ประเมินวิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* เชิงปริมาณ โดยอาศัยสมบัติการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิง ชนิดเอซิลโฮโมซีรีนแลกโทน

Evaluation of the Method for Quantitative Detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on Quorum Sensing; Acyl Homoserine Lactone Production Property

กิติมา เชื้อพานิช[1] ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา[1] และพัชณิตา ธรรมยงค์กิจ[2]

Kitima Chueapanich[1], Cheunjit Prakitchaiwattana[1] and Patchanita Tamayongkit[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* เชิงปริมาณ โดยอาศัยคุณสมบัติในการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิดเอซิลโฮโมซีรีนแลกโทน (AHL) การทดลองเริ่มจากการตรวจยืนยันการสร้าง AHL โดยการวิเคราะห์สารสกัดจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC ผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้สร้างสาร AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL จากนั้นประเมินวิธีการตรวจสอบ AHL ด้วยวิธี colorimetry โดยการตรวจวัดสารประกอบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate พบว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 นาโนเมตร ซึ่งเหมือนกับการทดสอบด้วยสารมาตรฐาน (3-oxo-C6-HSL) และผลการทดลองยังยืนยันได้ว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นในคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่าง $FeCl_3$ กับ AHL เท่านั้น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเมตาบอไลต์อื่นที่เชื้อสร้างขึ้นไม่รบกวนต่อระบบการตรวจสอบด้วยวิธี colorimetry นี้ ต่อมาจึงนำวิธี colorimetry ที่ประเมินได้มาใช้ในการตรวจสอบสมบัติการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเกลือ และเติมเกลือ 6% และ 8% ตามลำดับ พบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญใน nutrient broth ที่ไม่เติมเกลือได้ดีที่สุด (μ = 1.56 generation/hr) และเจริญในสภาวะเกลือ 6% และ 8% ได้ต่ำกว่า (μ = 1.13 และ 0.13) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับปริมาณ AHL ในแต่ละระบบ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือจะสร้าง AHL ได้สูงกว่า เมื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับการสร้าง AHL ในระบบเกลือ 6% ที่แปรจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 2 logCFU/ml และ 4 logCFU/ml ผลการทดลองพบว่าเซลล์ทั้งสองระบบมีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน (μ = 1.10 และ 1.13) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเซลล์และปริมาณ AHL ในช่วง log phase มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรงในทั้งสองระบบ โดยมีค่า r^2 ไม่แตกต่างกัน (0.9226 และ 0.9471) ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณ AHL สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ได้ และข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* เชิงปริมาณในระบบอาหารต่อไปได้

คำสำคัญ : *V. parahaemolyticus* เอซิลโฮโมซีรีนแลกโทน เกลือ

---

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[2] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the methods for quantitative determination of *V. parahaemolyticus* based on its quorum sensing; acyl homoserine lactone (AHL) production property. Initially the production of AHL from *V. parahaemolyticus* was confirmed by HPLC analysis. The results indicated that *V. parahaemolyticus* could produce 3-hydroxyl-C4-HSL. Subsequently, the colorimetric method for the detection of AHL from *V. parahaemolyticus* was evaluated by the determination of coloring complex resulting from Ferric(III)-hydroxamate complex formation using spectrophotometry. It was found that the coloring complex had the maximum absorbance wavelength at 520 nm (λ_{max} = 520 nm) which were similar to the standard substance (3-oxo-C6-HSL). In addition, the result also indicated that the coloring complex in the culture of *V. parahaemolyticus* was generated from the specific reaction between $FeCl_3$ and AHL. The medium composition and metabolites secreted from *V. parahaemolyticus* could not interfere the detection system of colorimetry. The colorimetry as evaluated was then use for the determination of AHL production property of *V. parahaemolyticus* cultured in nutrient broth which were not added and added with 6% and 8%NaCl. The result showed that *V. parahaemolyticus* cultured in nutrient broth which was not added with NaCl had the highest growth rate (μ = 1.56 generation/hr). The growth rate of *V. parahaemolyticus* cultured in nutrient broth added with 6% and 8%NaCl were lower (μ = 1.13 and 0.13), respectively. When the relationship between cell number of *V. parahaemolyticus* and AHL content in each cultivation system was evaluated, it demonstrated that the cell cultivated under NaCl conditions could generate higher AHL. When the relationship between growth rate and AHL production of *V. parahaemolyticus* that initial cell populations was varied to 2 log and 4 logCFU/ml and cultivated in 6%NaCl were evaluated, it was found that the growth rate of cell cultured in both systems were not different (μ = 1.10 and 1.13). In addition, the cell numbers and AHL concentrations during log phase of both systems would be related in linear line and the coefficient of determination (R^2) was similar (0.9226 and 0.9471). This demonstrated that AHL content could be used as an indicator of cell number of *V. parahaemolyticus* in the broth culture system. Consequently this information could be use as a guideline for the development of a method for quantitative determination of *V. parahaemolyticus* in food system.

Keywords : *V. parahaemolyticus*, AHL, NaCl

E-mail : p_kitima@hotmail.com

คำนำ

ในปัจจุบันการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล ประกอบด้วยขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ pre-enrichment และ selective enrichment แล้วจึงเลี้ยงบนอาหารแข็งแบบ selective plating เพื่อแยกโคโลนี และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของโคโลนี ส่วนการตรวจสอบระดับการปนเปื้อนจะใช้

วิธีทดสอบแบบ Most Probable Numbers (MPN) ซึ่งทั้งสองวิธีใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนานถึง 5 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่าย และในปัจจุบันก็ยังไม่มีวิธีตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่รวดเร็วสำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการตรวจแบคทีเรียดังกล่าว มีรายงานว่าเซลล์จุลินทรีย์สามารถสื่อสารกันด้วยการส่งสัญญาณทางเคมีที่เรียกว่าควอรัมเซนซิง ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เมื่อจุลินทรีย์สร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงมากถึงระดับหนึ่งจะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำกระบวนการทางพันธุกรรมและก่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างสปอร์ การเกิดไบโอฟิล์ม และการผลิตเอนไซม์หลั่งออกมานอกเซลล์ เป็นต้น (Gobbetti และคณะ, 2007) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงที่มีรูปแบบและปริมาณแตกต่างกันออกไป โดยกลุ่มของสัญญาณควอรัมเซนซิงที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารคือ สัญญาณในกลุ่มเอซิลโฮโมซีรีนแลกโทน (AHL) *V. parahaemolyticus* เป็นจุลินทรีย์ที่สร้าง AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL (Henke และ Bassler, 2004) มีรายงานว่าสารในกลุ่มเอซิลโฮโมซีรีนแลกโทนนี้สามารถตรวจวัดได้โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีที่ตรวจวัดได้ (Yang และคณะ, 2006) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการตรวจสอบ AHL ที่สร้างจาก *V.parahaemolyticus* ด้วยวิธีทางเคมี สำหรับใช้ในการพัฒนาเป็นวิธีที่รวดเร็วที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* เชิงปริมาณต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วิเคราะห์สาร AHL ที่สร้างโดย *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC

สกัด AHL จากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* DMST 22092 และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ (ไม่แสดงวิธีสกัด) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ *N*-(β-ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) (Sigma-Aldrich, Germany) เป็นสารมาตรฐาน และใช้สารสกัดจากโคโลนีของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 เป็นตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) คอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองคือ Luna C_{18} II column, 100A 150 x 4.6 mm (Phenomenex), Ultraviolet-Visible detector ; Waters 2487 Dual Absorbance เฟสเคลื่อนที่คือ water-CH_3CN gradient system ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) คือ 10 ไมโครลิตร อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ 25 องศาเซลเซียส

2. ประเมินวิธีการตรวจสอบ AHL จาก *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี colorimetry

นำคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ใน nutrient broth (NB) (Himedia, USA) ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปตรวจสอบ AHL ด้วยวิธี colorimetry ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Yang และคณะ (2006) โดยการนำสารสกัด AHL มาทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ ด้วยการทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสีที่เกิดขึ้นด้วย

เครื่อง spectrophotometer (Lambda 25 UV/VIS spectrometer, PerkinElmer, USA) โดยใช้ *N*-(β-ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C6-AHL) (Sigma-Aldrich, Germany) เป็นสารมาตรฐาน และใช้คัลเจอร์ของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 ที่แยกเซลล์ออกแล้วเป็นตัวอย่างควบคุมลบ

ประเมินความถูกต้องของวิธีแบบ partial method validation (USFDA guideline, 2001) โดยตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ คือ ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไว

3. ศึกษาการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ

3.1 เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4 logCFU/ml ใน nutrient broth ที่ไม่เติมเกลือ และเติมเกลือ 6% และ 8% ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนประชากรด้วยวิธีการ spread plate และปริมาณ AHL ที่สร้างด้วยวิธี colorimetry ที่ประเมินได้จากข้อ 2 ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 28 ชั่วโมง และประเมินอัตราการเจริญในค่าของอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ)

3.2 นำสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมที่ประเมินได้จาก 3.1 มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เริ่มต้น (2 logCFU/ml กับ 4 logCFU/ml) กับอัตราการเจริญและการสร้าง AHL ประเมินอัตราการเจริญในค่า specific growth rate (μ) และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ และปริมาณ AHL โดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์

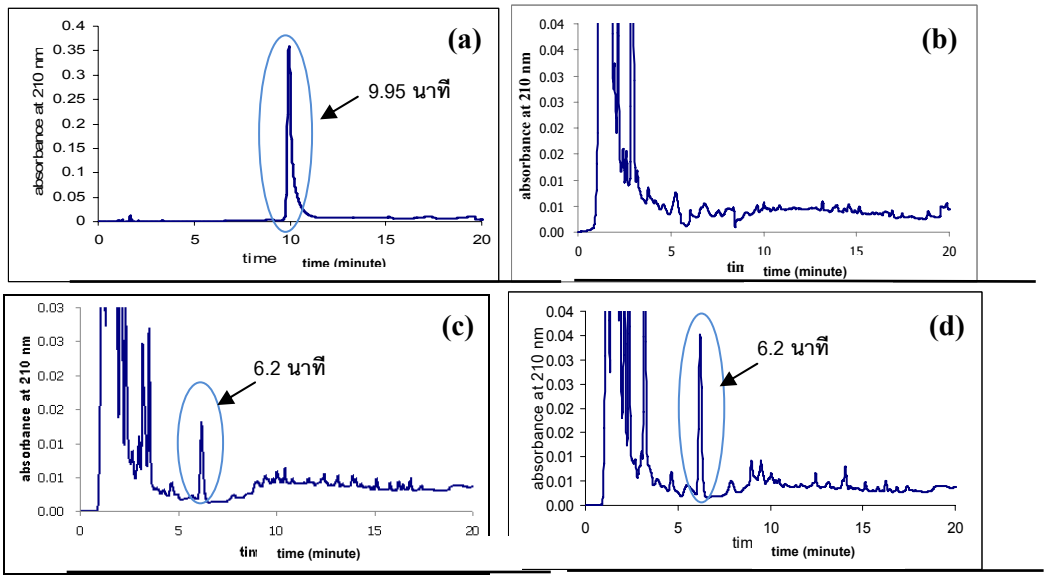
ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษาสมบัติการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* โดยเริ่มต้นจากการตรวจยืนยันการสร้าง AHL โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLCและประเมินวิธีในการตรวจสอบ AHL ด้วยวิธี colorimetry จากนั้นจึงนำวิธี colorimetry ที่ได้ไปใช้ในการตรวจสอบสมบัติการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ที่สภาวะต่างๆ ผลการทดลองเป็นดังต่อไปนี้

1. วิเคราะห์สาร AHL ที่สร้างโดย *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC

จากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ที่แสดงในรูปที่ 1(a) พบว่าพีคของสารดังกล่าวปรากฏที่เวลา 9.95 นาที ส่วนโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *V. parahaemolyticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่แสดงในรูปที่ 1(c) และ 1(d) นั้นพบว่ามีพีคปรากฏขึ้นที่เวลา 6.2 นาที ซึ่งพีคดังกล่าวมีแนวโน้มว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มของ เอซิลโฮโมซีรีนแลกโทน ที่มีสายโซ่เอซิลที่สั้นกว่า 3-oxo-C6-HSL ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้มีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* สร้างสัญญาณ AI-1 ชนิด 3-hydroxybutanoyl-homoserine lactone (3-hydroxyl-C4-HSL) เป็นชนิดหลัก (Henke และ Bassler, 2004) ซึ่งมีความยาวของสายโซ่เอซิลที่สั้นกว่าสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL สารที่มีโมเลกุลสายสั้นกว่าจะถูกชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ออกมาก่อน ดังนั้นพีคของโครมาโตแกรมในรูปที่ 1(c) และ 1(d) จึงน่าจะเป็นพีคของสาร AHL ที่มีโมเลกุลสายสั้นกว่า เช่น 3-hydroxyl-C4-HSL และเมื่อพิจารณาที่โครมาโตแกรมของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 แสดงดังรูปที่ 1(b) พบว่าไม่ปรากฏพีคใดๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่า *Salmonella* sp. เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสารในกลุ่ม AHL (Walters และคณะ, 2006) ส่วนพีครบกวนอื่นๆที่ปรากฏในโครมาโตแกรมของสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามชนิด น่าจะเกิดจากสารอื่นๆที่ปนเปื้อนมาจากโคโลนี ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงบ่งชี้ได้ว่า *V. parahaemolyticus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้น่าจะ

สร้างสาร AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL อย่างไรก็ตามควรตรวจสอบยืนยันโครงสร้างของสารนี้ต่อไปด้วยเครื่อง Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LCMS)

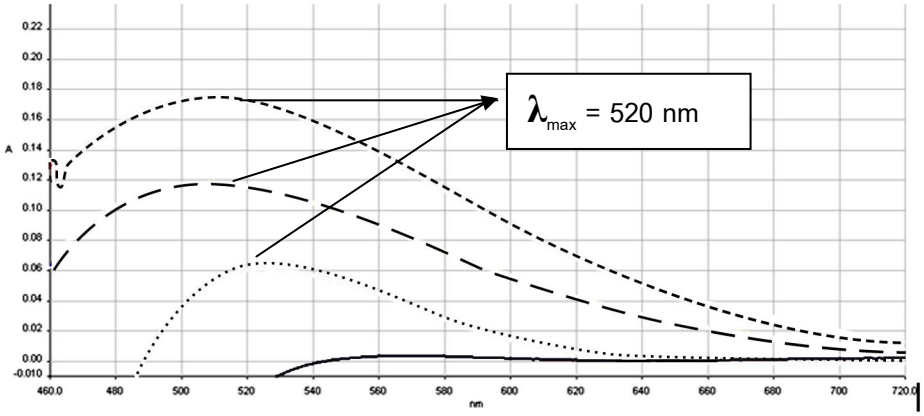


รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสาร AHL มาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL (a), สารสกัดจากโคโลนีของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 (b), สารสกัดจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* DMST 22092 (c) และสารสกัดจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 (d)

2. ประเมินวิธีการตรวจสอบ AHL จาก *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี colorimetry

การประเมินเริ่มต้นโดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate ที่เกิดขึ้นระหว่าง AHL กับสารละลาย $FeCl_3$ โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ที่ละลายในน้ำกลั่นแล้วนำไปทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate เมื่อตรวจสอบสารประกอบสีที่เกิดขึ้น พบว่าสารประกอบดังกล่าวดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2 และเมื่อนำสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ละลายใน nutrient broth แล้วนำไปทำปฏิกิริยาแบบเดียวกัน เมื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสง พบว่ายังคงมีค่า λ_{max} ที่ประมาณ 520 นาโนเมตรเพียงจุดเดียวเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบต่างๆใน NB ไม่ทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ ดังนั้นจึงทดลองตรวจสอบการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* โดยนำส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงมาทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ เมื่อเปรียบเทียบสารประกอบสีที่เกิดขึ้น พบว่ามีค่า λ_{max} เท่ากับสารมาตรฐาน อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันว่าสารประกอบสีที่ได้จากคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ AHL หรือเกิดจากเมตาบอไลต์อื่นๆที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเซลล์ จึงทดลองนำส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีรายงานว่าไม่สร้าง AHL (Walters และคณะ, 2006) มาทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ พบว่าไม่พบสารประกอบสีลักษณะเดียวกับการทดสอบในคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งจากผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นในคัลเจอร์ของ *V.*

parahaemolyticus เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่าง $FeCl_3$ กับ AHL เท่านั้น ดังนั้นวิธีนี้น่าจะนำไปใช้ในการตรวจสอบ AHL ที่สร้างจากเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และเมื่อทำการประเมินความถูกต้องของวิธีตามที่ได้กล่าวเอาไว้ในวิธีการทดลอง พบว่าวิธีนี้มีความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ยังได้ทดลองศึกษาปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิไม่มีอิทธิพลต่อการสร้าง AHL แต่พบว่าความเข้มข้นเกลือมีอิทธิพลต่อสมบัติการสร้าง AHL (ไม่แสดงผลการทดลอง)

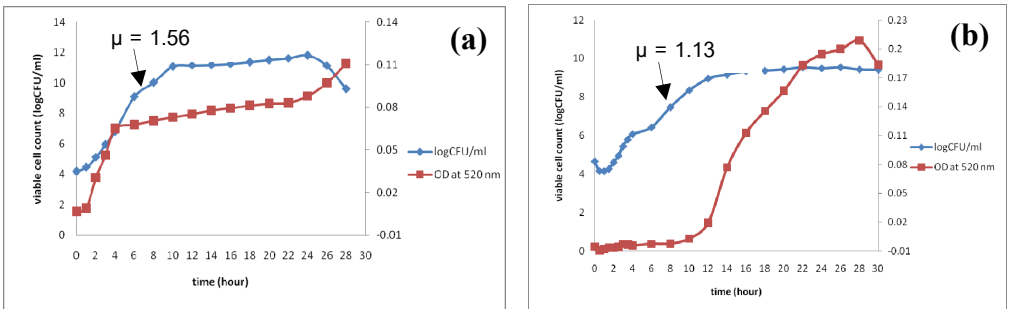


รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $FeCl_3$ กับ สารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ที่ละลายในน้ำกลั่น (- - - .), สารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ละลายใน nutrient broth (— —) ส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 (AHL positive) (·····) และส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 (AHL negative) (——)

3. ศึกษาสมบัติการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ

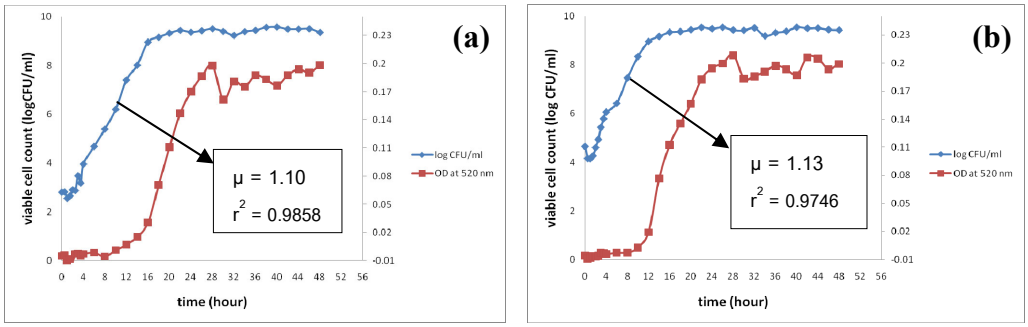
3.1 *V. parahaemolyticus* เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาวะที่มีเกลือ จึงมักพบการปนเปื้อนในอาหารทะเลอยู่เสมอ ตามมาตรฐานของ Bacteriological analytical manual online (BAM), USFDA, (May 2004) มีการใช้เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆในการแยก species ภายใน genus *Vibrio* และเกลือยังสามารถใช้แยกแบคทีเรียใน genus อื่นๆออกจากระบบได้ด้วย ด้วยเหตุนี้จึงประเมินสมบัติการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะที่มีเกลือโดยทำการทดลองเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร nutrient broth ซึ่งแบ่งเป็น 3 สภาวะ คือ ไม่เติมเกลือ, เติมเกลือ 6% และ 8% ตามลำดับ แล้วประเมินอัตราการเจริญในค่า specific growth rate (μ) และอัตราการสร้าง AHL ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 28 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3(a) และ 3(b) พบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญใน nutrient broth ที่ไม่เติมเกลือได้ดีที่สุด (1.56 generation/hr) และเจริญในสภาวะที่มีเกลือ 6% และ 8% ได้ต่ำกว่า มีค่า μ เท่ากับ 1.13 และ 0.13 ตามลำดับ เนื่องจากที่สภาวะเกลือ 8% อัตราการเจริญของเชื้อต่ำมาก ทำให้ AHL ที่สร้างมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมีได้ (ไม่แสดงผลการทดลอง) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับปริมาณ AHL ในแต่ละระบบ พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือจะสร้าง AHL ได้สูงกว่า เช่น ในสภาวะเกลือ 6% เมื่อเซลล์เจริญถึง 9.3 logCFU/ml จะสร้าง AHL (OD_{520} = 0.113) สูงกว่าค่า AHL

ที่สร้างจากจำนวนเซลล์ 9.7 logCFU/ml ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ (OD_{520} = 0.070) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าการมีเกลืออยู่ในระบบ น่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานสำหรับใช้อ้างอิงได้ว่าเกลือสามารถกระตุ้นการสร้าง AHL ได้จริง และจากผลการทดลองนี้จึงเลือกสภาวะที่มีเกลือ 6% ไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ และปริมาณ AHL โดยการประเมินด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ต่อไป

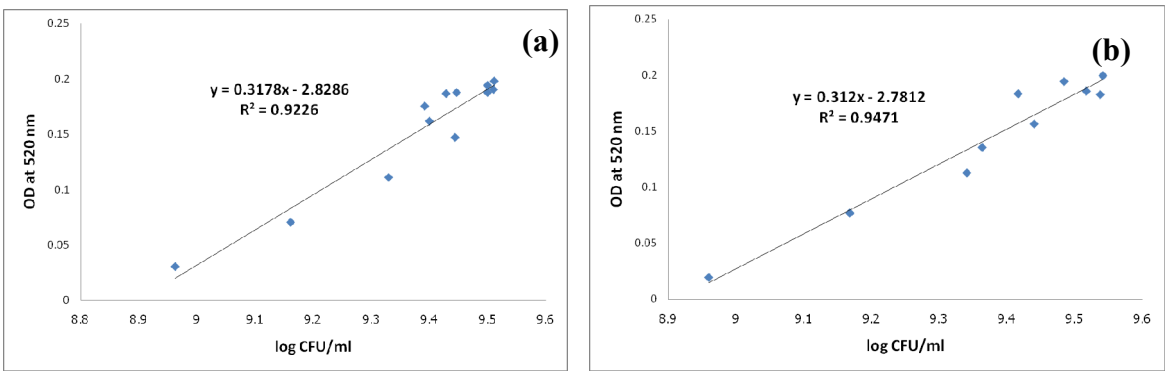


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากร (logCFU/ml) ปริมาณ AHL (OD_{520}) และเวลา (ชั่วโมง) ในสภาวะที่ไม่เติมเกลือ (a) และเติมเกลือ 6% (b)

3.2 ในการทดลองนี้ศึกษาอัตราการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 6% โดยแปรจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 2 logCFU/ml และ 4 logCFU/ml และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับการสร้าง AHL ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4(a) และ 4(b) พบว่าในระบบการเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างกัน *V. parahaemolyticus* จะยังคงมีอัตราการเจริญและการสร้าง AHL ไม่แตกต่างกัน โดยอัตราการเจริญในระบบที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml มีค่า μ เท่ากับ 1.10 ส่วนในระบบที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4 logCFU/ml มีค่า μ เท่ากับ 1.13 และยังพบว่าเมื่อเชื้อเจริญจนมีจำนวนเซลล์เท่ากัน ค่า AHL ที่ตรวจวัดได้ (OD_{520} = 0.1 ขึ้นไป) จะมีค่าไม่แตกต่างกัน เช่น เมื่อเชื้อในทั้งสองระบบเจริญจนมีจำนวนเซลล์มากถึง 9.3 logCFU/ml ค่า OD_{520} ที่วัดได้จะมีค่า 0.11 เท่ากัน และเมื่อประเมินค่าความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และการสร้าง AHL ของทั้งสองระบบ พบว่ามีความสัมพันธ์กันเป็นแบบเส้นตรงเหมือนกัน โดยมีค่า r^2 ที่ไม่แตกต่างกัน (0.9226 และ 0.9471) แสดงในรูปที่ 5(a) และ 5(b)



รูปที่ 4 อัตราการเจริญและการสร้างสัญญาณ AHL ที่ตรวจวัดด้วยวิธี colorimetry ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml (a) และ 4 logCFU/ml (b)



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับปริมาณ AHL (OD_{520}) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml (a) และ 4 logCFU/ml (b)

จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่า ปริมาณ AHL ที่เกิดขึ้นในระบบนั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ โดยจะต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เริ่มต้นและเวลาที่ใช้ในการเจริญจนมีจำนวนเซลล์มากถึงระดับที่สร้าง AHL ถึงปริมาณที่ตรวจวัดได้ (OD_{520} = 0.1 ขึ้นไป) ซึ่งอาจแสดงในค่าของ Detection time และข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* เชิงปริมาณในระบบอาหารต่อไปได้

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *V. parahaemolyticus* มีคุณสมบัติในการสร้าง AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate เกิดเป็นสารประกอบสีที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และจากผลการประเมินวิธี colorimetry ในการตรวจสอบ AHL ในคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* พบว่า สารประกอบสีที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะระหว่าง AHL กับ $FeCl_3$ และไม่มีการรบกวนจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนเมตาบอไลต์อื่นๆที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อประเมินสมบัติการสร้าง AHL ในเกลือความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาวะเกลือ 6% มีความเหมาะสมต่ออัตราการเจริญและอัตราการสร้าง AHL มากที่สุด และเมื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และปริมาณ AHL โดยแปรจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 2 logCFU/ml และ 4 logCFU/ml พบว่ามีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน (μ = 1.10 และ 1.13) และพบว่าจำนวนเซลล์และปริมาณ AHL ในช่วง log phase มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง มีค่า r^2 ไม่แตกต่างกัน (0.9226 และ 0.9471) และข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* เชิงปริมาณในระบบอาหารต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

Gobbetti, M., Angelis, M., Cagno, R., Minervini, F. and Limitone, A. 2007. Cell–cell communication in food related bacteria. International Journal of Food Microbiology. 120:34–45.

Henke, J.M., and Bassler, B.L., 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology. 186:3794–3805.

Walters, M. and Sperandio, V., 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. International Journal of Medical Microbiology. 296:125–131.

U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation Online. [cited 8 June 2009]. Available at http://www.fda.gov/CDER/guidance/4252fnl.htm.

US Food and Drug Administration (FDA). 2004. Bacteriological Analytical Manual Online.[cited 14 February 2009]. Available at http://www.cfsan.fda.gov/_ebam/ bam-toc.html.

Yang, Y.H., Lee, T.H., Kim, J.H., Kim, E.J., Joo, H.S., Lee, C.S. and Kim, B.G. 2006. High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications. Analytical Biochemistry. 356:297-299.