ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42160

MEDIA OPTIMIZATION OF ENRICHMENT PROTOCOL TO IMPROVE LISTERIA SELECTIVITY

MISS SIRIPA DAENGPHUANG

A SPECIAL RESEARCH PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING (FOOD ENGINEERING)
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
2011

b00256890

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42160

Media Optimization of Enrichment Protocol to Improve Listeria Selectivity

Miss Siripa Daengphuang B.Sc. (Food Science)

A Special Research Project Submitted in Partial Fulfillment
of the Requirements for
the Degree of Master of Engineering (Food Engineering)
Faculty of Engineering
King Mongkut's University of Technology Thonburi
2011

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

Special Research Project Committee

..... Chairman of Special Research
(Assoc. Prof. Suwit Siriwattanayotin) project Committee

..... Member and Special
(Asst. Prof. Aluck Thipayarat, Ph.D.) Research Project Advisor

P. Vongsawasdi
..... Member
(Assoc. Prof. Punchira Vongsawasdi, Ph.D.)

Copyright reserved

Special Research Project Title	Media Optimization of Enrichment Protocol to Improve *Listeria* Selectivity
Special Research Project Credits	6
Candidate	Miss Siripa Daengphuang
Special Research Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat
Program	Master of Engineering
Field of study	Food Engineering
Department	Food Engineering
Faculty	Engineering
B. E.	2554

Abstract

E 42160

Listeria innocua growth and selectivity during non-selective enrichment and selective enrichment steps were studied to formulate fundamental knowledge to enhance *Listeria* spp. detection protocol. *L. innocua* was utilized as a non-pathogenic *Listeria* model because it shares similar physiological traits with *Listeria monocytogenes.* The growth of *L. innocua* was compared on three conventional non-selective media (i.e., NB, LB and TSB) and three Listeria enrichment broth bases from which selective agents were intentionally removed (i.e., BLEB, FB and PB). The incubation conditions were varied at different temperatures (i.e., 30, 35, 37 and 40 °C). Sigmodial-type mathematical model was applied to capture the growth characteristics during batch cultivation and to extract key kinetic parameters (i.e., maximum specific growth rate; μ_{max}) used to investigate the optimum non-selective enrichment protocol. The growth characteristics and the estimated kinetic parameters (μ_{max}) indicated that the optimal incubation temperature for *L. innocua* growth was 35 °C where the growth profile showed the highest μ_{max} and high final cell density. TSB, as an effective non-selective enrichment medium, was selected to multiply *L. innocua* in the non-selective enrichment step. The

E 42160

effects of conventional inhibitors were studied by using common selective inhibitors suggested in most global microbiological detection standards (i.e., NGFIS, IDF, USFDA, NMKL, ISO, AOAC and USDA-FSIS). The TSB broth base was modified by adding selected conventional selective agents to study the growth and selectivity of *Listeria* spp. The growth profiles showed that acriflavine significantly affected the growth of Gram-positive bacteria. Interestingly, *L. innocua* has less resistant to acriflavine than *Staphylococcus aureus*. Polymyxin B inhibited Gram-negative bacteria as well as Gram-positive bacteria but to a lesser extent. As low as 10 mg/L of polymyxin enabled effective reduction of *E. coli* from 6 to less than 2 log CFU/mL within 2 h of incubation. Nalidixic acid only suppressed Gram-negative bacteria and was not as effective as polymyxin B. Although lithium chloride did not significantly affect the inhibition of any target microorganisms, it was included in the optimization experiment to find an effective selective enrichment combination. Using the response surface analysis the optimum selective composition to isolate *E. coli* and *S. aureus* from *L. innocua* includes 5.7 mg/L of acriflavine, 10.0 mg/L of polymyxin B and 20.7 g/L of lithium chloride.

Keywords: Growth Kinetics/ *Listeria innocua* / *Listeria* Selectivity / Maximum Specific Growth Rate/ Non Selective Enrichment

หัวข้อโครงการศึกษาวิจัยพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเพื่อปรับปรุงการคัดเลือกเชื้อลิสทีเรีย
หน่วยกิต	6
ผู้เขียน	นางสาวสิริภา แดงพ่วง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์
หลักสูตร	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมอาหาร
ภาควิชา	วิศวกรรมอาหาร
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
พ.ศ.	2554

E 42160

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและการคัดเลือกเชื้อ ลิสทีเรีย อินโนคัว ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบคัดเลือกและไม่คัดเลือก เพื่อสร้างความรู้พื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับขั้นตอนการตรวจเชื้อลิสทีเรีย ทั้งนี้ใช้ เชื้อ แอล อินโนคัว ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค เป็นเชื้อทดสอบ เนื่องจากเชื้อ แอล อิโนคัว มีลักษณะทางสรีรวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อ ลิสทีเรีย โมโนไซโตจีเนส สำหรับการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ แอล อินโนคัว บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้กันอยู่ทั่วไป ได้แก่ เอ็นบี แอลบี และ ทีเอสบี และบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อ ลิสทีเรียโดยเฉพาะ โดยไม่มีการใส่สารยับยั้งในสูตร ได้แก่ บีแอลอีบี เอฟบี และ พีบี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดซิกมอยด์ในการอธิบายลักษณะการเจริญโดยคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือก จากลักษณะการเจริญและพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้พบว่าอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ แอล อินโนคัว เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส โดยเป็นสภาวะที่ค่า μ_{max} และ ความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายสูงที่สุด นอกจากนี้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือก ยังได้เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

E 42160

ทีเอสบี มาใช้กับเชื้อ แอล อินโนคัว ด้วย สำหรับการศึกษาผลของสารยับยั้งสำหรับการตรวจพบเชื้อลิสทีเรีย ใช้สารยับยั้งที่แนะนำให้ใช้ในการตรวจเชื้อตามวิธีมาตรฐานทั่วไป ได้แก่ เอ็นจีเอฟไอเอส ไอดีเอฟ ยูเอส เอฟดีเอ เอ็นเอ็มเคแอล ไอเอสโอ เอโอเอซี และ ยูเอสดีเอ-เอฟเอสไอเอส ทำการทดลองโดยเติมสารคัดเลือกสำหรับเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทีเอสบี เพื่อศึกษาการเจริญและการคัดเลือกเชื้อลิสทีเรีย จากกราฟการเจริญของเชื้อ พบว่า อคริฟลาวีน มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอย่างเห็นได้ชัด และประเด็นที่น่าสนใจคือ เชื้อ แอล อินโนคัว สามารถทนต่อ อคริฟลาวีน ได้น้อยกว่าเชื้อสแต็ปฟีโลค็อกคัส ออเรียส ในทางตรงกันข้าม โพลีมัยซิน บี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวก แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้น้อยกว่า โดยโพลีมัยซิน บี ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดในการศึกษา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ อี โคไล จาก 6 ล็อก ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ให้ลดลงเหลือน้อยกว่า 2 ล็อก ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ภายในระยะเวลาการบ่ม 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ากรดนาลิดิซิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น และมีประสิทธิภาพน้อยกว่า โพลีมัยซิน บี ในกรณีของ ลิเธียม คลอไรด์ ถึงแม้จะไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อจุลชีพเป้าหมาย แต่ยังคงใช้ ลิเธียม คลอไรด์ ร่วมในการทดลองด้วย ในส่วนของการหาสภาวะที่เหมาะสมของส่วนผสมสารคัดเลือก ทำการทดลองโดยการวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนอง และสรุปได้ว่าส่วนผสมของสารคัดเลือกที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อ อี โคไล และ เชื้อ เอส ออเรียส ออกจาก เชื้อ แอล อินโนคัว คือการใช้ อคริฟลาวีน 5.7 มิลลิกรัม/ลิตร โพลีมัยซิน บี 10 มิลลิกรัม/ลิตร ลิเธียม คลอไรด์ 20.7 มิลลิกรัม/ลิตร

คำสำคัญ: การคัดเลือกเชื้อ ลิสทีเรีย/ การเพิ่มจำนวนแบบไม่คัดเลือก/ การศึกษาจลนพลศาสตร์/
ลิสทีเรีย อินโนคัว/ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not have been successful without helpful contributions from many advisors and colleagues. First of all, I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat for giving me a great opportunity to thisembark on this brilliant project and offering helps and suggestions all along. Many appreciations go to all project committee members including, Assoc. Prof. Suwit Siriwatanayotin and Assoc. Prof. Dr. Punchira Vongsawasdi for giving valuable suggestions and knowledge during presentation and project.

Moreover, my special gratitude is extended to professors and all staff members of Food Engineering Department, KMUTT who established an outstanding program like FEPS to give me and others the opportunity to progress my knowledge and skills. Furthermore, I would like to thank all the ALUCK Research Team including, Ruamporn Liamkaew, Siripilin Kosonpisit, Pattarin Supanichwatin, Natthiga Saeteaw, Orana Rattanabumrung and Wipavadee Sangadkit for their helpful suggestions and how to work with colleague as a team. Moreover, very grateful thanks are carried to all friends and seniors at Food Engineering and Food Engineering Practice School (FEPS) programs for their supports and encouragement.

CONTENTS

ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
CHAPTER 1 INTRODUCTION	**1**
1.1 Introduction	1
1.2 The Objectives	2
1.3 The Expected Outcomes	3
CHAPTER 2 THEORY AND LITERATURE REVIEW	**4**
2.1 *Listeria* spp.	4
2.2 History	4
2.3 Listeriosis Outbreaks	5
2.4 Symptoms of Listeriosis	7
2.5 Taxonomy of the Genus Listeria	7
2.6 Detection Methods	9
CHAPTER 3 MATERIALS AND METHODOLOGY	**17**
3.1 Equipments and Instruments	17
3.2 Media culture and Chemical Reagents	17
3.3 Bacterial Strains	18
3.4 Sample Preparation	18
3.5 Cell Enumeration	22
3.6 Growth Characteristics Determination Using Sigmoidal Function	23
CHAPTER 4 RESULTS AND DISCUSSION	**24**
4.1 Investigation of Non Selective Enrichment Protocol	24
4.2 Examination of Inhibitory Effect of the Conventional Selective Agents on Growth and Selectivity of *L. innocua*	31
4.3 Optimize Combination of the Effective Inhibitors	41

CHAPTER 5 CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS **49**

5.1 Conclusions 49

5.2 Recommendations 50

REFERENCES **51**

APPENDIX A. Expermental Data **65**

CURRICULUM VITAE **76**

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
3.1	Non-selective fomulars	20
3.2	Design of experiment by using Minitab	22
4.1	Inhibitory effect of *L. innocua, E. coli* and *S. aureus* from Box-behnken design	42
A.1	Data of *Listeria innocu* in non selective enrichment broth at 30°C (log CFU/ml)	66
A.2	Data of *L. innocua* in non selective enrichment broth at 35°C (log CFU/ml)	67
A.3	Data of *L. innocua* in non selective enrichment broth at 37°C (log CFU/ml)	68
A.4	Data of *L. innocua* in non selective enrichment broth at 40°C (log CFU/ml)	69
A.5	Data of *L. innocua* growth on acriflavine (log CFU/ml)	70
A.6	Data of *L. innocua* growth on polymyxin B (log CFU/ml)	70
A.7	Data of *L. innocua* growth on nalidixic acid (log CFU/ml)	71
A.8	Data of *L. innocua* growth on lithium chloride (log CFU/ml)	71
A.9	Data of *E. coli* growth on acriflavine of (log CFU/ml)	72
A.10	Data of *E. coli* growth on polymyxin B (log CFU/ml)	72
A.11	Data of *E. coli* growth on nalidixic acid (log CFU/ml)	73
A.12	Data of *E. coli* growth on lithium chloride (log CFU/ml)	73
A.13	Data of *S. aureus* growth on acriflavine (log CFU/ml)	74
A.14	Data of *S. aureus* growth on polymyxin B (log CFU/ml)	74
A.15	Data of *S. aureus* growth on nalidixic acid (log CFU/ml)	75
A.16	Data of *S. aureus* growth on lithium chloride (log CFU/ml)	75

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Percent of reported laboratory-confirmed listeriosis within age groups for males and females	5
2.2	Overview of isolation, identification and typing methods for *Listeria* and *L. monocytogenes* in foods and environmental samples	9
2.3	A methodological system for the phenotypic identification of *Listeria*	13
3.1	96 deep well plate	21
4.1	An example of photograph of *L. innocua* colonies grown on TSA	25
4.2	Effect of different incubation temperatures on growth profiles of *L. innocua* in different non-selective enrichment broths	26
4.3	Effect of different non-selective on growth profiles of *L. innocua* at the same temperature	29
4.4	Effect of non-selective enrichment media and incubation temperature on growth of *L. innocua*	30
4.5	Effect of non-selective enrichment media and incubation temperature on growth of *L. innocua*	30
4.6	Comparison of growth profiles of *L. innocua, E. coli* and *S. aureus* on acriflavine	33
4.7	Comparison of growth profiles of (a) *L. innocua,* (b) *E. coli* and (c) *S. aureus* on polymyxin B	36
4.8	Comparison of growth profiles of (a) *L. innocua,* (b) *E. coli* and (c) *S. aureus* on nalidixic	39

4.9 Comparison of growth profiles of (a) *L. innocua,* (b) *E. coli* and (c) *S. aureus* on lithium chloride 41

4.10 Inhibitory effects of acriflavine and polymyxin B on a) *L. innocua*, b) *E. coli* and c) *S. aureus* 44

4.11 Inhibitory effects of acriflavine and lithium chloride on a) *L. innocua*, b) *E. coli* and c) *S. aureus* 46

4.12 Inhibitory effects of polymyxin B and lithium chloride on a) *L. innocua*, b) *E. coli* and c) *S. aureus* 48