การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อซาโมเนลลา

Development of enhanced growth medium for *Salmonella* spp.

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้จัดทำ

ชื่อ - สกุล : นายธีรวัฒน์ ป้อมสุวรรณ
ตำแหน่งงาน / แผนก : ผู้ช่วยนักวิจัย
สถานประกอบกิจการ : บริษัท ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหาร ซีพีเอฟ จำกัด
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.พรเทพ ถนนแก้ว และ ผศ.ดร.ปรีย์กมล กลั่นฤทธิ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. โดยมักพบได้ในเนื้อไก่สด สุกร ไข่ ผลิตภัณฑ์จากนม ผัก และผลไม้ ความปลอดภัยของอาหารกำลังกลายเป็นประเด็นด้านสาธารณสุขที่สำคัญมากขึ้น โดยเชื้อ *Salmonella* spp. มักพบในอาหารปริมาณต่ำ ดังนั้นการตรวจหาจึงเป็นไปได้ยาก โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอาหารและสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. และพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถส่งเสริมการเจริญและลดระยะเวลาในการตรวจจับของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยการเปรียบเทียบอาหาร 3 ชนิด (Buffer peptone water (BPW), Brain heart infusion (BHI) และ Tryptic soy broth (TSB)) ที่เชื้อเริ่มต้น <1 และ 1-10 CFU/portion ซึ่งพบว่าอาหารเหลวชนิด BHI มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการช่วยส่งเสริมการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ใช้อาหารเหลว BHI เป็นอาหารหลักที่ใช้ในการพัฒนาสูตรอาหาร โดยการเสริมด้วย Sodium pyruvate, Magnesium sulphate, Bile salts, Novobiocin และ Trehalose ได้ออกมาเป็นอาหารสูตรใหม่ 17 สูตร (A1-E2) โดยพบว่าอาหารทั้ง 17 สูตรยังไม่สามารถลดระยะเวลาพักตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ แต่มีอาหารอยู่ 2 สูตรที่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ให้เพิ่มขึ้นได้เมื่อเทียบกับอาหารเหลว BHI คือ อาหารสูตร B3 และ B4 โดยที่เชื้อเริ่มต้น <1 CFU/portion อาหารสูตร B3 และ B4 สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อหลังการเพาะเลี้ยงได้ถึง 7.47×10^{5} และ 7.93×10^{5} CFU/ml ตามลำดับ และที่เชื้อเริ่มต้น 1-10 CFU/portion อาหารสูตร B3 และ B4 สารมารถเพิ่มปริมาณเชื้อหลังการเพาะเลี้ยงได้ถึง 8.28×10^{8} และ 8.23×10^{8} CFU/ml ตามลำดับ

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาอาหารและสารที่ช่วยส่งเสริมการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp.
- เพื่อศึกษาการเติบโตของเชื้อและนำไปสู่การพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถส่งเสริมการเจริญและลดระยะเวลาในการตรวจจับของเชื้อ *Salmonella* spp.

วิธีดำเนินโครงการ

การคัดเลือกอาหารที่ใช้ในการนำมาพัฒนาสูตรอาหารใหม่

การคัดเลือกอาหารที่ใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารใหม่ เพื่อหาอาหารที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญ และมีระยะพักตัว (Lag phase) ที่สั้นที่สุด สำหรับใช้เป็นอาหารหลักในการพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญ และลดระยะพักตัว (Lag phase) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ลงได้ โดยจะมีการใช้

- สูตรอาหารที่มีขายโดยทั่วไป ได้แก่ BPW, BHI และ TSB
- อาหารสูตรที่ทางบริษัททำการพัฒนาขึ้น (ส่วนประกอบเป็นความลับของบริษัท) ได้แก่ A1-A4, B1-B4, C1-C4, D1-D3 และ E1-E2

จากนั้นทำการศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยใช้ *S.* Typhimurium เป็นต้นแบบ โดยตรวจสอบในสภาวะต่าง ๆ ทั้งสังเกตจากการเจริญด้วยการวัดความขุ่น การตรวจสอบการเจริญบนจานเพาะเชื้อ และการทดสอบด้วยชุดทดสอบที่มีความจำเพาะของบริษัท CPF

การศึกษาการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. (Growth curve)

การวัดค่าการเจริญของเชื้อ *S.* Typhimurium จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 600 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบระยะพักตัวของเชื้อ *S.* Typhimurium ในอาหารชนิดต่าง ๆ โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจากที่มีการเติมเชื้อในปริมาณความเข้มข้น <1 และ 1-10 CFU/portion (ที่ได้จากการคำนวณ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง FLUOstar Omegar Microplate Reader ในทุก ๆ การทดสอบจะทำอย่างน้อย 4 ซ้ำ

การศึกษาปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ผ่านการเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจากที่มีการเติมเชื้อ *S.* Typhimurium ในปริมาณความเข้มข้น <1 และ 1-10 CFU/portion (ที่ได้จากการคำนวณ) ปริมาตร 1 ml ลงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ 100 ml แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ Spread plate เพื่อนับจำนวนเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดหลังผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยการเจือจางตามลำดับส่วน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่มีการเจริญได้ โดยการปิเปตตัวอย่าง 100 µl ลงบน Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar แล้วทำการ Spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็น CFU/ml

การศึกษาการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยชุดทดสอบ CPF Strip test (*Salmonella* Rapid Test Kit)

ปิเปตตัวอย่าง 3 - 4 หยด จากอาหารชนิดต่าง ๆ ในขั้นตอนก่อนหน้า หลักจากบ่มแล้ว 24 ชั่วโมง (ประมาณ 100 µL) หยดลงในหลุมหยดตัวอย่างของ Strip test ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที และสามารถยืนยันผลได้ภายใน 10 นาที รายงานผลเป็น Detect (+) หรือ Not Detected (-)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาการคัดเลือกอาหารที่เป็นอาหารที่มีใช้อยู่ทั่วไป เพื่อใช้ในการนำมาพัฒนาสูตรอาหารใหม่

จากการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโต และการตรวจสอบของเชื้อ *Salmonella* spp. ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์ปกติ, เซลล์ที่ถูกทำให้บาดเจ็บด้วยการผ่านความร้อน และเซลล์ที่ได้รับการบาดเจ็บจากสารเคมี จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกทดสอบในสภาวะต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ non-selective medium (BPW, BHI และ TSB) พบว่าเซลล์ทั้ง 3 สภาวะถูกส่งเสริมการเติบโตได้ดี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะมีการเลือกอาหาร BHI มาเป็นฐานในการทดสอบเปรียบเทียบกับอาหารส่งเสริมการเจริญสูตรใหม่ ทั้งนี้ พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ <1 CFU/portion นั้นมีผลทำให้เกิดความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยาได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 1-10 CFU/portion

ผลการศึกษาการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้รับการพัฒนา

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะแบบปกติเป็นตัวแทนของการศึกษาในลำดับขั้นนี้ โดยยังคงใช้ ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่ระดับ <1 และ 1-10 CFU/portion จากนั้นนำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่พัฒนาขึ้นใหม่ จำนวน 17 สูตร **(ส่วนประกอบเป็นความลับของบริษัท)** จากการทดลองพบว่า การศึกษาระยะการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาใหม่ทั้ง 17 ชนิด **(ส่วนประกอบเป็นความลับของบริษัท)** (A1-E2) เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ non selective medium คือ BHI แสดงให้เห็นว่าที่ระยะพักตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 17 ชนิดนั้น **(ส่วนประกอบเป็นความลับของบริษัท)** มีระยะพักตัวที่ใกล้เคียงกับอาหาร BHI ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า อาหารทั้ง 17 ชนิด **(ส่วนประกอบเป็นความลับของบริษัท)** นั้นยังไม่มีประสิทธิภาพมากพอที่จะใช้ในการช่วยลดระยะพักตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ และจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถส่งเสริมของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น <1 และ 1-10 CFU/portion หลังผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขายโดยทั่วไป BHI คือ B3 และ B4 สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อหลังบ่มได้ที่ 7.47×10^{8} และ 7.93×10^{8} CFU/ml ตามลำดับ (กรณีเชื้อเริ่มต้นที่ <1 CFU/portion) และ 8.28×10^{8} และ 8.23×10^{8} CFU/ml ตามลำดับ (กรณีเชื้อเริ่มต้นที่ 1-10 CFU/portion) โดยการยืนยันผลด้วย **CPF Strip test** ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการนับจำนวนบน XLD Agar แสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ ไม่มีผลต่อการทดสอบ

สรุปผล

จากการศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อส่งเสริมการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ *Salmonella* Typhimurium เป็นต้นแบบ ซึ่งเป็นเชื้อที่ผ่านการเลี้ยง 3 สภาวะดังนี้ สภาวะปกติ, ได้รับบาดเจ็บจากความร้อน และได้รับบาดเจ็บด้วยสารเคมี โดยเริ่มต้นจากการใช้อาหารที่มีขายโดยทั่วไป ได้แก่ Buffer peptone water (BPW), Brain heart infusion (BHI) และ Tryptic soy broth (TSB) ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ <1 และ 1-10 CFU/portion พบว่าอาหารเหลวชนิด Brain heart infusion (BHI) มีประสิทธิภาพในการช่วยส่งเสริมการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. มากที่สุดจึงคัดเลือกนำมาใช้การพัฒนาสูตรเพิ่มเติม ทั้งนี้ภายหลังจากที่พัฒนาสูตรเพิ่มเติมแล้วนั้น พบว่า สูตร B3 และ B4 สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโตของ *Salmonella* spp. มากที่สุดเมื่อเทียบกับ BHI โดยสามารถทำให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น <1 CFU/portion เพิ่มขึ้นเป็น 7.47×10^{8} และ 7.93×10^{8} CFU/ml ตามลำดับ และเชื้อเริ่มต้น 1-10 CFU/portion เพิ่มขึ้นเป็น 8.28×10^{8} และ 8.23×10^{8} CFU/ml ตามลำดับ เมื่อผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง