

รายงานผลการศึกษาวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2564

ชื่อโครงการวิชาการ การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953, *Bacillus stearothermophilus* TISTR 1560 และ TISTR 1517

ชื่อภาษาอังกฤษ Efficacy of media culture for endospore production of *Geobacillus stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953, *Bacillus stearothermophilus* TISTR 1560 and TISTR 1517

ผู้รับผิดชอบโครงการ

สัดส่วนของผลงาน

นายสุเมธ วันภูงา	นักวิทยาศาสตร์	40 %
นางเบญจวรรณ ใจสะอาด	นักวิชาการสัตวบาล	30 %
นางสาวจิตตาภรณ์ สุขศิริ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์	30 %

หน่วยงานรับผิดชอบ ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ (ศทวช.) 1212 หมู่ 11 ตำบลปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ Tryptose agar (TA), Tryptose broth (TB), Tryptose phosphate agar (TPA), Tryptose phosphate broth (TPB), Tryptic soy agar (TSA), Tryptic soy broth (TSB), Nutrient agar (NA), Nutrient broth (NB), Endospore agar (ESA) และ Endospore broth (ESB) ในการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Geobacillus stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953, *Bacillus stearothermophilus* TISTR 1560 และ TISTR 1517 โดยติดตามการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยการย้อมสีแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าระยะเวลา 2 วัน เหมาะสมในการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจึงคัดเลือกเชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953 และ *B. stearothermophilus* TISTR 1517 และอาหารเลี้ยงเชื้อ ESA, NA และ TA มาทำการศึกษาต่อ โดยการนับจำนวนเอนโดสปอร์ที่สร้างได้ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารแต่ละชนิดคำนวณปริมาณเอนโดสปอร์ที่ผลิตได้ พบว่าเชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329 และ ATCC 7953 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ESA สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้สูงที่สุด 3.5×10^6 cfu/ml จึงสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ ESA เหมาะสมต่อการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329 และ ATCC 7953 สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนโดสปอร์สำหรับการเตรียมชุดทดสอบประสิทธิภาพเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อได้

Keyword: อาหารเลี้ยงเชื้อ, endospore, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*

บทนำ

ฝ่ายแบคทีเรีย ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ ได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบประสิทธิภาพเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ภายในหน่วยงานและได้มีการนำเสนอเป็นผลงานการจัดการความรู้ของศูนย์ฯ ประจำปีงบประมาณ 2562 ในหัวข้อ ชุดทดสอบประสิทธิภาพเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Biological indicators) โดยให้ชื่อผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นว่า VBAC Spore I เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อชุดทดสอบ ซึ่งในการพัฒนาชุดทดสอบนั้น

การเตรียมเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ วิธีการเดิมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB สามารถเตรียมเอนโดสปอร์ได้ในปริมาณที่น้อย จากงานวิจัยของ LEE, SANG-WOOK และ SANG JUN SIM (2006) พบว่ามีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อบางสูตรในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *G. stearothermophilus* เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ในปริมาณมากขึ้นและเป็นสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อนมากนัก ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ โดยปรับในส่วนประกอบภายใต้เงื่อนไขความพร้อมของวัสดุอุปกรณ์สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ภายในหน่วยงาน เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนโดสปอร์สำหรับการเตรียมชุดทดสอบประสิทธิภาพเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask 1000 ml
2. Glass bottle
3. Glass slide
4. Pipette aid
5. Plastic pipette 1 ml, 5 ml, 10 ml
6. Sterilize plastic petri dish
7. Spreader
8. Test tube screw cap 16 x 100 cm, 20 x150 cm

สารเคมี

1. Gram's stain set solution
2. Malachite green solution
3. McFarland No. 0.5
4. 0.85 % NaCl
5. Sterile Deionized water

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1. Tryptose agar (TA) | Tryptose broth (TB) |
| 2. Tryptose phosphate agar (TPA) | Tryptose phosphate broth (TPB) |
| 3. Tryptic soy agar (TSA) | Tryptic soy broth (TSB) |
| 4. Nutrient agar (NA) | Nutrient broth (NB) |
| 5. Endospore agar (ESA) | Endospore broth (ESB) |
| 6. Plate count agar | |

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Geobacillus stearothermophilus* TISTR 329
2. *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953
3. *Bacillus stearothermophilus* TISTR 1560
4. *Bacillus stearothermophilus* TISTR 1517

เครื่องมือ

1. Autoclave
2. Balance
3. Biosafety cabinet class II
4. Centrifuge
5. Microscope
6. Stirrer hotplate
7. Incubator 56°C

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ TA ,TB, TPA, TPB, TSA, TSB, NA, NB, ESA และ ESB ตามสูตรและวิธีที่ระบุในฉลาก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C 15 นาที

2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Geobacillus stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953, *Bacillus stearothermophilus* TISTR 1560 และ TISTR 1517 ลงบนอาหาร TA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 หรือปริมาณ 1.5×10^8 cfu/ml ด้วย 0.85% NaCl

3. การศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อในอาหารแต่ละชนิด

เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ลงบนอาหารทั้ง 5 ชนิดในรูปอาหารแข็งและอาหารเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 56°C ติดตามผลการสร้างเอนโดสปอร์โดยการย้อมสีแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ประเมินร้อยละปริมาณของเอนโดสปอร์ต่อเซลล์ปกติด้วยสายตาทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน เพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ได้ร้อยละ 2 ขึ้นไปมาทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไปดังแสดงในตารางที่ 1

4. การนับจำนวนเอนโดสปอร์

เพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารที่คัดเลือกมาจากขั้นตอนที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 2 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเอนโดสปอร์ และนับจำนวนด้วยเทคนิค Total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการศึกษา

จากการศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953, *B. stearothermophilus* TISTR 1560 และ TISTR 1517 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร TA, TB, TPA, TPB, TSA, TSB, NA, NB, ESA และ ESB ติดตามการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยการย้อมสีแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบร้อยละของปริมาณเอนโดสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าระยะเวลา 2 วัน เหมาะสมในการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดและเชื้อที่สร้างเอนโดสปอร์ได้ร้อยละ 2 ขึ้นไป ได้แก่เชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329, ATCC 7953 และ *B. stearothermophilus* TISTR 1517 ไปทำการศึกษาต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ESA, NA และ TA โดยการนับจำนวนเอนโดสปอร์ที่สร้างได้

และคำนวณปริมาณเอนโดสปอร์ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งเชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329 และ ATCC 7953 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ESA สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้สูงที่สุด 3.5×10^6 cfu/ml

ตารางที่ 1 ร้อยละปริมาณเอนโดสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด เป็นเวลา 7 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ร้อยละปริมาณเอนโดสปอร์ของเชื้อ <i>G. stearothermophilus</i> TISTR 329, ATCC 7953, <i>B. stearothermophilus</i> TISTR 1560 และ TISTR 1517																											
	วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5				วันที่ 6				วันที่ 7			
	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517	TISTR 329	ATCC 7953	TISTR 1560	TISTR 1517
ESA	10%	7.5%	-	25%	40%	30%	-	60%	30%	17.5%	-	25%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NA	8%	20%	-	7.5%	10%	16.5%	-	25%	2%	10%	-	20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA	2%	-	-	-	-	2%	-	2%	-	2.5%	-	3.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPA	-	-	-	-	-	1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 แสดงผลค่าเฉลี่ยปริมาณการสร้างเอนโดสปอร์ (cfu/ml)

อาหารเลี้ยงเชื้อ		ปริมาณเอนโดสปอร์ (cfu/ml)		
		1	2	Mean
TISTR 329	ESA	3.6×10^6	3.3×10^6	3.5×10^6
	NA	2.5×10^6	2.3×10^6	2.4×10^6
TA		4.9×10^4	5.1×10^4	5.0×10^4
TISTR 1517	ESA	7.1×10^5	7.0×10^5	7.1×10^5
	NA	2.4×10^5	2.5×10^5	2.5×10^5
TA		6.2×10^3	5.8×10^3	6.0×10^3
ATCC 7953	ESA	3.5×10^6	3.4×10^6	3.5×10^6
	NA	1.6×10^6	1.3×10^6	1.5×10^6
TA		3.2×10^4	3.3×10^4	3.3×10^4

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาสรุปว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ESA เหมาะสมต่อการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อ *G. stearothermophilus* TISTR 329 และ ATCC 7953 สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนโดสปอร์สำหรับการเตรียมชุดทดสอบประสิทธิภาพเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยทั่วไปการเตรียม spore strip จะใช้ปริมาณเอนโดสปอร์/strip เท่ากับ 2×10^5 cfu/ml (สุวิทย์; 2015) ดังนั้นจากผลการศึกษานี้พบว่าการเตรียมเอนโดสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ESA ปริมาตร 1 ลิตร สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ถึง 3.5×10^6 cfu/ml ซึ่งสามารถนำไปเตรียมชุดทดสอบประสิทธิภาพนึ่งฆ่าเชื้อได้ถึง 17,000 strip

เอกสารอ้างอิง

LEE, SANG-WOOK and SANG JUN SIM. 2006. Increased Heat Resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores Heat-Shocked During Sporulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16(4): 633-636.

สุวิทย์ แวนเกต “ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biological Indicator)” <http://www.cssd-gotoknow.org/2015/02/biological-indicator.html>

ภาคผนวก

สูตรอาหาร Endospore medium (LEE, SANG-WOOK และ SANG JUN SIM)

ส่วนที่ 1 สารอาหารหลัก เตรียม 900 ml

Peptone	5.5 g
Yeast extract	4.0 g
DW	900 ml

ส่วนที่ 2 Supplement (สูตรสำหรับเตรียม 1 ลิตร)

KH_2PO_4	5.0 g
Glutamic acid	4.0 g
Glucose	1.8 g
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0 g
NaCl	0.1 g
MgSO_4	0.1 g
CaCl_2	0.1 g
MnSO_4	0.1 g
FeSO_4	0.03 g
DW	1000 ml

1. เตรียม Supplement ตามสูตรส่วนที่ 2 ไว้ใช้เป็น stock solution นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C 15 นาที
2. เตรียมส่วนที่ 1 ตามสูตร ปริมาตร 900 มล. เติม Supplement 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C 15 นาที หากต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติม agar 15 กรัม/ลิตร