

การประยุกต์ใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate
ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Mann Rogasa Sharpe (MRS) เพื่อตรวจนับ
แบคทีเรียกรดแลคติก
Application of Petrifilm™ Aerobic Count Plate
Associated with de Mann Rogasa Sharpe (MRS) Broth for Enumeration
Lactic Acid Bacteria

มณฑล เลิศคนาวนิชกุล^{1,2*} กิจติศักดิ์ ชววิสิฐ¹ ภาณุวัฒน์ นันทะภู³ และรวีวรรณ เนาวิสุวรรณ³ วรัญญา ปังสี³
Monthon Lertcanawanichakul^{1,2*}, Kittisak Chawawisit^{1,2}, Panuwat Nantakoon³, Rawiwan Noasuan³
and Warunya Pangsee³

บทคัดย่อ

การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้แผ่นตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Mann Rogasa Sharpe (MRS) เพื่อตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่นำมาศึกษาจำนวน 4 ชนิด [*Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *Ped. acidilactici* L25 (L25) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26) และ *Enterococcus faecium* N15 (N15)] โดยเปรียบเทียบกับวิธีตรวจนับแบบการกระจายเชื้อ ด้วยการใส่ระดับเซลล์ตั้งต้น 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รวมทั้งตัวอย่างจากนมหมักพบว่าวิธีการทั้ง 2 สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาทุกชนิดได้ที่ระดับการเจือจาง 10^6 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับผลิตภัณฑ์นมหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดของ L25 L26 และ N15 ได้ที่ระดับการเจือจาง 10^8 ในขณะที่สามารถตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดของ L14/1 ที่ระดับการเจือจาง 10^7 เมื่อตรวจนับด้วยวิธีการใช้แผ่นตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งจะเห็นได้ว่าแผ่นตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS สามารถนำไปใช้ในเบื้องต้นเพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์

คำสำคัญ: การตรวจนับแบคทีเรีย แบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์นมหมัก เพตริฟิล์ม

¹ รศ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

² หน่วยวิจัยการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

³ นักเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

¹ Assoc. Prof. Dr., Division of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

² The Research Unit of Natural Products Utilization, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

³ Medical Technologist, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

* Corresponding author: Tel./Fax. 075672104 / 075672106. E-mail address: lmonthon55@gmail.com

Abstract

This study was aimed to compare the enumeration of Lactic Acid Bacteria (LAB) between spread plate method and using of Petrifilm™ Aerobic Count Plate associated with de Mann Rogosa Sharpe (MRS) broth. They were used to enumerate of 4 tested LABs [*Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *Ped. acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), *Enterococcus faecium* N15 (N15)] and LABs from fermented milks. The results indicated that both methods could be enumerated the tested LAB from starter (1.5×10^8 cfu/ml) at dilution rate of 10^{-6} are not statistically different ($p < 0.05$) but are statistically different when enumerated from yoghurts at dilution rate of 10^{-6} and 10^{-8} . However, the detection limit of colonies of LAB could be enumerated, using Petrifilm™ Aerobic Count Plate associated with MRS broth, at dilution rate of 10^{-8} . From the results it may imply that Petrifilm™ Aerobic Count Plate associated with MRS broth could be efficaciously used for enumeration of LABs.

Keywords: Enumeration Method, Lactic Acid Bacteria, Fermented Milks, Petrifilm

บทนำ

โปรไบโอติก (Probiotic) มักถูกกล่าวถึงชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในด้านการช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร [1-2] แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้เนื่องจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมา จึงได้มีการนำเอาแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์ในแง่ของการนำไปเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการหมักเพื่อให้อาหารมีรสชาติและกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะรวมไปถึงคุณสมบัติของโปรไบโอติกอื่นๆ และยังช่วยเพิ่มคุณค่าอาหารเหล่านั้นที่อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์เรียกว่า “อาหารฟังก์ชัน” [2-3] แต่การที่จะได้รับประโยชน์อย่างสูงสุดจากอาหารฟังก์ชันจำเป็นต้องมีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับ 10^8 - 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) หรือโดยเฉลี่ย 10^6 CFU/ml เป็นอย่างน้อย [4] โดยการตรวจนับเชื้อแบบดั้งเดิม คือ การกระจายเชื้อหรือการเกลี่ยเชื้อ (Spread Plate) ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับกันว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูงและประหยัด แต่บางครั้งวิธี spread plate อาจขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างน้อย (0.1 มิลลิลิตร) ในการกระจายเชื้อในจานเพาะเชื้อ [4-5] โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ตัวอย่างมีเซลล์หรือจุลินทรีย์อยู่ในปริมาณต่ำ นอกจากนั้นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพาะเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ การนับจำนวนโคโลนี และการสุ่มลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี มีความจำเป็นต้องใช้ทักษะความชำนาญของผู้ที่มีประสบการณ์และต้องใช้แรงงานมาก จึงได้มีการพัฒนาคิดค้นวิธีที่ทันสมัยเพื่อตรวจหาและตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิค real-time PCR ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีปะปนอยู่ในตัวอย่างศึกษา โดยจะเป็นวิธีที่มีความไวสูง มีความแม่นยำ สะดวกรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม แต่ค่าใช้จ่ายในการทดลองสูงมาก [6] จึงได้มีการหาวิธีการใหม่หรือทางเลือกใหม่ในการตรวจหาและตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการประยุกต์ใช้แผ่น Petrifilm™ ที่อาศัยหลักการของ agar-poured plate สามารถนับโคโลนีบนแผ่นฟิล์มได้ด้วยตาเปล่า [7-9] อย่างไรก็ตามแผ่น Petrifilm™ ที่ใช้สำหรับตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกโดยตรงยังไม่มีความจำเพาะ แต่ได้มีการนำจากคู่มือการแปลผลให้มีการประยุกต์ใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ไปใช้เพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก [10] ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Mann Rogosa Sharpe (MRS) ดังนั้นจึงสนใจตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ รวมถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์นมหมักไปเปรียบเทียบกับ

วิธีการตรวจนับแบบดั้งเดิมเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกจากการประยุกต์ใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate รวมทั้งระยะเวลาและความสะดวกในการใช้งาน อันอาจได้ข้อมูลยืนยันเกี่ยวกับการนำเอาแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate มาประยุกต์ใช้ในงานตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัสดุ วิธีการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกและผลิตภัณฑ์นมหมัก

Pediococcus pentosaceus 1 L14/1 (L14/1), *Ped. acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26) และ *Enterococcus faecium* N15 (N15) [11-14] ใช้เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกมาตรฐาน ส่วนผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์นมหมัก (โยเกิร์ต นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม) ใช้เป็นตัวแทนผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก

การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติก มาแยกชั่งลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) ใน candle jar (5% CO₂) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ชม.) หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนี แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวมาแยกชั่งลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS อีกครั้ง โดยบ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่สภาวะเช่นเดียวกับข้างต้น จากนั้นยืนยันเชื้อด้วยการย้อมสีแบบแกรมและวินิจัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์อะลาเลส [1-2]

การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจนับเซลล์

1. แบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมได้จากข้างต้นมาแยกปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) แล้วเจือจางแบบ 10 เท่า จนถึง 10^{-8} แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} - 10^{-6} ไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก

2. ผลิตภัณฑ์นมหมัก (โยเกิร์ต นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม)

สุ่มเลือกซื้อผลิตภัณฑ์นมหมัก ชนิดละ 3 ชนิด แล้วนำชนิดที่เหมือนกันไปผสมรวมกันเพื่อเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์นมหมักปริมาตร 25 มิลลิลิตร (มล.) ใส่ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มล. และเจือจางแบบ 10 เท่าต่อไปจนถึง 10^{-8} จากนั้นนำผลิตภัณฑ์นมหมักที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} - 10^{-8} ไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก

การตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติก

1. วิธีการกระจายเชื้อ (spread plate method)

ดูดสารแขวนลอยเชื้อจากระดับความเจือจางที่ 10^{-4} - 10^{-6} ที่เตรียมไว้แล้วในข้างต้นมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (มล.) ไปเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ด้วยเทคนิคการกระจายเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ใน candle jar เป็นเวลา 48 ชม. และตรวจนับโคโลนี และทำซ้ำวิธีการเดิมแต่เปลี่ยนชนิดของตัวอย่างไปเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่ถูกเจือจางแล้วในข้างต้นที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} - 10^{-8} ทำการทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ และทำการทดสอบ 3 ครั้งในแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์และผลิตภัณฑ์นมหมัก

2. Petrifilm™ Aerobic Count Plate

นำสารแขวนลอยเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} - 10^{-6} ของแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์และที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} - 10^{-8} ของผลิตภัณฑ์นมหมักไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ความเข้มข้น 2 เท่าจากสูตรปกติ (2x MRS) อย่างละครึ่ง (อัตราส่วน 1:2) แล้วดูดสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มล. ถ่ายลงบนแผ่น Petrifilm [10] บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ใน candle jar เป็นเวลา 48 ชม. แล้วตรวจนับโคโลนีสีแดง ตามคำแนะนำของคู่มือการแปลผล [10]

จำนวนต่ำสุดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถตรวจนับได้ด้วยแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

นำสารแขวนลอยเชื้อและสารแขวนลอยผลิตภัณฑ์นมหมักที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} ไปแยกตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการตรวจนับเช่นเดียวกันกับในหัวข้อการตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS และแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Paired T-test ของเพียร์สัน (Pearson) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ [Correlation coefficient (r)] ของวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เปรียบเทียบกับวิธีการกระจายเชื้อ

ผลการวิจัย

การตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติก

1. การตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ด้วยการกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เปรียบเทียบกับวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6} ของจำนวนเซลล์ตั้งต้น 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่นำมาศึกษาจากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-6} ($p < 0.05$) แต่ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} พบว่าจำนวนโคโลนีที่นับได้จากทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์เมื่อตรวจนับโดยวิธีการกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เปรียบเทียบกับวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

ระดับการเจือจาง	วิธีการ	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$) ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) Mean $\pm$ SD			
		L14/1	L25	L26	N15
10^{-4}	Spread	1593.33 $\pm$ 676.72	2052.67 $\pm$ 158.92	2231.67 $\pm$ 144.70	1365.00 $\pm$ 786.28
	Petrifilm	476.00 $\pm$ 0.00*	476.00 $\pm$ 0.00*	476.00 $\pm$ 0.00*	476.00 $\pm$ 0.00*
10^{-5}	Spread	240.00 $\pm$ 95.28	231.67 $\pm$ 60.80	250.00 $\pm$ 65.42	190.00 $\pm$ 50.60
	Petrifilm	200.00 $\pm$ 133.49	168.33 $\pm$ 32.95	158.67 $\pm$ 23.00*	133.33 $\pm$ 39.27*
10^{-6}	Spread	38.33 $\pm$ 13.29	35.00 $\pm$ 25.10	30.00 $\pm$ 14.14	43.33 $\pm$ 15.06
	Petrifilm	25.00 $\pm$ 16.33	24.00 $\pm$ 4.20	36.33 $\pm$ 13.05	43.50 $\pm$ 13.53

L14/1, *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1); L25, *Ped. acidilactici* L25 (L25); L26, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26); N15, *Enterococcus faecium* N15 (N15); Spread, วิธีการกระจายเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS; Petrifilm: วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS; *, $p < 0.05$ vs วิธีการกระจายเชื้อ

2. การตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักโดยวิธีการตรวจนับแบบการกระจายเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เปรียบเทียบกับวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ตั้งแต่ระดับการเจือจาง 10^{-6} - 10^{-8} พบว่า ผลิตภัณฑ์นมหมักให้ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมหมักเมื่อตรวจนับโดยวิธีการกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เปรียบเทียบกับวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

ระดับการเจือจาง	วิธีการ	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$) ต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) Mean $\pm$ SD		ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)	
		นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม	โยเกิร์ต	นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม	โยเกิร์ต
10^{-6}	Spread	> 300.00	26.00 $\pm$ 2.91	ND	ND
	Petrifilm	3.30 $\pm$ 0.20	0.45 $\pm$ 0.27*		
10^{-7}	Spread	123.33 $\pm$ 23.16	123.33 $\pm$ 7.02	r=0.003	r=0.643
	Petrifilm	5.67 $\pm$ 0.83*	2.13 $\pm$ 1.14*		
10^{-8}	Spread	673.33 $\pm$ 234.59	596.67 $\pm$ 104.08	r=0.006	r=0.500
	Petrifilm	16.00 $\pm$ 7.21*	7.33 $\pm$ 4.16*		

Spread, วิธีการกระจายเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS; Petrifilm: วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS; ND, ไม่พบความสัมพันธ์; *, $p < 0.05$ vs วิธีการกระจายเชื้อ

ความสัมพันธ์ของวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS กับวิธีการกระจายเชื้อ

การหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS กับวิธีการกระจายเชื้อในแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} - 10^{-6} พบว่าเชื้อ *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 มีความสัมพันธ์กันสูงที่ระดับการเจือจาง 10^{-5} ($r=0.949$) เชื้อ *Ent. faecium* N15 มีความสัมพันธ์กันน้อยที่ระดับการเจือจาง 10^{-5} ($r=0.517$) และ 10^{-6} ($r=0.491$) เชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L26 มีความสัมพันธ์กันน้อยที่ระดับการเจือจาง 10^{-6} ($r=0.368$) และ *Ped. acidilactici* L25 ไม่มีความสัมพันธ์ ($r=-0.490$ ที่ 10^{-5} , $r=-0.760$ ที่ 10^{-6})

สำหรับผลิตภัณฑ์นมหมักพบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันปานกลางถึงน้อยที่ระดับการเจือจาง 10^{-7} ($r=0.643$) และ 10^{-8} ($r=0.500$) ในโยเกิร์ต แต่ในนมเปรี้ยวพร้อมดื่มทั้งสองวิธีไม่มีความสัมพันธ์ ($r=0.003$ ที่ 10^{-7} , $r=0.006$ ที่ 10^{-8})

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดที่สามารถตรวจนับได้

จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดที่สามารถตรวจนับได้โดยวิธีการกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS พบว่าสามารถตรวจนับโคโลนีได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-6} ยกเว้นเชื้อ *Ent. faecium* N15 สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-8} ส่วนการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS พบว่าสามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-8} ยกเว้นเชื้อ *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-7} (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ต่ำสุดที่สามารถตรวจนับได้โดยวิธีการกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS กับวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

ระดับการ เจือจาง	วิธีการ	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$) ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) Mean $\pm$ SD			
		L14/1	L25	L26	N15
10^{-4}	Spread	1593.33 $\pm$ 676.72	2051.67 $\pm$ 158.92	2231.67 $\pm$ 144.70	1365.00 $\pm$ 786.28
	Petrifilm	476.00 $\pm$ 0.00	476.00 $\pm$ 0.00	476.00 $\pm$ 0.00	476.00 $\pm$ 0.00
10^{-5}	Spread	240.00 $\pm$ 95.29	231.67 $\pm$ 60.80	250.00 $\pm$ 65.42	190.00 $\pm$ 50.60
	Petrifilm	200.00 $\pm$ 133.49	168.33 $\pm$ 32.95	158.67 $\pm$ 23.00	133.33 $\pm$ 39.27
10^{-6}	Spread	38.33 $\pm$ 13.29	35.00 $\pm$ 25.10	30.00 $\pm$ 14.14	43.33 $\pm$ 15.06
	Petrifilm	25.00 $\pm$ 16.33	24.00 $\pm$ 4.20	36.33 $\pm$ 13.05	43.50 $\pm$ 13.53
10^{-7}	Spread	10.00 $\pm$ 10.95	0	0	20.00 $\pm$ 16.73
	Petrifilm	7.00 $\pm$ 6.16	4.33 $\pm$ 2.34	5.33 $\pm$ 3.01	10.67 $\pm$ 4.13
10^{-8}	Spread	0	0	0	6.67 $\pm$ 12.11
	Petrifilm	0	2.67 $\pm$ 1.63	1.67 $\pm$ 1.97	5.00 $\pm$ 2.76

L14/1, *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1); L25, *Ped. acidilactici* L25 (L25); L26, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26); N15, *Enterococcus faecium* N15 (N15); Spread, วิธีการกระจายเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS; Petrifilm: วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

อภิปรายผลการวิจัย

การตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติก

จากผลการทดลองสามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^8 CFU/ml ได้ตั้งแต่ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} - 10^{-6} จากทั้ง 2 วิธี และให้ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีไม่แตกต่างกันที่ระดับการเจือจาง 10^{-6} แต่ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} ให้ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีจากทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) อาจเนื่องมาจากมีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกมากเกินไปและมีข้อจำกัดของการตรวจนับจำนวนโคโลนีโดยวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ซึ่งกำหนดจำนวนโคโลนีที่สามารถนับได้ไม่ควรเกิน 250 CFU/ml [10] แต่อย่างไรก็ตามการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate มีความรวดเร็วและใช้แรงงานน้อยกว่าเนื่องจากไม่ต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากๆ และได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ในการตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติก lactococci ไม่พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจนับโดยวิธีการกระจายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Elliker และ M17 [16] อีกทั้งสามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plates เป็นวิธีเริ่มต้นในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เพราะเป็นวิธีที่ประหยัดเวลา และคล้ายคลึงกับวิธีการเขย่าจานเพาะเชื้อ (Pour Plate Method) เพราะใช้ปริมาตรในการตรวจนับจำนวนเท่ากับ 1 มล. นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การตรวจนับแบคทีเรียที่เจริญโดยใช้อากาศใน goat's cheese ด้วยการใช่วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate เปรียบเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) มีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน ($t = 1.33$, $p = 0.193$) และมีความสัมพันธ์เชิงเส้นของ

ข้อมูล ไม่แตกต่างกัน ($r=0.971, p=0.0001$) [7] หรือการนำแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในนมดิบเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมแบบเขย่าจานเพาะเชื้อ (Pour Plate Method) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, KF และ KFS พบว่ามีดัชนีความสัมพันธ์ที่ดีมาก ($r=0.97$) สำหรับ MRS และดีสำหรับ KFS ($r=0.84$) และ KF ($r=0.82$) แต่อาจมีผลรบกวนเล็กน้อยจากกรดแลคติกที่เชื้อผลิตออกมา อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการใช้วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate เป็นทางเลือกหนึ่งที่สะดวก รวดเร็ว และเหมาะสมสำหรับเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจนับทั้ง Aerobic Bacteria และแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำนม [7, 15]

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งสองวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นสามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักที่ระดับการเจือจาง 10^{-6} - 10^{-8} แต่ให้ผลการตรวจนับโคโลนีของทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามวิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ยังไม่เหมาะสมกับการนับจำนวนแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์นมหมักโดยตรงเพราะยังไม่มีแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก จึงได้ปรับปรุงการใช้งานโดยการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ลงไปพร้อมกับผลิตภัณฑ์นมหมักตามคำแนะนำของกลุ่มการใช้งานเพื่อช่วยกระตุ้นให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดีขึ้น แต่เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นกรดและอาจส่งผลต่อการตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติก [8, 15] หรืออาจจะเกิดจากองค์ประกอบของสารเคมีที่มีอยู่ในแผ่น Petrifilm™ ไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก จึงทำให้ในบางค่าของการเจือจางมีจำนวนของการตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกได้แตกต่างกันจากทั้งสองวิธี แต่ถ้าหากไม่คำนึงถึงชนิดของกลุ่มแบคทีเรียก็จะเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์หรือผลิตภัณฑ์นมหมักซึ่งจากรายงานการใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M17 หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ pH 5.4 มีความเหมาะสมในการตรวจ *Strep. salivarius* แต่ยังไม่เหมาะสมมากนักที่จะนับไปตรวจนับจำนวนของ *Lb. bulgaricus* อาจเนื่องมาจากสภาวะกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อ [8] โดยอาจเนื่องมาจากความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน

การหาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดที่สามารถตรวจนับได้

แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate เมื่อใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS สามารถให้ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-8} (≤ 10 CFU/ml) ที่ระดับเซลล์ตั้งต้น 1.5×10^8 CFU/ml ซึ่งต่างจากการตรวจนับด้วยวิธีการกระจายเชื้อ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate สามารถตรวจนับแบคทีเรียที่มีปริมาณเชื้อน้อย หรืออาจเนื่องมาจากการใช้ปริมาตรของการตรวจนับจากทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกันคือ วิธีการกระจายเชื้อจะใช้ปริมาตรเพียง 0.1 มล. แต่ วิธี Petrifilm™ Aerobic Count Plate ใช้ปริมาตร 1 มล. จึงทำให้จำนวนโคโลนีที่นับจากทั้งสองวิธีแตกต่างกันแต่มีรายงานสนับสนุนว่าแผ่น Petrifilm™ มีประสิทธิภาพในการตรวจนับแบคทีเรียในปริมาณเชื้อน้อยได้โดยพบว่าการประยุกต์แผ่น Petrifilm™ *E. coli* สามารถตรวจนับเชื้อ *Escherichia coli* จากดิน และมูลสุกรในปริมาณเซลล์เพียง 10 CFU/g [17]

สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่นำมาศึกษาที่ระดับเซลล์ตั้งต้น 1.5×10^8 CFU/ml สามารถถูกตรวจนับได้ด้วยแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ระดับเซลล์ 10^{-6} - 10^{-8} CFU/ml โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกับการตรวจนับแบบวิธีการกระจายเชื้อที่ระดับเซลล์ 10^2 CFU/ml แต่สำหรับการตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักจากทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบที่มีอยู่

ในผลิตภัณฑ์นมหมักไปบดบังการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก อย่างไรก็ตามการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แสดงผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกได้มีความใกล้เคียงกับวิธีการตรวจนับแบบกระจายเชื้อ และหากไม่คำนึงถึงชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกจะเห็นได้ว่าแผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดได้ที่ระดับเซลล์ 10CFU/ml ซึ่งดีกว่าการตรวจนับแบบวิธีการกระจายเชื้อ นอกจากนี้การประยุกต์ใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มีความรวดเร็วและง่ายในการนำไปใช้ปฏิบัติเพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์เพราะให้ค่าของการตรวจนับของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกัน รวมทั้งสามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ต่ำสุดได้ดีกว่าการตรวจนับแบบวิธีการกระจายเชื้อ จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะใช้แผ่น Petrifilm™ Aerobic Count Plate ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการเบื้องต้นในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ได้ แต่หากจะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมหมักอาจต้องมีการปรับค่าความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์นมหมักให้มีความเหมาะสมก่อนจะนำไปทดสอบ

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับการสนับสนุนจากโครงการความร่วมมือเพื่อพัฒนางานวิจัยเชิงพื้นที่ ระหว่าง มวล. และ สกว. (ABC มวล. สกว.) รหัสทุน WU-TRF_ABC5901

เอกสารอ้างอิง

- [1] Alvarez-Olmos, M.I. and Oberhelman, R.A. (2001). "Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy", **Clinical Infectious Disease**. 32,1567-76.
- [2] Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**. 71(Suppl), 1 682S-7S.
- [3] Bellisle, F., Diplock A.T. and Hornstra, G. (1998). "Functional food science in Europe. **British Journal of Nutrition**. 80(Suppl1), S3-4.
- [4] Jain, S., Yadav, H. and Sinha. P.R. (2009). Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures", **Journal Dairy Research**. 76, 385-91.
- [5] Jackson, T.G., Taylor, G.R.J., Clohessy, A.M. and William, C.M. (1999). The effects of the daily intake of insulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. **British Journal of Nutrition**. 89, 23-30.
- [6] Garcia, C.T., Tabasco, R., Pelaez, C. and Requena, T. (2009). "Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR", **International of Dairy Journal**. 19, 405-409.
- [7] de Sousa, G.B., Tamagnini, L.M., Gonzalez, R.D. and Budde, C.E. (2005). "Evaluation of Petrifilm method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat's cheese", **Revista Argentina De Microbiologia**. 37, 214-216.

- [8] Gonçalves, M.M., Freitas, R., Nero, L.A. and Carvalho, A.F. (2009). “Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm AC plates associated with acidified MRS and M17 broths”, **Journal Dairy Research**. 76, 229-233.
- [9] Wu, S., Chouliara, E., Jensen, L.B. and Dalsgaard, A. (2008). “Evaluation of Petrifilm™ Select *E. coli* Count Plate medium to discriminate antimicrobial resistant *Escherichia coli*”, **Acta Veterinaria Scandinavica**. 50, 1-7.
- [10] Interpretation Guide 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate Use for Growing Lactic Acid Bacteria. St. Paul, MN, USA, nd, np.
- [11] Lertcanawanichakul, M. (2005). “Isolation and selection of anti-*Candida albicans* producing lactic acid bacteria”, **Walailak Journal of Science & Technology**. 2(2), 179-187.
- [12] Suchira, G. (2002). **Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bacteriocin C3 Produced by *Lactococcus lactis* C3**. Thesis in Biopharmaceutical Science: Mahidol University, Bangkok : 105.
- [13] Smet, D.I., Boever, P.D. and Verstraete, W. (1998). “Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity”, **British Journal of Nutrition**. 79, 185-194.
- [14] Losteinkit, C.H., Uchiyama, K.E., Ochi, S.H., Takaoka, T.O., Nagahisa, K.E. and Shioya, S.U. (2001). “Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes”, **Journal of Bioscience and Bioengineer**. 91, 390-395.
- [15] Ortolani, M.B., Viçosa, G.N., Beloti, V. and Nero, L.A. (2007). “Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in PAC and conventional pour plate methodology”, **Journal of Dairy Research**. 74, 387-391.
- [16] Champagne, C.P., Gardner, N., Piette, M. and Gelais, D.S. (2003). “The use of Petrifilm™ for the Enumeration of *Lactococci*”, **International Dairy Journal**. 4, 789-795.
- [17] Samarajeewa, A.D., Glasauer, S.M. and Dunfield, K.E. (2010). “Evaluation of Petrifilm EC method for enumeration of *E. coli* from soil”, **Letter of Applied Microbiology**. 50, 457-461.