อนในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### OCLA

การศึกษาผลของการเสื่อมสภาพเนื่องจากความร้อนได้ทำการเปรียบเทียบผลจากวิธีการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอกับวิธีการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหม้อนึ่งความดันไอให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นระยะเวลา 15 นาที ส่วนไมโครเวฟให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 100°C เป็นระยะเวลา 1 นาที การทดลองนี้ใช้ *L. innocua* เป็นตัวแทนของ *Listeria* ใช้ TSB ในการเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น Serial dilution ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ spread plate ประมาณ  $10^3$  CFU/mL ปริมาตร 20  $\mu$ L บนอาหาร OCLA ในจานเพาะเชื้อพลาสติก หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.5.3.4 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ (Selective media)

#### 3.5.3.4.1 การศึกษาผลของสารคัดเลือก (selective agent) ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ในอาหาร non-selective agar (TSA) และ OCLA agar base ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii*

การศึกษาแรกเป็นการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันระหว่าง TSA สูตรมาตรฐานและ TSA ที่เติมสารคัดเลือกซึ่งนำมาจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ในอัตราส่วนต่างๆ กัน สารคัดเลือกถูกนำมาเติมในอัตราส่วน 25%, 50%, และ 100% ของความเข้มข้นใน

สูตรมาตรฐานของ OCLA การศึกษาที่สองเป็นการเปรียบเทียบระหว่าง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลงในอัตราส่วน 100% และอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA สูตรมาตรฐานซึ่งมีปริมาณของสารคัดเลือกลงเท่ากัน สำหรับการศึกษานี้ใช้ 24-microwell plate ใส่อาหารเพาะเชื้อ และใช้ TSB ในการเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น serial dilution ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^3$  CFU/mL ปริมาตร 10  $\mu$ L หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 84 ชั่วโมง

#### 3.5.3.4.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตรมาตรฐาน

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตรมาตรฐานต่างๆ ได้แก่ Oxford agar, PALCAM agar, และ OCLA โดยทำการเพาะเชื้อใน 24-microwell plate การเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น serial dilution ใช้ TSB ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU/mL และ  $10^3$  CFU/mL สำหรับ *L. ivanovii* และ *L. innocua* ตามลำดับ ปริมาตร 10  $\mu$ L หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

#### 3.5.3.5 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ (Selective media)

##### 3.5.3.5.1 การศึกษาผลของสารคัดเลือกลง (selective agent) ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ในอาหาร non-selective agar (TSA) และ OCLA agar base ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii*

การศึกษาแรกเป็นการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันระหว่าง TSA สูตรมาตรฐานและ TSA ที่เติมสารคัดเลือกลงซึ่งนำมาจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ในอัตราส่วนต่างๆ กัน สารคัดเลือกลงนำมาเติมในอัตราส่วน 25%, 50%, และ 100% ของความเข้มข้นในสูตรมาตรฐานของ OCLA การศึกษาที่สองเป็นการเปรียบเทียบระหว่าง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลงในอัตราส่วน 100% และอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA สูตรมาตรฐานซึ่งมีปริมาณของสารคัดเลือกลงเท่ากัน สำหรับการศึกษานี้ใช้ 24-microwell plate ใส่อาหารเพาะเชื้อและใช้ TSB ในการเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น serial dilution ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^3$  CFU/mL ปริมาตร 10  $\mu$ L หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 84 ชั่วโมง

### 3.5.3.5.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

#### จำเพาะสูตรมาตรฐาน

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตรมาตรฐานต่างๆ ได้แก่ Oxford agar, PALCAM agar, และ OCLA โดยทำการเพาะเชื้อใน 24-microwell plate การเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น serial dilution ใช้ TSB ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU/mL และ  $10^3$  CFU/mL สำหรับ *L. ivanovii* และ *L. innocua* ตามลำดับ ปริมาตร 10  $\mu$ L หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

### 3.5.3.6 การดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะเพื่อพัฒนาการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *Listeria*

#### spp.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Listeria* สามารถแบ่งออกได้เป็นสองส่วนหลัก ส่วนแรกเป็น agar base และอีกส่วนคือสารคัดเลือก (selective agent) อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ Oxford, PALCAM, และ OCLA ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารคัดเลือกได้แก่ TSA ซึ่งถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบผลของจำนวนโคโลนีสุดท้ายที่นับได้ โดยใช้ *L. innocua* เป็นตัวแทนของเชื้อ *Listeria* ในการศึกษา ใช้ TSB เป็นสารละลายเจือจางความเข้มข้นเชื้อในขั้น serial dilution ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^3$  CFU/mL ปริมาตร 10  $\mu$ L โดยทำการเพาะเชื้อในจานเพาะเชื้อพลาสติก และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

### 3.5.3.6.1 การศึกษาผลของสารคัดเลือกที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ

#### สูตรมาตรฐานที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

การศึกษานี้สารคัดเลือกจะถูกเติมในขั้นตอนการเตรียมอาหารแข็งจำเพาะที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นในสูตรมาตรฐาน ซึ่งในแต่ละ agar base จะใช้ชุดสารคัดเลือกของตัวเอง เช่น Oxford agar base จะถูกเติมสารคัดเลือกชุด Oxford formulation ที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น

### 3.5.3.6.2 การศึกษาผลของสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร PALCAM และ OCLA

ในการทดลองนี้ได้นำสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford มาเติมในขั้นตอนการเตรียมอาหารแข็งจำเพาะที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นในสูตรมาตรฐาน Oxford แต่นำมาคัดแปลงใช้ใน PALCAM และ OCLA agar base

### 3.5.3.6.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารคัดเลือกลูกสูตรและความเข้มข้นกับสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.6.5.1 และ 3.6.5.2 จะถูกนำมาเปรียบเทียบจนผลศาสตร์การเจริญเติบโตโดยรวมในหัวข้อนี้

### 3.5.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

หลังจากการถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล รูปถ่ายที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Image J 1.43U เพื่อหาขนาดพื้นที่ของแต่ละโคโลนี ( $\text{mm}^2$ ) โดยมีการสุ่มเลือกจำนวน 5 โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำข้อมูลมาเข้าสมการ logistic ด้วยโปรแกรม Sigma Plot 10.0 เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ได้แก่  $A_{\text{max}}$  (ขนาดพื้นที่ผิวที่ใหญ่ที่สุดของโคโลนี),  $t_i$  (inflection point),  $\mu_{\text{max}}$  (ค่าสูงสุดของอัตราจำเพาะ) และค่าความชันที่ inflection point ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ข้อมูลบางส่วนถูกนำไปวิเคราะห์ t-test และอีกส่วนถูกนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยซอฟต์แวร์ SPSS ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นของ 95% ( $P < 0.05$ )

$$A = \frac{A_{\text{max}}}{1 + e^{-2\mu_{\text{max}}(t - t_i)}}$$

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาภาพรวมของชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก โดยในการพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์จะพัฒนาในส่วนของอาหารเหลวเพิ่มจำนวน (enrichment broth) และอาหารแข็ง (selective agar) การพัฒนาอาหารเหลวเป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและการคัดเลือกเชื้อลิสทีเรียอิน โนคัวในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบคัดเลือก โดยในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบคัดเลือกของเชื้อแอลอิน โนคัว ร่วมกับการศึกษาผลของสารยับยั้งที่เหมาะสมสามารถยับยั้งเชื้อแข่งขัน แต่ในขณะเดียวกัน ไม่มีผลกระทบต่อเพิ่มจำนวนของเชื้อลิสทีเรีย การศึกษาผลของสารยับยั้งสำหรับการตรวจพบเชื้อลิสทีเรีย นั้น สารยับยั้งที่ใช้เป็นสารยับยั้งตามวิธีมาตรฐานทั่วไป ได้แก่ เอ็นจีเอฟไอเอส ไอดีเอฟ ยูเอส เอฟดีเอ เอ็นเอ็มเคแอล ไอเอสไอ เอโอเอซี และยูเอสดีเอ-เอฟเอสไอเอส สำหรับในส่วนของการศึกษาเพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของสารอาหาร สารชีวะ และสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อลิสทีเรีย ทั้งนี้ความเข้าใจที่มีต่อกลไกภายในของแต่ละองค์ประกอบจะนำไปสู่ความสามารถในการบ่งชี้เชื้อลิสทีเรีย และการปรับปรุงการตรวจหาเชื้อ ซึ่งจะนำไปสู่การลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์เชื้อและทำให้ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว

โดยในส่วนแรกเป็นการศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน (non-selective) และขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบจำเพาะ (selective enrichment) ในงานวิจัยนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ถูกดำเนินการ โดยการใช้เทคนิคที่ได้มีการพัฒนาเพื่อศึกษาปฏิกิริยาในภาชนะ 96 deep well เพลทที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ การตอบสนองของเซลล์เพื่อเป็นทางเลือกของอาหารเหลวไม่จำเพาะ และมีการศึกษาผลของสารยับยั้ง การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์และการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ได้มีการติดตามศึกษาโดยลักษณะสำคัญของการเจริญเติบโตที่ศึกษา ได้แก่ ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (maximum specific growth rate;  $\mu_{max}$ ) ถูกประเมินศึกษาด้วยการใช้สมการทางคณิตศาสตร์ Sigmoidal-type และเปรียบเทียบเงื่อนไขการเพาะเลี้ยงที่สภาวะต่าง ๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เชื้อ *Listeria* spp. และการคัดเลือกเป้าหมายหลักเพื่อทำความเข้าใจพารามิเตอร์การเจริญเติบโตที่มีความสัมพันธ์กัน เพื่อช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นและมีความสามารถในการคัดเลือกเพียงเชื้อ *Listeria* spp. ในอาหารเหลวเพิ่มจำนวน ผลจากการค้นพบนี้สามารถนำไปสู่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนที่มีประสิทธิภาพมาก ช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

#### 4.1 การสำรวจกระบวนการในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน

โดยทั่วไปจำนวนของ *Listeria* spp. ที่พบในตัวอย่างอาหารมีแนวโน้มปริมาณที่น้อย (Sheridan et. al., 1994a; Jay, 1996; Walsh et. al., 1998) ในหลายๆ งานวิจัยได้รายงานว่า *Listeria monocytogenes* บ่อยครั้งที่เกิดการบาดเจ็บจากการที่อาหารผ่านกระบวนการและผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสามารถที่จะถูกเป็นประโยชน์เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในสถานการณ์เหล่านั้น สารเสริมในการเพิ่มจำนวนได้ถูกนำเสนอเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณในระดับที่มากเป็นระดับปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ในหลายวิธี กลุ่มของนักวิจัยหลายๆ กลุ่มได้ทำการทดลองโดยการใช้อาหารเหลวไม่เพิ่มจำนวนเพื่อที่จะพัฒนาการเพิ่มจำนวนของ *Listeria* และการตรวจวิเคราะห์ (Kosonpisit et. al., 2011; Sheridan et. al., 1994b; Budu-Amoako et. al., 1992; Beumer et. al., 1996; Walsh et. al., 1998; Vaz-Velho et. al., 2000 และ Nancy และ Herman, 2004) วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อที่จะค้นหาเงื่อนไขสภาวะการเพิ่มจำนวนที่เหมาะสมซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

##### 4.1.1 รายละเอียดการทดลอง

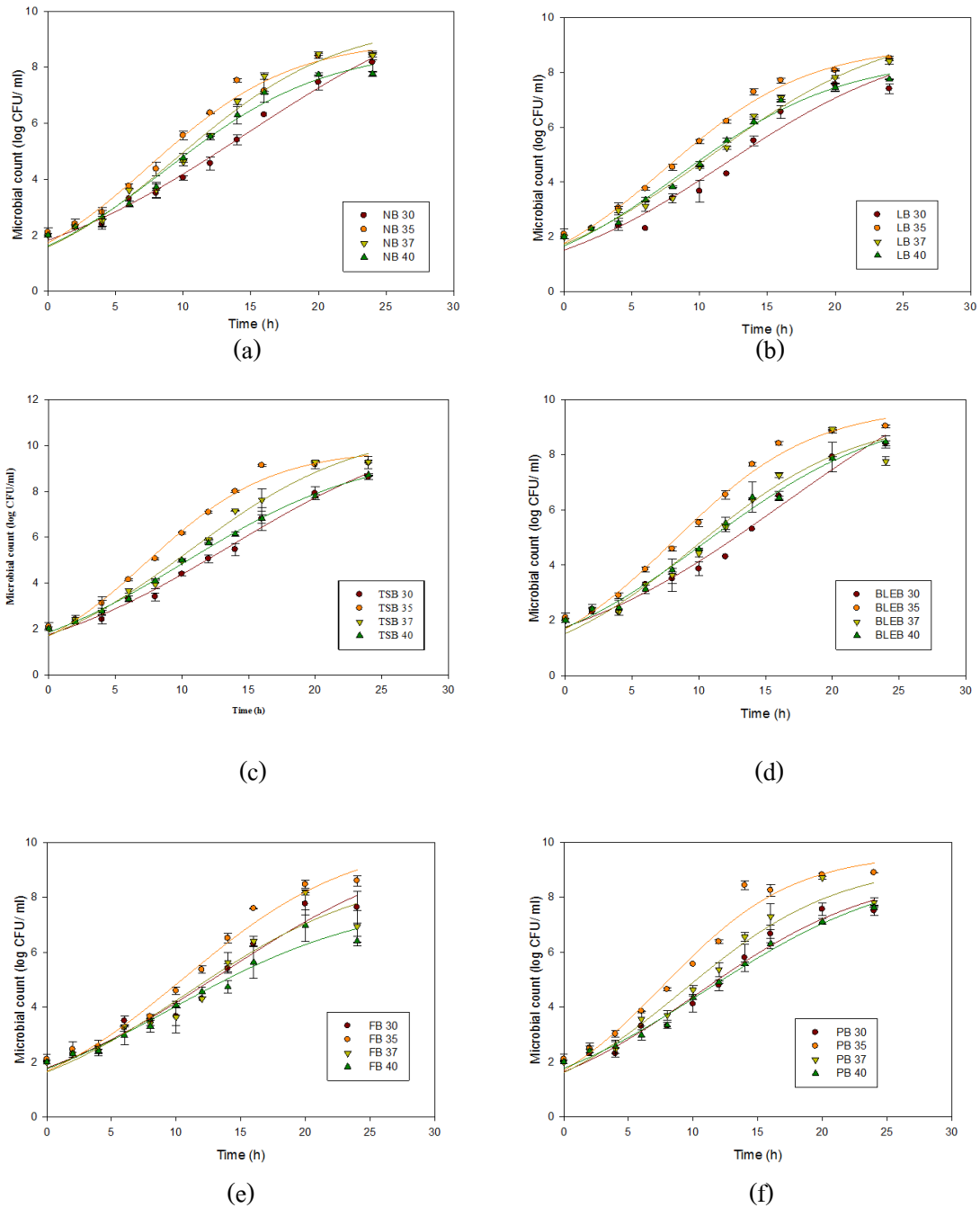
ในการทดลองนี้เชื้อ *Listeria innocua* ถูกทำให้เพิ่มจำนวนด้วยการบ่มจนได้ปริมาณเชื้อที่ 9 log CFU/mL ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นของ *L. innocua* ถูกเตรียมที่ 2-3 log CFU/mL โดยใช้เทคนิคการเจือจางปริมาณ 100  $\mu$ L ของเชื้อ *L. innocua* ถูกนำไป inoculated ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟขนาด 1.5 mL ที่มีการเติมน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 900  $\mu$ L อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจำนวนถูกรวมกันในขวด duran ที่ 20 mL สำหรับในแต่ละเงื่อนไข ความเข้มข้นของปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต้องการของเชื้อ *L. innocua* ที่ 2-3 log CFU/mL ถูก inoculated ลงในขวดที่ได้มีการเตรียมอาหารเหลวเพิ่มจำนวน ทำการผสมอาหารดังกล่าวด้วยการใช้เครื่องผสม ทั้งนี้ปริมาณของโคโลนีทั้งหมดถูกสังเกตและนับโคโลนี

##### 4.1.2 ผลการทดลองและอภิปรายผล

อาหารเหลวเพิ่มจำนวนที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ อาหารเหลวไม่จำเพาะทั่วไป (conventional non-selective) เช่น Nutrient broth (NB), Lactose broth (LB), และ Tryptic soy broth (TSB) และอาหารเหลวจำเพาะสำหรับ *Listeria* เช่น Buffered *Listeria* Enrichment Broth base (BLEB), Fraser broth (FB), และ Palcam broth (PB) โดยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจำเพาะถูกพัฒนามาจาก standard selective enrichment media ซึ่งด้วยยังมาตรฐานที่ใช้นำมาจากส่วนประกอบในสูตรอาหารมาตรฐานทั่วไป โดย

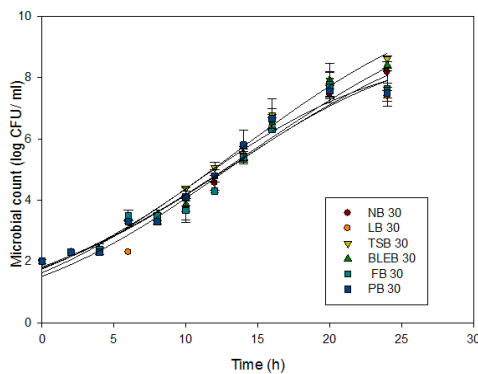


รูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงกราฟ profile ของเชื้อ *L. innocua* ที่เวลาต่างๆ ของเจริญเติบโตในอาหาร non-selective media และอุณหภูมิการบ่มที่ต่างกัน

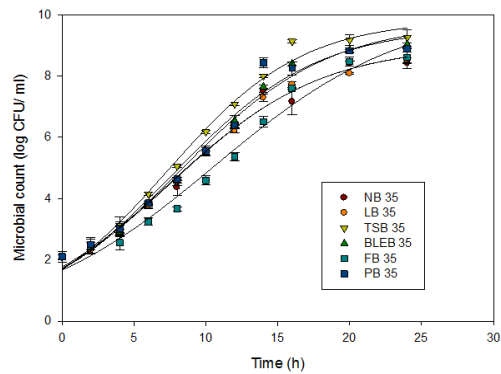


รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกันในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. innocua* ในอาหารเหลวไม่จำเพาะที่แตกต่างกัน a) nutrient broth (NB), b) Lactose broth (LB), c) Tryptic soy broth (TSB), d) Buffered Listeria Enrichment Broth base (BLEB), e) Fraser broth (FB), และ f) Palcam broth (PB)

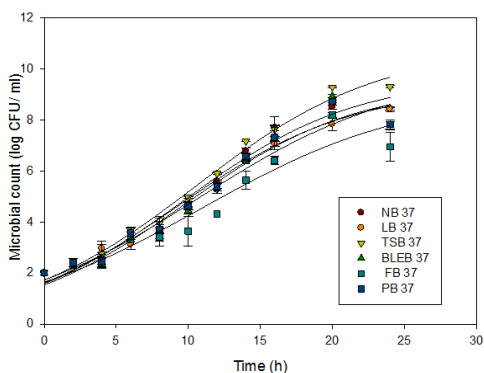
โดยจากการทดลองจะเห็นได้ว่ากราฟ profile การเจริญเติบโตของผลของอุณหภูมิการบ่มที่มีต่อเชื้อ *L. innocua* ก่อนข้างที่จะชัดเจนที่อุณหภูมิการบ่ม 35°C กราฟการเจริญเติบโตของอาหารเหลวไม่จำเพาะทุกอาหาร ลักษณะของกราฟก่อนข้างที่จะมีลักษณะชันในระหว่างช่วง exponential growth phase โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ก่อนข้างสูงกว่าเงื่อนไขอื่นๆ โดยเงื่อนไขการเจริญเติบโตนี้สะท้อนให้เห็นการขยายตัวที่ดี โดยช่วงรอยต่อที่ด้านล่างและด้านบน (อุณหภูมิ 30 และ 40°C ตามลำดับ) การเจริญเติบโตของ *L. innocua* ถูกพบว่าจะไม่ใช่ตัวเลือกที่ดีที่สุด การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C แสดงให้เห็นอัตราการเจริญเติบโตที่ช้า อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิดังกล่าวยังคงสามารถที่จะมีประโยชน์เป็นทางเลือกเพื่อที่จะทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตของเชื้อ psychrophiles อื่นๆ ที่จำเป็น การประเมินประนอมการเจริญเติบโตของ *L. innocua* อยู่ในขอบเขตช่วงอุณหภูมิของการบ่มระหว่าง 35 และ 37°C สำหรับเชื้อ *L. innocua*



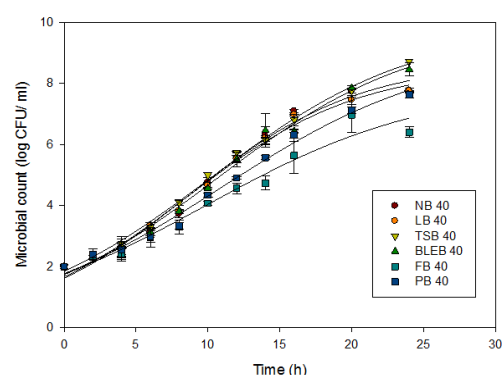
(a)



(b)



(c)



(d)

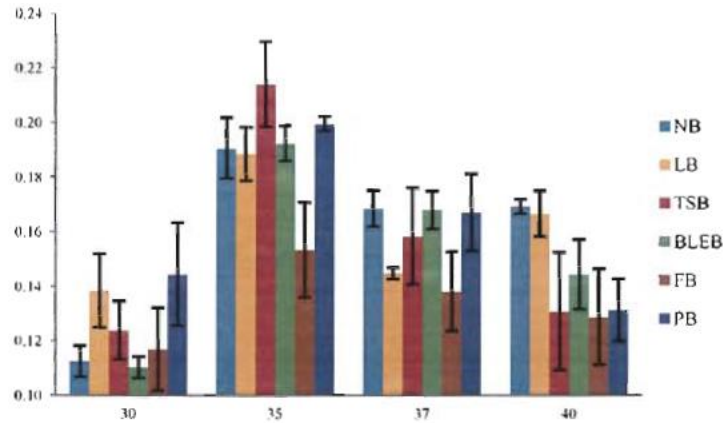
**รูปที่ 4.2** ผลของการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิการบ่ม a) 30°C b) 35°C c) 37°C d) 40°C

รูปที่ 4.2 แสดงให้เห็น profile การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. innocua* ในอาหารที่ศึกษาชนิดต่างๆ โดยกราฟเหล่านี้ได้ให้ลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในอาหารเหลวไม่จำเพาะที่แตกต่างกันที่ปริมาณอุณหภูมิการบ่มที่  $30^{\circ}\text{C}$  ไม่สัมพันธ์กับชนิดของ non-selective media ที่ใช้ในการโตของ *L. innocua* เมื่ออุณหภูมิในการบ่มสูงกว่า  $35^{\circ}\text{C}$  การมาบรรจบกันของการเจริญเติบโตเริ่มที่จะปรากฏ โดยอาหาร TSB ปรากฏว่ามีความสามารถในการเพิ่มจำนวน *L. innocua* กว่าอาหารชนิดอื่นๆ กราฟเหล่านี้ช่วยให้นับผลของอุณหภูมิต่อความเข้มข้นของเซลล์สุดท้าย ที่อุณหภูมิการทดลอง  $30^{\circ}\text{C}$  มันชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำมากๆ อัตราการเจริญเติบโตจะช้าในทุกเมทาบอลิซึมของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในแต่ละสูตรอาหารไม่ได้มีผลกับการเจริญเติบโตของ *L. innocua* การเจริญเติบโตของเซลล์มีปริมาณน้อย เมื่ออุณหภูมิในการบ่มเป็นสภาวะที่เหมาะสม ความแตกต่างขององค์ประกอบในอาหารเริ่มที่จะมีลักษณะจำเพาะของการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.2b)

จากกราฟเหล่านี้ มีการสำรวจพบว่ามีสิ่งที่น่าสนใจคือ องค์ประกอบของสารอาหารในอาหารเหลวจำเพาะทำให้การเจริญเติบโตของ *L. innocua* ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับที่ทดลองอื่นๆ ในอาหาร media โดยทั่วไป ด้วยอุณหภูมิในการบ่มที่สูง ( $35-40^{\circ}\text{C}$ ) การ combined ผลของการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ที่มาจากการทดลองต่างๆ บางที่ที่ปริมาณของเซลล์สูงเนื่องมาจากอุณหภูมิมีผลทำให้เกิดการแย่ง ไม่เหมาะสมกับองค์ประกอบของอาหารใน non-selective medium เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สารเคมีและเอนไซม์เกิดปฏิกิริยาที่อัตราเร็วมากและอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เป็นที่แน่นอนที่อุณหภูมิมากขึ้นมีผลต่อโปรตีนเกิดความเสียหาย ดังนั้นการเจริญเติบโตและกิจกรรมเมทาบอลิซึมเพิ่มขึ้นถึงจุดที่เป็นการทำลายปฏิกิริยา อย่างเป็นที่ชัดเจนที่อุณหภูมิมากกว่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมส่งผลในทางลบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แม้ว่าอาหารโดยส่วนใหญ่แล้ว เช่น TSB ที่อุณหภูมิในการบ่ม  $40^{\circ}\text{C}$  นำไปสู่ปริมาณเซลล์ที่จาก  $9 \log \text{CFU/mL}$  (อุณหภูมิในการบ่มที่  $35 - 37^{\circ}\text{C}$ ) เหลือเพียง  $8 \log \text{CFU/mL}$  และกราฟในช่วง exponential เกิดขึ้นช้าอย่างมีนัยสำคัญ

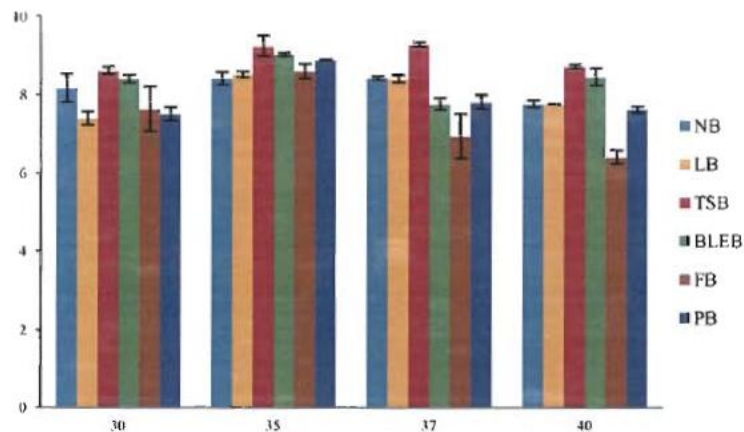
การทำนายลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นรูปที่ 4.1 และ 4.2 ได้ประยุกต์ใช้สมการทางคณิตศาสตร์ sigmoid ในการนำเสนอรูปแบบการเจริญเติบโตของ *L. innocua* โดยการใช้สับเซตที่แตกต่างกันและเงื่อนไขการบ่มที่อุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกัน จากผลข้อมูลการทดลองพบเห็นพ้องตรงกันกับสมการที่ได้ทำนาย และแบบจำลองมีความเหมาะสม รูปที่ 4.3 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของ *L. innocua* ในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะที่อุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกัน ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดแสดงให้เห็นสภาวะที่ *L. innocua* ถูกเลี้ยงเพาะบ่มใน TSB ที่อุณหภูมิ  $35^{\circ}\text{C}$  และด้วย

เหมือนกัน ที่อุณหภูมินี้ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดโดยเฉพาะที่อาหาร Frase Broth ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด จากการติดตามการเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37°C แสดงให้เห็นว่าให้อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดที่น้อยกว่า ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C จะให้อัตราการเจริญเติบโตที่น้อย นั้นหมายความว่า *L. innocua* โตช้ามากที่อุณหภูมิเหล่านี้



**รูปที่ 4.3** ผลของอาหารเหลวเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะชนิดต่างๆ และอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. innocua* ที่มีต่อค่า  $\mu_{\max}$  (h<sup>-1</sup>)

เมื่อพิจารณาปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สุดท้าย (รูปที่ 4.4) ของ *L. innocua* ในอาหารเหลวไม่จำเพาะที่อุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกัน เชื้อ *L. innocua* ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงใน TSB ที่อุณหภูมิการบ่ม 35 และ 37°C ให้ปริมาณจำนวนเซลล์สุดท้ายที่ตีมาก ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเห็นด้วยสอดคล้องกับ Farber และ Peterkin (1991) ซึ่งรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. อยู่ระหว่าง 30 และ 37°C โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ระหว่าง 40 และ 45 °C (Smith et. al., 1991)



**รูปที่ 4.4** ผลของอาหารเหลวเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะชนิดต่างๆ และอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อปริมาณเซลล์ของเชื้อ *L. innocua*

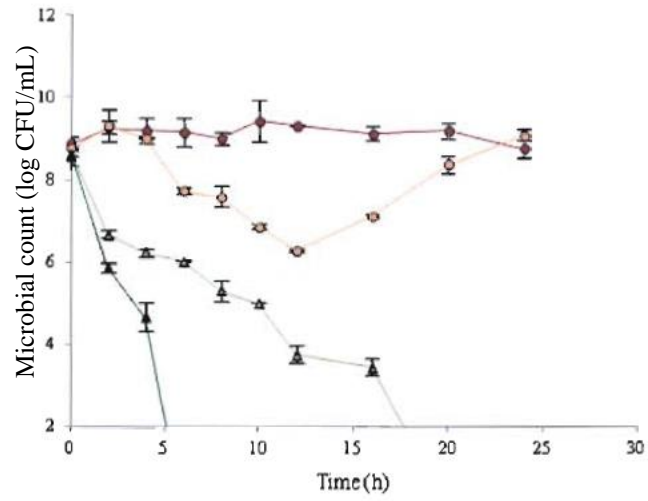
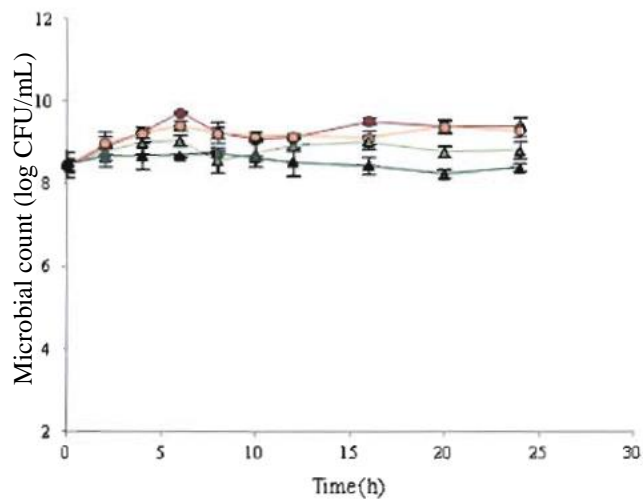
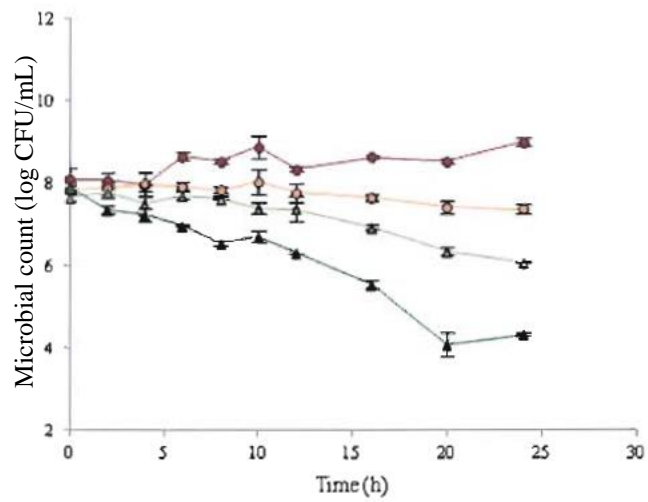
## 4.2 การทดสอบผลของตัวยับยั้งจาก Conventional selective agents ที่มีต่อการเจริญและการคัดเลือกเชื้อ *L. innocua*

ในการทดลองนี้ *L. innocua*, *E. coli*, และ *S. aureus* ถูกเตรียมใน TSB จนได้ปริมาณเซลล์จนถึง 9 log CFU/mL ด้วยขบวนการผสมพู่ ปริมาณเซลล์ 120  $\mu$ L ของแต่ละเชื้อถูก inoculated ลงใน 1.2 mL ที่เป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบที่บรรจุด้วยอาหารต่างชนิดกันและความเข้มข้นของ selective agents ใน 96 deep well plate โดยสาร selective agents รวมถึง acriflavine, Polymysin B, nalidixic acid, และลิเชียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงถูกควบคุมที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อที่จะศึกษาไคนेटิกของการเจริญเติบโต ปริมาณ โคโลนีถูกตรวจพบด้วยการใช้อาหารแข็ง

### 4.2.2 ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.2.2.1 อคริฟลาเวิน

ผลของอคริฟลาเวินที่เป็นสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ถูกแสดงผลในรูปแบบที่ 4.5 ซึ่งได้แสดงกราฟไคนेटิกเปรียบเทียบ profile การเจริญเติบโตระหว่าง *L. innocua*, *E. coli*, และ *S. aureus* ในอาหารเหลว TSB ที่มีการเติมอคริฟลาเวินที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน รูปที่ 4.5(a) แสดง profile การเจริญเติบโตของ *L. innocua* ที่ใช้ความเข้มข้นของอคริฟลาเวินที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดลอง 5 mg/L พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการตายของเชื้อ *L. innocua* ที่ความเข้มข้นของอคริฟลาเวิน 10 mg/L แสดงให้เห็นการลดลงของปริมาณเซลล์ที่ 10 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นเซลล์มีการฟื้นตัวกลับเข้ามา ปริมาณเซลล์ถูกเพิ่มขึ้น บางทีเนื่องมาจาก *L. innocua* สามารถที่จะปรับตัวมันเองต่อความทนทานต่อพิษของอคริฟลาเวิน ความต้านทานความสามารถที่มีต่ออคริฟลาเวินของเชื้อ *L. innocua* สามารถที่จะถูกปรับตัวมันเองต่อการทนความเป็นพิษของ acriflavine โดยเนื้อแท้ความต้านทานของอคริฟลาเวินของ *L. innocua* ถูกดำเนินโดยสารที่ปล่อยออกมาที่เกิดขึ้นเมื่อมันถูกชักนำ (Mata et. al., 2000)

(a) *L. innocua*(b) *E. coli*(c) *S. aureus*

รูปที่ 4.5 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. innocua*, *E. coli*, และ *S. aureus* ที่มีต่อครีฟลาวิน;

(●) อคริฟลาวิน 5 mg/mL, (●) อคริฟลาวิน 10 mg/mL, (▲) อคริฟลาวิน 20 mg/mL, และ (▲) อคริฟลาวิน 40 mg/mL

อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 mg/L ความเข้มข้นของเชื้อ *L. innocua* ลดลงเป็นฟังก์ชันกับเวลาของการบ่มและแสดงให้เห็นไม่มีสัญญาณบ่งบอกของการฟื้นคืนของเซลล์ รูปที่ 4.6(a) ได้จำลองให้เห็นถึงความเป็นพิษที่แรงของอคริฟลาวินในอาหารที่มี *L. innocua* เมื่อความเข้มข้นของอคริฟลาวินมากกว่า 40 mg/L มันสามารถที่จะนำไปสู่ปริมาณของ *L. innocua* ที่ลดลงจาก 9 log CFU/mL ไปเป็นน้อยกว่า 2 log CFU/mL ภายในระยเวลาน้อยกว่า 5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามในการทดลองที่ 20 mg/L การถูกทำลายของ *L. innocua* ถูกลดน้อยลง และมันใช้เวลานานมากกว่า 18 ชั่วโมงเพื่อที่จะลดความหนาแน่นของเซลล์ให้น้อยกว่า 2 log CFU/mL การประยุกต์ใช้อคริฟลาวินเพื่อเป็นตัว selective media จาก 5 ไปเป็น 40 mg/L ถูกพบว่าเป็นอันตรายอย่างมากในการแยก *L. innocua* เพราะมันส่งผลกระทบต่อการเจริญของ *L. innocua* อย่างมีนัยสำคัญจากที่ไม่ทำให้เซลล์ตายไปเป็นการลดปริมาณของเซลล์

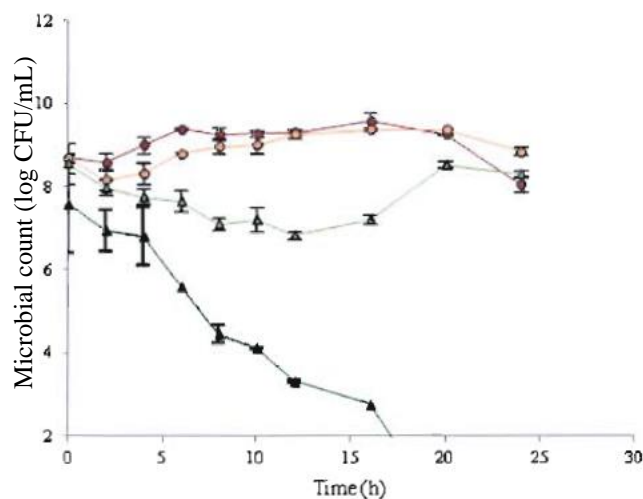
ผลของอคริฟลาวินที่มีต่อ *E. coli* ถูกพิจารณาว่ามีความแตกต่างกับเชื้อ *L. innocua* (รูปที่ 4.5(b)) ในขณะที่ *L. innocua* ถูกพบว่ามีความไวในการถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 mg/L ความหนาแน่นของ *E. coli* มีความเสถียรภาพในการทดลองที่มีอคริฟลาวิน นักวิจัยบางคนรายงานความสามารถในการทนของ *E. coli* ที่มีต่ออคริฟลาวิน สำหรับเชื้อ wild-type *E. coli* K-12 สามารถที่จะทนความเข้มข้นของอคริฟลาวินที่แตกต่างกันได้ (Nakamura, 1968) ต่อมามันถูกบ่งชี้ว่าเป็น Gene *acrA+* ซึ่งถูกติดตั้งใกล้กับส่วนของโครโมโซม ซึ่งเป็นส่วนด้านทาน *E. coli* ที่มีต่ออคริฟลาวิน แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* โดยทั่วไปส่วนใหญ่แล้วมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและสารฆ่าเชื้อมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกโดยส่วนใหญ่ (Nikaido, 2011) มันถูกพบเป็นสมมติฐานว่าช่องพอรินที่ด้านนอกของเมมเบรนจำกัดการแทรกซึมส่งผ่านของไฮโดรฟิลิกและสารไลโปฟิลิก (Nikai, 1985; Ple'siat, 1992) โดยเพิ่มเติม Phalanisong (2008) ได้แสดงให้เห็นความซับซ้อนของเมมเบรนด้านนอกของแบคทีเรียแกรมลบ พบว่ามีความประสิทธิภาพในการป้องกันแบคทีเรียแกรมลบ

ผลของอคริฟลาวินที่มีต่อการเจริญของ *S. aureus* ถูกแสดงในรูปที่ 4.5(c) อคริฟลาวินมีผลต่อ *S. aureus* ในทิศทางเดียวกัน ตามที่มันไม่มีผลต่อ *L. innocua* แต่มันมีผลกับเชื้อ *S. aureus* อย่างไรก็ตามมีความทนทานต่อความเป็นพิษของอคริฟลาวินมากกว่า *L. innocua* ที่ความเข้มข้นน้อยของอคริฟลาวินในช่วงระหว่าง 5 ถึง 10 mg/L มันมีผลกระทบกับ profile การเจริญเติบโตน้อย การเจริญของเชื้อ *L. innocua*

หยุดนิ่งลดลงที่ 20 mg/L ผลของอคริฟลาวินที่มีต่อการเจริญเติบโตพบเป็นที่สังเกตว่า การลดลงของค่า log เป็น 2 และ 4 orders ของ magnitude ถูกสังเกตเมื่อความเข้มข้นของอคริฟลาวินถูกเพิ่มขึ้นจาก 20 และ 40 mg/L หลังจาก 24 ชั่วโมงของการบ่มตามลำดับ อาจจะเป็นเพราะเชื้อ *S. aureus* ถูกเตรียมโดยธรรมชาติด้วย peptidoglycan และความหนาของเซลล์ที่ผนังทนทานต่อการตอบสนองการมีอยู่ของตัวยับยั้งอย่างเช่น อคริฟลาวิน การพัฒนาโดยกลไกตามธรรมชาติแล้ว เป็นผลจากความต้านทานของอคริฟลาวินที่สูงกว่าในเชื้อ *S. aureus* มากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Kawai et. al., 2009)

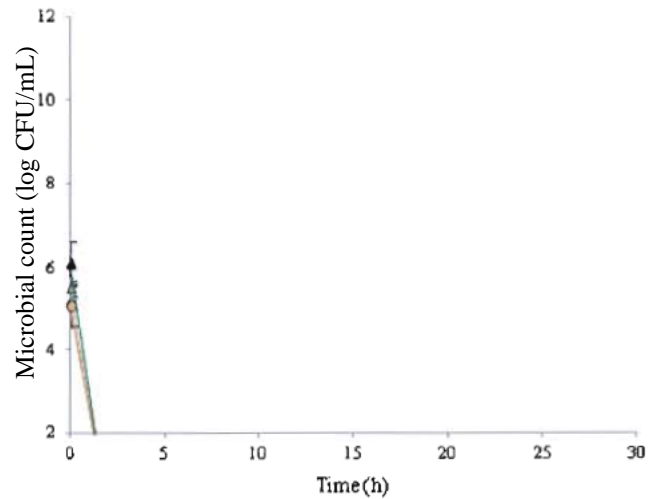
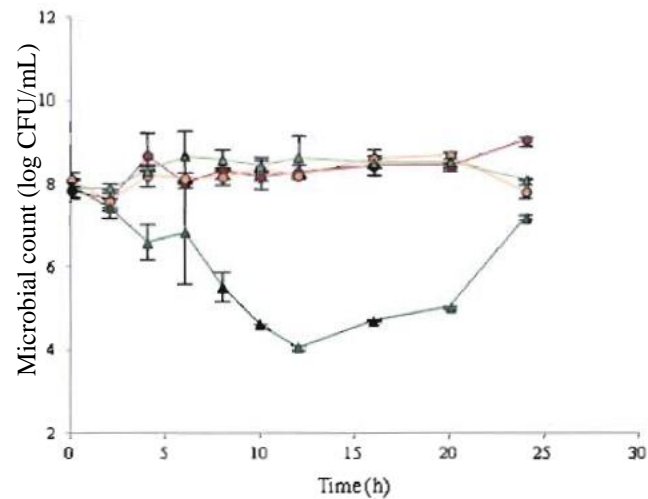
#### 4.2.2.2 โพลีมัยซิน B

ผลของโพลีมัยซิน B ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. innocua* และความสามารถในการคัดเลือก *E. coli* และ *S. aureus* ถูกนำเสนอในรูปแบบที่ (4.6) Polymyxin B เป็นสาร selective agent โดยส่วนใหญ่ที่มีผลต่อการมีชีวิตทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*L. innocua* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) มันถูกทำให้เสียหายอย่างชัดเจนที่ระดับความเป็นพิษที่สูงของแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก Polymyxin B สามารถที่จะลดความหนาแน่นเซลล์ *L. innocua* อย่างรวดเร็วเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น เป็น 100 mg/L มันสามารถที่จะลดปริมาณเซลล์ของ *L. innocua* จากที่ปริมาณเซลล์ 8 log CFU/mL ไปเป็น 2 log CFU/mL ภายใน 16 h โดยการฟุ้งตัวของ *L. innocua* ถูกสังเกตที่ปริมาณของสาร 50 mg/L ที่ปรากฏผลก่อนหน้าที่ความเข้มข้นของอคริฟลาวินที่ 20 mg/L



(a) *L. innocua*



(b) *E. coli*(c) *S. aureus*

รูปที่ 4.6 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ (a) *L. innocua* (b) *E. coli* และ (c) *S. aureus* ที่มีต่อ

Polymyxin B; (●) Polymyxin B 10 mg/L, (○) Polymyxin B 20 mg/L, (▲) Polymyxin B 50 mg/L และ (△) Polymyxin B 100 mg/L

ที่ระดับของ Polymyxin B พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10 mg/L *E. coli* ถูกปรากฏพบว่าลดลงต่ำกว่า 2 log CFU/mL ภายใน 2 ชั่วโมงของการบ่ม ความแตกต่างของ Polymyxin B ที่มีต่อ *L. innocua* และ *E. coli* มีประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกจากแบคทีเรียแกรมลบ ผลกระทบเริ่มต้นของ Polymyxin B ที่มีต่อแบคทีเรียแกรมบวกถูกสังเกตโดยการทดลองกับเชื้อ *S. aureus* การประยุกต์ใช้ Polymyxin B ครอบคลุมการเจริญเติบโตของ *S. aureus* เมื่อความเข้มข้นของสารน้อยกว่า 50 mg/L ดังนั้น profile การเจริญเติบโตของ *S. aureus*

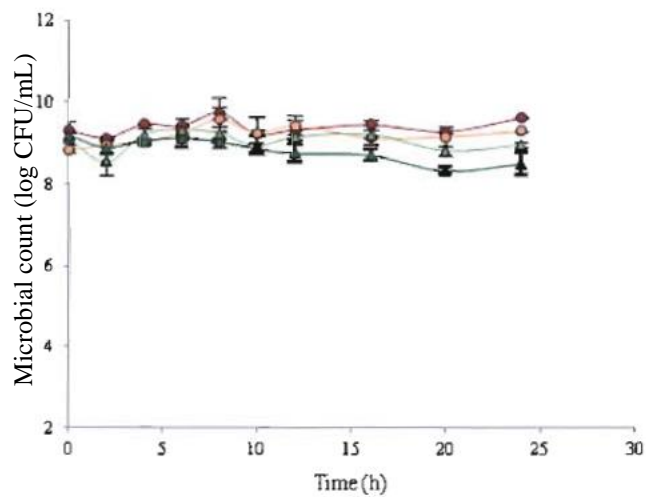
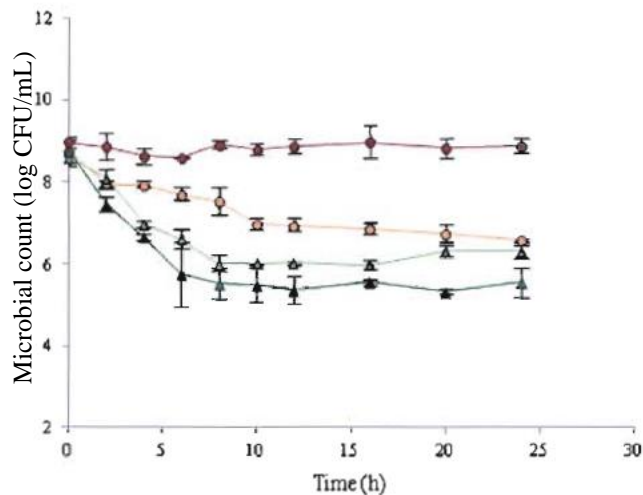
คงที่ตลอดช่วงของการบ่ม เฉพาะที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 mg/L ของ Polymyxin B ที่มีผลกับการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ด้วยอัตราการลดของปริมาณเซลล์ที่คงที่จาก 8 log CFU/mL ไปเป็น 4 log CFU/mL ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการบ่ม อย่างไรก็ตามจำนวนความหนาแน่นของเซลล์ที่บ่มหลังจากนั้นสูงขึ้นจนกระทั่งเสร็จสิ้นการบ่ม ในการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวนความหนาแน่นของเซลล์จากผลกระทบของ Polymyxin B ที่มีต่อแบคทีเรียแกรมบวกแสดงให้เห็นมีการฟื้นตัวของเซลล์เมื่อความเข้มข้นของ Polymyxin B ไม่มากกว่าระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์

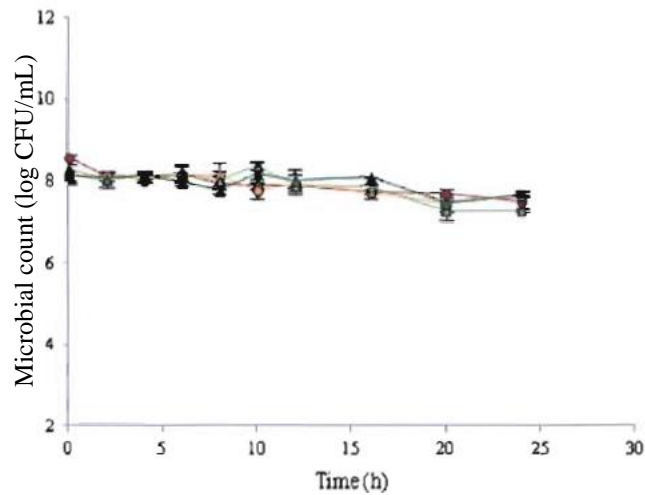
บทบาทของ Polymyxin B ที่เป็นสารยับยั้งพบว่าเป็นจุดที่ดีโดย Polymyxin B เป็น โพลีเปปไทด์ที่ซึ่งมีกรู๊ปอะมิโนในฟอร์มของวงจรรูปเปปไทด์และเชื่อมต่อกับกรดไขมัน โพลีเปปไทด์มีลักษณะจำเพาะพิเศษนี้ที่มีเซลล์เมมเบรนเหมือนกับฟอสโฟไลปิดและไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรีย (Hsu Chen และ Feingold, 1973; Newton, 1956; Teuber, 1973; Teuber และ Bader, 1971) ปฏิกริยาเหล่านี้ทำให้เซลล์มีความสามารถในการแทรกซึมผ่านได้มากสำหรับสารจากภายนอก เป็นผลให้เซลล์ตายได้ มันปรากฏสามารถที่จะทำให้เกิดเสียหายในแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เพราะว่าแบคทีเรียแกรมลบบมีผนังเซลล์ที่บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้แบคทีเรียแกรมลบบมีไลโปโพลีแซคคาไรด์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นมันง่ายต่อความเสียหาย

#### 4.2.2.3 Nalidixic acid

สารยับยั้งของ Nalidixic acid ที่มีต่อ *L. innocua* ถูกแสดงในรูปที่ 4.8 โดยการเจริญของ *L. innocua* ในอาหารที่มี Nalidixic acid ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ให้ผลที่แตกต่างจาก *E. coli* แต่เหมือนกับ *S. aureus* แบคทีเรียแกรมบวก *L. innocua* และ *S. aureus* ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ถูกยับยั้งโดย Nalidixic acid การเจริญเติบโตของ *L. innocua* ที่มีต่อ Nalidixic acid มีความคงที่ในขณะที่ *S. aureus* ปริมาณเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อบ่มเพาะในอาหาร TSB ที่มีความเข้มข้นของ Nalidixic acid ที่แตกต่างกัน แบคทีเรียแกรมลบถูกทำให้เซลล์ขาดตอนโดย Nalidixic acid ที่แตกต่างกัน แต่มีประสิทธิภาพที่น้อยใน Polymyxin B ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10 mg/L ความหนาแน่นของเซลล์ของ *E. coli* ก่อนข้างมีความเสถียรตลอดช่วงเวลากการบ่ม ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองที่สูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณเซลล์ลดลง ที่ความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่มีต่อปริมาณเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องภายใน 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะคงที่อยู่ที่ 5 log CFU/mL จนกระทั่งบ่มเสร็จ

กลไกการยับยั้งของ Polymyxin B และ Nalidixic acid เป็นสาเหตุให้เกิดความแตกต่างของความสามารถในการยับยั้ง โดย Polymyxin ทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบหรือองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นผลให้มีความสามารถในการแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์นำไปสู่การที่เซลล์ตายอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ Nalidixic acid ไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยการไปก่อกิจกรรมของ DNA ระบบของ DNA gyrase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ DNA ซึ่งทำให้กิจกรรมดังกล่าวมีความช้า เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของ Polymyxin B (Bhanot et. al., 2001; Andriole, 1998) และด้วยเหตุนี้ความเข้มข้นต่ำ Nalidixic acid เป็นเพียงออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย นั้นหมายถึงมันยับยั้งการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์แต่ไม่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Goss et. al., 1964)

(a) *L. innocua*(b) *E. coli*

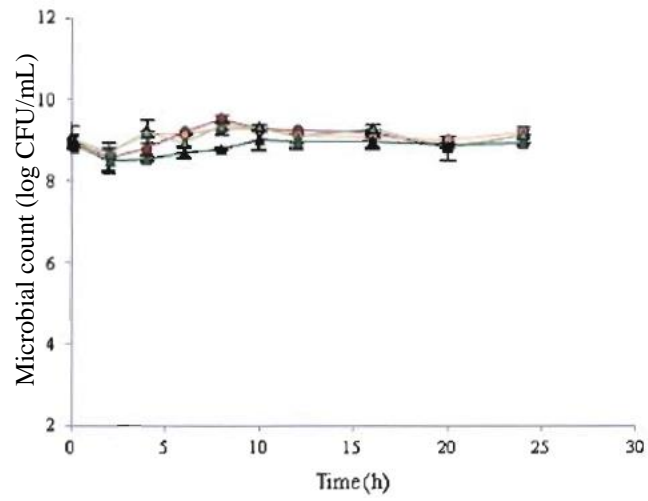
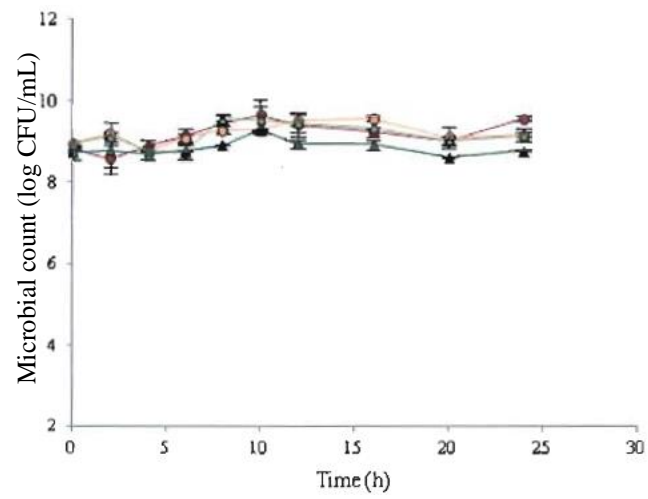
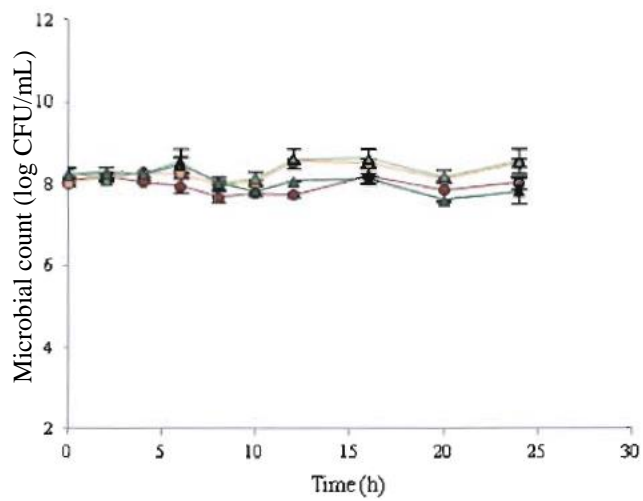
(c) *S. aureus*

รูปที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ (a) *L. innocua*, (b) *E. coli* และ (c) *S. aureus* ที่มีต่อ

nalidixic; (●) nalidixic 10 mg/L, (○) nalidixic 20 mg/L, (▲) nalidixic 50 mg/L และ (▲) acriflavine 100 mg/L

#### 4.2.2.4 Lithium chloride

ผลของความแตกต่างของความเข้มข้นของลิเทียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญของ *L. innocua*, *E. coli*, และ *S. aureus* ถูกแสดงผลในรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า Lithium chloride ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาในอาหารเหลว Lithium chloride ให้ไฮเปอร์โทนิกของการเจริญ โดยเงื่อนไขของการบังคับน้ำเพื่อแพร่จากเซลล์และเป็นผลทำให้เซลล์ตาย อย่างไรก็ตาม *L. innocua* และ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ทนทานต่อเกลือสูง มันสามารถที่จะทนเกลือได้สูงถึง 10% w/v (Seeliger และ Jonesy, 1986; Shahamat และ Woodbine, 1980; Carr และ Hageman, 2005) การทดลองใช้อาหารเหลวที่ความเข้มข้นสูงสุด 20 g/L หรือ 2% w/v ซึ่งที่ความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นการทำลายเชื้อจุลินทรีย์จึงไม่ปรากฏให้เห็น

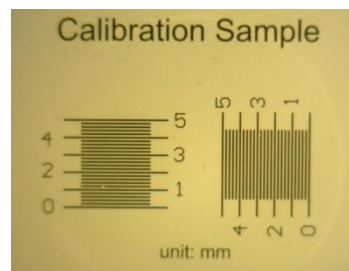
(a) *L. innocua*(b) *E. coli*(c) *S. aureus*

**รูปที่ 4.8** กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ (a) *L. innocua* (b) *E. coli* และ (c) *S. aureus* ที่มีสารตัว  
ยับยั้งลิเทียมคลอไรด์ (●) ลิเทียมคลอไรด์ 5 g/L, (○) ลิเทียมคลอไรด์ 10 g/L, (▲) ลิเทียมคลอไรด์ 15 g/L และ (△) ลิเทียมคลอไรด์ 20 g/L

### 4.3 การตรวจสอบลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

#### 4.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการทดลอง

ในการถ่ายรูปแบบการทดลองครั้งนี้อุปกรณ์ที่ใช้แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ กล้องถ่ายภาพดิจิทัลและกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล โดยกล้องถ่ายภาพดิจิทัลใช้ในการถ่ายรูปแบบงานเพาะเชื้อทั้งงาน ส่วนกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลใช้ในการถ่ายรูปแบบเฉพาะส่วนของงานเพาะเชื้อ ซึ่งค่าจุมรวมแสงและระยะทางระหว่างกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลและงานเพาะเชื้อจะถูกปรับเปลี่ยนเพื่อเพิ่มกำลังขยายและความคมชัดของรูปภาพขณะที่ใช้ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้แก่ 24 micro-well plate และงานเพาะเชื้อพลาสติกเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต ส่วนการหาขนาดจริงของโคโลนีได้มีการนำแผ่นแสดงระยะหน่วยมิลลิเมตรในรูปที่ 4.9 มาใช้เทียบมาตราส่วน นอกจากนี้ยังมีการตั้งค่า USB bandwidth ในการถ่ายรูปแบบของกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลและการนำพื้นหลังสีต่างๆ นั้นมาตัดกับโคโลนีของเชื้อ *Listeria* เพื่อให้ได้รูปที่ชัดเจนที่สุด

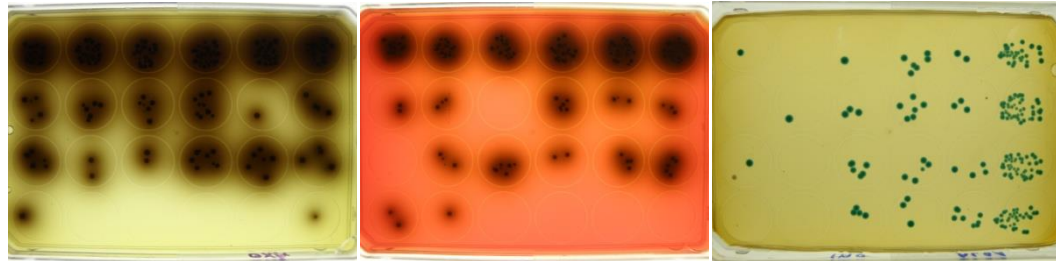


**รูปที่ 4.9** แผ่นแสดงระยะหน่วยมิลลิเมตร

#### 4.3.1.1 การประยุกต์ใช้ 24-microwell plate และงานเพาะเชื้อพลาสติก

ในการทดลองนี้ได้ใช้ 24 micro-well plate และงานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. เป็นภาชนะใส่อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแทนงานเพาะเชื้อมาตรฐานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. เพื่อลดปริมาณการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและพื้นที่ในการบ่มตัวอย่าง สำหรับ 24 micro-well plate ได้นำมาใช้ในการทดลองก่อนงานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. โดยหยเชื้อ *Listeria* ที่ผ่านการเจือจางแบบ serial dilution มาแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในแต่ละพื้นที่วงกลม ซึ่งพบว่าการบ่มเชื้อในระยะแรกโคโลนีของเชื้อ *Listeria* แต่ละโคโลนีเจริญขึ้นแยกกันอย่างชัดเจน แต่เมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานโคโลนีบางส่วนจะขยายขนาดจนกระทั่งเกิดการซ้อนทับกันและทำให้ไม่สามารถวัดขนาดของแต่ละโคโลนีได้

ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ดังนั้นจึงนำจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. ร่วมกับวิธีการ spread plate มาแก้ปัญหาดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 4.11 นอกจากนี้ยังมีการแบ่งพื้นที่ของจานเพาะเชื้อทั้งหมดออกเป็นส่วนๆ ด้วยการทำเส้นตารางแบ่งวงไว้ได้จานเพาะเชื้อ ระหว่างการถ่ายรูปเก็บผลการทดลองเพื่อให้ได้รูปโคโลนีที่ชัดเจนมากขึ้น

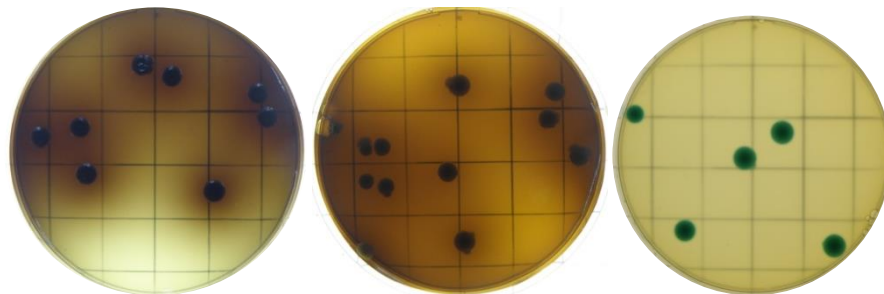


ก) Oxford agar

ข) PALCAM agar

ค) OCLA

**รูปที่ 4.10** รูปถ่ายโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะใน 24 micro-well plate จากกล้องถ่ายภาพดิจิทัล



ก) Oxford agar

ข) PALCAM agar

ค) OCLA

**รูปที่ 4.11** รูปถ่ายโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะในจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. จากกล้องถ่ายภาพดิจิทัล

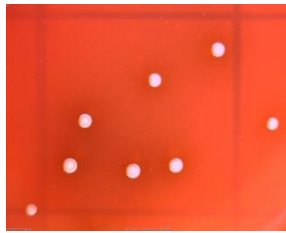
#### 4.3.1.2 การตั้งค่า USB bandwidth ของกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล

ผลจากการตั้งค่า USB bandwidth จากค่าที่ 1-8 แสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13 การเพิ่มค่า USB bandwidth ทำให้รูปถ่ายสว่างมากขึ้น อย่างไรก็ตามค่า USB bandwidth ที่เหมาะสมนั้นต่างกันไปในแต่ละสภาวะการทดลอง เช่น ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง สีของโคโลนี เป็นต้น จากรูปที่ 4.12 แสดงโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* ที่มีริ้วสีดำล้อมรอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM พบว่าค่า USB bandwidth ที่ 6 ทำให้รูปชัดเจนที่สุด ในกรณีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford ควรตั้งค่า USB bandwidth ที่ 6 เช่นเดียวกัน ส่วน

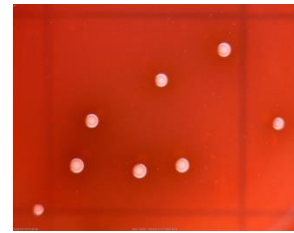
อาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ที่มีโคโลนีสีเขียวอมฟ้าของเชื้อ *L. innocua* ปรากฏขึ้นพบว่าค่า USB bandwidth ที่ 7 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดดังแสดงในรูปที่ 4.13



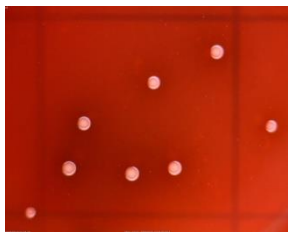
(ก) USB bandwidth = 1



(ข) USB bandwidth = 2



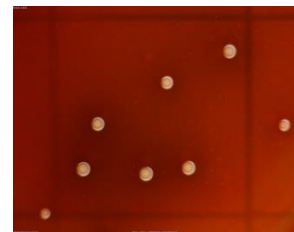
(ค) USB bandwidth = 3



(ง) USB bandwidth = 4



(จ) USB bandwidth = 5



(ฉ) USB bandwidth = 6



(ช) USB bandwidth = 7



(ซ) USB bandwidth = 8

รูปที่ 4.12 ผลจากการตั้งค่า USB bandwidth ในการถ่ายรูปโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

PALCAM



(ก) USB bandwidth = 1



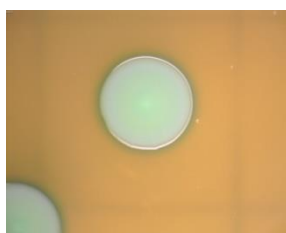
(ข) USB bandwidth = 2



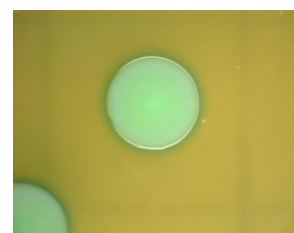
(ค) USB bandwidth = 3



(ง) USB bandwidth = 4



(จ) USB bandwidth = 5



(ฉ) USB bandwidth = 6





(ข) USB bandwidth = 7



(ค) USB bandwidth = 8

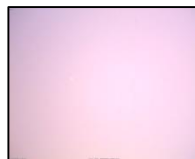
รูปที่ 4.13 ผลจากการตั้งค่า USB bandwidth ในการถ่ายรูปโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA

#### 4.3.1.3 การเปรียบเทียบพื้นหลังของรูปถ่าย

การเพิ่มสีพื้นหลังในระหว่างการถ่ายรูปเพื่อทำให้มองเห็นโคโลนีของเชื้อ *Listeria* ได้ชัดเจนมากขึ้น รูปที่ 4.14 แสดงพื้นหลังแบบต่างๆ ได้แก่ แผ่นใสสีฟ้า แผ่นใสชมพูอ่อน แผ่นใสชมพูเข้ม แผ่นใสสีส้ม กระดาษสีขาว และกระดาษสีดำ การนำพื้นหลังที่แตกต่างกันวางไว้ใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งจะให้รูปออกมาแตกต่างกัน โดยพบว่าการใช้กระดาษสีค่านั้นทำให้เห็นลักษณะของโคโลนีได้ชัดเจนที่สุดในทุกกรณีดังแสดงในรูปที่ 4.15 และ 4.16 ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้กระดาษสีดำเป็นพื้นหลังระหว่างการถ่ายรูป อย่างไรก็ตามอาจไม่จำเป็นต้องใช้พื้นหลังระหว่างการถ่ายรูปในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง Oxford และ PALCAM เปลี่ยนเป็นสีดำอย่างชัดเจนอันเนื่องมาจากการสลาย esculin ของเชื้อ *Listeria*



(ก) แผ่นใสสีฟ้า



(ข) แผ่นใสชมพูอ่อน



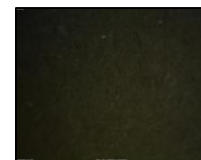
(ค) แผ่นใสชมพูเข้ม



(ง) แผ่นใสสีส้ม



(จ) กระดาษสีขาว

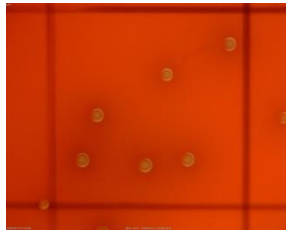


(ฉ) กระดาษสีดำ

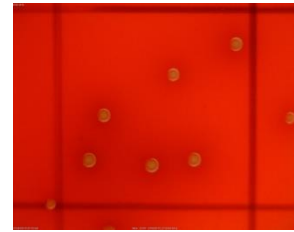
รูปที่ 4.14 พื้นหลังแบบต่างๆ ที่ใช้ในการถ่ายรูป



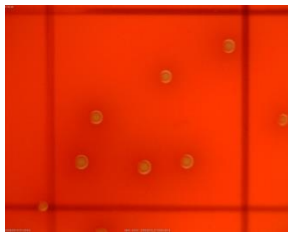
(ก) การใช้แผ่นใสสีฟ้า



(ข) การใช้แผ่นใสสีชมพูอ่อน



(ค) การใช้แผ่นใสสีชมพูเข้ม



(ง) การใช้แผ่นใสสีส้ม



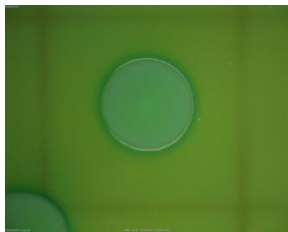
(จ) การใช้กระดาษสีขาว



(ฉ) การใช้กระดาษสีดำ

รูปที่ 4.15 การใช้พื้นหลังแบบต่างๆ ในการถ่ายรูปโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### PALCAM



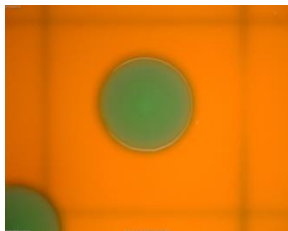
(ก) การใช้แผ่นใสสีฟ้า



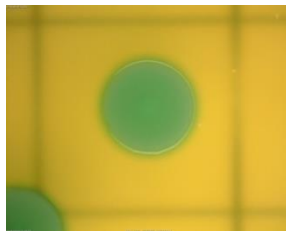
(ข) การใช้แผ่นใสสีชมพูอ่อน



(ค) การใช้แผ่นใสสีชมพูเข้ม



(ง) การใช้แผ่นใสสีส้ม



(จ) การใช้กระดาษสีขาว



(ฉ) การใช้กระดาษสีดำ

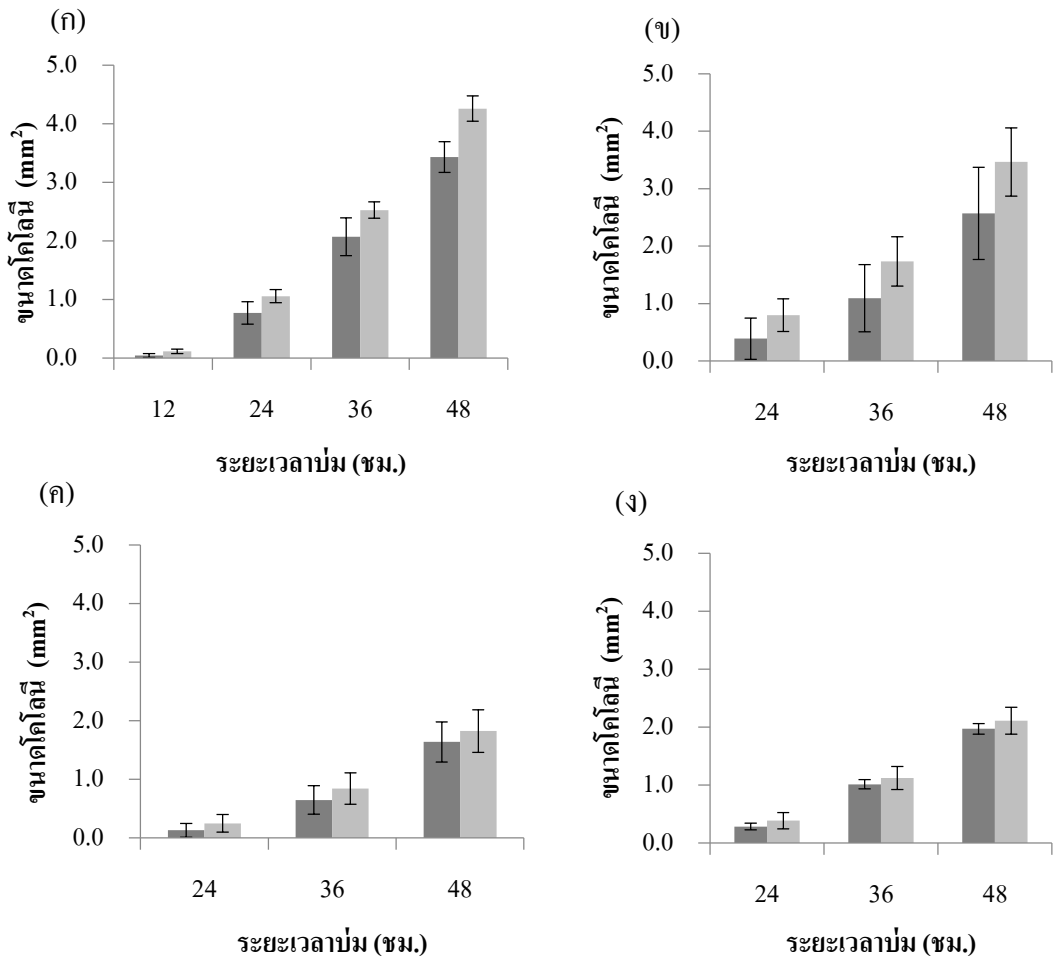
รูปที่ 4.16 การใช้พื้นหลังแบบต่างๆ ในการถ่ายรูปโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA

#### 4.3.2 การทำ Serial dilution เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

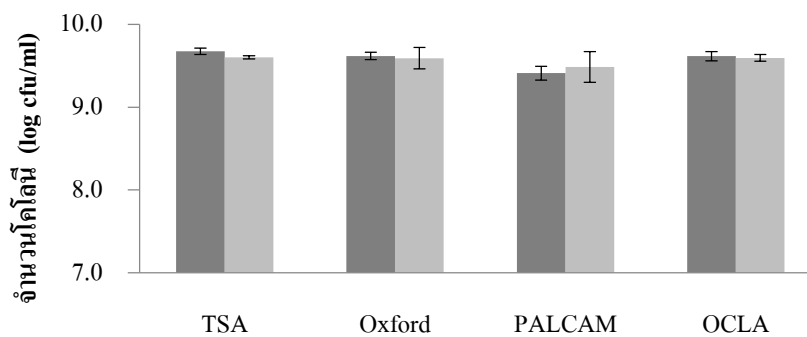
จุดประสงค์ในการศึกษานี้คือการพัฒนาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีการทำ serial dilution โดยสารละลายที่ใช้ในการเจือจางความเข้มข้นเชื้อ *L. innocua* มี 2 ชนิด ได้แก่ น้ำเกลือ (0.85% NaCl) และ Tryptic soy broth (TSB)

จากรูปที่ 4.17ก แสดงการเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* (mm<sup>2</sup>) ที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยพบว่าขนาดโคโลนีที่เจือจางด้วย TSB ใหญ่กว่าขนาดโคโลนีที่เจือจางด้วยน้ำเกลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 12, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่จำนวนโคโลนีที่นับได้ (log CFU/mL) นั้นไม่ต่างกัน ดังนั้นการเลือกสารละลายที่นำมาใช้ในขั้นตอนการทำ serial dilution มีผลต่อขนาดของโคโลนี อิทธิพลสำคัญของสารละลายที่ใช้เจือจางซึ่งมีต่อการยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียยังได้รับการยืนยันจากการศึกษาต่างๆ (Jayne-Williams, 1963; Mian et. al., 1997) โดย Straka และ Stokes (1957) รายงานการใช้ น้ำ เกลือ และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นสารละลายเจือจางพบว่า มีผลในการทำลายเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว สำหรับการทดลองในหัวข้อนี้มีขั้นตอนการทำ enrichment ในการเตรียมเชื้อเริ่มต้นซึ่งใช้ TSB เป็นอาหารจากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการทำ serial dilution ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนการทำ enrichment จะเข้าสู่สภาวะใหม่ในสารละลายที่ใช้ในการเจือจาง และเข้าสู่ระยะปรับตัว (Lag phase) ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อแบคทีเรียปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่หลังจากการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากผลการทดลองมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ *L. innocua* สามารถปรับตัวในสารละลาย TSB ได้ง่ายกว่าในน้ำเกลือ เพราะในระยะปรับตัวนั้นเป็นระยะที่แบคทีเรียเตรียมพร้อมในการสืบพันธุ์โดยการสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ (Jowett et. al., 2003) ดังนั้นกรณีนี้สารละลาย TSB ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อ *L. innocua* มีสารอาหารและมีสภาวะใกล้เคียงกับขั้นตอนการทำ enrichment มากกว่าน้ำเกลือ ดังนั้นการใช้สารละลาย TSB ในการเจือจางเชื้อ *L. innocua* จึงให้ผลที่ดีกว่า

อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารละลายในการเจือจางไม่มีผลต่อขนาดโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 4.17ข, 4.17ค, และ 4.17ง ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลจากสารคัดเลือก (selective agent) ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีอิทธิพลมากกว่าประโยชน์จากการใช้ TSB เป็นสารละลายเจือจาง นอกจากนี้รูปที่ 4.18 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่นับได้ (log CFU/mL) ระหว่างการใช้น้ำเกลือและ TSB เป็นสารละลายเจือจาง พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด



รูปที่ 4.17 การเปรียบเทียบขนาดโคโลนี (mm<sup>2</sup>) ของเชื้อ *L. innocua* ที่เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำเกลือ (■) และ TSB (■) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ก)TSA, (ข) Oxford, (ค) PALCAM และ (ง) OCLA



รูปที่ 4.18 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) ระหว่างการใช้น้ำเกลือ (■) และ TSB (■) เป็นสารละลายเจือจางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA, Oxford, PALCAM, และ OCLA ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 4.3.3 การศึกษาผลของการเสื่อมสภาพเนื่องจากความร้อนในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA

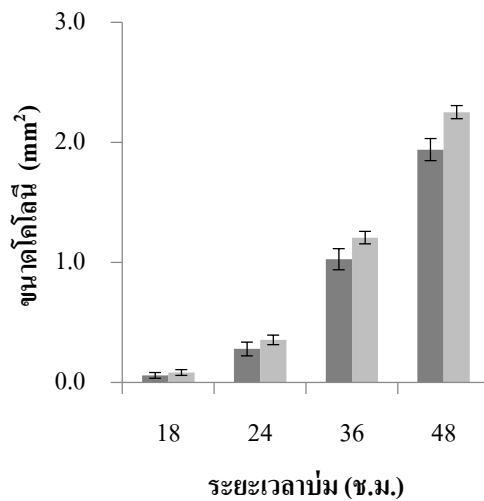
หัวข้อนี้ต้องการพัฒนาการให้ความร้อนในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ chromogenic *Listeria* agar (OCLA) เพื่อให้การตรวจสอบโคโลนีของเชื้อ *Listeria* รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเปรียบเทียบผลจากการให้ความร้อนระหว่างการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (วิธีปกติ) และการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่มีต่อการเสื่อมสลายของสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากรูปที่ 4.19 แสดงการเปรียบเทียบขนาดโคโลนีเชื้อ *L. innocua* ( $\text{mm}^2$ ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ซึ่งเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ด้วยวิธีการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน โดยพบว่าโคโลนีเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ที่เตรียมจากการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟมีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ที่เตรียมจากการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไออย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ที่ระยะเวลาการบ่ม 24, 36, และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult coliform agar ของ Supanivatin et al. (2010) ซึ่งตรวจสอบวิธีการให้ความร้อนในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการผสมอย่างรุนแรงร่วมกับการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ด้วยไมโครเวฟให้ผลดีที่สุดในการตรวจหาโคโลนีเชื้อ Coliforms และ *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการให้ความร้อนสูงเป็นระยะเวลานาน (ให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดัน) และวิธีการให้ความร้อนสูงเป็นระยะเวลาดสั้น ดังนั้นการให้ความร้อนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีบทบาทสำคัญต่อการสูญเสียสารอาหารและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของโคโลนี

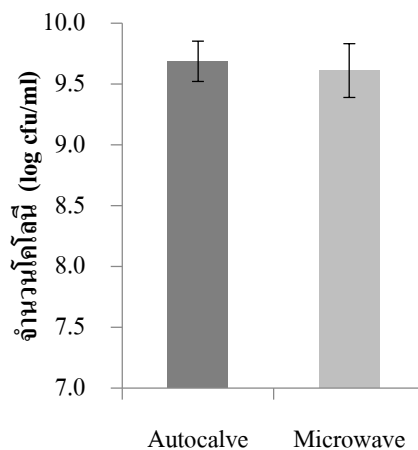
สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นในการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์เซลล์ ตัวอย่างเช่น กรดอะมิโนเป็นที่ต้องการในการสังเคราะห์โปรตีน และวิตามินเป็นที่ต้องการของโคเอนไซม์และหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ (Todar, 2011) ในปี 1991 Premaratne และคณะได้รายงานว่า *L. monocytogenes* Scott A ต้องการกลูโคส กลูตามีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน เมไทโอนีน วาลีน ซิสเทอีน ไบโอฟลวิน ไบโอทีน ไพอะมีน และกรดไทออกติก สำหรับการเจริญเติบโต ในขณะที่ฟรุกโทส แมนโนส เซลโลไบโอส ทรีฮาโลส มอลโทส กีเซอรอล กลูโคซามีน N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตกรณีขาดกลูโคส (Lungu et. al., 2009) อาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ประกอบด้วยกรดอะมิโนและวิตามินจาก enzymatic digest of animal tissues และ enzymatic digest of casein (Oxoid, 2010) อาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ยังประกอบด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส โซเดียมไพรูเวต และ X-glucopyranoside เพื่อสร้างพลังงานและมีส่วนในการขบวนการเมแทบอลิซึมกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม

สารอาหารบางส่วนนั้นไวต่อความร้อน เช่น วิตามิน บี1 (ไทอะมีน), บี5 (กรดแพนโทเทนิค), บี6 (ไพริดอกซีน), บี9 (โฟเลต) และ บี12 (โคบาลามีน) (Leskova et. al., 2006)

นอกจากขนาดโคโลนีเชื้อ *L. innocua* เจริญเติบโตได้ดีกว่าแล้ว วิธีการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟยังสามารถลดระยะเวลาในการให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อและทำให้ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อง่ายขึ้นอีกด้วย โดยลดระยะเวลาการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยรวมจาก 2 ชั่วโมง การให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เหลือเพียง 2-3 นาทีเท่านั้น สำหรับการนับจำนวนโคโลนีพบว่าวิธีการให้ความร้อนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 วิธีนั้นให้ผลไม่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.19 การเปรียบเทียบขนาดโคโลนี (mm<sup>2</sup>) ของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA ซึ่งเตรียมจากวิธีการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (■) และไมโครเวฟ (▒)



รูปที่ 4.20 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA

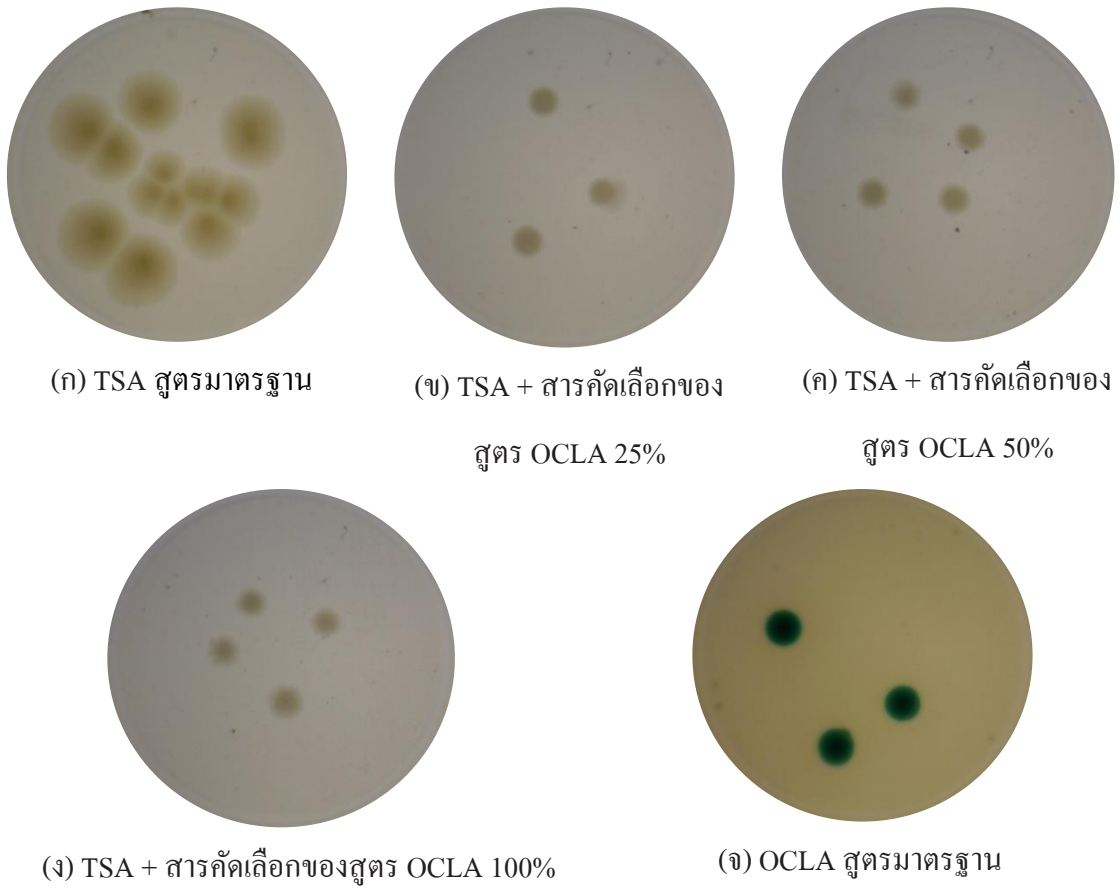
#### 4.3.4 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ (Selective media)

การศึกษานี้ต้องการตรวจสอบลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไม่จำเพาะ (TSA) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ (Oxford agar, PALCAM agar, และ OCLA) เพื่อเป็นพื้นฐานการศึกษาขั้นต่อไป

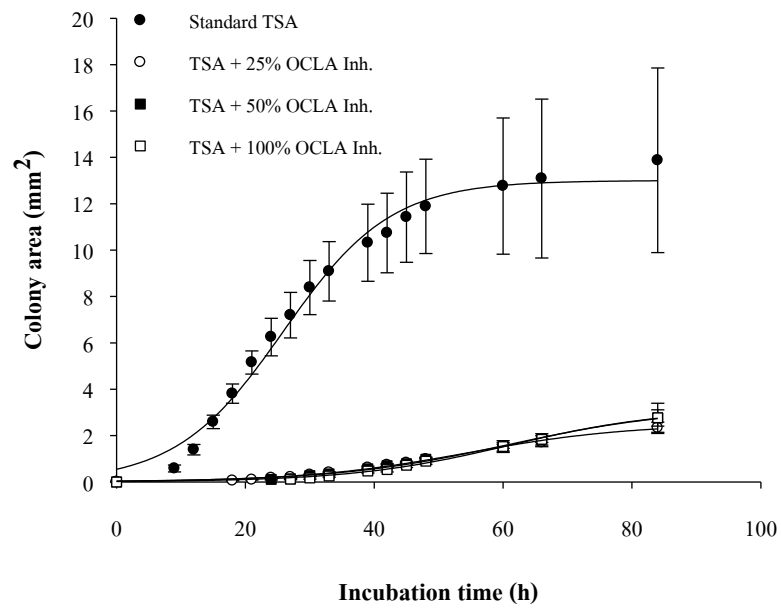
##### 4.3.4.1 การศึกษาผลของสารคัดเลือก (selective agent) ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA ในอาหาร non-selective agar (TSA) และ OCLA agar base ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii*

จากการเปรียบเทียบโคโลนีของเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สูตรมาตรฐานและ TSA ผสมกับชุดสารคัดเลือกที่นำมาจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาตรฐานขยายขนาดได้อย่างรวดเร็วและมีขนาดใหญ่ ในทางตรงกันข้ามเมื่อเริ่มใช้สารคัดเลือกกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โคโลนีของเชื้อ *L. ivanovii* ไม่สามารถขยายขนาดได้เท่ากับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สูตรมาตรฐาน โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สูตรมาตรฐานมีขนาดสุดท้ายถึง  $13 \text{ mm}^2$  ส่วนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารคัดเลือกมีขนาดสุดท้ายเพียง  $2-3 \text{ mm}^2$  ไม่เพียงขนาดสุดท้ายของโคโลนี ( $A_{\text{max}}$ ) เท่านั้นแต่ยังใช้ระยะเวลาในการตรวจพบนานกว่าด้วยซึ่งแสดงได้จากค่า  $t_f$  หรือระยะเวลาที่จุด inflection อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{\text{max}}$ ) ของเชื้อ *L. ivanovii* มีค่ามากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่สารคัดเลือกและความชันที่เวลา  $t_f$  หรืออัตราการขยายตัวของโคโลนี (Slope at  $t_f$ ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารคัดเลือกนั้นมากกว่า

จากการเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นสารคัดเลือกที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 25%, 50%, และ 100% พบว่าไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) ซึ่ง *L. ivanovii* อาจจะค่อนข้างไวต่อสารคัดเลือกเหล่านี้และความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารคัดเลือกเหล่านี้ไม่ใช่เชิงเส้น นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสมกับชุดสารคัดเลือกที่นำมาจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA ความเข้มข้น 100% กับอาหารเลี้ยงเชื้อ OCLA สูตรมาตรฐานซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้มีปริมาณของสารคัดเลือกเท่ากัน พบว่าโคโลนีเจริญเติบโตด้วยอัตราที่เท่ากันเพราะมีปริมาณสารคัดเลือกเท่ากันจึงยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* ได้ใกล้เคียงกัน นั่นหมายความว่า OCLA ต้องมีสารอาหารเพียงพอในการทำให้เชื้อ *L. ivanovii* เจริญเติบโตได้ดีพอๆ กับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ซึ่งแสดงได้จากขนาดโคโลนีสุดท้าย ระยะเวลาในการตรวจพบ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและอัตราการขยายตัวของโคโลนีที่ไม่แตกต่างกัน

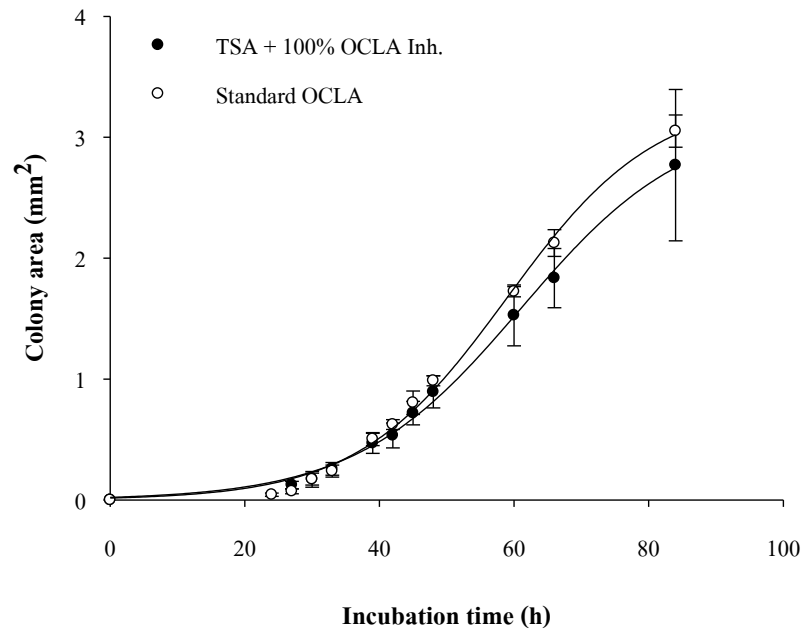


รูปที่ 4.21 โคลนเชื้อ *L. ivanovii* ที่ระยะเวลาการบ่ม 84 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สูตรมาตรฐาน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลงสูตร OCLA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน

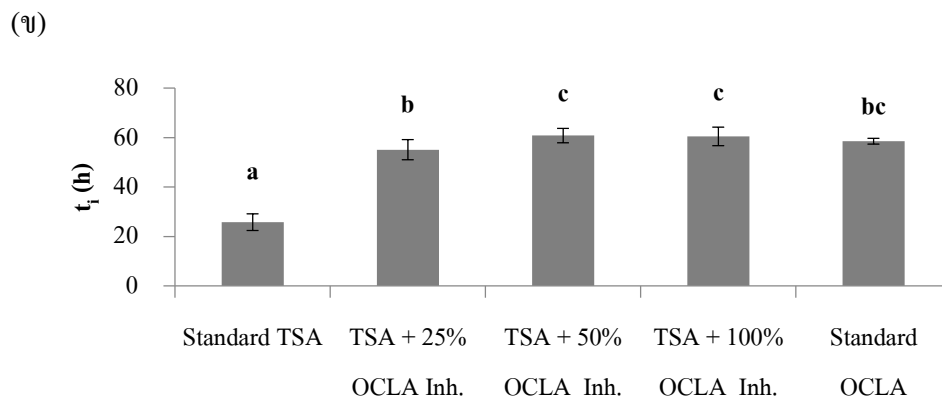
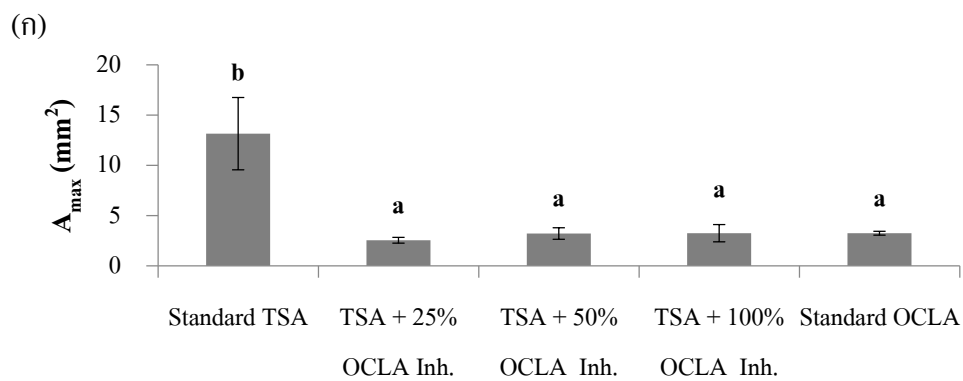


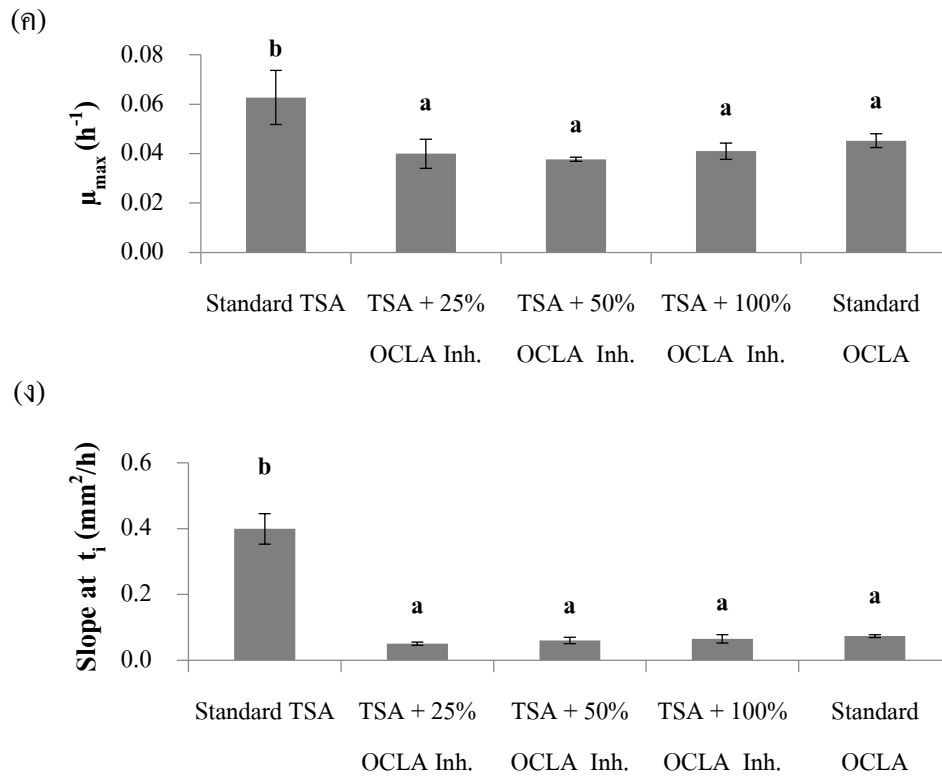


รูปที่ 4.22 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สูตรมาตรฐานและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลูก OCLA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4.23 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกลูก OCLA 100% และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน





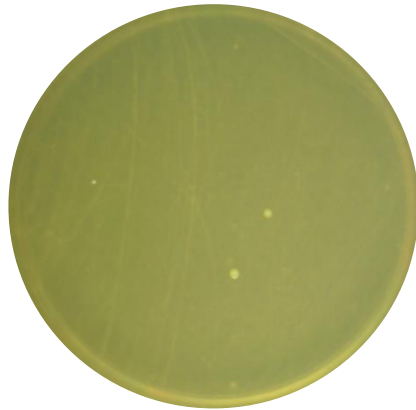
**รูปที่ 4.24** การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สูตรมาตรฐาน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสารคัดเลือกสูตร OCLA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน

#### 4.3.4.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตรมาตรฐาน

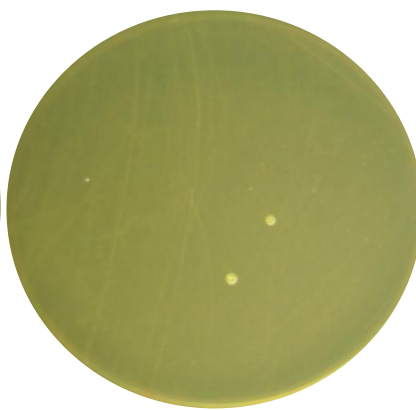
##### 4.3.4.2.1 การเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่นิยมมากซึ่งได้อธิบายไว้ในทุกคู่มือขององค์กรระหว่างประเทศ ได้แก่ ISO, USFDA, และ AOAC อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford ประกอบด้วย esculin และ ferric ammonium citrate ซึ่งเป็นสารชี้วัด (indicator) เพื่อใช้ผลิตสีน้ำตาลดำขึ้นรอบโคโลนีของ *Listeria* จากผลการทดลองพบว่าโคโลนีเชื้อ *L. innocua* ขยายขนาดอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีขนาดสุดท้ายใหญ่กว่าโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* เกือบ 3 เท่า นอกจากนี้สามารถตรวจพบได้เร็วกว่าและอัตราการขยายตัวของโคโลนีมีค่ามากกว่าเกือบ 3 เท่าดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยในช่วงระหว่างการบ่มนี้พบว่า *L. ivanovii* ไม่แสดงรัศมีสีน้ำตาลดำรอบโคโลนีในขณะที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *L. innocua* เท่านั้นดังแสดงในรูปที่ 4.25 และ 4.26 ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Van Netten และคณะ, 1989 พบว่า fosfomycin ซึ่งเป็นหนึ่งในสารคัดเลือกของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria*

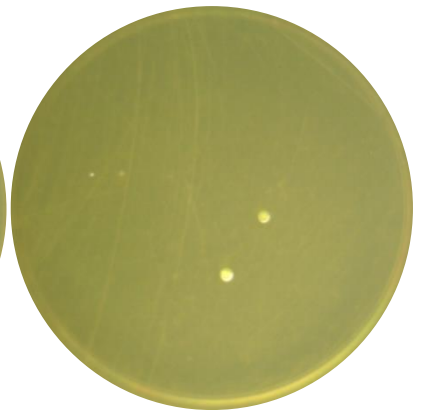
spp.บางชนิดได้ ได้แก่ *L. ivanovii*, *L. seeligri*, และ *L. welshimeri* โดยงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองนี้และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *L. ivanovii* เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford ได้ไม่ดี



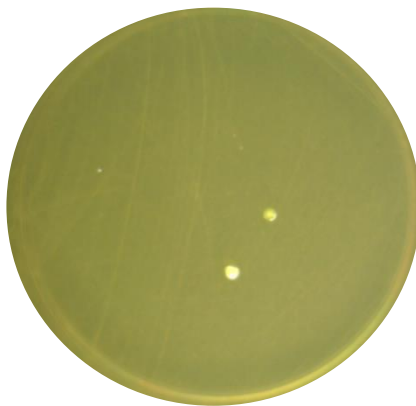
40 ชั่วโมง



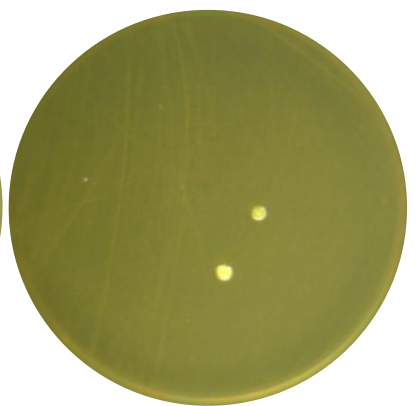
48 ชั่วโมง



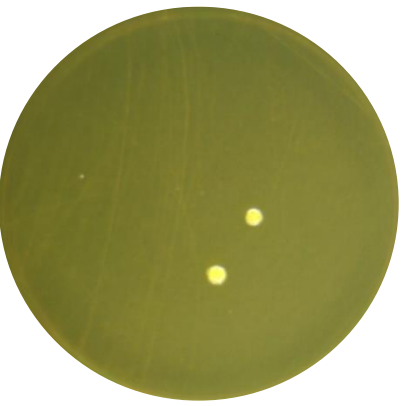
54 ชั่วโมง



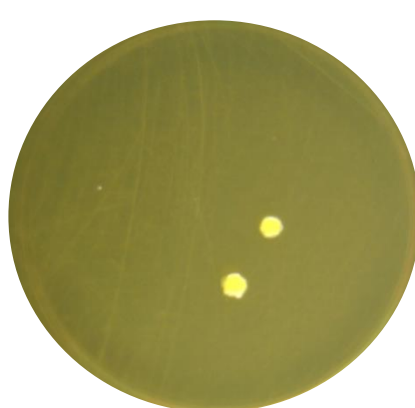
60 ชั่วโมง



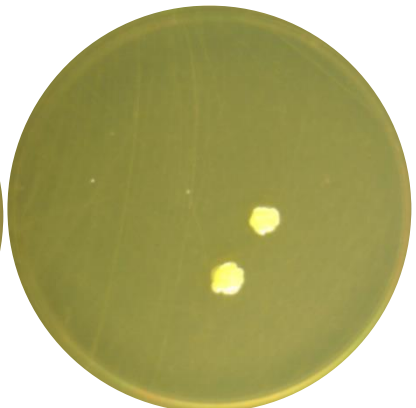
66 ชั่วโมง



72 ชั่วโมง

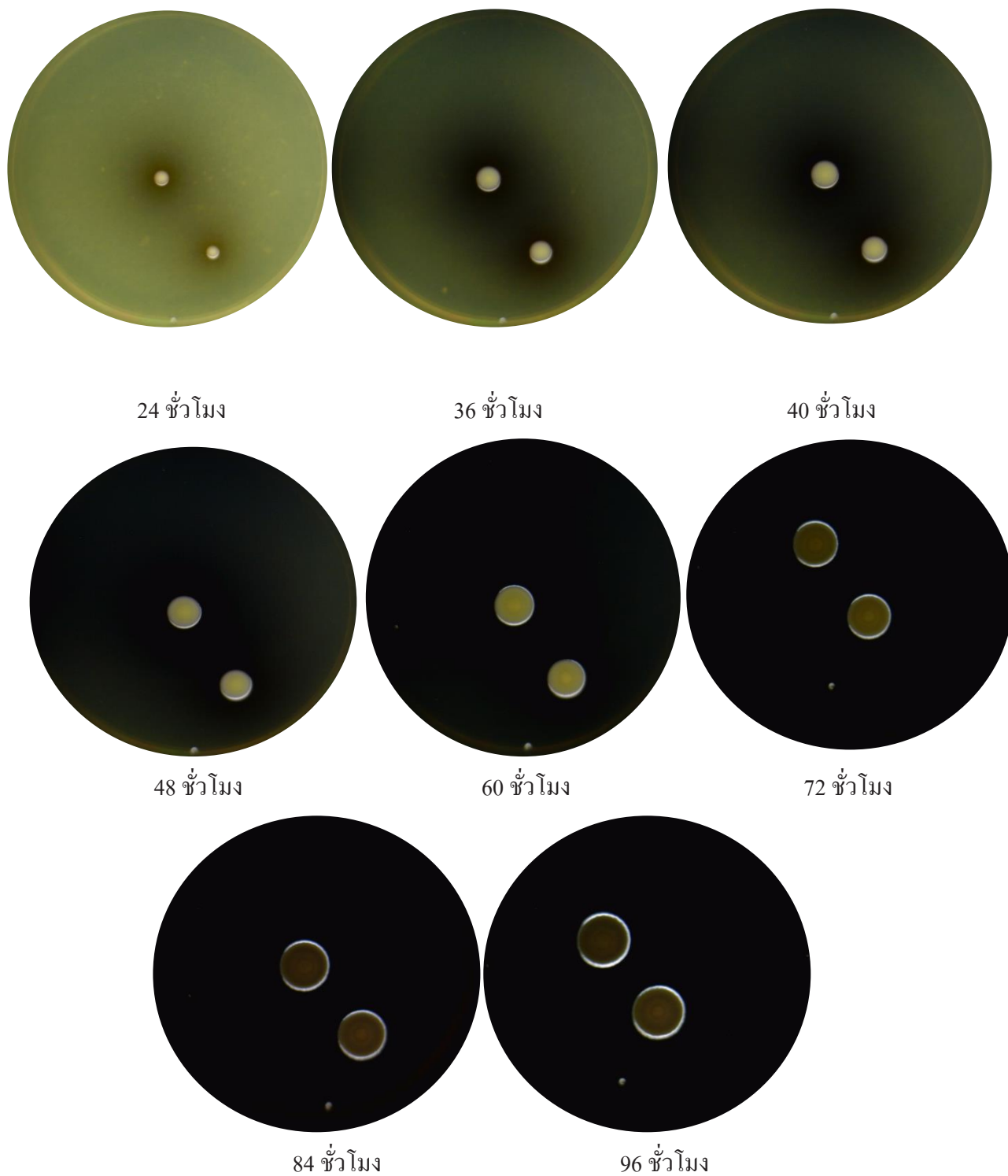


84 ชั่วโมง

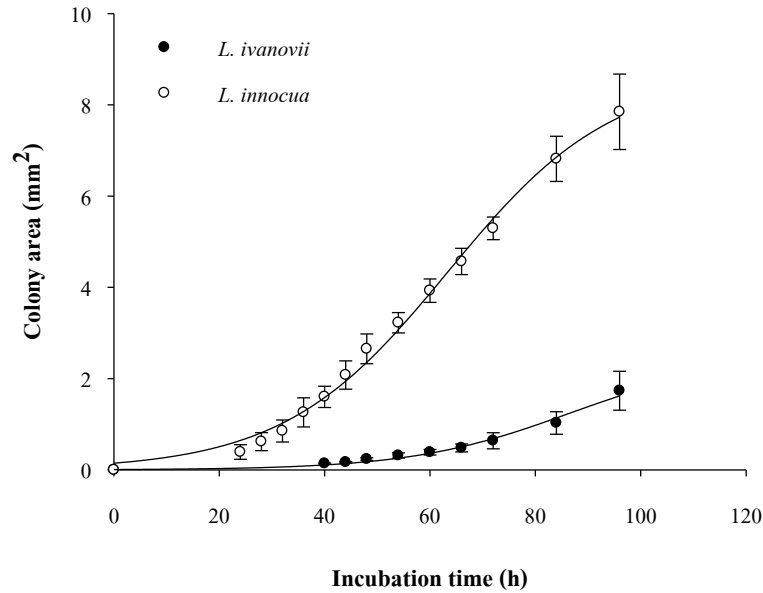


96 ชั่วโมง

รูปที่ 4.25 โคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 40 ถึง 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.26 โคโลนีเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง



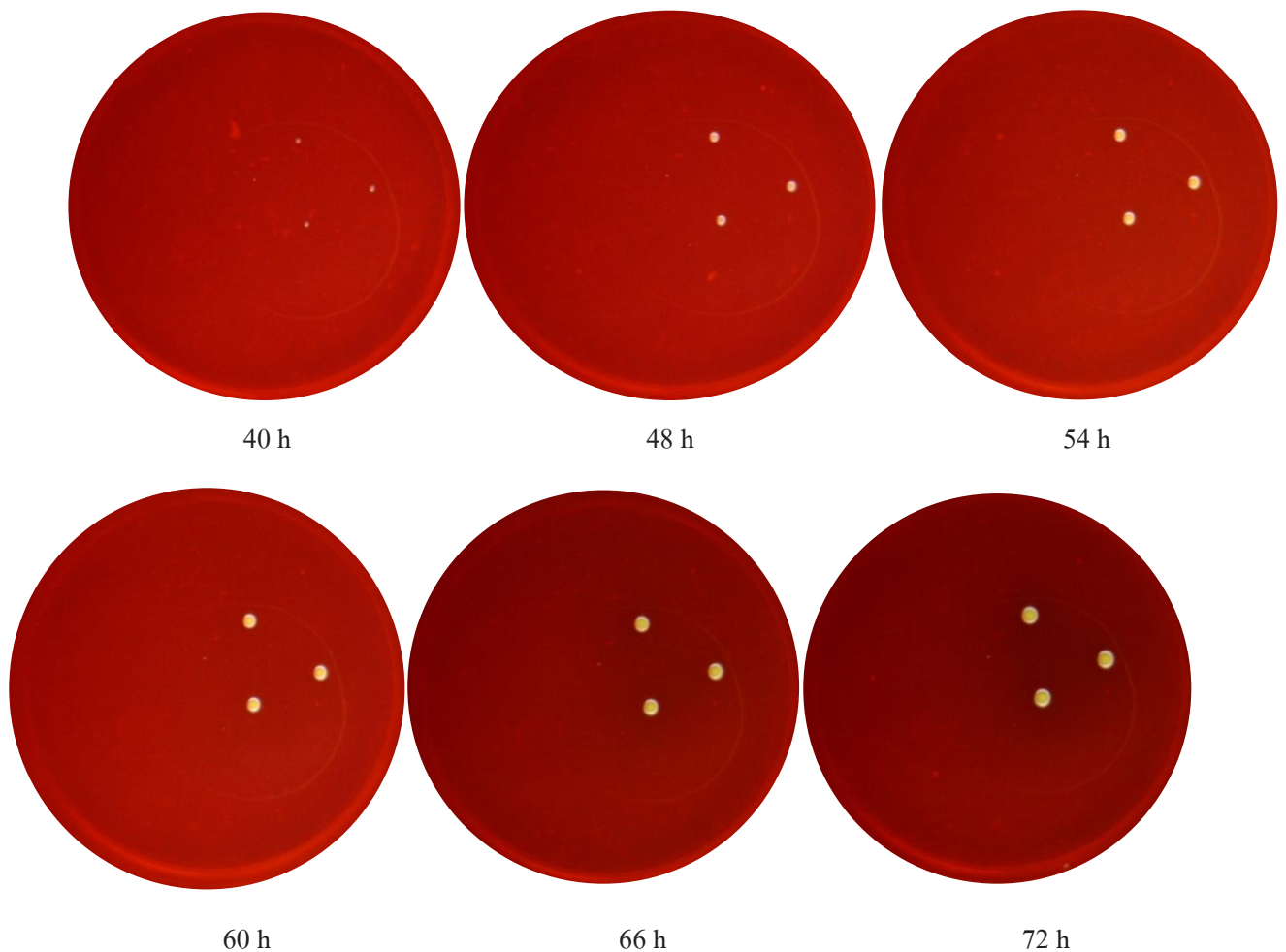
รูปที่ 4.27 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐาน

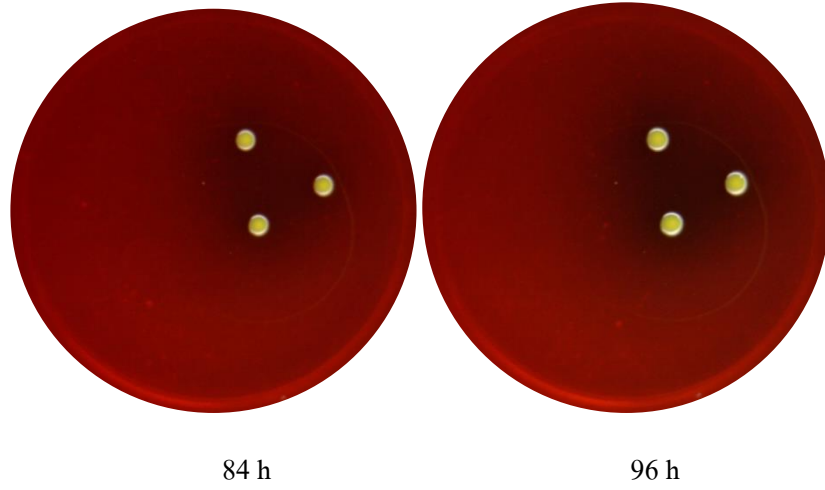
ตารางที่ 4.1 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford สูตรมาตรฐาน

ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์	<i>Listeria</i> spp.	
	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>
$A_{\max} \text{ (mm}^2\text{)}$	$2.48 \pm 0.39^a$	$8.78 \pm 1.30^b$
$t_i \text{ (h)}$	$86.93 \pm 2.78^b$	$63.30 \pm 5.86^a$
$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0.033 \pm 0.004^a$	$0.033 \pm 0.003^a$
Slope at $t_i \text{ (mm}^2\text{/h)}$	$0.042 \pm 0.011^a$	$0.142 \pm 0.016^b$
$R^2$	0.983	0.995
RSME	0.071	0.195

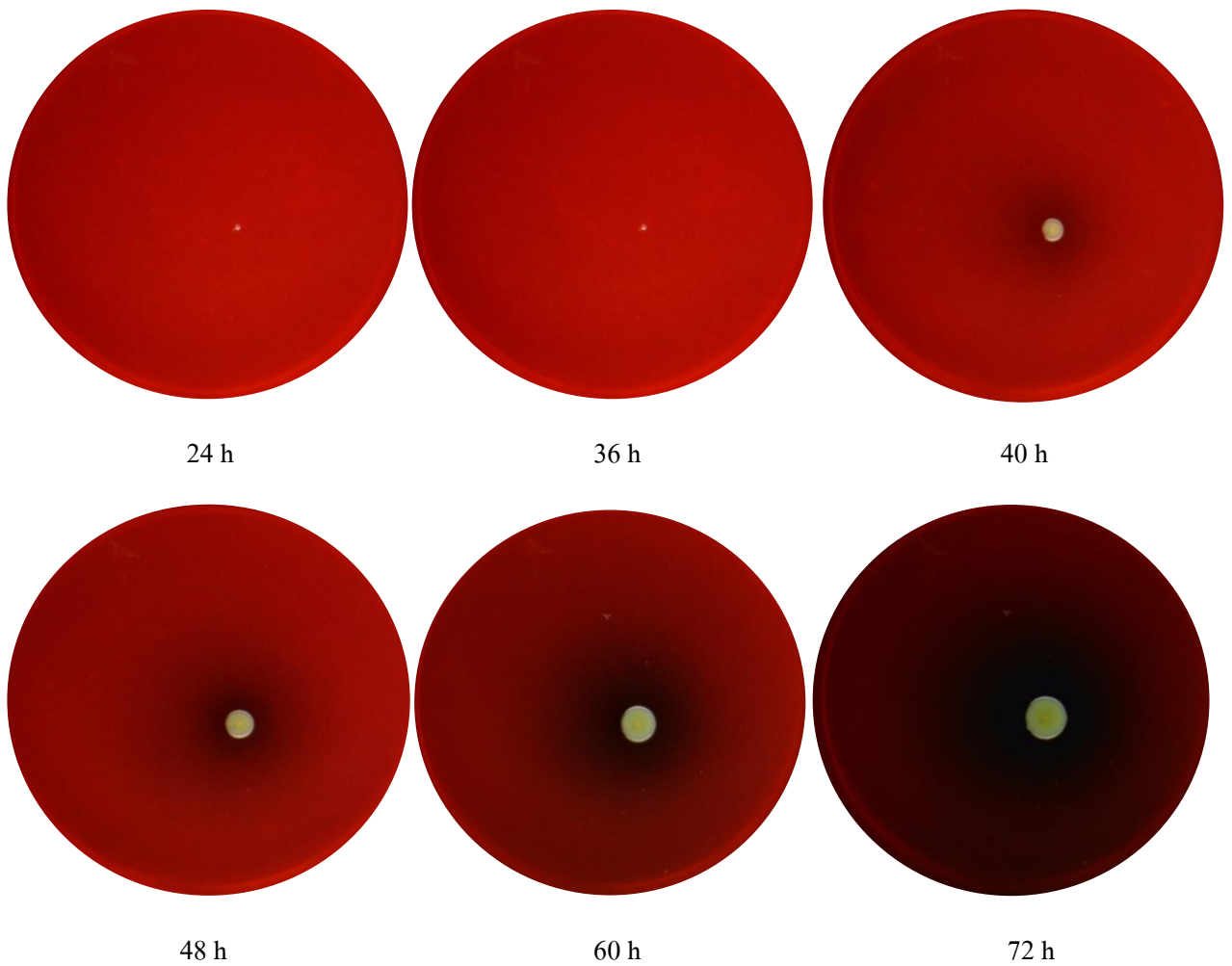
4.3.4.2.2 การเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM  
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM ประกอบด้วย esculin และ ferric ammonium citrate ซึ่งเป็นสารชี้  
วัดที่ทำให้เกิดครีมีสีน้ำตาลดำรอบโคโลนีของเชื้อ *Listeria* เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford

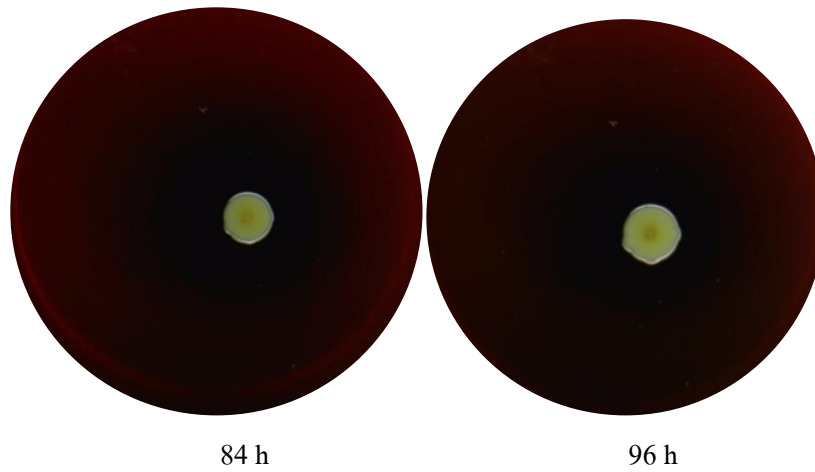
นอกจากนี้ยังประกอบด้วย mannitol และ phenol red ซึ่งอาจทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PALCAM เปลี่ยนจากสีแดงกลายเป็นสีเหลืองหากค่าความเป็นกรดเป็นเบส (pH) บนอาหารมีค่าเป็นกรด สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PALCAM จะไม่เกิดการเปลี่ยนสีแต่อย่างใดเนื่องจาก *Listeria spp.* ไม่ใช้ mannitol เป็นอาหารในการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่าโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PALCAM ได้อย่างรวดเร็วโดยสังเกตได้จากค่าขนาดโคโลนีสุดท้าย และอัตราการขยายตัวของโคโลนีที่  $t_c$  เหมือนผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford สำหรับเชื้อ *L. ivanovii* พบว่าไม่แสดงรัศมีสีดำภายใน 48 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลามาตรฐานในการตรวจสอบเชื้อ แต่ *L. innocua* แสดงรัศมีสีดำภายใน 48 ชั่วโมงได้ ดังในรูปที่ 4.28 และ 4.29 ตามลำดับ



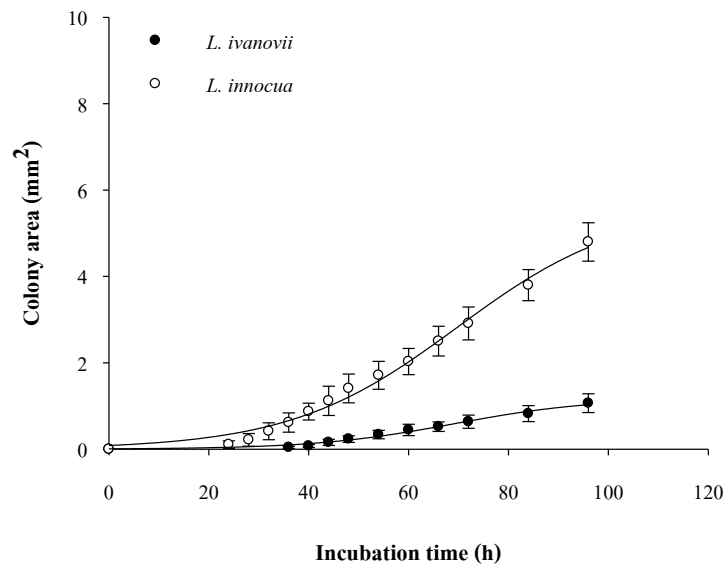


**รูปที่ 4.28** โคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 40 ถึง 96 ชั่วโมง





รูปที่ 4.29 โคโลนีเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.30 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 4.2 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM สูตรมาตรฐาน

ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์	<i>Listeria</i> spp.	
	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>
$A_{\max}$ (mm <sup>2</sup> )	1.18 ± 0.26 <sup>a</sup>	5.64 ± 0.60 <sup>b</sup>
$t_i$ (h)	69.31 ± 3.01 <sup>a</sup>	69.57 ± 3.62 <sup>a</sup>

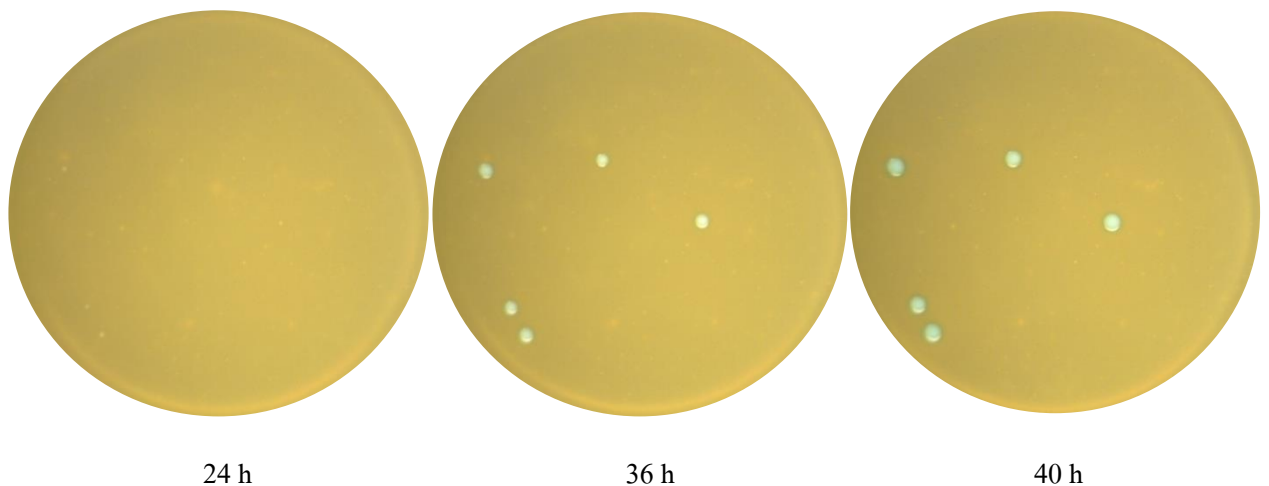


$\mu_{\max}^{-1}$ (h)	0.036±0.003 <sup>b</sup>	0.030±0.002 <sup>a</sup>
Slope at $t_i$ (mm <sup>2</sup> /h)	0.021±0.004 <sup>a</sup>	0.085±0.006 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0.985	0.989
RSME	0.046	0.163

#### 4.3.4.2.3 การเจริญเติบโตของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA ไม่มีสารประกอบ ferric ammonium เหมือนในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Oxford และ PALCAM แต่ประกอบด้วยสารชีวชนิดอื่นคือ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside และ L- $\alpha$ -phosphatidylinositol ซึ่งทำให้โคโลนีของ *Listeria spp.* มีสีเขียวอมฟ้าและอาจมีหรือไม่มีสีขาวขุ่นรอบโคโลนีขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยสีขาวขุ่นรอบโคโลนีจะถูกสร้างขึ้นจาก *L. monocytogenes* และ *L. ivanovii* จากผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA มีความแตกต่างจากอาหาร 2 ชนิดแรกเล็กน้อย ในกรณีนี้อัตราการขยายตัวของโคโลนีที่  $t_i$  ของ *L. ivanovii* และ *L. innocua* มีค่าใกล้เคียงกันและโคโลนีของ *L. innocua* มีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย

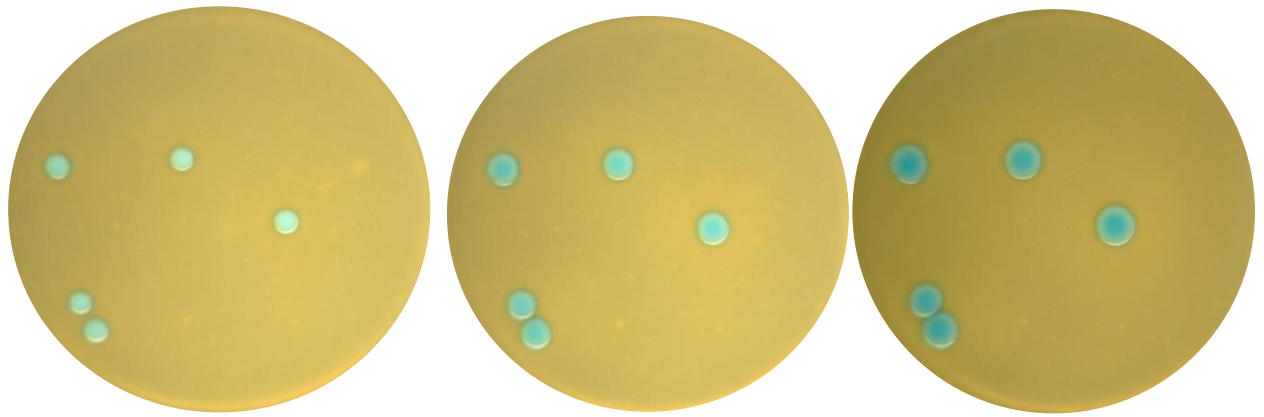
อย่างไรก็ตามแม้ว่า *L. ivanovii* จะแสดงโคโลนีสีเขียวมฟ้าที่ล้อมรอบด้วยสีขาวขุ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA ซึ่งคาดว่าจะเห็นได้จากการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* เช่นกัน แต่สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford กลับไม่ได้ปรากฏรัศมีสีค่าที่ล้อมรอบโคโลนี *L. ivanovii* ดังนั้น *L. ivanovii* จึงอาจไม่เหมาะที่จะนำมาเป็นตัวแทนในการศึกษา *L. monocytogenes* ขณะทำงานวิจัยหลายฉบับเลือก *L. innocua* เป็นตัวแทน *L. monocytogenes* ในการศึกษา (Miller et. al., 2009; Kamat และ Nair, 1996) เพราะ *L. innocua* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรค สรีรวิทยาใกล้เคียงกับ *L. monocytogenes* และทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถเกิดขึ้นได้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดเดียวกัน (Cornu et. al., 2002)



24 h

36 h

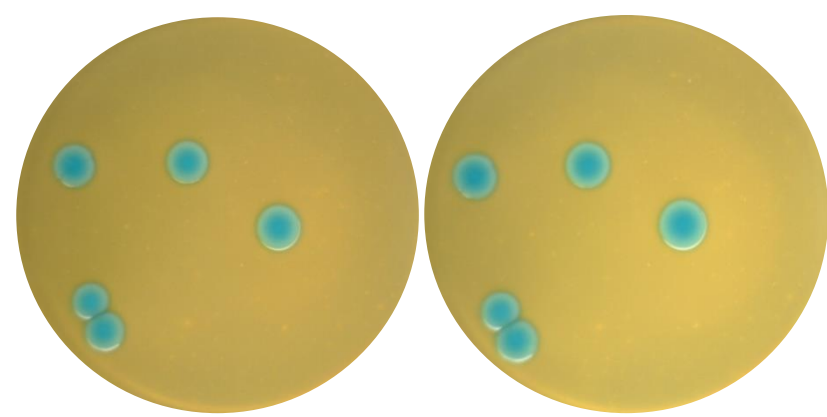
40 h



48 h

60 h

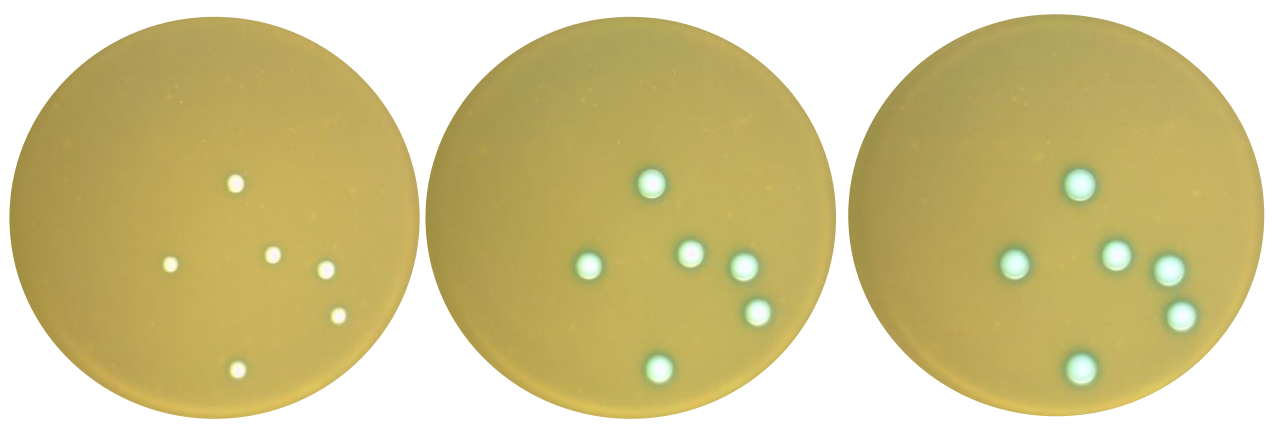
72 h



84 h

96 h

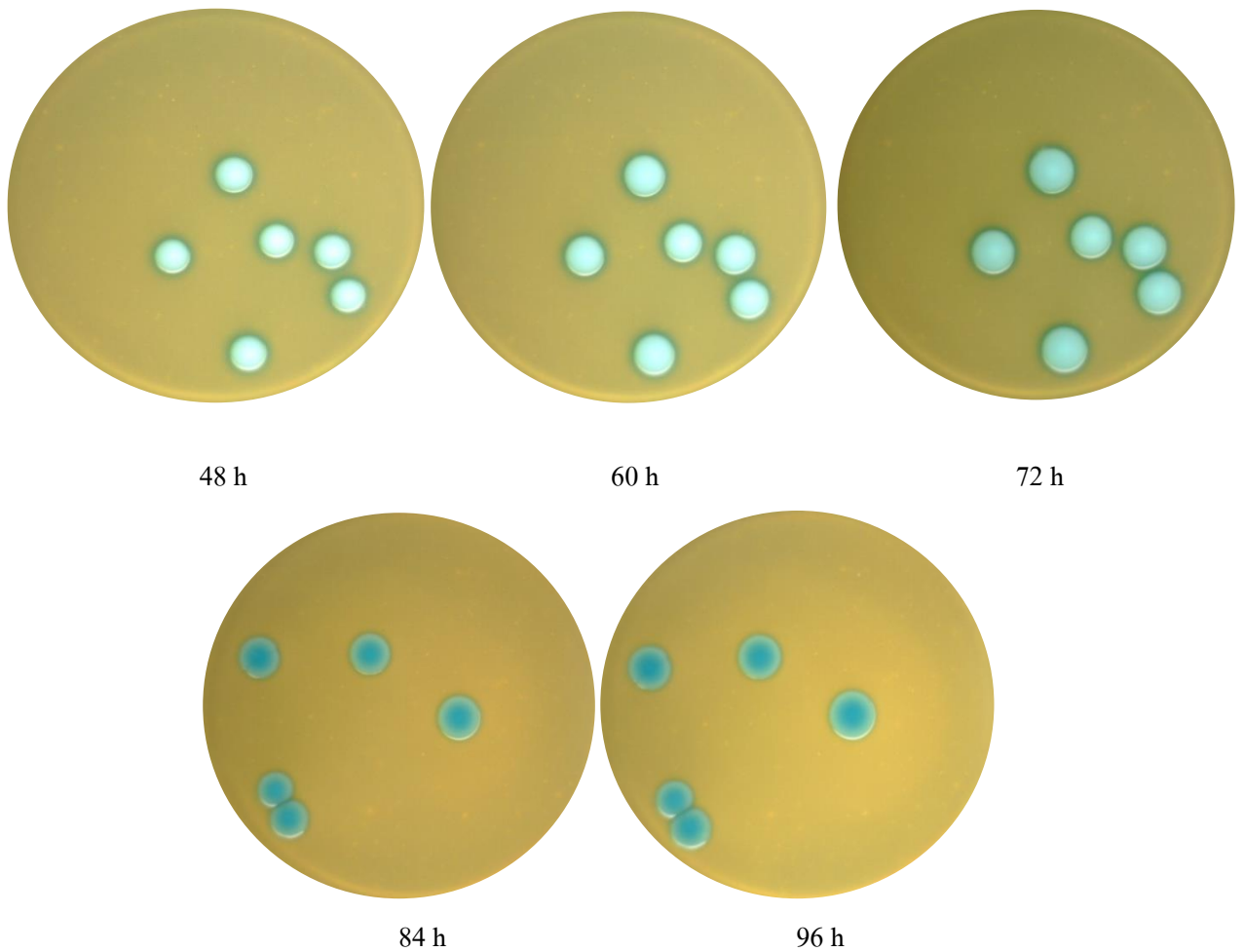
**รูปที่ 4.31** โคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง



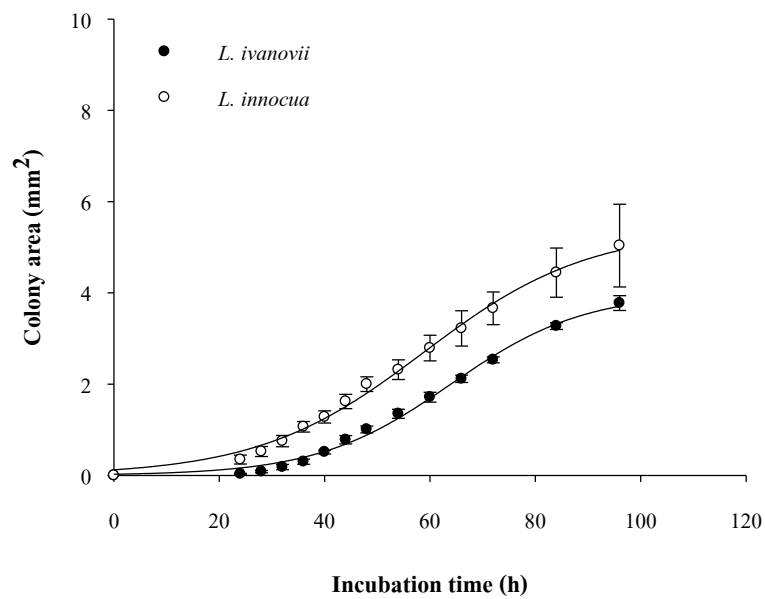
24 h

36 h

40 h



รูปที่ 4.32 โคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิการบ่ม 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.33 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน

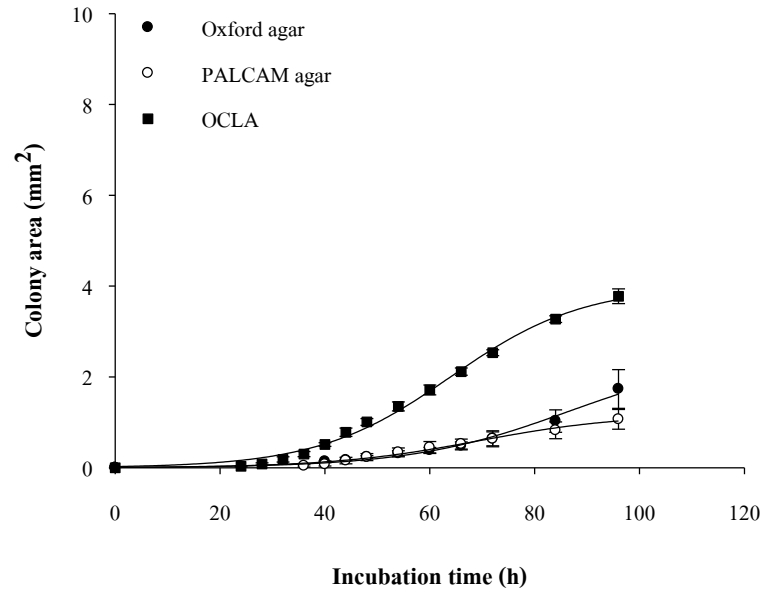
ตารางที่ 4.3 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* และ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน

ค่าตัวแปรทาง จลนพลศาสตร์	<i>Listeria spp.</i>	
	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>
$A_{\max}^2$ (mm <sup>2</sup> )	4.02 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.44 ± 1.15 <sup>b</sup>
$t_i$ (h)	64.53 ± 0.33 <sup>b</sup>	58.60 ± 4.60 <sup>a</sup>
$\mu_{\max}^{-1}$ (h)	0.039 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.032 ± 0.002 <sup>a</sup>
Slope at $t_i$ (mm <sup>2</sup> /h)	0.079 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.087 ± 0.012 <sup>a</sup>
$R^2$	0.994	0.994
RSME	0.099	0.133

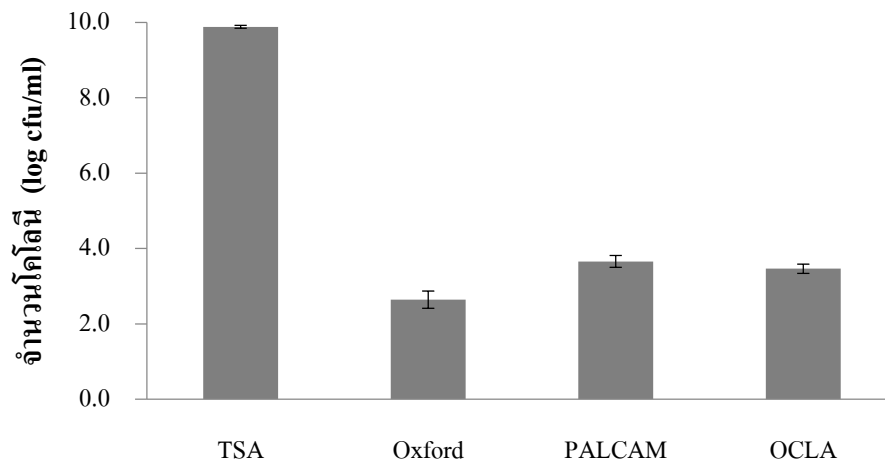
#### 4.3.4.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตรมาตรฐานชนิดต่าง ๆ

##### 4.3.4.3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA

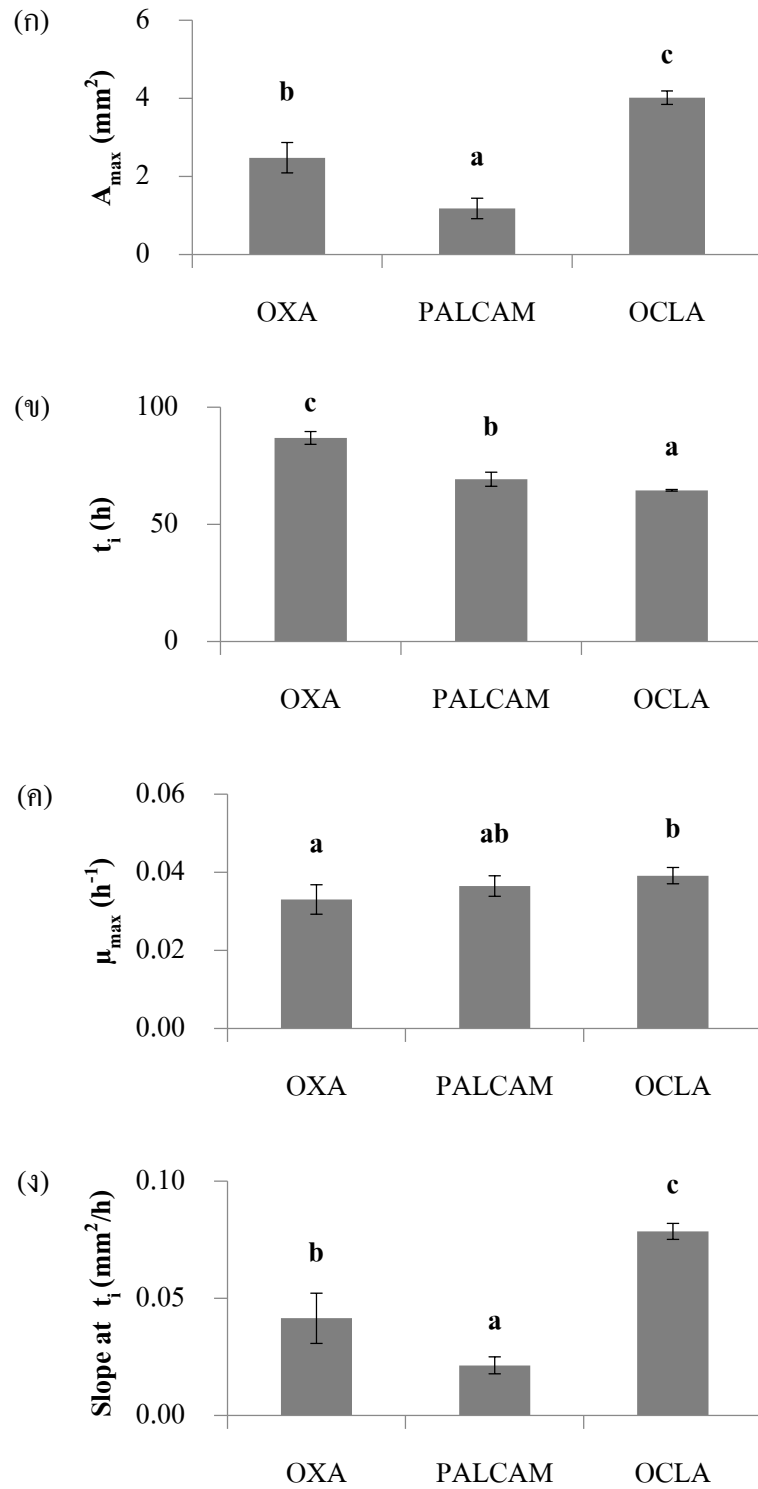
จากผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะทั้งสามชนิด แสดงให้เห็นว่าในการตรวจสอบเชื้อ *L. ivanovii* อาจต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OCLA ที่ทำให้โคโลนีของ *L. ivanovii* มีขนาดใหญ่และมีอัตราการขยายตัวของโคโลนีสูงที่สุดและยังใช้เวลาในการตรวจสอบน้อยที่สุดด้วยดังแสดงในรูปที่ 4.36x เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ *L. ivanovii* ที่นับได้ (log CFU/mL) หลังจากการบ่ม 48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ไม่มีสารคัดเลือก (TSA) มากกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะอย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ *L. ivanovii* ไม่แสดงคุณสมบัติที่คล้ายกับ *L. monocytogenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดียวกัน



รูปที่ 4.34 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน



รูปที่ 4.35 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ *L. ivanovii* ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง TSA, Oxford, PALCAM, และ OCLA



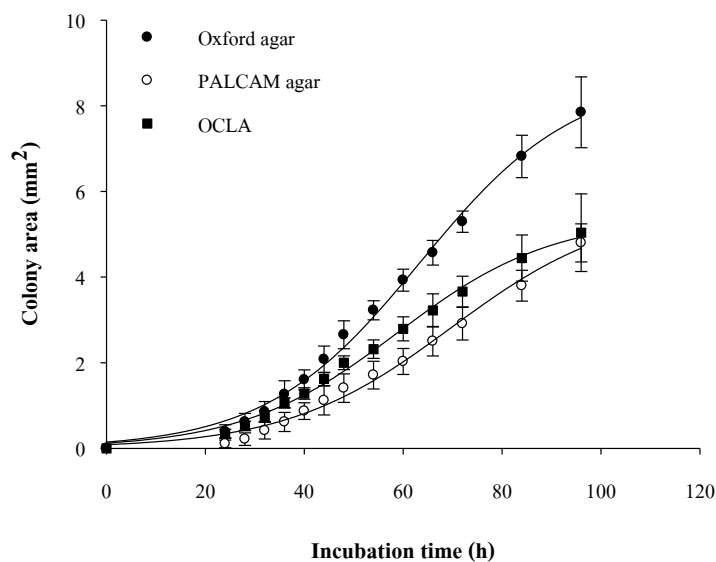
รูปที่ 4.36 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สู่ตรมาตรฐาน

#### 4.3.4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA

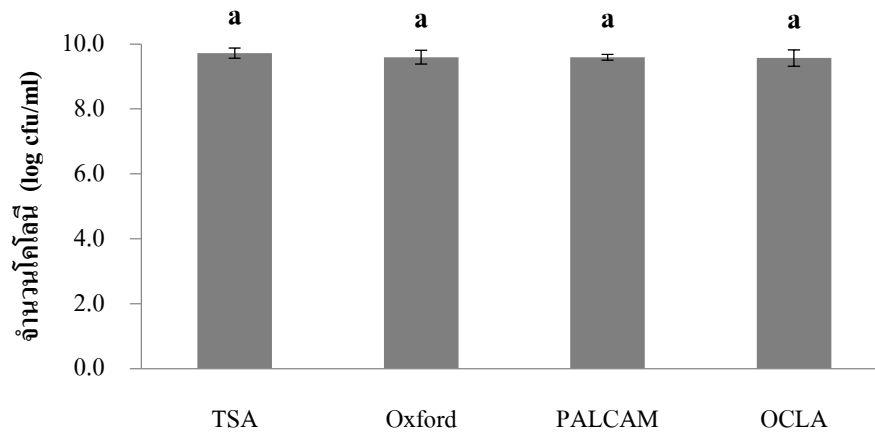
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะทั้ง 3 ชนิดสามารถนำมาใช้กับ *L. innocua* ได้ โดยเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford ซึ่งโคโลนี *L. innocua* สามารถเจริญจนมีขนาดใหญ่และมีอัตราการเติบโตสูง ในรูปที่ 4.39 แสดงค่าตัวแปรจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford มีขนาดสุดท้ายที่ใหญ่กว่าและมีค่าความชันที่  $t_0$  มากกว่า

ถึงแม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนน้อยกว่า PALCAM และ OCLA แต่ *L. innocua* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford จนมีขนาดที่ใหญ่กว่าและมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากสารคัดหลั่งในระบบการยับยั้งของอาหารแต่ละสูตร จากผลดังกล่าวจึงเป็นที่น่าสนใจในการผสมผสานระบบสารยับยั้งของสูตร Oxford เข้ากับส่วนสารอาหารและวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PALCAM และ OCLA ซึ่งอาจจะทำให้โคโลนีเจริญเติบโตมากขึ้นและสามารถตรวจสอบเชื้อ *Listeria* ได้เร็วขึ้น

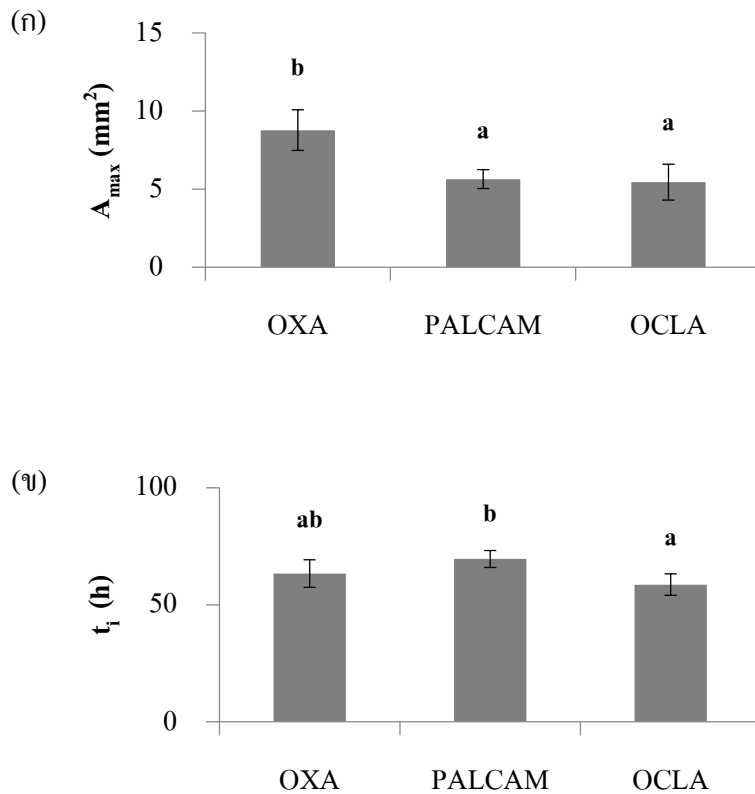
จากการเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของ *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงในรูปที่ 4.38 พบว่าจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ไม่มีสารคัดหลั่งไม่แตกต่างกับบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ ดังนั้นสารคัดหลั่งในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะเหล่านี้ไม่ส่งผลต่อจำนวนโคโลนีของ *L. innocua* ที่นับได้



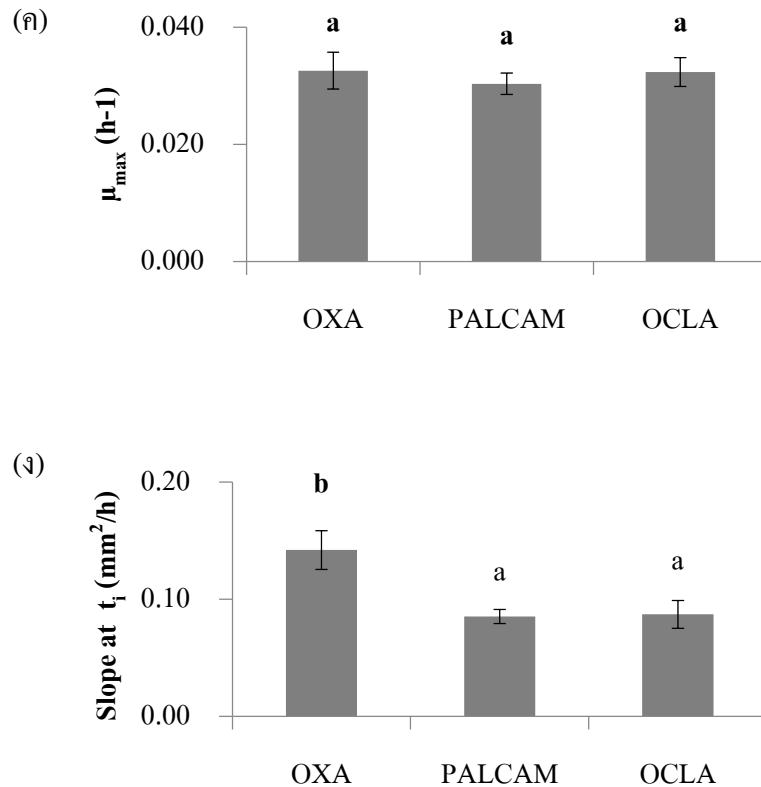
รูปที่ 4.37 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน



รูปที่ 4.38 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อ *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA, Oxford, PALCAM, และ OCLA







รูปที่ 4.39 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน

#### 4.3.5 การตัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะเพื่อพัฒนาการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *Listeria* spp.

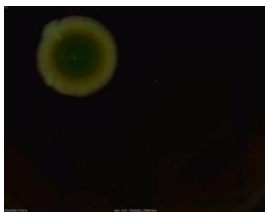
จุดประสงค์ในการศึกษานี้ต้องการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria* spp. โดยการนำส่วนสารอาหารและวุ้น (agar base) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Oxford, PALCAM, และ OCLA มาผสมกับส่วนของสารคัดเลือกที่ความเข้มข้นต่างๆ และสูตรต่างๆ จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ใน 4.4.2 การทดลองนี้จึงเลือก *L. innocua* มาเป็นตัวแทนของ *Listeria* spp.

##### 4.3.5.1 ผลของสารคัดเลือกที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตรมาตรฐานที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

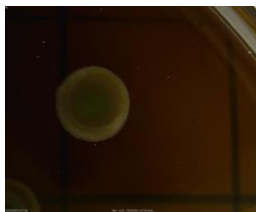
###### 4.3.5.1.1 ผลของความเข้มข้นของสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford

สารคัดเลือกในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ Oxford มาตรฐานประกอบด้วย lithium chloride (15 g/L), acriflavine (5 mg/L), colistin (20 mg/L), fosfomycin (10 mg/L), cefotetan (2 mg/L) และ

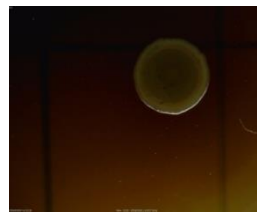
amphotericin B (10 mg/L) (หรือ cycloheximide (400 mg/L)) จากการทดลองได้กำหนดความเข้มข้นของสารคัดเลือกว่า 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อศึกษาอิทธิพลของสารคัดเลือกว่า Oxford และกำหนดปริมาณส่วนของสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford คงที่ที่ปริมาณมาตรฐาน ในรูปที่ 4.40 แสดงรูปถ่ายโคโลนิของ *L. innocua* หลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งสังเกตได้ว่าการใช้สารคัดเลือกว่าความเข้มข้น 200% ทำให้โคโลนิของ *L. innocua* มีขนาดเล็กมาก นอกจากนี้ในรูปที่ 4.41 ซึ่งแสดงลักษณะกราฟการเจริญเติบโตของโคโลนิเชื้อ *L. innocua* สามารถสังเกตได้ว่าโคโลนิ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีสารคัดเลือกว่าเข้มข้น 200% เจริญเติบโตช้ากว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีสารคัดเลือกว่าน้อยกว่า จากการเปรียบเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ในรูปที่ 4.42 พบว่าการลดความเข้มข้นของสารคัดเลือกว่ามาตรฐานลงจาก 100% เป็น 25% ทำให้โคโลนิเชื้อ *L. innocua* เจริญเติบโตได้ดีขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากขนาดโคโลนิสุดท้ายและอัตราการขยายตัวของโคโลนิที่มากขึ้น และใช้เวลาในการตรวจพบสั้นลง ดังนั้นปริมาณของสารคัดเลือกว่า Oxford จึงมีผลกับการเจริญเติบโตของโคโลนิเชื้อ *L. innocua* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 4.44 ผลดังกล่าวพบว่าจำนวนโคโลนิของ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีสารคัดเลือกว่าเข้มข้น 25% ปรากฏขึ้นครบก่อนที่ความเข้มข้นอื่น ส่วนจำนวนโคโลนิสุดท้ายที่นับได้นั้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $P>0.05$ ) ในทุกความเข้มข้น



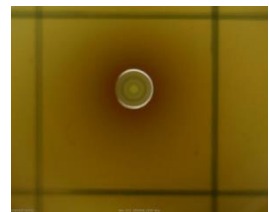
(ก) สารคัดเลือกว่า 25%



(ข) สารคัดเลือกว่า 50%

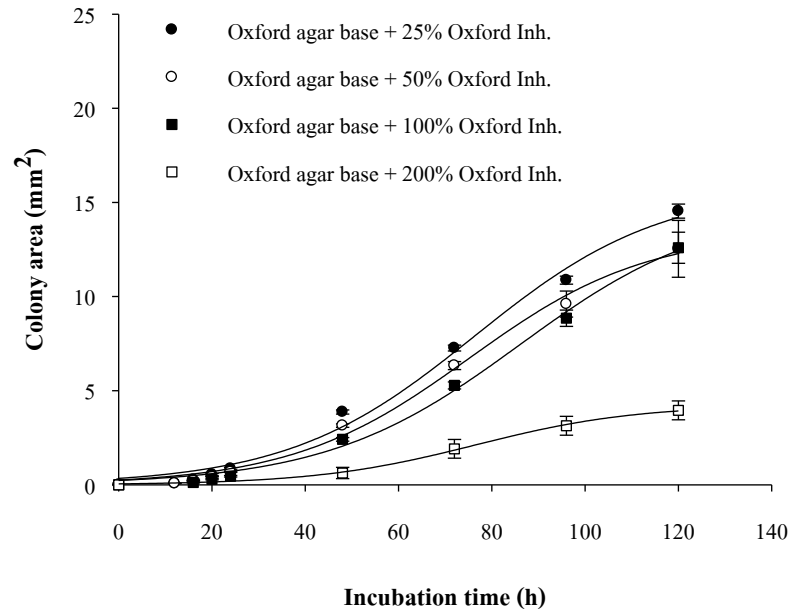


(ค) สารคัดเลือกว่า 100%

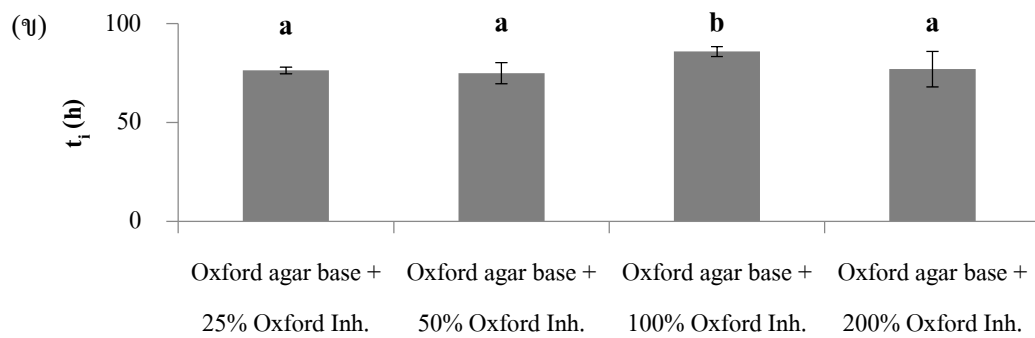
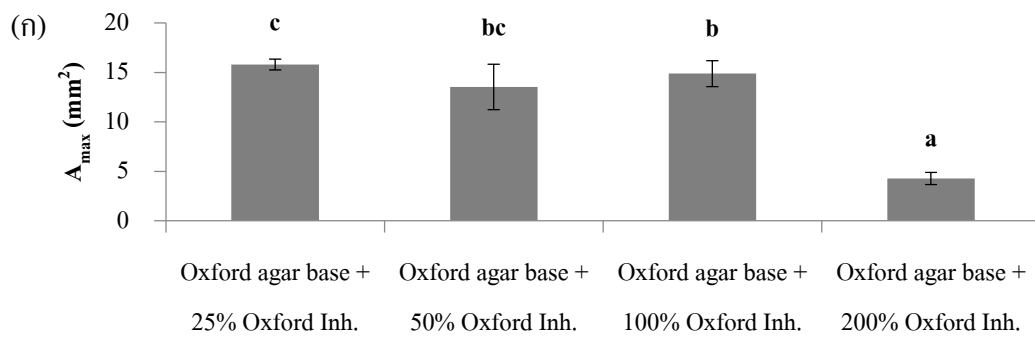


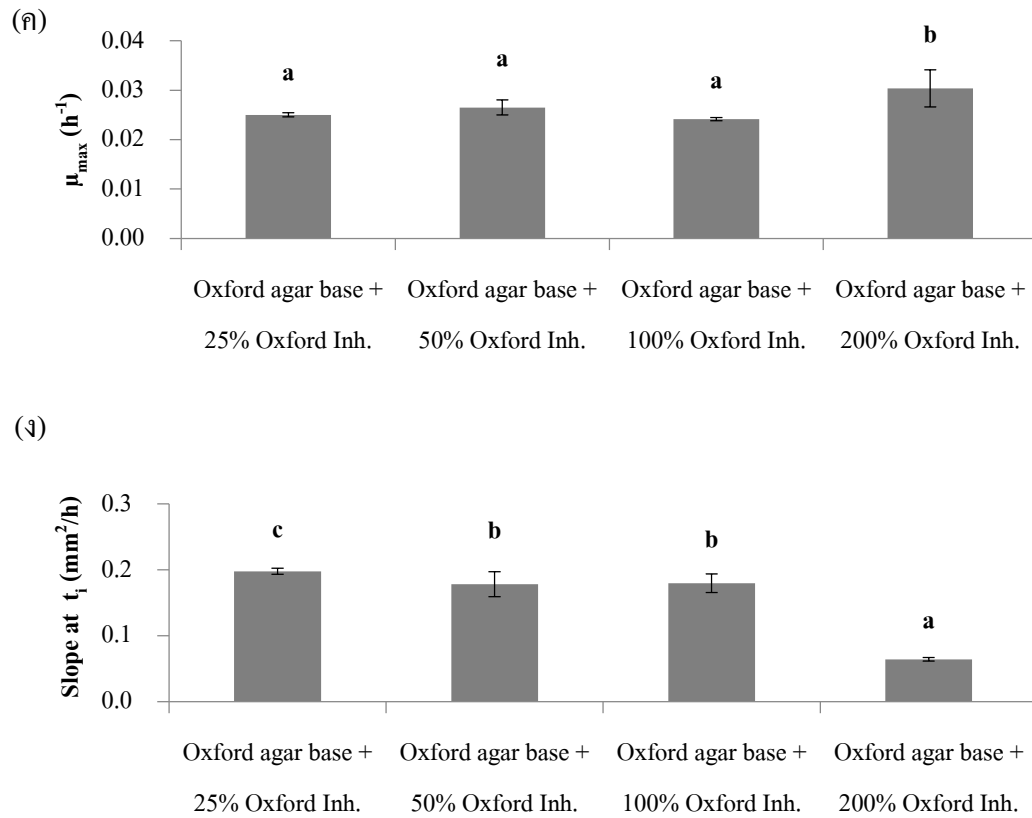
(ง) สารคัดเลือกว่า 200%

**รูปที่ 4.40** โคโลนิ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกว่า Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง

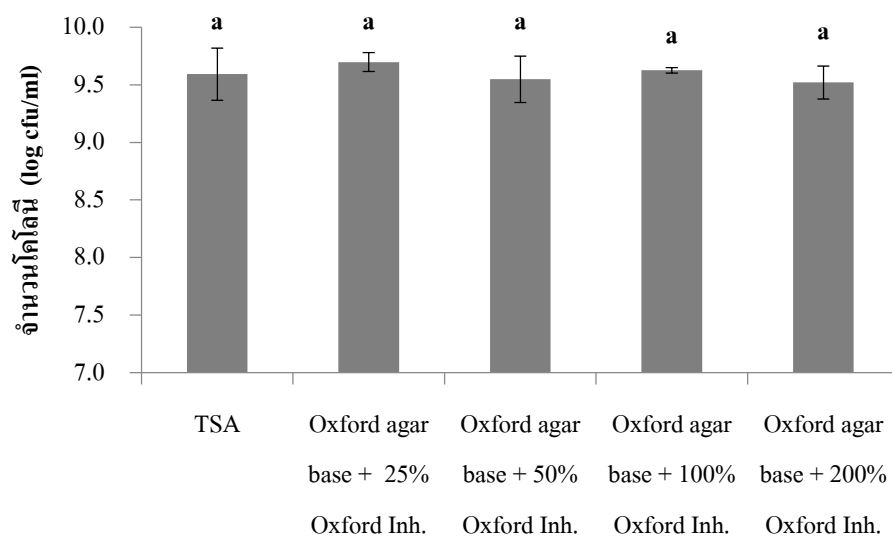


รูปที่ 4.41 การเจริญเติบโตของโคไลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหาร และวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือดสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ

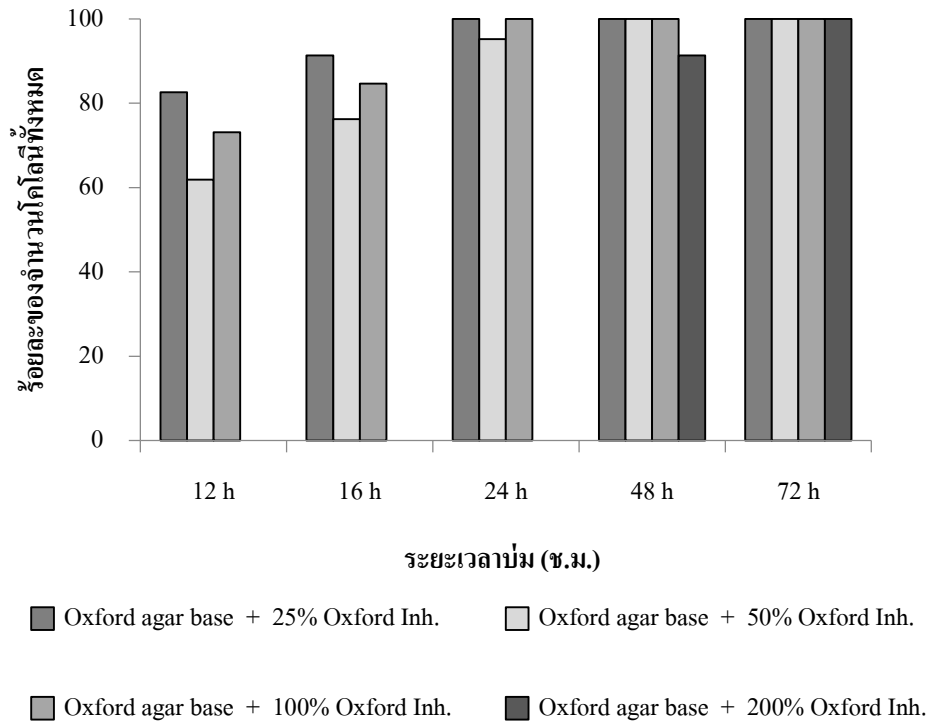




**รูปที่ 4.42** การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ



**รูปที่ 4.43** การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ ( $\log CFU/mL$ ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

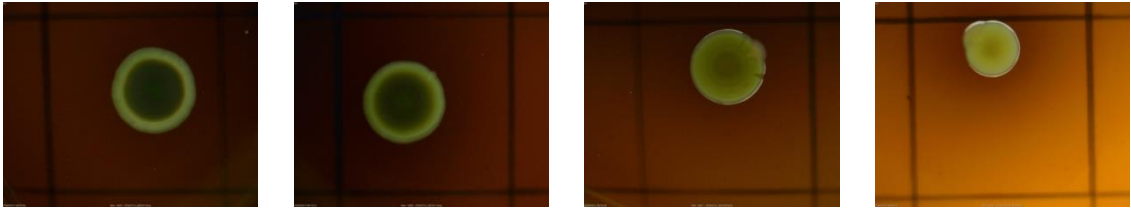


**รูปที่ 4.44** ร้อยละของจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ

#### 4.3.5.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารคัดเลือกลูกสูตร PALCAM ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM

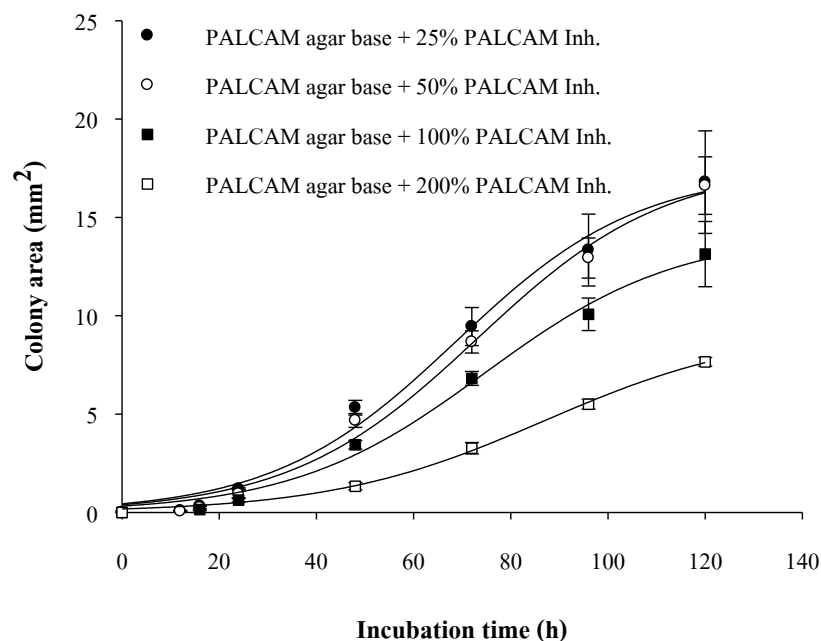
สำหรับการศึกษานี้คล้ายกับในหัวข้อที่แล้ว โดยตรวจสอบผลของสารคัดเลือกลูกสูตร PALCAM ที่ผสมกับส่วนของสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. innocua* และกำหนดความเข้มข้นของสารคัดเลือกลูกที่ศึกษา ได้แก่ 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นมาตรฐานเช่นเดียวกัน สารคัดเลือกลูกที่อยู่ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ PALCAM มาตรฐานประกอบด้วย lithium chloride (15 g/L), acriflavine (5 mg/L), polymyxin (10 mg/L) และ ceftazidime (20 mg/L) รูปที่ 4.46 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* และรูปที่ 4.47 แสดงการเปรียบเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ พบว่าการลดปริมาณสารคัดเลือกลูกความเข้มข้นมาตรฐานลงจาก 100% เหลือ 50% และ 25% นั้นทำให้โคโลนี *L. innocua* เจริญได้ดีขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากขนาดโคโลนีสุดท้ายและอัตราการขยายตัวของโคโลนีที่สูงขึ้นทั้งระดับความเข้มข้น 50% และ 25% และใช้เวลาในการตรวจพบสั้นลงที่ความเข้มข้น 25% อย่างไรก็ตามการลดสารคัดเลือกลูกที่ระดับความเข้มข้น 50% ลงเหลือ 25% นั้นให้ผลต่อการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ไม่แตกต่างกันนัก ในทำนองเดียวกันจากรูปที่ 4.49 แสดงร้อยละของจำนวน

โคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ทั้งหมดที่เวลาต่างๆ พบว่าการใช้สารคัดเลือกระดับความเข้มข้น 25% และ 50% ทำให้โคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งปรากฏขึ้นครบก่อนการใช้สารคัดเลือกระดับความเข้มข้น 100% และ 200% นอกจากนี้การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* ช้าลงเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารคัดเลือกระดับมาตรฐานจาก 100% ถึง 200% ซึ่งสังเกตได้จากขนาดโคโลนีสุดท้าย อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและอัตราการขยายตัวของโคโลนีที่ลดลงและใช้เวลาในการตรวจพบนานขึ้น สำหรับจำนวนโคโลนีสุดท้ายที่นับได้ พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $P>0.05$ ) ในทุกความเข้มข้น

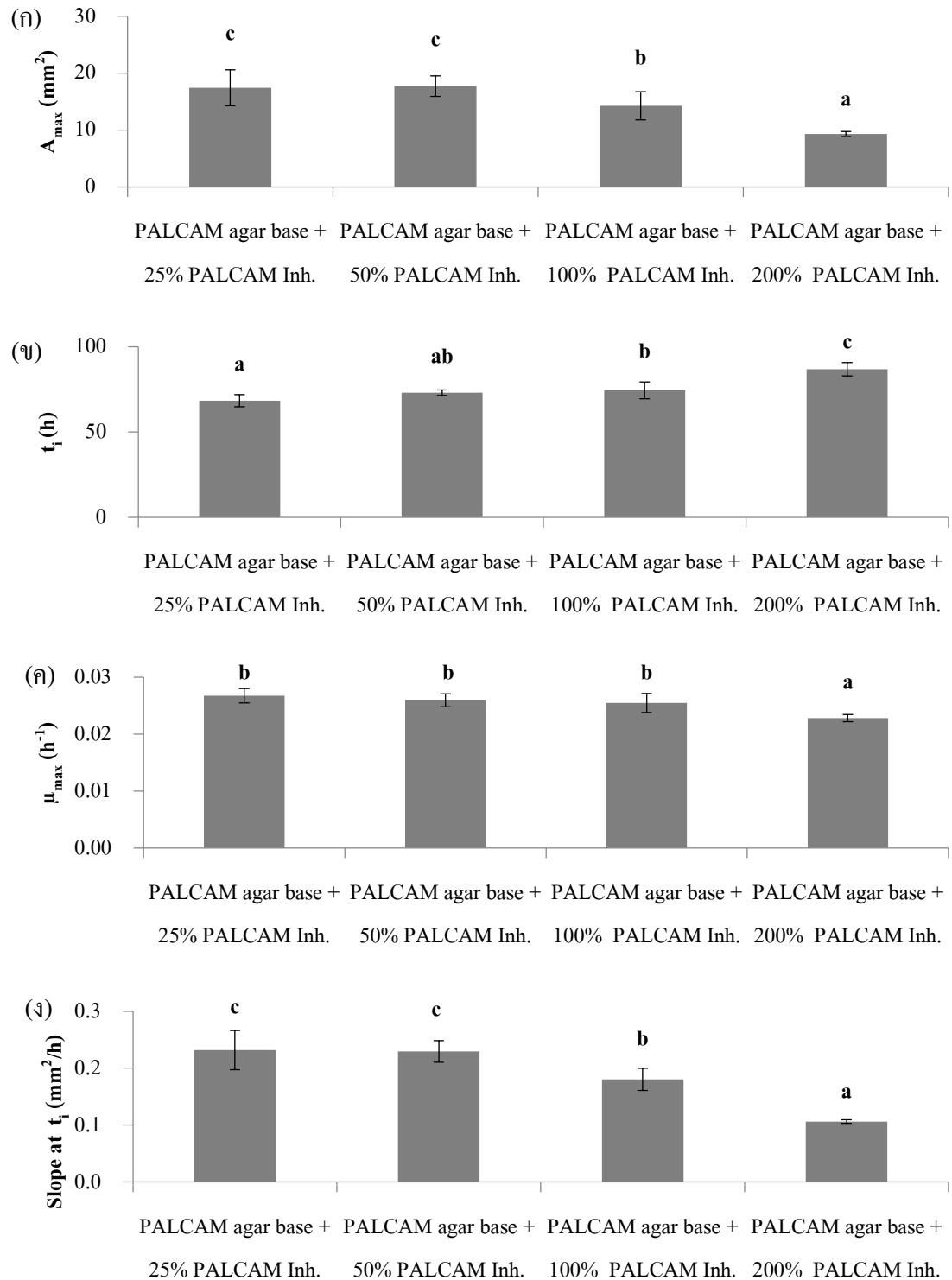


(ก) สารคัดเลือก 25%      (ข) สารคัดเลือก 50%      (ค) สารคัดเลือก 100%      (ง) สารคัดเลือก 200%

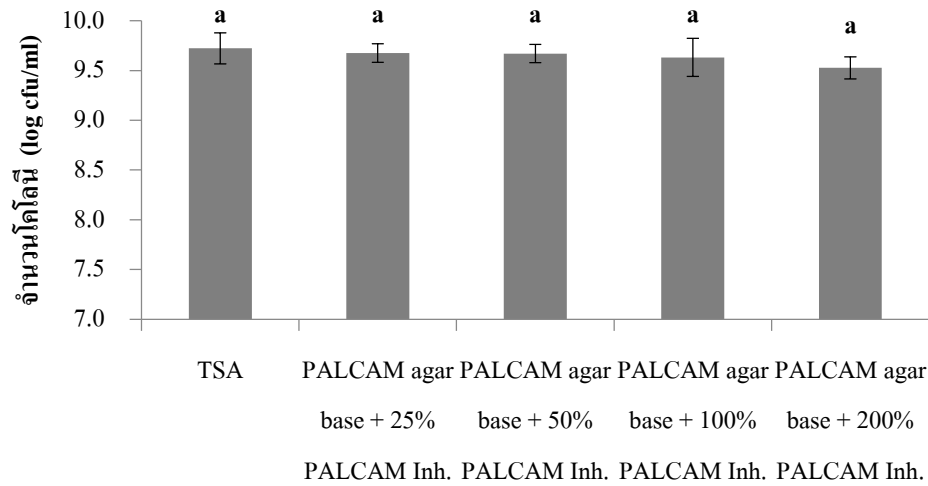
**รูปที่ 4.45** โคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกระดับ PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง



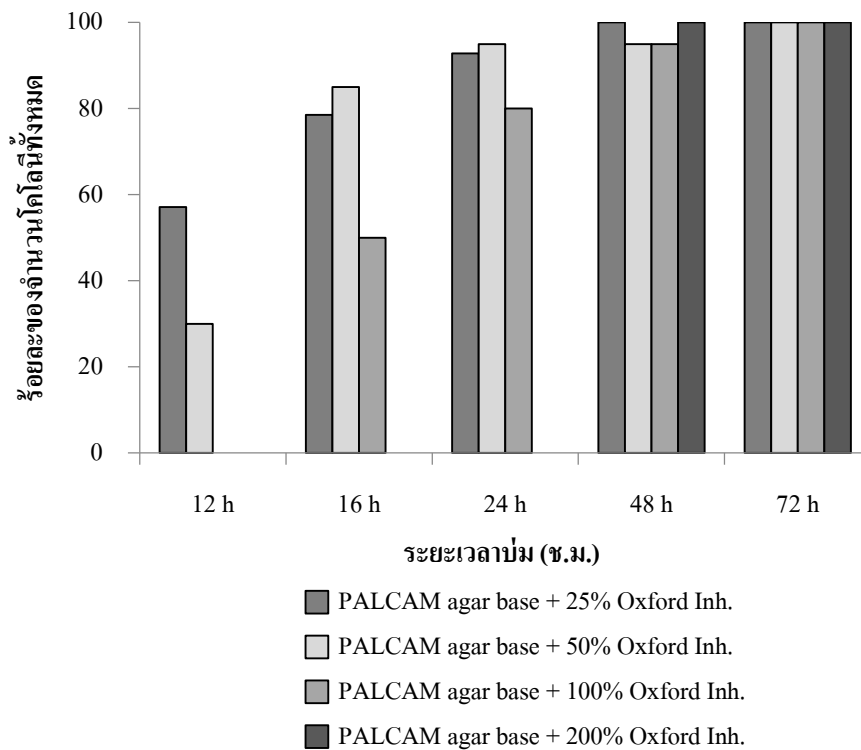
**รูปที่ 4.46** การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกระดับ PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4.47 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารกีดเลือกสูตร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



**รูปที่ 4.48** การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกสูตร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



**รูปที่ 4.49** ร้อยละของจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกสูตร PALCAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



#### 4.3.5.1.3 ผลของความเข้มข้นของสารคัดเลือกลูกสูตร OCLA ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร

##### OCLA

สารคัดเลือกรวมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA ได้แก่ lithium chloride (10 g/L), ceftazidime (20 mg/L), polymyxin B (76,700 IU/L), nalidixic acid (20 mg/L) และ amphotericin B (10 mg/L) จากการตรวจสอบผลของสารคัดเลือกลูกสูตร OCLA ที่ความเข้มข้น 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นมาตรฐาน แต่ไม่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ)lithium chloride ที่ระดับความเข้มข้น 25%, 50% และ 100%) ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA พบว่าโคโลนี *L. innocua* ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีปริมาณสารคัดเลือกลูกสูตร OCLA เข้มข้น 200% ได้ แสดงว่าการใช้สารคัดเลือกลูกสูตร OCLA ที่ความเข้มข้น 200% ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ได้ทั้งหมด ในรูปที่ 4.51 แสดงการเปรียบเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์สามารถสังเกตได้ว่าการลดความเข้มข้นมาตรฐานของสารคัดเลือกลูกสูตรจาก 100% เหลือ 25% ทำให้โคโลนี *L. innocua* ขยายขนาดได้ดีขึ้น โดยขนาดโคโลนีสุดท้ายใหญ่ขึ้น อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดมีค่ามากขึ้น อัตราการขยายตัวของโคโลนีมีค่ามากขึ้น และลดระยะเวลาในการตรวจพบ *L. innocua* ลง นอกจากนี้จำนวนโคโลนีที่นับได้ที่ระดับการใช้สารคัดเลือกรวมเข้มข้น 25% นั้นปรากฏขึ้นครบภายใน 24 ชั่วโมงดังแสดงในรูปที่ 4.54 ด้วย สำหรับรูปที่ 4.53 แสดงให้เห็นว่าจำนวนโคโลนี *L. innocua* สุดท้ายที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการใช้ระดับสารคัดเลือกลูกสูตร OCLA เข้มข้น 25%, 50%, และ 100% นั้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $P>0.05$ )



(ก) สารคัดเลือกรวม 25%



(ข) สารคัดเลือกรวม 50%

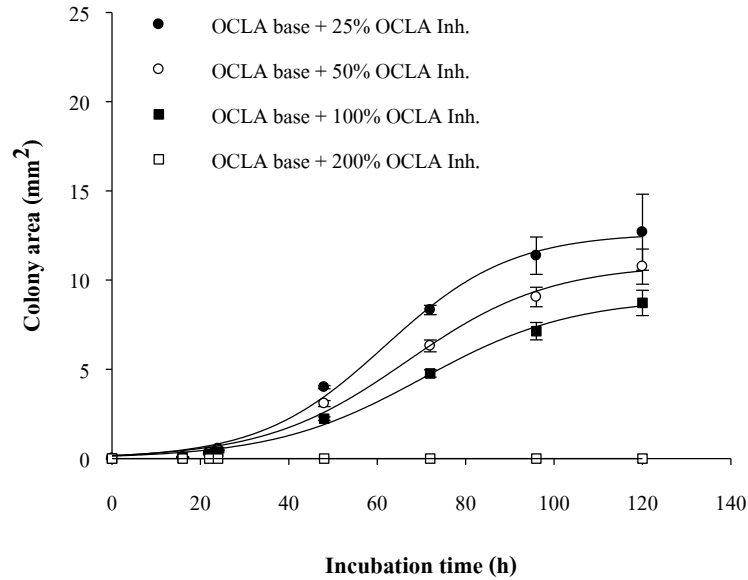


(ค) สารคัดเลือกรวม 100%

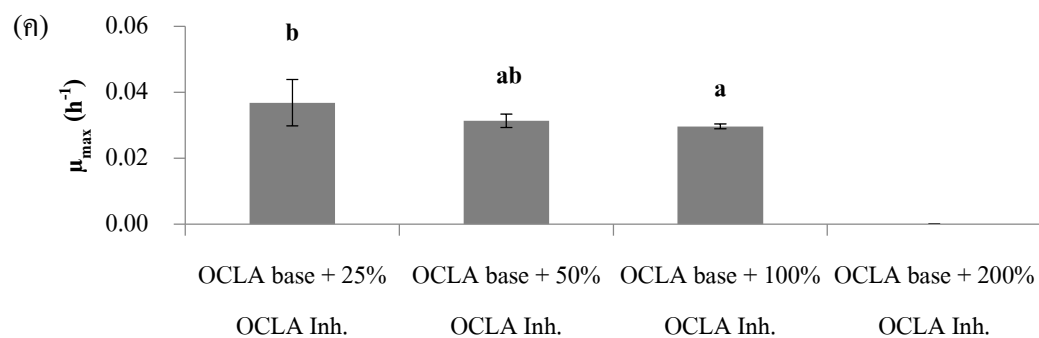
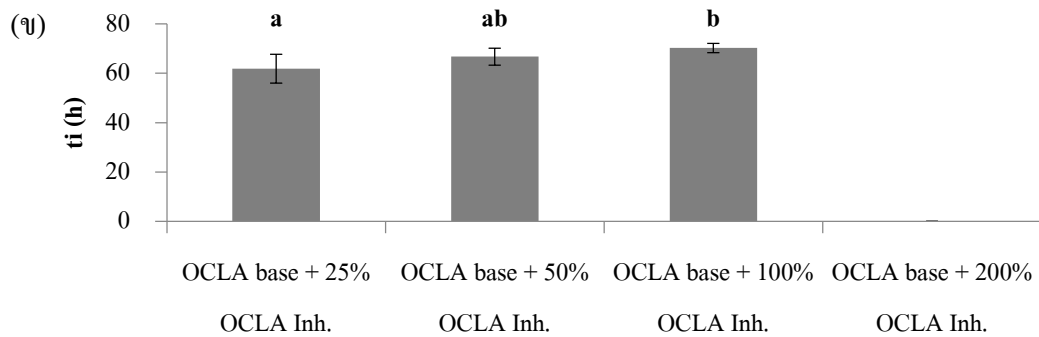
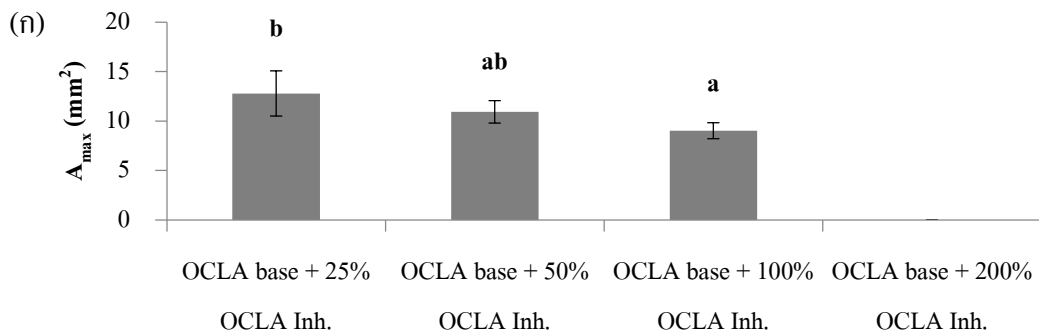


(ง) สารคัดเลือกรวม 200%

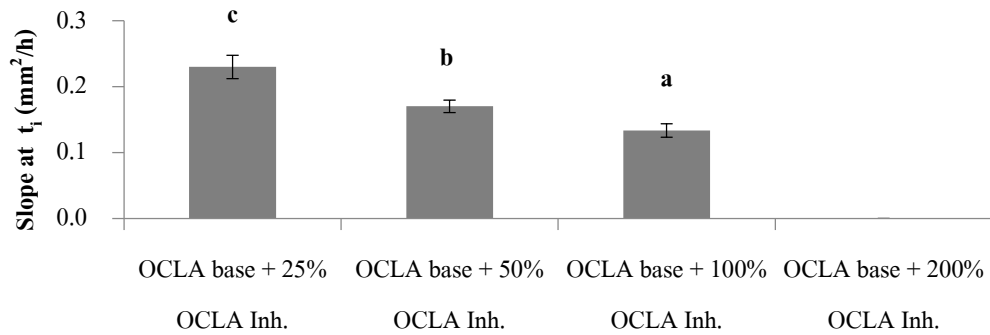
**รูปที่ 4.50** โคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูกสูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง



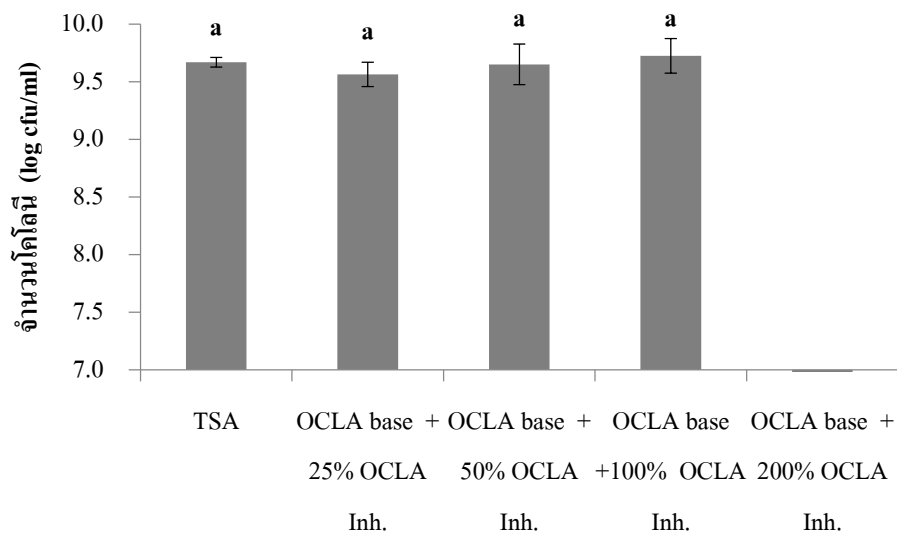
รูปที่ 4.51 การเจริญเติบโตของโคไลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหาร และวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



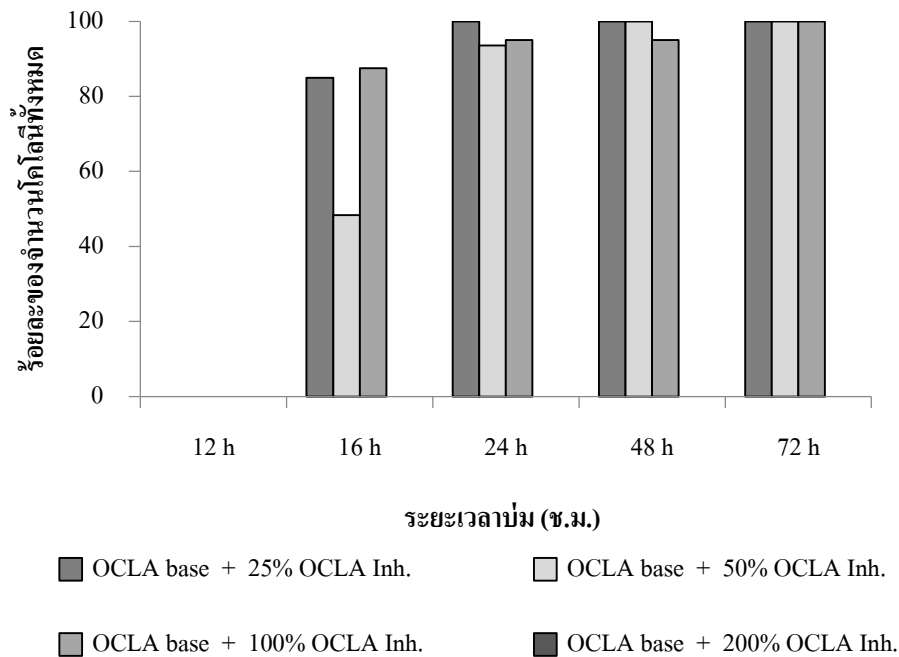
(ง)



**รูปที่ 4.52** การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



**รูปที่ 4.53** การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



**รูปที่ 4.54** ร้อยละของจำนวน โคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกลูกสูตร OCLA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

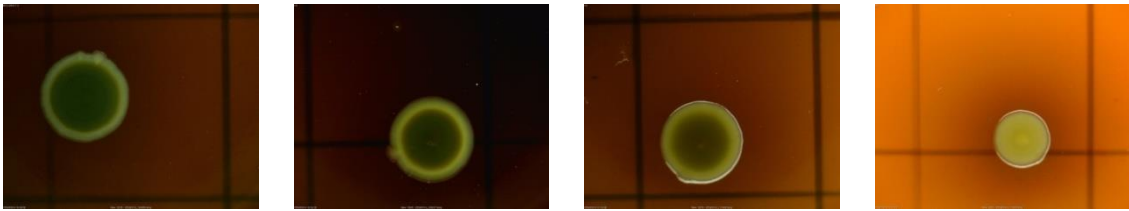
#### 4.3.5.2 การศึกษาผลของสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร PALCAM และ OCLA

จากผลการทดลองใน 4.3.3.2 ซึ่งเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA มาตรฐานทำให้เกิดความสนใจในการผสมผสานระบบสารยับยั้งใหม่โดยการนำสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford มาแทนที่ในส่วนของสารคัดเลือกลูกสูตร PALCAM และ OCLA

##### 4.3.5.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM

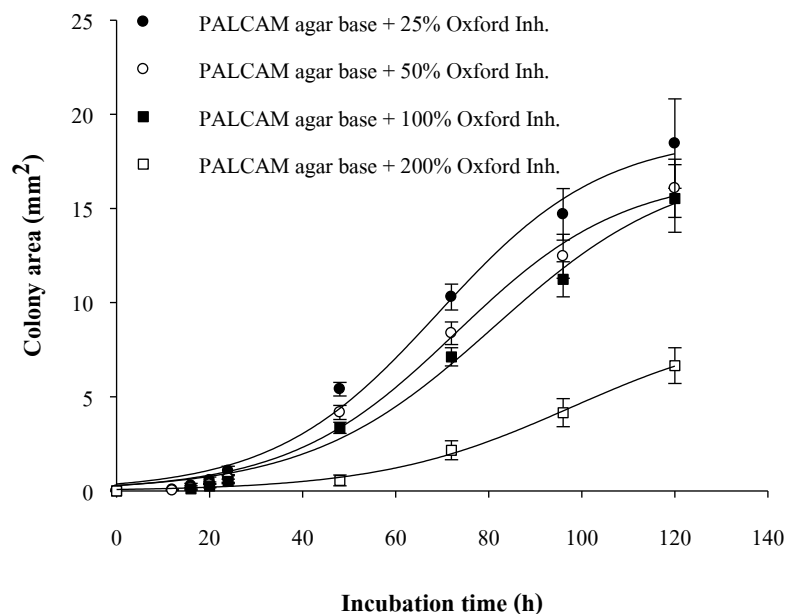
รูปที่ 4.56 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้น 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อตรวจสอบผลของสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. innocua* และจากรูปที่ 4.57 แสดงการเปรียบเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารคัดเลือกลูก 25%, 50%, และ

100% ให้ผลของขนาดของโคโลนีสุดท้ายต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญ ( $P>0.05$ ) แต่การใช้สารคัดเลือก Oxford ที่ระดับความเข้มข้น 25% และ 50% นั้นทำให้ใช้ระยะเวลาในการตรวจพบโคโลนี *L. innocua* สั้นกว่าที่ระดับความเข้มข้น 100% และค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของการใช้สารคัดเลือกความเข้มข้น 100% มีค่าต่ำกว่าการใช้สารคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า สำหรับโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแข็งที่ใช้สารคัดเลือกความเข้มข้น 200% นั้นยังคงมีลักษณะการเจริญเติบโตช้าเหมือนในผลการทดลองของการใช้สารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนของสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford และการใช้สารคัดเลือกสูตร PALCAM ที่ผสมกับส่วนของสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM โดยสังเกตได้จากค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ทุกค่า นอกจากนี้จากรูปที่ 4.59 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารคัดเลือกความเข้มข้น 200% ทำให้จำนวนโคโลนีสุดท้ายที่นับได้น้อยกว่าจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่ผสมสารคัดเลือก 25%, 50%, และ 100% อีกด้วย

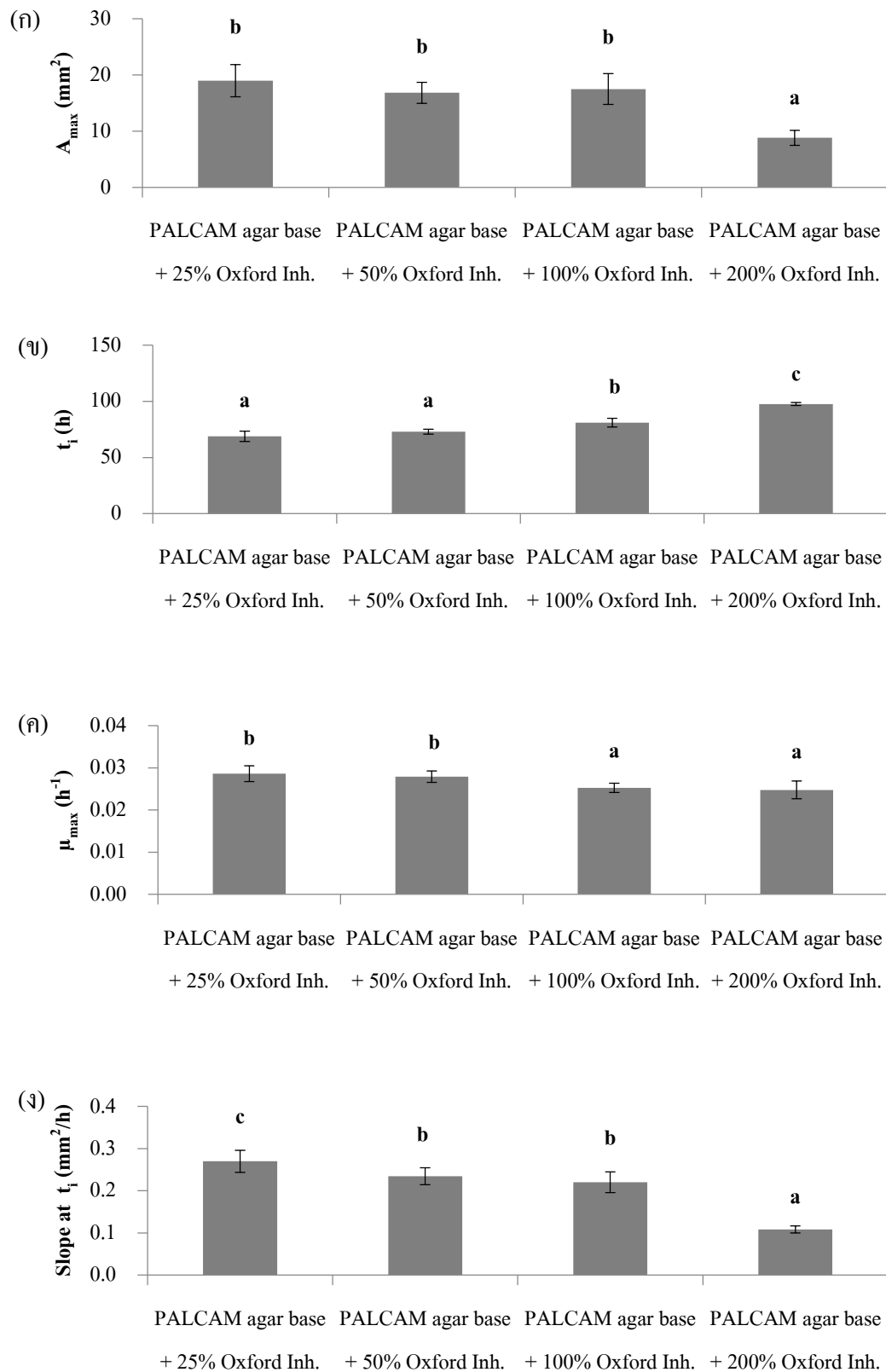


(ก) สารคัดเลือก 25%      (ข) สารคัดเลือก 50%      (ค) สารคัดเลือก 100%      (ง) สารคัดเลือก 200%

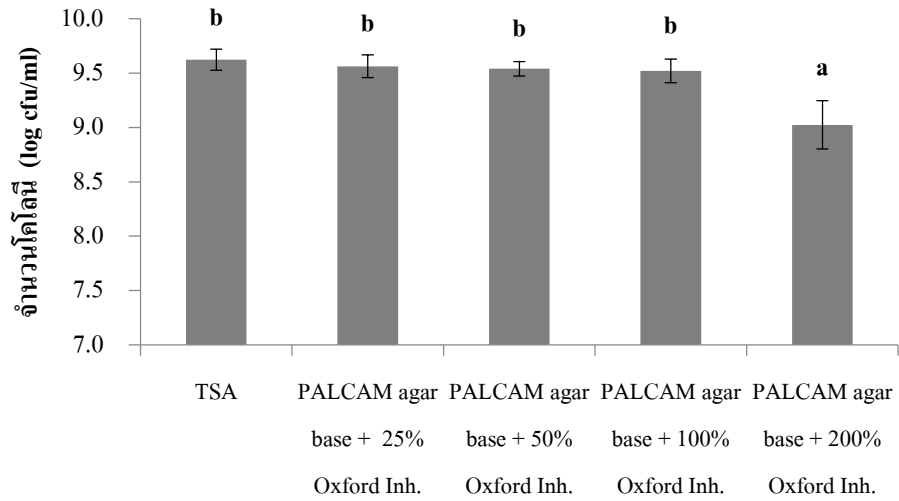
**รูปที่ 4.55** โคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง



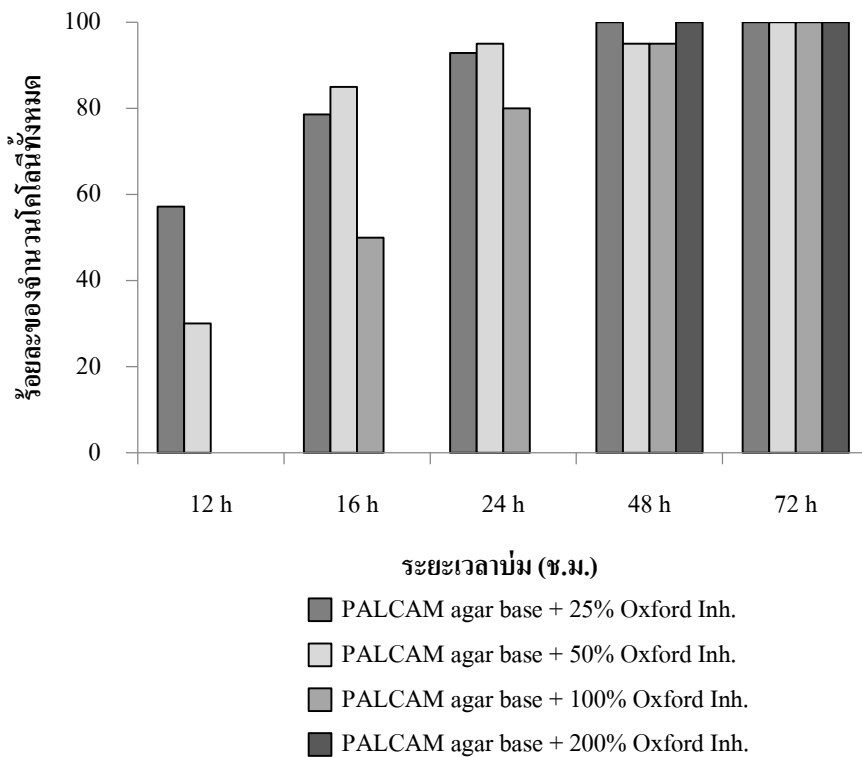
**รูปที่ 4.56** การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4.57 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ



**รูปที่ 4.58** การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

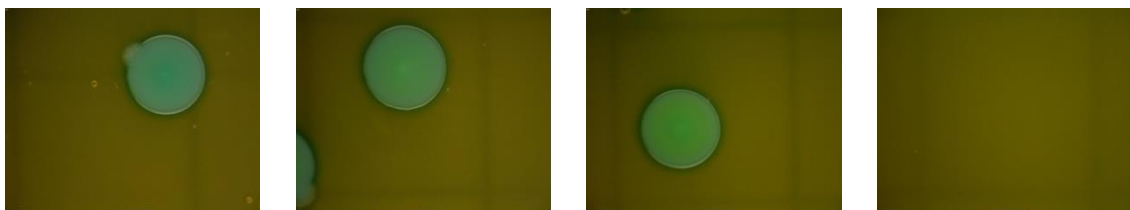


**รูปที่ 4.59** ร้อยละของจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM กับสารคัดเลือกลูกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

#### 4.3.5.2.2 ผลของความเข้มข้นของสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร

##### OCLA

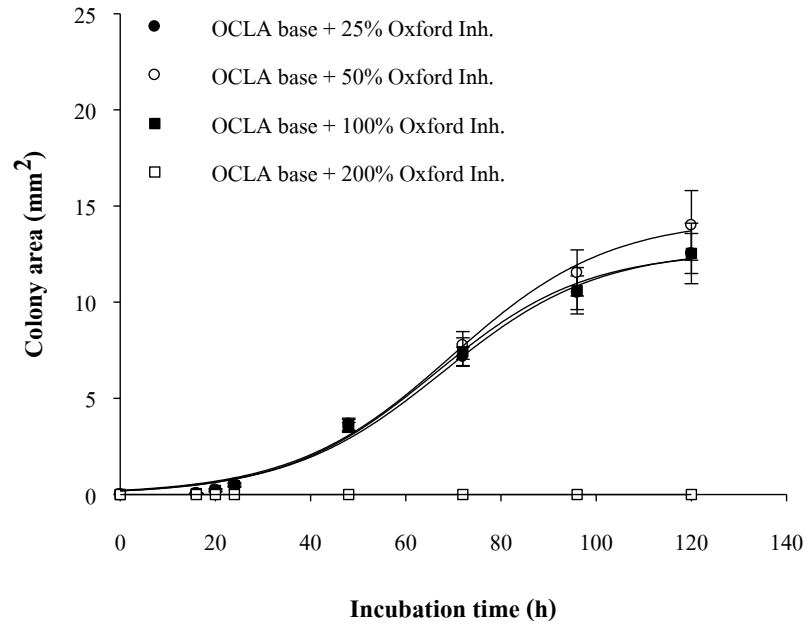
ในรูปที่ 4.61 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะซึ่งเป็นผลจากการเติมสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ระดับความเข้มข้น 25%, 50%, 100%, และ 200% ของความเข้มข้นมาตรฐาน แต่ไม่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ)lithium chloride ที่ระดับความเข้มข้น 25%, 50%, และ 100% ผสมกับส่วนสารอาหารและวุ้นสูตร (OCLA จากผลการทดลองพบว่าการใช้สารคัดเลือก Oxford ที่ระดับความเข้มข้น 200% มีผลยับยั้งโคโลนี *L. innocua* ไม่ให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซึ่งเหมือนกับผลการทดลองของการใช้สารคัดเลือกสูตร OCLA ที่ระดับความเข้มข้น 200% ผสมกับส่วนของสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA ส่วนการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติมสารคัดเลือก Oxford ที่ระดับความเข้มข้น 25%, 50%, และ 100% นั้นไม่แตกต่างกันซึ่งสังเกตได้จากค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ทุกค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $P>0.05$ ) ในรูปที่ 4.62 ดังนั้นสำหรับกรณีนี้การลดปริมาณสารยับยั้งลงไม่ช่วยให้จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* ดีขึ้น ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารคัดเลือกกับการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะไม่ได้เป็นเชิงเส้น ส่วนจำนวนโคโลนีสุดท้ายที่นับได้ (log CFU/mL) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่ผสมสารคัดเลือก Oxford ที่ระดับความเข้มข้น 25%, 50%, และ 100% นั้นไม่แตกต่างกัน ( $P>0.05$ )



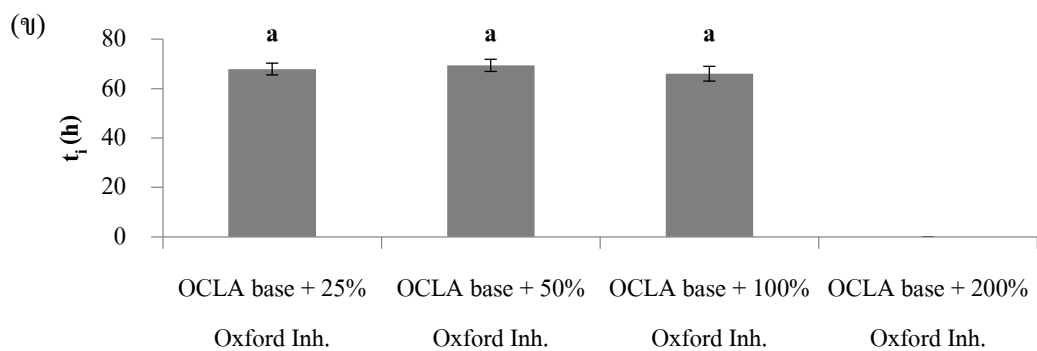
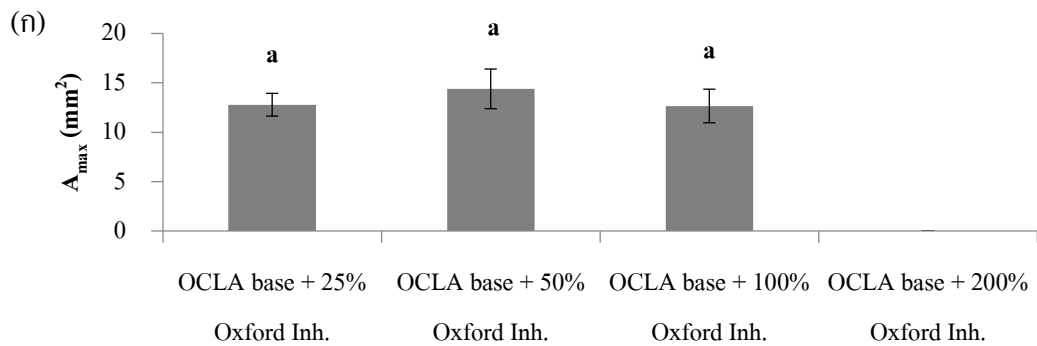
(ก) สารคัดเลือก 25%      (ข) สารคัดเลือก 50%      (ค) สารคัดเลือก 100%      (ง) สารคัดเลือก 200%

**รูปที่ 4.60** โคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการบ่ม 120 ชั่วโมง

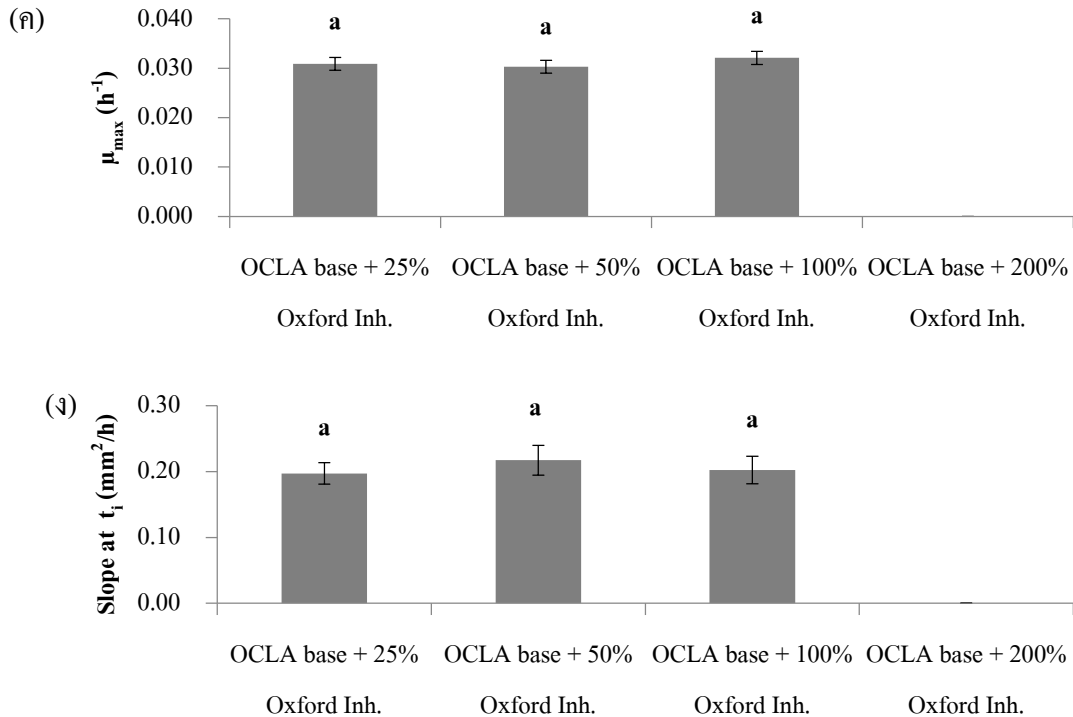




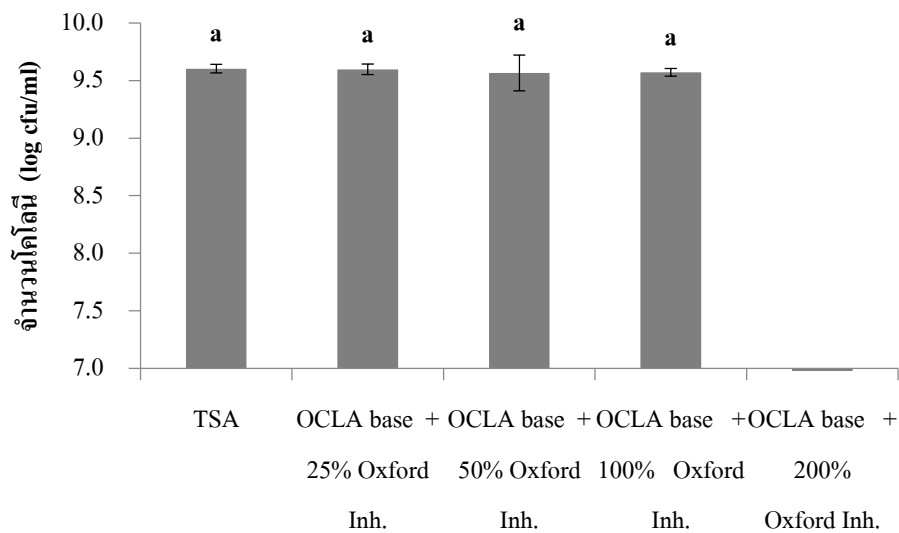
รูปที่ 4.61 การเจริญเติบโตของโคไลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหาร และวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



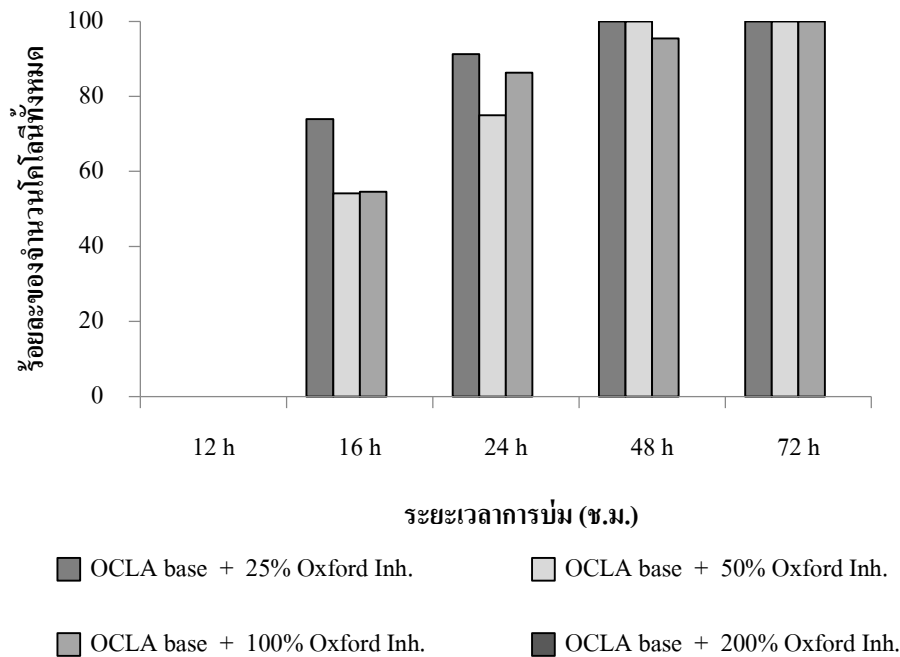
(ก)



รูปที่ 4.62 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4.63 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ ( $\log CFU/mL$ ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

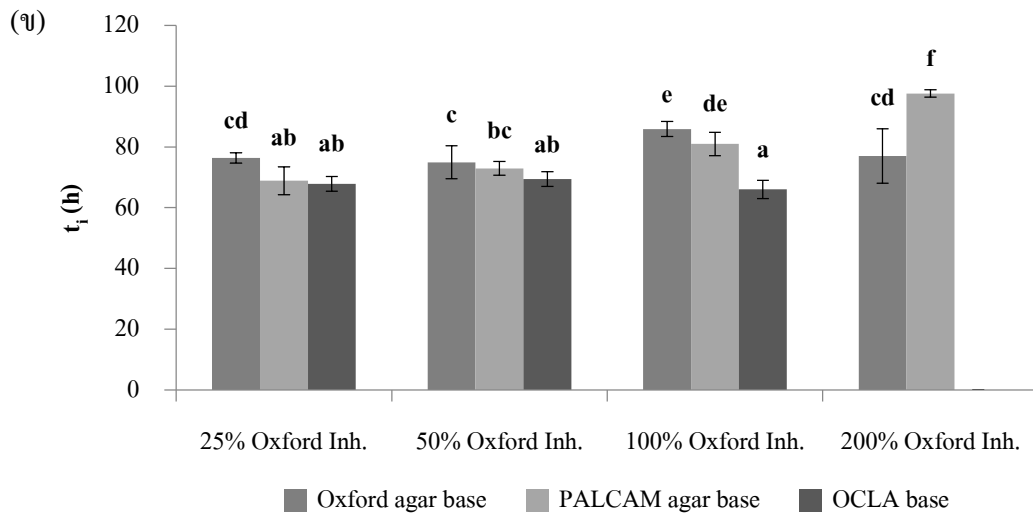
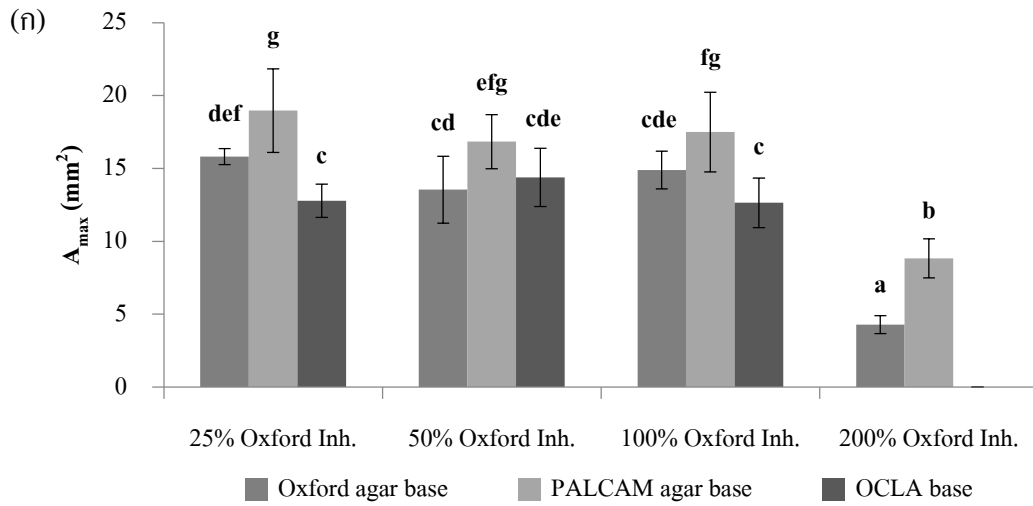


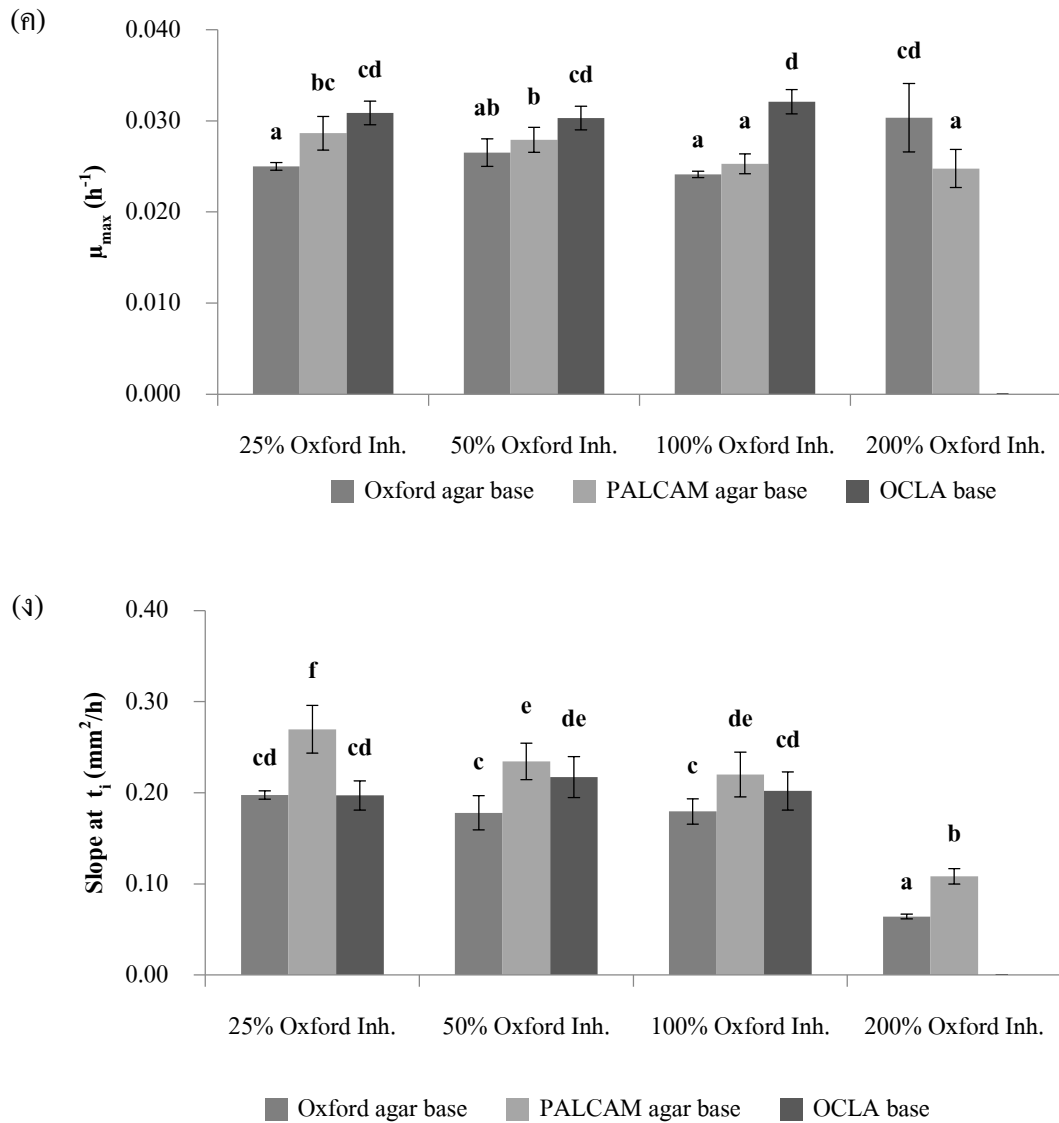
**รูปที่ 4.64** ร้อยละของจำนวน โคโลนี *L. innocua* ที่นับได้ทั้งหมดในระยะเวลาต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

#### 4.3.5.2.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารคัดเลือกสูตร Oxford กับสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA

สำหรับหัวข้อนี้ได้นำผลการทดลองก่อนหน้าในกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่ใช้สารคัดเลือกสูตร Oxford ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกัน โดยมีความแตกต่างในส่วนของสารอาหารและวุ้นจากสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA จากรูปที่ 4.65ก แสดงการเปรียบเทียบขนาดโคโลนีสุดท้ายพบว่าโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่ผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM มีขนาดใหญ่กว่าการใช้สารอาหารจากสูตร Oxford และ OCLA ที่แต่ละระดับความเข้มข้นของสารคัดเลือกสูตร Oxford เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของสารอาหารและวุ้นในสูตร Oxford และ PALCAM แล้วพบว่าทั้งสองสูตรมีสารชี้วัดชนิดเดียวกัน คือ esculin และ ferric ammonium citrate จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโคโลนี *L. innocua* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะที่ผสมสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM ได้ดีกว่าการใช้สูตร Oxford ซึ่งสังเกตได้จากขนาดโคโลนีสุดท้ายที่ใหญ่กว่าและการขยายตัวของโคโลนีเร็วกว่าที่แต่ละระดับความเข้มข้นของสารคัดเลือก เนื่องจากในสารอาหารและวุ้นสูตร PALCAM ไม่เพียงแต่มี esculin เป็นแหล่งอาหารธาตุคาร์บอนเท่านั้นแต่ยังประกอบด้วยกลูโคสซึ่งถือว่า

เป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria* spp. (Lachica, 1990) ในขณะที่สารอาหารในสูตรอาหาร Oxford ไม่มีกลูโคส





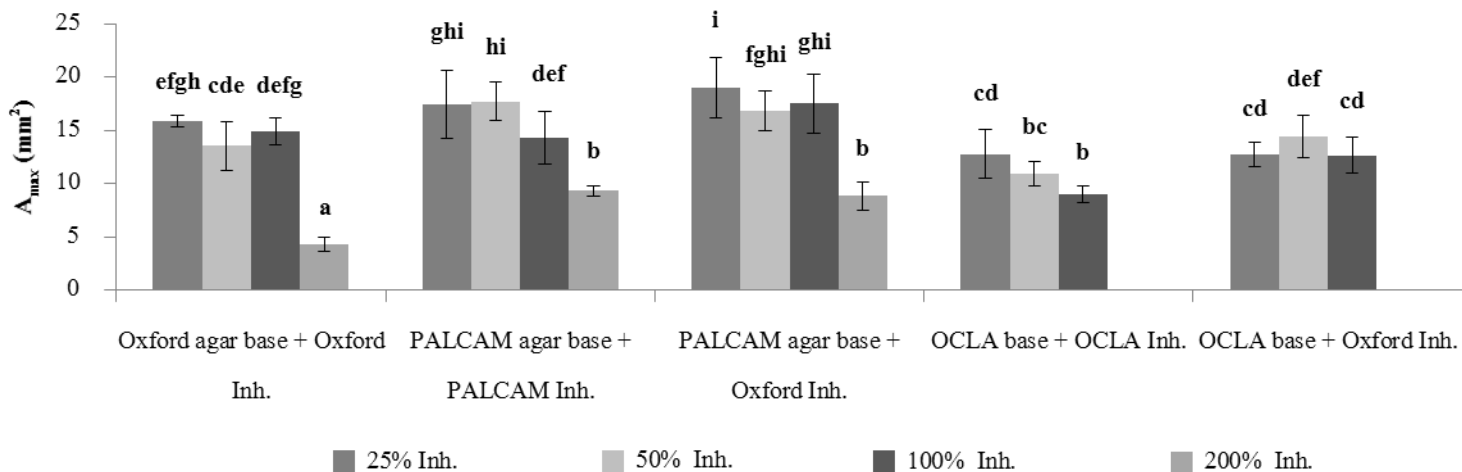
รูปที่ 4.65 การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA กับสารคัดเลือกสูตร Oxford ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.3.5.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria spp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารคัดเลือกต่างสูตรและความเข้มข้นกับสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐาน

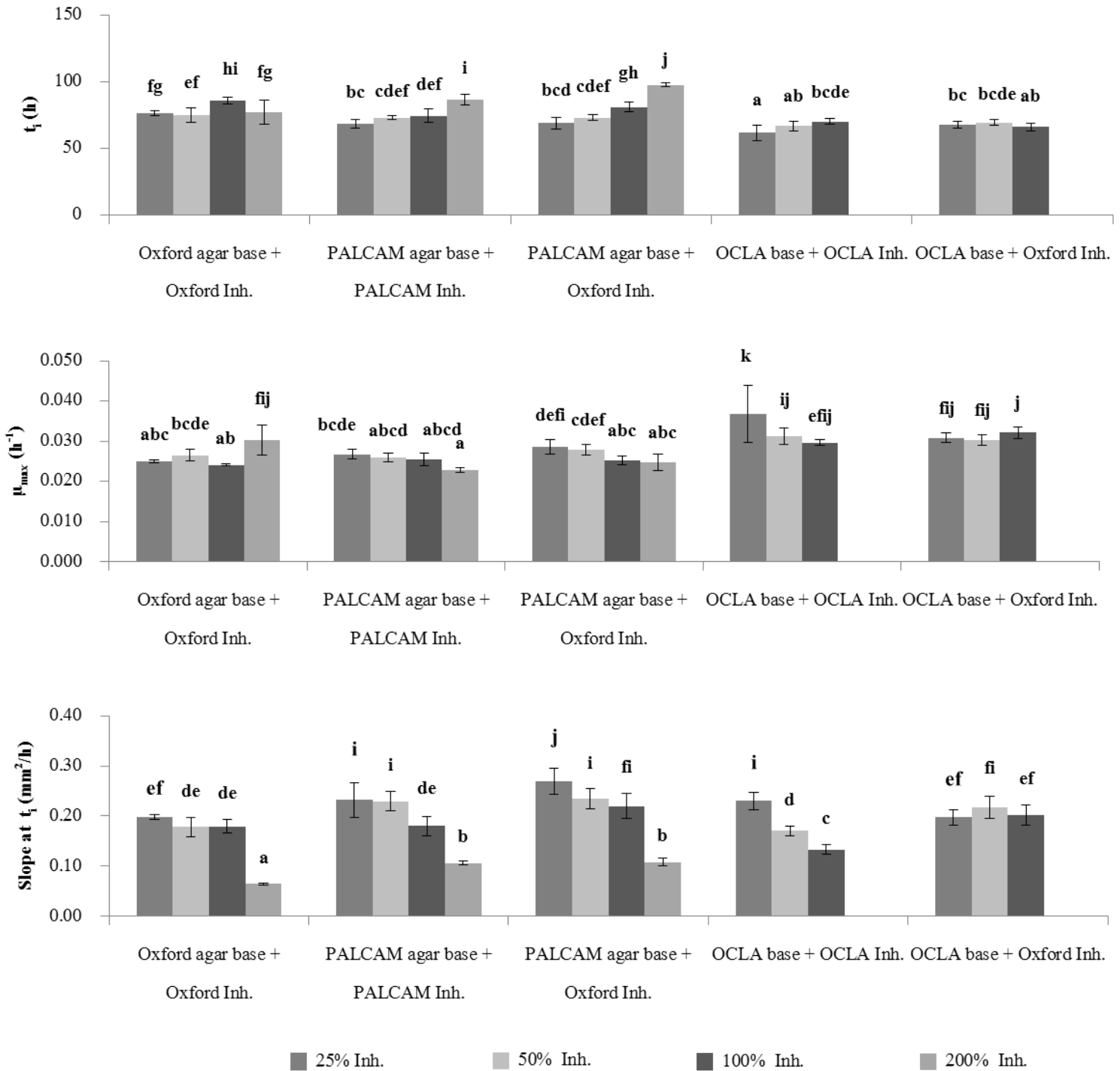
วัตถุประสงค์ในหัวข้อนี้ต้องการนำผลการทดลองทั้งหมดของหัวข้อ 4.3.5 มาพิจารณาร่วมกัน จากรูปที่ 4.66 แสดงการเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะชนิดต่างๆ เมื่อได้พิจารณาอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะในกลุ่มที่ใช้สารอาหารและวุ้นของ PALCAM พบว่าเมื่อแทนที่สารคัดเลือกสูตร PALCAM มาตรฐาน (ความเข้มข้น 100%) ด้วยสาร

คัดเลือกสูตร Oxford ความเข้มข้น 100% ทำให้ขนาดโคโลนี *L. innocua* สุดท้ายมีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาในการตรวจสอบเชื้อ และเพิ่มความเร็วในการเจริญเติบโตได้อีกด้วย ในทำนองเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะในกลุ่มที่ใช้สารอาหารและวุ้นของ OCLA ที่ระดับสารคัดเลือกเข้มข้น 50% และ 100% พบว่าการใช้สารคัดเลือกสูตร Oxford ทำให้การเจริญเติบโตของ *L. innocua* ดีกว่าการใช้สารคัดเลือกสูตร OCLA โดยสังเกตได้จากขนาดของโคโลนีสุดท้ายที่ใหญ่กว่าและสามารถขยายขนาดได้เร็วกว่า

ผลการแทนที่ชุดสารคัดเลือกมาตรฐานของ PALCAM และ OCLA ด้วยชุดสารคัดเลือก Oxford ข้างต้นนั้นอาจเกี่ยวข้องกับสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ที่มาจาก Polymycin B, nalixidic acid, และ ceftazidime ที่อยู่ในชุดสารคัดเลือกสูตร PALCAM และ OCLA แต่ไม่อยู่ในชุดสารคัดเลือกสูตร Oxford จากงานวิจัยของ Curtis และ Lee (1995) พบว่า การผสม ceftazidime ที่ความเข้มข้น 20 mg/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เช่น PALCAM อาจเกิดความล้มเหลวในการคืนสภาพ *L. monocytogenes* เป็นบางครั้ง ผลของสารคัดเลือกที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปในอนาคต



**รูปที่ 4.66** การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐานกับสารคัดเลือกสูตรต่างๆ และที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ



**รูปที่ 4.66** การเปรียบเทียบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะจากการผสมสารอาหารและวุ้นสูตร Oxford, PALCAM, และ OCLA สูตรมาตรฐานกับสารคัดเลือกร่างต่าง ๆ และที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ (ต่อ)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารเพิ่มจำนวนเพื่อการฟื้นฟูและการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในการเข้าใจอย่างแท้จริงของไคเนติกการเพิ่มจำนวนเซลล์ การทดลองถูกออกแบบเป็น 2 ส่วน ซึ่งเป็นอาหารเหลวไม่เพิ่มจำนวนและอาหารเหลวจำเพาะ ในแต่ละส่วนรูปแบบของการเจริญเติบโตและไคเนติกของการเจริญเติบโตถูกวัด โดยการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนา (MIT) และการเพาะเชื้อระดับเล็ก (micro-cultivation) การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. innocua*, *E. coli*, และ *S. aureus* ใน 96 deep well plates การนำเสนอรูปแบบการวิเคราะห์แบบใหม่ ถูกเป็นที่ยอมรับเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายและการจัดการรูปแบบการวิเคราะห์นี้สามารถลดเวลาการวิเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญและสามารถเพิ่มจำนวนและตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. ในการทดลองอาหารเหลวเพิ่มจำนวน (non-selective enrichment) 6 ชนิด ในการบ่มเพาะ *L. innocua* ท่ามกลางระหว่างอาหารที่ใช้ในการทดสอบ อาหารเหลว TSB พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการฟื้นคืนและเพิ่มจำนวนของ *L. innocua* ในอาหารขณะทำการเพิ่มจำนวนในขั้นตอน non selective enrichment โดยให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตที่สูงที่สุดที่ค่า  $0.21 \text{ h}^{-1}$  ของเชื้อ *L. innocua* ด้วยค่า  $R^2$  ที่ดีเท่ากับ 0.989 และปริมาณเซลล์สุดท้ายที่ได้เป็น  $9.25 \log \text{ CFU/mL}$

การทดลองอาหารเหลวจำเพาะได้ต่อยอดไปสู่การแยกบนอาหารแข็ง ในความเข้าใจบทบาทผลกระทบของสารยับยั้งและเน้นความสำคัญของไคเนติกในการแยก *Listeria* spp. จากการปนเปื้อนด้วยเชื้อตัวอื่นๆ สารยับยั้งโดยทั่วไปมาจากสูตรอาหารมาตรฐานซึ่งได้ถูกนำมาทดสอบในการทดลองนี้ acriflavine และ Polymyxin B เป็นตัวยับยั้งที่ดีมากในการใช้เป็นสารยับยั้งสำหรับ *Listeria* spp. ถึงแม้ว่าลิเทียมคลอไรด์จะไม่มีผลกับการเจริญเติบโตและความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Listeria* spp. มันรวมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหาตัวยับยั้งที่เหมาะสมเพื่อที่จะศึกษาการ combination และความเข้มข้นของสารต่อการเจริญเติบโต และความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *L. innocua* การหาสภาวะของสารผสมที่เหมาะสมของสารยับยั้งชี้ให้เห็นการใช้ตัวยับยั้งแต่ละตัวมีผลกระทบกับการเจริญเติบโตของเชื้อและความสามารถในการคัดเลือกเชื้อแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของ Polymyxin B มีอิทธิพลกับประสิทธิภาพของ acriflavine นอกเหนือจากนี้ความเข้มข้นของลิเทียมคลอไรด์มีผลกระทบกับการเจริญเติบโตของ *S. aureus* เมื่อใช้ร่วมกันกับ Polymyxin B อย่างในที่สุด การใช้ร่วมกันของสารยับยั้งที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ได้ออกแบบเหมือนกับสูตรอาหารใน Palcam broth



การสังเกตและศึกษาการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะในช่วงของการแสดงลักษณะเฉพาะเป็นผลสำเร็จ การศึกษาโคโลนีดังกล่าวได้พัฒนาการวิเคราะห์รูปถ่ายดิจิทัลร่วมกับการประยุกต์ใช้การเพาะเชื้อระดับจุลภาคของจุลินทรีย์เป้าหมายเข้ามาช่วย ทั้งนี้การใช้กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลที่มีอยู่ในเชิงพาณิชย์จำเป็นต้องมีการปรับค่าแสงให้เหมาะสมเพื่อช่วยในการวัดขนาดของโคโลนีและการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Listeria* spp. (*L. ivanovii* และ *L. innocua*) อุปกรณ์ต้นแบบของการถ่ายรูปดิจิทัลที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจติดตามการขยายขนาดของโคโลนีและทำให้ได้รูปดิจิทัลที่มีประโยชน์ สำหรับการศึกษาด้านจุลทรรศน์วิทยาการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* การทดลองนี้ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดซิกมอยด์ (Sigmoid) เพื่อนำมาอธิบายการขยายขนาดของโคโลนี *Listeria* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซึ่งไม่มีสารคัดหลั่งและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะซึ่งมีสารคัดหลั่ง แบบจำลองชนิดลอจิสติกสามารถแสดงให้เห็นลักษณะเส้นโค้งการเจริญเติบโตรูปตัวเอส (S-shape) และหาค่าตัวแปรทางคณิตศาสตร์ที่มีความหมายได้ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เวลาที่จุด inflection ขนาดโคโลนีสุดท้าย และอัตราการขยายตัวของโคโลนีที่จุด inflection โดยค่าตัวแปรเหล่านี้ใช้ในการเปรียบเทียบผลของปัจจัยทั้งภายในและภายนอกที่แตกต่างกันซึ่งมีต่อการเจริญเติบโตของโคโลนี

ในงานวิจัยนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีการดั้งเดิมเพื่อช่วยในการระบุลักษณะโคโลนี *Listeria* เช่น การทำ serial dilution เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยพบว่าการใช้ TSA เป็นสารละลายเจือจาง ความเข้มข้นของเชื้อ *Listeria* สามารถช่วยในการขยายขนาดของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ได้ แต่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะพบว่าการใช้ TSA เป็นสารละลายเจือจางความเข้มข้นเชื้อ *Listeria* มีผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะสูตร Oxford มากกว่า PALCAM และ OCLA นอกจากนี้การผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ chromogenic *Listeria* agar (OCLA) ด้วยความเร็วผสมสูงร่วมกับการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้ไมโครเวฟสามารถช่วยการเจริญเติบโตและการระบุลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ดีขึ้นได้

ส่วนบทบาทในการยับยั้งของสารคัดหลั่งได้มีการตรวจสอบโดยเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซึ่งไม่มีสารคัดหลั่ง เช่น TSA ในการทดลองนี้ใช้ OCLA เป็นตัวแทนของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ พบว่าโคโลนี *L. ivanovii* เจริญเติบโตบน TSA ได้ดีกว่าบน OCLA อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการเติมสารคัดหลั่งจากสูตร OCLA ลงใน TSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้ *L. ivanovii* เจริญเติบโตได้ไม่ดีที่ทุกระดับความเข้มข้น การเจริญเติบโตของโคโลนี *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมสาร

คัดเลือกจากสูตร OCLA ในหลายระดับความเข้มข้นมีลักษณะคล้ายกับการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. ivanovii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะ OCLA สูตรมาตรฐาน

นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* spp. สองสายพันธุ์ (*L. ivanovii* และ *L. innocua*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะต่างชนิดต่างๆ (Oxford, PALCAM, และ OCLA) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการระบุเชื้อ *L. monocytogenes* โดยพบว่าการใช้อาหารต่างชนิดกันให้ผลต่อการเจริญเติบโตของโคโลนี *Listeria* spp. ต่างกัน และ *Listeria* spp. ต่างสายพันธุ์กันมีปฏิกริยากับสารยับยั้งที่ผสมในชุดสารคัดเลือกต่างกันด้วย โดยทั่วไป *L. innocua* เป็นที่ยอมรับให้เป็นตัวแทนของ *L. monocytogenes* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะทั้ง (Oxford, PALCAM, และ OCLA) ได้ดีกว่า *L. ivanovii* ซึ่งสังเกตได้จากขนาดโคโลนีสุดท้ายในอาหารแต่ละชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA โดยเฉพาะ *L. ivanovii* นั้นไวต่อสารคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะมาก (PALCAM > Oxford > OCLA) ซึ่งมีผลให้ขนาดโคโลนีและจลนพลศาสตร์ลดลงอย่างมาก ในทางตรงกันข้ามความไวต่อสารคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะของ *L. innocua* นั้นสลับกัน (PALCAM > OCLA > Oxford)

สำหรับการปรับเปลี่ยนระดับสารคัดเลือกในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะแต่ละชนิดจาก 25% ถึง 200% แสดงให้เห็นว่าการลดปริมาณสารคัดเลือกให้ต่ำกว่ามาตรฐาน (น้อยกว่า 100%) สามารถเพิ่มจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและลดระยะเวลาในการตรวจพบโคโลนี *L. innocua* ได้และมีการพิจารณาและสร้างแบบจำลองลักษณะการเจริญเติบโตของ *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแข็งทั้ง 3 ชนิดเพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เหมาะสมและนำเสนอแนวทางในการเพิ่มจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตรวมไปถึงความจำเพาะด้วย โดยการนำสารคัดเลือกสูตร Oxford มาแทนที่สารคัดเลือกสูตรดั้งเดิมในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ PALCAM และ OCLA พบว่าโดยส่วนใหญ่ให้ผลคล้ายกับการใช้สารคัดเลือกสูตรดั้งเดิมที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนี *L. innocua* ส่วนผลทางด้านความจำเพาะที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นควรมีการทดลองต่อไปในอนาคต

### ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นโอกาสของการลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Listeria* spp. และลดอัตราการเกิด false negative จากการตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. ในสายกระบวนการผลิตโดยการประยุกต์ใช้เงื่อนไขสภาวะที่เหมาะสมของอาหารไม่เพิ่มจำนวนและขั้นตอนการเพิ่มจำนวนจำเพาะ

และการใช้เทคนิคการวิเคราะห์เชื้อในระดับจุลภาค (MIT) อย่างไรก็ตามอาหารเหลวไม่จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนที่เหมาะสมและอาหารเหลวจำเพาะของวิธีการวิเคราะห์ที่ได้แนะนำจากการศึกษานี้ยังคงต้องการทดลองโดยทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ผลจากการศึกษานี้เป็นเพียงแนวทางสำหรับการตรวจวิเคราะห์ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างอาหาร เพราะเชื้อ *Listeria* ที่ใช้ในงานวิจัยเป็น *L. innocua* นอกจากนี้มีสารยับยั้งบางตัวที่ไม่ได้ถูกศึกษาในการทดลองนี้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไป เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ควรที่จะรวมกันเพื่อสร้างสภาวะเงื่อนไขที่เหมือนกับสภาวะเงื่อนไขจริง ในเพิ่มเติม ceftazidime และ cycloheximide ควรที่จะมีการทดสอบในการศึกษาถัดมาเพื่อเพิ่มความถูกต้องในการวิเคราะห์และได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือและนำเสนอเทคนิคที่ควรที่จะเปรียบเทียบกับเทคนิคที่เป็นมาตรฐานเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพความน่าเชื่อถือ

การประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลควรได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นประโยชน์กับอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะเชื้อ *Listeria* ที่เจริญเติบโตได้ช้ากว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นวิธีการที่ช่วยกระตุ้นให้เชื้อ *Listeria* เจริญเติบโตได้เร็วยิ่งขึ้นนั้นเป็นสิ่งสำคัญ ในขณะเดียวกัน โคลนินของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่ควรปรากฏในลักษณะเดียวกับเชื้อ *Listeria* เพื่อป้องกันความผิดพลาดจากการตรวจวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม อิทธิพลของความเข้มข้นของสารยับยั้งและการตัดแปลงสูตรควรได้รับการตรวจสอบต่อไป เนื่องจากการหาปริมาณสารยับยั้งที่เหมาะสมที่สุดนั้นจะส่งผลดีต่อการตรวจสอบเชื้อ *Listeria* ในตัวอย่างอาหาร

## ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

1.1 Sangadkit, W., Deepatana, A. and Thipayarat, A., 2019, "Media optimization of enrichment protocol to improve *Listeria* selectivity", Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology), 11(22).

2. การจดสิทธิบัตร

อาหารเหลวจำเพาะสำหรับเพิ่มจำนวนและคัดเลือกเชื้อลิสทีเรียโดยใช้อาหารสนับสนุนการเจริญเติบโตที่เสริมสารยับยั้ง

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาครัฐกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก ได้มีการนำผลงานดังกล่าวเสนอแนวทางการนำไปใช้งานแก่ บริษัท บุญโหนด (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทผลิตอาหารแช่แข็งส่งออกโดยทางคณะผู้วิจัยได้นำชุดวิเคราะห์ดังกล่าวไปทดสอบการใช้งานจริงที่โรงงาน โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของทางโรงงาน และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (swab testing) มาทดสอบวิเคราะห์กับชุดทดสอบที่นำเสนอ พบว่าทางโรงงานพึงพอใจกับการใช้ชุดทดสอบดังกล่าว โดยมีแผนที่จะนำมาใช้ควบคู่กับการทดสอบที่เป็นมาตรฐานของโรงงานเมื่อต้องการผลการทดสอบที่รวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์กับงานวิจัยที่จำเป็นต้องใช้ชุดวิเคราะห์การปนเปื้อนของลิสทีเรียเพื่อที่สามารถทดสอบกับตัวอย่างจำนวนมาก ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย สามารถเป็นแนวทางต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจทดสอบการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคชนิดอื่นที่ช่วยลดต้นทุนจากการนำเข้าชุดทดสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ เป็นการส่งเสริมศักยภาพความสามารถนักวิทยาศาสตร์ไทย และเป็นความท้าทายที่จะนำผลงานดังกล่าวไปประยุกต์ใช้จริงในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐต่างๆ สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลโดยเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์

## เอกสารอ้างอิง

1. Andriole, V.T., editor, 1998, The quinolone, United state of America: Academic Press.
2. Baranyi, J. and Roberts, T.A., 1994, “A dynamic approach to predicting bacterial growth in food”, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 23, pp. 277 – 294.
3. Beumer, R.R., Giffel, Kok, M.C.T., and Rombouts, F.M., 1996, “Confirmation and identification of *Listeria* spp., *Letters in Applied Microbiology*”, Vol. 22, pp. 448 – 452.
4. Buchanan, R.L., Whiting, R.C. and Damert, W.C., 1997, “When is simple good enough: a comparison of the Gomperts, Baranyi, and three phases models for fitting bacterial curves”, *Food Microbiology*, Vol. 14, pp. 313 – 326.
5. Bhanot, S.K., Singh, M. and Chatterjee, N.R., 2001, “The chemical and biological aspects of fluoroquinolones: Reality and dream, *Current Pharmaceutical Design*”, Vol. 7, pp. 313-317.
6. Budu-Amoako, E., Toora, S., Ablett, R.F. and Smith, J., 1992, “Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat-injured and freeze-injured *Listeria monocytogenes* cells, *Applied and Environmental Microbiology*”, Vol. 58, pp. 3177-3179.
7. Carr, J and Hageman, J., 2005, *Staphylococcus aureus*, Center for Disease Control and Prevention. USA.
8. Cornu, M., Kalmokoff, M. and Flandrois, J., 2002, “Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths”, *International Journal of Food Microbiology [Electronic]*, Vol. 73, pp. 261-274, Available: Elsevier/Science Direct [2010, December 23].
9. Curtis, G.D.W. and Lee, W.H., 1995, “Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*”, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 26, pp. 1 – 13.
10. Faber, J.M. and Peterkin, P.I., 1991, “*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *Microbiology Reviews*”, Vol. 55, pp. 476-511.
11. Farber, J.M. and Peterkin, P.I., 1991, “*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *Microbiology Reviews*, Vol. 55, pp. 476-511.
12. Goss, W.A., Deitz, W.H. and Cook, T. II., 1964, “Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, Vol. 88, pp. 1112-1118.

13. Jay, J.M., 1996, "Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products", *Food Control*, Vol. 7, pp. 209-214.
14. Jayne-Williams, D.J., 1963, "Report of a discussion on the effect of the diluent on recovery of bacteria", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 26, pp. 398-404.
15. Jowett, C., Millar, H. and Pataky K., 2003, Effect of Increased Flow Rate on the Microbial Population in the Waterloo Biofilter® [Online], Available: <http://www.waterloo-biofilter.com/downloads/effect-of-increased-flow-rate-microbial-population-waterloo-biofilter.pdf> [2011, March 18]
16. Kamat, A.S. and Nair P.M., 1996, [Abstract of "Identification of *Listeria innocua* as a Biological Indicator for Inactivation of *L. monocytogenes* by some Meat Processing Treatments", *Lebensmittel-Wissenschaft and – technologie*, Vol. 29, No. 8, pp. 714-720], [Electronic], Available: Academic Press [2011, March 30].
17. Kawai, M., Yamada, S., Ishidoshiro, A., Oyamada, Y., Ito, H. and Yamagishi, J., 2009, "Cell wall thickness: possible mechanism of acriflavine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Journal of Medical Microbiolog*, Vol. 58(Pt 3), pp. 331-336.
18. Kosonpisit, P., 2010, "Optimization of Liquid Enrichment to Enhance Batch Growth Kinetics of *Listeria* spp.", Master of Engineering Thesis, Food Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi.
19. Lachicha, R.V., 1990, "Selectivity Medium for Quantitative Recovery of Foodborne *Listeria monocytogenes*", *Applied and Environmental Microbiology* [Electronic], Vol. 56, No. 1, pp. 167-169, Available: American Society for Microbiology [2011, April 1].
20. Les'kova', E., Kubi'kova', J., Kova'c'ikova', E., Kos'icka', M., Porubská', J. and Holc' i'kova, K., 2006, "Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models", *Journal of Food Composition and Analysis* [Electronic], Vol. 19, pp. 252-276, Available: Elsevier/Science Direct [2011, April 9].
21. Lungu, B., Ricke, S.C. and Johnson, M.G., 2009, "Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review", *Anaerobe* [Electronic], Vol. 15, pp. 7-17, Available: Elsevier/Science Direct [2011, April 4].

22. Mata, M.T., Baquero, F. and Perez-Diaz, J.C., 2000, "A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*", FEMS Microbiology Letters, Vol. 187, pp. 185-188.
23. Membre', J.M., Ross, T. and McMeekin, T., 1999, "Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling process", Letters in Applied Microbiology, Vol. 28, pp. 216 – 220.
24. Mian, M.A., Fleet, G.H. and Hockingb, A.D., 1997, "Effect of diluent type on viability of yeasts enumerated from foods or pure culture", International Journal of Food Microbiology [Electronic], Vol. 35, pp. 103-107, Available : Elsevier/Science Direct [2011, March 8]
25. Miller, F.A., Ramos, B., Gil, M.M., Branda' o, T.R.S., Teixeira, P. and Silva, C.L.M., 2009, "Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*", International Journal of Food Microbiology [Electronic], Vol. 133, pp. 121-128, Available: Elsevier/Science Direct [2011, March 30].
26. Nakamura, H., 1968, "Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethyl alcohol, and sodium dodecyl sulfate in *E. coli*", Journal of Bacteriology, Vol. 96, pp. 987-996.
27. Nancy, R. and Herman, L., 2004, "Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese", International Journal of Food Microbiology, Vol. 94, pp. 15-22.
28. Newton, B.A., 1956, "The properties and mode of action of the polymyxins", Bacteriology Reviews, Vol. 20, pp. 14-27.
29. Nikaido, H., 2011, "Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps", Infectious Diseases Society of America, Vol. 27, pp. 32-41.
30. Phalanisong, P., 2008, "Effect of Some Thai Medicinal Plant Extracts on Growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*", Master of Science Thesis, Biology, Chiang Mai University.
31. Ple'siat, P. and Nikaido, H., 1992, "Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes", Molecular Microbiology, Vol. 6, pp. 1323-1333.
32. Ralovich, B., Forray, A., Mero, E., Malovics, H. and Szazados, I., 1971, "New selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr, Hyg. Abt. I Orig, Vol. 216, pp. 88 – 91.

33. Ryser, E.T. and Marth, E.H., 1989, "Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese", *Journal of Dairy Science*, Vol. 72, pp. 838-853.
34. Seeliger, H.P.R. and Jonesy, D., 1986, "Genus *Listeria* pirie 1940. In Bergey's manual of systematic bacteriology", Vol. 2, eds. P.H.A. Sneathy, N.S. Mair, N.E. Sharpe, and J.G. Holt.
35. Shahamat, M., Seaman, A. and Woobine, M., 1980, "Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations, *Zentralbl*", *Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig*, Vol. 246, pp. 506-511.
36. Sheridan, J.J., Duffy, G., Mcdowell, D.A. and Blair, I.S., 1994a, "The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and <sup>®</sup>sh product, and the recovery of injured cells from frozen", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 22, pp. 105-113.
37. Smith, J.L. and Marmer, B.S., 1991, "Temperature shift effects on injury and death in *Listeria monocytogenes* Scott A", *Journal of Food Safety*, Vol. 11, pp. 73-80.
38. Straka, R.P. and Strokes, J.L., 1957, "Rapid Destruction of Bacteria in Commonly Used Diluents and Its Elimination", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 5, pp. 21-25.
39. Teuber, M. and Bader, J., 1971, "Quantitative correlation of uptake with antibiotic activity of polymysin B in *Salmonella typhimurium*", *FEBS Letter*, Vol. 16, pp. 195-197.
40. Teuber, M., 1973, "Action of polymysin B on bacterial membranes.II. Formation of lipophilic complexes with phosphatidic acid and phosphatidyl-glycerol", *Z. Naturforsch. Teil C*, Vol. 28, pp. 476-477.
41. Todar, K., 2011, *Nutrition and Growth of Bacteria* [Online], Available: <http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html> [2011, April 9]
42. Van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G.D.W. and Mossel, D.A.A., 1989, "Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp.", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 8, pp. 299-316.
43. Vaz-Velho, M., Duarte, G. and Gibbs, P., 2000, "Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish", *Journal of Microbiology Methods*, Vol. 40, pp. 147-151.
44. Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and Mcdowell, D.A., 1998, "Comparison of selective and non-selective media for the isolation of *Listeria* species from retail foods", *Journal of Food Safety*, Vol. 18, pp. 85 – 89.



45. Welshimer, H.J., 1981, "The genus *Listeria* and related organism, In: The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria (Starr, M.P., Stolp, H., Truper, A., Balows, A. and Schlegel, H.G., Eds.), pp. 1680-1687. Springer Berlin.
46. Yamaki, J., Synold, T. and Wong-Beringer, A., 2011, "Antivirulence Potential of TR-700 and Clindamycin on Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Producing Phenol-Soluble Modulins", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 55, pp. 4432-4435.