

ศึกษาอิทธิพลของ sodium chloride ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ buffered peptone water และอุณหภูมิในการบ่มต่อ background flora และความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ในเนื้อไก่ดิบ

ชานนท์ ขำตา^{1*} สรเฉลิม ศักดิ์ศรี¹ พิเชษฐ์ กุมภาว¹

บทคัดย่อ

จากการศึกษาอิทธิพลของ sodium chloride (NaCl) ใน buffered peptone water (BPW) และอุณหภูมิการบ่ม BPW ต่อการเจริญของ background flora ในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบ 12 ตัวอย่าง โดยใช้ BPW ที่มี NaCl ที่ 0.5%, 1%, 5%, 7%, 10% และ 12% และบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 41.5 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW สูงขึ้น เชื้อ background flora รวมถึง *Salmonella* spp. มีการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยสถิติ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p = 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *E. coli* และ Coliform ที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าการลดลงของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวม (Total plate count) อีกทั้ง *Salmonella* spp. และ background flora ไม่สามารถเจริญได้ใน BPW ที่มี NaCl 7% ขึ้นไป และพบการเจริญของเชื้อทั้งสองกลุ่มลดลงที่อุณหภูมิการบ่มที่ 41.5 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบอิทธิพลของ sodium chloride ใน BPW และอุณหภูมิการบ่มดังกล่าวต่อความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. (*Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium) ในเนื้อไก่ดิบ 120 ตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 5% และอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส สามารถลดการเจริญของ background flora ได้ แต่ไม่สามารถทำให้ความไวในการตรวจพบ *S. Enteritidis* นั้นเปลี่ยนแปลง ขณะเดียวกันความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 5% ยังทำให้ความไวในการตรวจพบของ *S. Typhimurium* นั้นลดลง และพบว่าอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 5% ได้ 20%

คำสำคัญ: sodium chloride buffered peptone water อุณหภูมิในการบ่ม background flora ความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp.

เลขทะเบียนวิชาการ : 64(2)-0404-088

¹สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

*ผู้รับผิดชอบบทความ e-mail : chanon_helix@hotmail.com

Study of the influence of sodium chloride in Buffered Peptone Water and incubation temperature to background flora and sensitivity of detection of *Salmonella* spp. in raw chicken meat

Chanon Khamta^{1*} Sonchalerm Suksri¹ Pichet Koompa¹

Abstract

In the study of the influence of sodium chloride (NaCl) in Buffered Peptone Water (BPW) and incubation temperature to background flora in 12 raw chicken meat samples with 6 levels NaCl concentration of BPW (0.5%, 1%, 5%, 7%, 10% and 12%) and 2 different incubation temperatures (37 and 41°C) showed significant decrease of growth of background flora and *Salmonella* spp. when we estimated by Chi-square test at 95% confidence level ($p = 0.05$), especially the growth of *E. coli* and coliform were the most significant decrease. *Salmonella* spp. and the background flora couldn't grow in the 7% NaCl concentration BPW and above. The growth of *Salmonella* spp. and background flora were decrease in 41.5 °C incubation temperature. The study of Influent of BPW's NaCl concentration and incubation temperature to the sensitivity of detection of *salmonella* spp. (*Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium) in 120 Raw chicken meat samples indicated 5% NaCl concentration BPW and 41.5 °C incubation temperature could reduce the growth of background flora, but the Sensitivity of detection of *S. Enteritidis* wasn't changed. Simultaneously, Sensitivity of detection of *S. Typhimurium* was decrease in 5% NaCl concentration BPW, and 41.5 °C incubation temperature made 20% increase of Sensitivity of detection of *S. Typhimurium* in 5% NaCl concentration BPW.

Keyword: sodium chloride Buffered Peptone Water incubation temperature background flora sensitivity of detection *Salmonella* spp.

Registered no.: 64(2)-0404-088

¹Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of livestock development

*Corresponding author e-mail : chanon_helix@hotmail.com

บทนำ

Salmonella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคจากอาหารเป็นสื่อ (Food Borne Diseases) (Manas et al, 2001) และในหลายประเทศให้ความสำคัญในเรื่องการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ในสินค้าอาหารนำเข้า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สหภาพยุโรปที่ถือว่าเป็นกลุ่มประเทศที่มีแนวทางปฏิบัติในการตรวจสอบที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากลว่าเป็นแนวทางปฏิบัติที่ดีที่สุดในโลก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561) การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะสินค้าประเภทเนื้อสัตว์ปีกนั้น สหภาพยุโรปได้กำหนดให้ใช้วิธี ISO 6579-1 เป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิง (reference method) (The European Regulation EC 2073/2005, 2005)

การทดสอบหา *Salmonella* spp. มีหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการทดสอบ เช่น ปริมาณ background flora ระดับความเข้มข้นของ sodium chloride (NaCl) และอุณหภูมิที่ใช้บ่ม เป็นต้น โดย background flora หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งจากรายงานผลการทดลองของวรรณกรรมหลายฉบับพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่สดที่เก็บตัวอย่างจากซากที่มีการตัดแต่งแล้วจะประกอบไปด้วยกลุ่ม Total viable count, Psychrotrophic bacteria, Mesophilic bacteria, Pseudomonas, Enterobacteriaceae, *B. thermosphacta*, *E. coli*, Coliforms และ *S. aureus* (Rouger, 2017)

ในขั้นตอน Pre-enrichment นั้น background flora ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างมีผลโดยตรงต่อการเจริญของ *Salmonella* spp. เพราะเมื่อมี background flora อยู่มากจะทำให้โอกาสในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายลดลง (Margot et al, 2015) และพบว่า *Salmonella* spp. สามารถเติบโตแข่งขันกับเชื้อ background flora ได้ดีเมื่อมีจำนวน background flora ปริมาณน้อยลง (Alford and Palumbo, 1969) ในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่มีจำนวน background flora ปนเปื้อนสูงๆ อาจจะเป็นเชื้อแข่งขันและมีผลต่อการเจริญของ *Salmonella* spp. จนทำให้เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่และอาจทำให้ตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างที่มี *Salmonella* spp. ปนเปื้อนอยู่จริงจากประเด็นปัญหาดังกล่าวจึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการรายงานผลเป็น False negative

Buffered peptone water (BPW) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งเพื่อการฟื้นฟูเชื้อจุลินทรีย์หรือใช้เป็น Diluent ในการทดสอบเชื้อหลายชนิด ซึ่งระดับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่ม โดยมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลแรงดัน Osmosis ระหว่าง cell และอาหารเลี้ยงเชื้อ (Swedish University of Agricultural Sciences - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, 2019) การทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธีมาตรฐาน ISO 6579-1 : 2017 หรือวิธีทางเลือก (alternative method) เช่น วิธี PCR ใช้ BPW ในขั้นตอน Pre-enrichment เพื่อฟื้นฟูสภาพ *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บ โดยที่วิธีมาตรฐาน ISO 6579-1 : 2017 กำหนดปริมาณความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW 0.5% และโดยทั่วไป BPW ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีความเข้มข้นของ NaCl ประมาณ 5 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 0.5% เช่นเดียวกัน ในสถานะที่มีความเข้มข้นของ NaCl สูงขึ้นจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำให้เชื้อบางกลุ่มเสียสภาพไป แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ได้ (Matches and

Liston, 1972) และพบว่า *Salmonella* spp. สามารถทนทานต่อความเข้มข้นของ NaCl ได้เมื่ออยู่ในสถานะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น (Matches and Liston, 1972; Manas et al, 2001)

ในการบ่มเพาะเชื้อนั้น อุณหภูมิถือเป็นปัจจัยที่สำคัญและมีผลโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน การทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ขั้นตอนการบ่ม BPW ตามวิธีมาตรฐาน ISO 6579-1 : 2017 กำหนดให้บ่มที่อุณหภูมิ 34- 38 องศาเซลเซียส (°C) วิธีมาตรฐาน Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5 *Salmonella* ใช้ lactose broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และวิธีทดสอบทางเลือก เช่น 3M™ Molecular Detection Assay 2 – *Salmonella* บ่ม BPW ที่อุณหภูมิต่างออกไปคือ 41.5 องศาเซลเซียส (Bird et al, 2016) ความแตกต่างของอุณหภูมิที่ใช้บ่มของแต่ละวิธี จึงเป็นเรื่องที่น่านศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากในสถานะที่อุณหภูมิต่ำพบว่า background flora จะสามารถโตได้ดีกว่า *Salmonella* spp. (Alford and Palumbo, 1969)

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือศึกษาอิทธิพลของ NaCl ที่เติมใน BPW และอุณหภูมิในการบ่ม ต่อเชื้อ background flora และความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ในเนื้อไก่ดิบ โดยผลการศึกษาวิจัยจะเป็นประโยชน์ ในการใช้ปรับปรุง และพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ใช้ BPW เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นการตอน pre-enrichment ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.1 กรัม
- ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ อุณหภูมิ 35±1, 37±1 และ 41.5 องศาเซลเซียส
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิ 37±1 และ 41.5±1 องศาเซลเซียส
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อัดแรงดัน (Autoclave) อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส
- ตู้บ่มร้อน อุณหภูมิ 170±10 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย (pH meter)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Pipette aid) เครื่องตีย่อยตัวอย่าง (Stomacher) และถุงใส่ตัวอย่าง (Stomacher bag)
- Graduated pipettes ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลอดใส่สารละลาย จานเพาะเชื้อ (Petri dishes)
- แผ่นให้ความร้อนและการกวน (Hot plate stirrer)
- 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate
- 3M™ Petrifilm™ *E. coli*/ Coliform Count Plate
- ชั้นวาง Petrifilm™ (Rack for Petrifilm™)
- 3M™ Molecular Detection Assay 2

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Buffered Peptone Water (BPW) (0.5% NaCl)
- Butterfield's phosphate buffer (BPB)
- Muller Kauffmann Tetrathionate with Novobiocin broth (MKTTn broth)
- Rappaport Vassiliadis broth (RVS broth)
- Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar)
- Hektoen enteric agar
- Nutrient agar
- Triple Sugar Iron agar (TSI agar)
- Urea agar
- L-Lysine decarboxylation medium
- Merck® Emsure® Sodium chloride for analysis

เชื้ออ้างอิง

- *Salmonella* Enteritidis DMST 15676
- *Salmonella* Typhimurium DMST 15676

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาอิทธิพลของ NaCl ใน BPW และอุณหภูมิการบ่ม BPW ต่อการเจริญของ background flora และ *Salmonella* spp.

1.1 เตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ดิบ จากโรงฆ่าสัตว์ปีก 12 ตัวอย่าง ที่ผลการทดสอบ *Salmonella* spp. เป็น Negative โดยชั่งตัวอย่างละ 25 กรัม

1.2 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *S. Enteritidis* DMST 15676 ปริมาณ 52 CFU/ml

1.3 Spike เชื้อจากข้อ 1.2 ในสภาวะปกติ ลงในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.1

1.4 เติม NaCl ลงใน BPW เพื่อให้มีความเข้มข้นของ NaCl 6 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1, 5, 7, 10 และ 12% (โดยการเตรียม BPW ที่มี NaCl 0.5% ไม่ต้องเติม NaCl เพิ่มเติม)

1.5 ผสม BPW 6 ระดับความเข้มข้นของ NaCl ในข้อ 1.4 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ลงใน 6 ตัวอย่าง ระดับความเข้มข้นละ 1 ตัวอย่าง และเตรียมเป็น 2 ชุด รวมเป็น 12 ตัวอย่าง นำเข้า Stomacher

1.6 นำตัวอย่างชุดที่ 1 ไปบ่มใน Incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามวิธีที่กำหนดในวิธีมาตรฐานอ้างอิง ISO 6579-1: 2017 และชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

1.7 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD, Petrifilm™ Aerobic Count Plates และ Petrifilm™ *E. coli*/ Coliform Count Plate เพื่อใช้นับจำนวน *Salmonella* spp., Total plate count,

E. coli และเชื้อกลุ่ม Coliform ตามลำดับ โดยดูตุสารละลายจากข้อ 1.6 ก่อนเข้าบ่มและหลังจากบ่มครบ 20 ชั่วโมง จากทั้ง 2 ชุด ลงบน XLD และ 3M™ Petrifilm™ ทั้ง 2 ชนิด

1.8 นำ 3M™ Petrifilm™ ทั้ง 2 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาตามวิธีอ้างอิงกำหนด ดังนี้ Petrifilm™ Aerobic Count Plates บ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส 48 ± 3 ชั่วโมง อ้างอิงตาม AOAC (2016) 990.12 และ Petrifilm™ *E. coli*/ Coliform Count Plate บ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ± 2 ชั่วโมง อ้างอิงตาม AOAC (2016) 991.14 และนำ XLD ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ± 3 ชั่วโมง ตามที่วิธีอ้างอิงกำหนด (ISO 6579-1, 2017)

1.9 นับจำนวน Typical colony ที่ขึ้นบน XLD จากข้อ 1.8 และสุ่มเลือกโคโลนีไปทดสอบยืนยัน *Salmonella* spp. ด้วย วิธี 3M™ Molecular Detection Assay 2 โดยอ้างอิงตามวิธี AOAC (2016) กรณีที่เชื้อมีปริมาณมากจะใช้ Butterfield's phosphate buffer (BPB) ช่วยในการทำ การเจือจางเชื้อสำหรับการนับ

1.10 นับจำนวน Total plate count จาก Petrifilm™ Aerobic Count Plates จากข้อ 1.8 และนับจำนวน *E. coli* และ Coliform ที่ขึ้นบน Petrifilm™ *E. coli*/ Coliform Count Plate ทั้งสองชนิด จากข้อ 1.8

1.11 หาผลต่างการเจริญของเชื้อในหน่วย Colony forming Unit (CFU) ระหว่างชั่วโมงที่ 0 และ 20

1.12 วิเคราะห์ข้อมูลการเจริญของเชื้อในระดับความเข้มข้นของ NaCl แต่ละระดับ ในทั้งสองอุณหภูมิด้วยสถิติ Chi – square test ที่ระดับระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p = 0.05$) เพื่อใช้ประกอบการอธิบายอิทธิพลของความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW และอุณหภูมิในการบ่มที่ส่งผลต่อปริมาณเชื้อแต่ละชนิด

2. ศึกษาอิทธิพลของ NaCl ใน BPW และอุณหภูมิการบ่ม BPW ต่อความไว (sensitivity) ในการตรวจพบ *Salmonella* spp.

2.1 เตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ดิบ จำนวน 120 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 25 กรัม

2.2 เตรียม *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* เพื่อเติมลงตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 ml โดยใช้ *S. Typhimurium* DMST 13311 ความเข้มข้น 43 CFU/ml และ *S. Enteritidis* DMST 15676 ความเข้มข้น 69 CFU/ml ที่นำไปทำให้เชื้อขาดเจ็บด้วยการแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง ตามมาตรฐาน ISO 16140: 2016

2.3 เตรียม BPW ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 2 ระดับ คือ ระดับปกติ (0.5%) ตามวิธี ISO 6579-1: 2017 และ ระดับความเข้มข้นของ NaCl สูงสุดที่ยังพบ typical colony ของ *Salmonella* spp. ตามการทดลองข้อที่ 1

2.4 เติมเชื้อจากข้อ 2.2 ลงในตัวอย่างข้อ 2.1 และผสม BPW จากข้อ 2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 41.5 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง จะได้รับการทดลองทั้งหมด 8 ชุด ชุดละ 15 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 1

2.5 นำ BPW จากข้อ 2.4 ไปทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ตามวิธี ISO 6579-1: 2017 ตั้งแต่ขั้นตอน selective enrichment

2.6 ใช้ 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate ดูการเปลี่ยนแปลงของ Total plate count เพื่อเป็นตัวแทนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ background flora ในแต่ละชุดการทดลอง ระหว่างชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 20

ตารางที่ 1 การแบ่งชุดของการทดลองในการศึกษาอิทธิพลของ NaCl ใน BPW และอุณหภูมิการบ่ม BPW ต่อความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp.

ความเข้มข้น NaCl	สายพันธุ์ของเชื้ออ้างอิง	อุณหภูมิการบ่ม (°C)	จำนวน (ตัวอย่าง)
ระดับปกติ (0.5%)	S. Typhimurium	37	15
		41.5	15
	S. Enteritidis	37	15
		41.5	15
ระดับความเข้มข้นของ NaCl สูงสุดที่ยังพบ	S. Typhimurium	37	15
		41.5	15
Typical colony ของ <i>Salmonella</i> spp.	S. Enteritidis	37	15
		41.5	15

2.7 สรุปเปรียบเทียบความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. โดยคำนวณจาก

$$\text{Sensitivity} = \text{True positive} / (\text{True positive} + \text{False Negative})$$

(Carvajal and Rowe, 2010)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาอิทธิพลของ NaCl ใน BPW และอุณหภูมิการบ่ม BPW ต่อการเจริญของ background flora และ *Salmonella* spp.

ตารางที่ 2 ผลต่างการเจริญของเชื้อในหน่วย CFU ในตัวอย่างไก่ดิบจากโรงฆ่าสัตว์ปีก ระหว่างชั่วโมงที่ 0 และ 20 ของเชื้อแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW 6 ระดับ และอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่แตกต่างกัน 2 ระดับ

Incubation temperature	Microorganism	Difference number of microorganism (CFU)						Chi-Square Test (p = 0.05) (Degree of freedom = 5) (Critical value = 11.070)
		Normal (0.5%)	1%	5%	7%	10%	12%	
		NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	
37 °C	<i>S. Enteritidis</i>	7.653 (+) ^b	7.342 (+) ^b	3.778 (+) ^b	0.000 ^a (-) ^b	0.000 ^a (-) ^b	0.000 ^a (-) ^b	$\chi^2=21.74$
	<i>E. coli</i>	7.778	7.892	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	$\chi^2=31.342$
	Coliform	8.602	8.041	4.079	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	$\chi^2=24.24$
	Total Plate Count	7.058	7.085	6.944	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	$\chi^2=21.09$
41.5 °C	<i>S. Enteritidis</i>	7.613 (+) ^b	8.431 (+) ^b	3.362 (+) ^b	0.000 ^a (-) ^b	0.000 ^a (-) ^b	0.000 ^a (-) ^b	$\chi^2=23.99$
	<i>E. coli</i>	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	-
	Coliform	7.415	9.114	3.114	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	$\chi^2=25.49$
	Total Plate Count	6.263	8.146	6.079	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	$\chi^2=21.25$

หมายเหตุ :

a = ไม่พบการเจริญของเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0

b = ผลการตรวจยืนยันเชื้อ *Salmonella* spp. (เครื่องหมาย (+) คือตรวจพบ และ (-) คือตรวจไม่พบ)

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 1) พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่เพิ่มขึ้น และอุณหภูมิในการบ่มทั้งสองอุณหภูมิ ทำให้การเจริญของ *Salmonella* spp., *E. coli*, Coliform และ Total Plate Count ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ทดสอบด้วยสถิติ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (p = 0.05) พบว่าค่า χ^2 มีค่ามากกว่า critical value) โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *E. coli* และ Coliform ที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญมากที่สุด

ใน BPW ที่มี NaCl 7% เป็นต้นไป ที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ทั้งสองอุณหภูมิ ไม่พบการเจริญของ *Salmonella* spp. และเชื้ออื่นๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0

ที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส เชื้อกลุ่ม Coliform และ TPC ลดลงในแต่ละระดับความเข้มข้นของ NaCl อย่างมีนัยสำคัญมากกว่าอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 37 องศาเซลเซียส และพบว่าเชื้อมีการเจริญในภาพรวมน้อยกว่าอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 37 องศาเซลเซียส รวมถึงไม่พบ *E. coli* ในระดับที่สามารถนับได้ในอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่สามารถพบการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้

2. ผลการศึกษาอิทธิพลของ NaCl ใน BPW และอุณหภูมิการบ่ม BPW ต่อความไว (sensitivity) ในการตรวจพบ *Salmonella* spp.

ตารางที่ 3 ความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. 2 สายพันธุ์ ในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบ ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 0.5% และ 5% อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 37 และ 41.5 องศาเซลเซียส และค่าเฉลี่ยจำนวน Total plate count ในแต่ละชุดย่อยของการทดสอบ

Microorganism	Sensitivity of detection			
	Normal BPW (0.5% NaCl)		5% NaCl BPW	
	37°C	41.5°C	37°C	41.5°C
<i>Salmonella</i>	100%	100%	100%	100%
Enteritidis	(15/15) ^a	(15/15) ^a	(15/15) ^a	(15/15) ^a
Average of TPC (CFU)	6.640	4.970	3.730	3.290
<i>Salmonella</i>	100%	100%	0%	20%
Typhimurium	(15/15) ^a	(15/15) ^a	(0/15) ^a	(3/15) ^a
Average of TPC (CFU)	4.990	5.070	4.000	3.700

หมายเหตุ :

a = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่าความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 0.5% ความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ เท่ากับ 100% ทั้งสองระดับอุณหภูมิการบ่ม BPW ในขณะที่ความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 5% ความไวในการตรวจพบ *S. Enteritidis* เท่ากับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 0.5% คือ 100% และความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* ลดลงเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 0.5%

ที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 41.5 องศาเซลเซียส ความไวในการตรวจพบ *S. Enteritidis* เท่ากับ 100% ที่ความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ทั้ง 2 ระดับ และความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* ได้ 100% ที่ความเข้มข้น NaCl ใน BPW ที่ 0.5% ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 5% อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส ความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* มากกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส 20%

ที่ระดับความเข้มข้น NaCl ใน BPW ที่ 5% และที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยของปริมาณการเจริญของเชื้อ TPC ในแต่ละชุดย่อยการทดสอบมีค่าลดลง

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW มีผลต่อ background flora โดยปริมาณ NaCl ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การเจริญของ background flora ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Coliform และ *E. coli* ที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าการลดลงของปริมาณ Total plate count สอดคล้องกับการศึกษาของ Wijnker et al. (2006) ที่พบว่าความเข้มข้นของ NaCl มีผลต่ออัตราการตายของแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งการศึกษาของ Hajmeer et al (2006)

ก็พบเช่นเดียวกันว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ NaCl มากขึ้นเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้รับผลกระทบอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญมากกว่า *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะเดียวกันการเพิ่มขึ้นของ NaCl ใน BPW จะทำให้จำนวนของ *Salmonella* spp. ลดลง เช่นเดียวกัน เห็นได้ชัดว่าหากความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW มากเกินไปก็ไม่สามารถที่จะทำให้เชื้อใดสามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกัน และจากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ไม่สามารถที่จะเพิ่มความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ได้ ในขณะเดียวกันยังลดความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium*

อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของ background flora ในภาพรวมน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อกลุ่ม Coliform และ TPC มีการลดลงในแต่ละระดับของความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW อย่างมีนัยสำคัญมากกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส แต่จากการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ระดับปกติ (0.5%) อุณหภูมิการบ่ม BPW ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ได้ โดยพบว่า *Salmonella* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความไวในการตรวจพบเท่าเทียมกันทั้ง 2 อุณหภูมิ สอดคล้องกับการทดลองของ Juneja et al. (2009) ที่ทดสอบ *Salmonella* spp. หลากหลาย Serotype และพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส และ 42 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่ 5% พบว่าความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* มีความแตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่ 41.5 องศาเซลเซียส สามารถทำให้ความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* เพิ่มขึ้น 20% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Matches and Liston (1972) ที่ได้ทำการทดลองในเชื้อ *S. Typhimurium* พบว่าเชื้อสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของ NaCl ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น

ถึงแม้ว่าสภาวะที่ทำให้เชื้อ background flora ลดลงจากการทดลองนี้อาจจะไม่ส่งผลกระทบต่อความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Katona (2014) ที่ทดสอบในเนื้อหมูและวัวโดยใช้ลักษณะการทำ Pooling sample พบว่าจำนวนของ background flora ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อ การตรวจพบ (Detection) ของ *Salmonella* spp. ใน pooled sample ดังกล่าว แต่จากการทดลองนี้เรากลับพบข้อสังเกตว่าการลด background flora นั้นเป็นผลดีต่อการแสดงออกของลักษณะ Colony ของเชื้อ *Salmonella* spp. บนอาหาร XLD ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่นักวิเคราะห์จะใช้พิจารณาเลือกโคโลนี เพื่อนำไปสู่ขั้นตอน confirmation ต่อไป โดยเชื้อคู่แข่งสำคัญของ *Salmonella* spp. ที่จะสามารถเจริญได้ดีใน BPW คือ *E. coli* อีกทั้ง *E. coli* ยังเป็นหนึ่งในเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ Selectivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบหา *Salmonella* spp. อีกด้วย (ISO1133, 2020)

สรุปผลการทดลอง

อิทธิพลของ sodium chloride ใน BPW และอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่เพิ่มขึ้นสามารถลดการเจริญของ background flora ได้ แต่ไม่สามารถทำให้ความไวในการตรวจพบ *S. Enteritidis* เปลี่ยนแปลง ขณะเดียวกันความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW ที่เพิ่มขึ้นยังทำให้ความไวในการตรวจพบของ *S. Typhimurium* ลดลง และพบว่าอุณหภูมิการบ่ม BPW ที่สูงขึ้น สามารถเพิ่มความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW สูงขึ้นได้

ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้จากการศึกษาจะพบว่าการลดจำนวน background flora โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW และการเพิ่มอุณหภูมิในการบ่ม BPW จะไม่สามารถเพิ่มความไวในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ได้ แต่ผลพลอยได้จากการศึกษานี้บ่งชี้ว่าห้องปฏิบัติการควรให้ความสำคัญกับขั้นตอนต่างๆ ที่จะทำให้เกิดการลดจำนวน background flora ไม่ว่าจะเป็น การทดสอบ selectivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานกำหนด หรือการเพิ่มจำนวน plate ในขั้นตอน Secondary selective enrichment หรือการใช้ plate ที่เป็น full size ในตัวอย่างที่มีเชื้อ background จำนวนมาก

การทดสอบหาความไวในการตรวจพบของวิธีทดสอบเชิงคุณภาพควรจะทดสอบตามมาตรฐาน ISO 16140 : 2016 ต่อไป

กรณีที่อุณหภูมิการบ่ม BPW ที่สูงขึ้น สามารถเพิ่มความไวในการตรวจพบ *S. Typhimurium* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl ใน BPW สูงขึ้นนั้น ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษาขอขอบคุณ

นายสัตวแพทย์ไพโรจน์ อารังโสภาส ที่ให้โอกาสในการทำวิจัย บริษัท 3M ประเทศไทย จำกัด ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ศูนย์วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรม 3เอ็ม เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ รวมถึงอุปกรณ์เพื่อใช้ในการทดลอง นางสาวณิดา พิสัยสวัสดิ์ นางสาวณิดา มรรคณา นางสาวนงนุช พรหมลา นางสาววิภา คงสกุล นายยอดลักษณ์ แสงแพรว และนางสาวแสงรวี จงวนิช ที่สนับสนุนการทดลองในห้องปฏิบัติการ และงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2561. กฎหมายฉบับใหม่ว่าด้วยการควบคุมและตรวจสอบสินค้าเกษตรและอาหารในสหภาพยุโรป Official Control Regulation (EU) 2017/625. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. แปลจาก Regulation (EU) 2017/625 of the European parliament and of the council.
- Alford, A.J. and S.A. Palumbo. 1969. Interaction of Salt, pH, and Temperature on the Growth and Survival of *Salmonellae* in Ground Pork. Appl Microbiol. 1969 17(4): 528–532.
- Bird, P., J. Flannery, E. Crowley, J. R. Agin and D. Goins, 2016. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 – *Salmonella* for the Detection of *Salmonella* spp. in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.01. Journal of AOAC International 99(4):980–997.
- Carvajal D.N. and P.C. Rowe. 2010. Research and Statistics: Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and Likelihood Ratios. Pediatrics in Review 2010 31(12):511-513.
- European Commission, 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union. L338: 1-26.
- George W. Latimer, Jr., 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International - 20TH Edition. AOAC International. Rockville, Maryland 20850–3250, USA. Chapter 17 Page : 12, 36, 109-110.
- Hajmeer, M., E. Ceylan, J.L. Marsden and D.Y. Fung. 2006. Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. Food microbiol 2006 23(5):446-52.
- International Organization for Standardization, 2014. ISO 11133: 2014 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 2017. ISO 6579-1: 2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.. International Organization for Standardization, Switzerland.

- Juneja, V.K., M.V. Melendres, L. Huang, J. Subbiah and H. Thippareddi, 2009. **Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45 °C.** International Journal of Food Microbiology. 131(2-3): 106-111.
- Katona, B. 2014. **Pooling of ground meat samples during analysis of *Salmonella* for compliance with regulations on microbiological criteria for foodstuffs.** Master degree project. Uppsala universitet.
- Manas, P., R. Pagan, I. Leguérinel, S. Condon and P. Mafart. 2001. **Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella* typhimurium.** International Journal of Food Microbiology, Elsevier 2001:209-216.
- Margot, H., M.H. Zwietering, H. Joosten, E. O'Mahony and R. Stephan. 2015. **Evaluation of different buffered peptone water (BPW) based enrichment broths for detection of Gram-negative foodborne pathogens from various food matrices.** Int J Food Microbiol 2015 214:109-115.
- Matches, J.R. and J. Liston. 1972. **Effects of incubation temperature on the salt tolerance of *Salmonella*.** Journal of Milk and Food Technology 35(1):39-44.
- Rouger, A., O. Tresse, and M. Zagorec. 2017. **Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics.** Microorganisms 2017 5(3): 50.
- Swedish University of Agricultural Sciences - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. 2019. **Buffered Peptone Water (BPW).** Available source : <http://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=45> , September 28, 2020.
- Wijnker, J.J., G. Koop and L.J. Lipman. 2006. **Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings.** Food Microbiol 2006 23(7):657-62.