รายงาน

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ผสมที่ผลิตทางการค้า (PICO) ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากอาหารเป็นพาหะ

ดร. วราภา มหากาญจนกุล

PICO ALIVE
PICO ALIVE
PICO ALIVE

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ผสมที่ผลิตทางการค้า (PICO) ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากอาหารเป็นพาหะ

Efficacy of PICO against Food borne Pathogenic Bacteria

วราภา มหากาญจนกุล และ จิราภา วงศ์วรรธนะโชติ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทร. 02-562031 โทรสาร 02-5625021 E-mail: fagwpm@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium , *Vibrio parahaemolyticus* และ *Escherichia coli* เมื่อทดสอบแบคทีเรียใน PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ เป็นเวลา 1 คืน ที่ความเข้มข้น 1% และเจือจางต่อไปที่ความเข้มข้น 0.5% (1:1) และ 0.25% (1:3) โดยยับยั้งที่เวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที นอกจากนี้ PICO ชนิดผงยังมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก คือ *Listeria monocytogenes* , *Staphylococcus aureus* , *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* เมื่อทดสอบแบคทีเรียใน PICO ชนิดผงที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 1 คืน ที่ความเข้มข้น 1% ที่ 120 นาที และ 24 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 0.5% และ 0.25% ที่ 24 ชั่วโมง จึงอาจกล่าวได้ว่า PICO ชนิดผง ที่ความเข้มข้น 1% จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมลบและ แบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมบวก ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น เพื่อเสริมสร้างความปลอดภัยในอาหารประเภทต่างๆ ต่อไป

PICO ALIVE

บทนำ

แบคทีเรียบางชนิดที่มีความสำคัญอย่างมากในแง่ของความปลอดภัยของอาหาร หากปนเปื้อนในอาหารและบริโภค อาจก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารได้แก่โรคท้องร่วง อาเจียน เป็นไข้ เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้ ได้แก่ *Escherichia coli* , *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* และ *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียบางชนิดตัวเซลล์มิได้ก่อให้เกิดโรคแต่สร้างสารพิษในอาหารและเมื่อรับประทานนั้นเข้าไปก็ทำให้เกิดอาการของโรคทางเดินอาหารได้ แบคทีเรียเหล่านี้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* , *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens*

ปัจจุบันวิธีการควบคุมและกำจัดเชื้อโรคเหล่านี้ในอาหารที่นิยมมากที่สุด คือ การใช้ความร้อน เช่น การพาสเจอไรส์ การสเตอริไรส์ เป็นต้น แต่ในบางครั้งอาหารบางชนิด เช่น ผักสด ไม่สามารถใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากความนิยมในการรับประทานสด การใช้สารเคมี เป็นสารฆ่าเชื้อ เช่น สารประกอบคลอรีน ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 200 ppm สามารถลดจำนวน *Salmonella* Typhimurium ลงได้ 1.6-3.3 log CFU/g แต่ทำให้เนื้อสัมผัสมะเขือเทศหั่นแว่นนิ่มและแครอทหั่นฝอยมีสีซีดลง (มนทกานต์, 2545) การใช้สารเคมีบางครั้งอาจมีประสิทธิภาพดีในการฆ่าเชื้อแต่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารในลักษณะที่ไม่ต้องการได้ อีกทั้งแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสารพิษได้ เช่น *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหารมีสมบัติทนต่อสารเคมีฆ่าเชื้อได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมลบ ไม่สามารถกำจัดได้ง่ายโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี การใช้สารสกัดธรรมชาติที่ผลิตโดยจุลินทรีย์หรือการนำจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญแข่งขันจุลินทรีย์ก่อโรคอาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะสามารถควบคุมและป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคจากอาหารเป็นพาหะได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการทดลองครั้งนี้ คือ ทดสอบหาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารเหล่านี้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารต่อไป

PICO ALIVE

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง
   - *Salmonella* Typhimurium S.13311
   - *Escherichia coli* ATCC 8739
   - *Vibrio parahaemolyticus* VP-293
   - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
   - *Bacillus cereus* DMST 5040
   - *Listeria monocytogenes* L-Scott A
   - *Clostridium perfringens* DMST 16178
2. การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อ 1 ลูป จากอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) 10 มิลลิลิตร (สำหรับ *V. parahaemolyticus* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด

TSB+3% NaCl และ *L. monocytogenes* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+0.6% yeast extract ส่วน *C. perfringens* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion broth) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส (ยกเว้น *B. cereus* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เหมาะสมข้างต้นอีก 1 ครั้ง จากนั้นปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB หรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดดังได้กล่าวมาแล้ว 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ยกเว้น *B. cereus* บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง) แล้วเจือจางด้วยสารละลาย 0.1% peptone water จนกระทั่งได้สารละลายเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU/ml

3. การศึกษาประสิทธิภาพของ PICO ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.1 การเตรียมละลายจากผง PICO

เตรียมสารละลายจากผง PICO ที่ 3 ความเข้มข้นดังนี้

3.1.1 แช่ผง PICO จำนวน 1 กรัมในน้ำประปาหรือใน TSB (แล้วแต่การทดสอบแบคทีเรีย) 100 มิลลิลิตร 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ได้สารละลาย PICO ความเข้มข้น 1%

3.1.2 เจือจางสารละลายในข้อ 3.1.1 ด้วย TSB ในอัตราส่วน 1 : 1 จะได้ 0.5% PICO

3.1.3 เจือจางสารละลายในข้อ 3.1.1 ด้วย TSB ในอัตราส่วน 1 : 3 จะได้ 0.25% PICO

3.2 การทดสอบ PICO โดยวิธี Petri dish (Spiral plate)

3.2.1 ผสมสารละลายของแบคทีเรียในข้อ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับสารละลายจากผง PICO 90 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.1.1 หรือ 3.1.2 หรือ 3.1.3) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4 log CFU/ml

3.2.2 สุ่มตัวอย่างจากข้อ 3.2.1 ที่เวลา 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที และที่ 24 ชั่วโมง โดยเทคนิค spiral plate จากเครื่องจ่ายสารละลายอัตโนมัติลงเพลต (Autoplate 4000, Advance Instruments, USA) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดบน selective media (ภาคผนวก) แล้วนับจำนวนเป็นโคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.3 การทดสอบ PICO โดยวิธี Agar diffusion (Parish and Davidson, 1993)

เนื่องจากในการทดสอบการเจริญและอยู่รอดของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมลบ เมื่อผสมจุลินทรีย์ก่อโรคกับสารละลาย PICO ที่ 24 ชั่วโมง พบว่า ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค จึงได้ทดสอบยืนยันโดยวิธี agar dilution

3.3.1 เตรียมสารละลายผง PICO เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 จากนั้นนำสารละลายผง PICO เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (Biofuge primo, Heraeus Instrments, Germany) ที่ 7,000 rpm เพื่อแยกเซลล์ออกเป็นเวลา 8 นาที ส่วนใส (supernatant) ที่ได้ เรียกว่า สารสกัด PICO 1% หลังจากนั้นนำ supernatant มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl (NSS) ในอัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 3 ได้สารสกัด PICO 0.5% และ 0.25% ตามลำดับ

PICO ALIVE

3.3.2 เจือจางสารละลายเชื้อในข้อ 2 ด้วยสารละลาย 0.1% peptone water ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ spread plate ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บนจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้สักครู่ จากนั้นเจาะหลุมด้วย cork border หมายเลข 2 ด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วจึงหยดสารสกัด PICO จากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุม

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพ PICO ชนิดผงในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร โดยวิธี Spiral plate

ชนิดของแบคทีเรียที่ทดสอบ	เวลา (นาที)	จำนวนจุลินทรีย์ (log CFU/ml)			
		Control (TSB)	ความเข้มข้นของ PICO		
			1%	0.5%	0.25%
S. Typhimurium*	10	2.62	0	0	0
	30	3.64	0	0	0
	60	4.48	0	0	0
	90	5.00	0	0	0
	24 ช.ม.	7.75	ND	7.15	7.50
*V. parahaemolyticus**	10	3.30	0	0	0
	30	6.63	0	0	0
	60	ND	0	0	0
	90	ND	0	0	0
	24 ช.ม.	6.95	ND	5.49	6.12
*E. coli**	10	3.72	0	0	0
	20	3.95	0	0	0
	40	3.80	0	0	0
	60	3.80	0	0	0
	24 ช.ม.	7.33	ND	6.30	7.43
*S. aureus***	10	3.32	3.00	3.21	4.00
	30	3.18	3.41	3.41	3.41
	60	3.18	3.13	3.13	3.51
	90	3.30	0	3.51	3.42
	120	3.19	0	0	0

PICO ALIVE

*B. cereus***	10	3.25	TNTC	TNTC	TNTC
	30	3.08	TNTC	TNTC	TNTC
	60	3.10	TNTC	TNTC	TNTC
	90	3.27	TNTC	TNTC	TNTC
	120	3.16	TNTC	TNTC	TNTC

<u>ตารางที่ 1</u> ประสิทธิภาพ PICO ชนิดผงในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร โดยวิธี Spiral plate (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียที่ทดสอบ	เวลา (นาที)	จำนวนจุลินทรีย์ (log CFU/ml)			
		Control (TSB)	ความเข้มข้นของ PICO		
			1%	0.5%	0.25%
*L. monocytogenes***	10	3.02	4.03	4.25	4.14
	30	3.27	3.74	4.41	4.26
	60	3.38	3.60	4.28	4.23
	120	3.34	0	4.33	4.34
	24 ช.ม.	9.07	0	0	0
*C. perfringens***	120	0	0	0	ND
	24 ช.ม.	0	0	0	ND

<u>หมายเหตุ</u> TNTC = ไม่สามารถนับโคโลนีของ *B. cereus* ได้เนื่องจากเชื้อจาก PICO เจริญเต็มจานเพาะเชื้อ

ND = ไม่ได้ทำการทดลอง

\+ = นับจำนวน *C. perfringens* ไม่ได้แต่เขี่ยเชื้อบนจากเพาะเชื้อปรากฏว่ามีเชื้อเจริญ

* = PICO ชนิดผงแช่ในน้ำ 1 คืน

** = PICO ชนิดผงแช่ใน TSB 1 คืน

<u>ตารางที่ 2</u> ประสิทธิภาพของสารสกัด PICO ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารแกรมลบ โดยวิธี Agar diffusion โดยวัดความสามารถในการยับยั้งเป็นเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)

ชนิดของแบคทีเรียที่ทดสอบ	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		
	ความเข้มข้นของ PICO		
	1%	0.5%	0.25%
E.coli	10	7	3
Vibrio parahaemolyticus	16	10	8
Salmonella Typhimurium	14	10	6

<u>หมายเหตุ</u> 0 คือ ไม่มี clear zone หรือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้

PICO ALIVE

ตารางที่ 3 สรุปประสิทธิภาพของ PICO ชนิดผงที่ 1% ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	Agar diffusion	Spiral plate					
	24 ชั่วโมง	10 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	24 ชั่วโมง
S. Typhimurium	-	-	-	-	-	ND	ND
E. coli	-	-	-	-	-	ND	ND
V. parahaemolyticus	-	-	-	-	-	ND	ND
S. aureus	ND	+	+	+	+	-	-
B. cereus	ND	+	+	+	+	-	-
L. monocytogenes	ND	+	+	+	+	-	-
C. perfringens	ND	+	+	+	+	-	-

หมายเหตุ + = จุลินทรีย์เจริญ

\- = จุลินทรีย์ไม่เจริญ

ND = ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของผง PICO ความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.25% ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารชนิดแกรมลบ ได้แก่ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* พบว่าสารละลายที่เตรียมจากผง PICO ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ได้ ที่ 10, 30, 60 และ 90 นาที และการทดสอบประสิทธิภาพของผง PICO ความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.25% ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารชนิดแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens* และ *L. monocytogenes* พบว่า สารละลายที่เตรียมจากผง PICO ความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *C. perfringens* และ *L. monocytogenes* ได้ที่เวลา 120 นาที และ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ผง PICO ความเข้มข้น 0.5 และ 0.25% ยังยับยั้ง *S. aureus*, *C. perfringens* และ *L. monocytogenes* ได้ที่ 24 ชั่วโมงอีกด้วย

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายที่เตรียมจากผง PICO ความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.25% ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารชนิดแกรมลบ 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S.* Typhimurium และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Agar dilution ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าสารละลายที่เตรียมจากผง PICO ความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้ง *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ได้มีประสิทธิภาพสูงกว่า การใช้สารละลายที่เตรียมจากผง PICO ความเข้มข้น 0.5% และ 0.25% แต่ในกรณีของแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมบวก ไม่ได้ทำการทดลองโดยวิธีนี้ต่อเพราะเซลล์จุลินทรีย์ที่หลงเหลือในสารสกัด PICO (หลังจากการเหวี่ยงเซลล์) เจริญแข่งขันกับเชื้อก่อโรคปรากฏเป็นโคโลนีเจริญรอบ ๆ หลุมที่หยดสารสกัด จึงไม่สามารถสังเกตเห็นการยับยั้งรอบๆ หลุมได้ชัดเจน

ตารางที่ 3 สรุปประสิทธิภาพของ PICO ชนิดผงที่ 1% ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยสารละลายที่เตรียมจากผง PICO ความเข้มข้นนี้จากการทดสอบด้วยเทคนิค spiral plate สามารถยับยั้ง *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ที่ 10, 30, 60 และ 90 นาที และยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens* และ *L. monocytogenes* ได้ที่ 120 นาทีและ 24 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบวิธี Agar diffusion พบว่าสารสกัด PICO 1% สามารถยับยั้ง *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ที่ 24 ชั่วโมงได้

สรุปผลการทดลอง

ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* ของ PICO ชนิดผง ปรากฏว่าผง PICO ที่แช่ในน้ำ 1 คืนก่อนนำมาทดสอบที่ความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.25% สามารถยับยั้ง *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในเวลา 90 นาที และผง PICO ที่แช่ TSB 1 คืนก่อนนำมาทดสอบที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับนี้สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *C. perfringens* และ *L. monocytogenes* ได้เมื่อเชื้อปฏิปักษ์นี้เจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ผง PICO ที่ความเข้มข้น 1% ยังสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens* และ *L. monocytogenes* ที่ 120 นาทีได้อีกด้วย จึงเป็นไปได้ที่จะนำ PICO ความเข้มข้น 1 % มาประยุกต์ใช้ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

มนทกานติ์ บุญยการ. 2545. การลดการปนเปื้อนข้ามของ Salmonella Typhimurium ระหว่างการเตรียมผักสลัดโดยสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Parish, M.E. and P.M. Davidson. 1993. Methods for Evaluation, pp. 597-615. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. Antimicrobials in Foods. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective media) ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

จุลินทรีย์	Selective media
S. Typhimurium	Xylose Lysine Deoxycholase agar (XLD)
E. coli	Chromocult Coliform agar
V. parahaemolyticus	Thiosulfate Citrate Bile Salt agar (TCBS)

S. aureus	Baird-Parker medium (BP)
B. cereus	*B. cereus* agar (BC)
L. monocytogenes	Modified Oxford Listeria Selective agar (MOX)
C. perfringens	SFP agar

PICALIVE
PICALIVE
PICALIVE