การพัฒนาวิธีการตรวจจุลินทรีย์ก่อโรค *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* โดยการตรวจสอบสัญญาณควอรัมเซนซิง

นางสาว รัชธิดา เดชอุดม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

DEVELOPMENT OF DETERMINATION METHODS FOR FOOD PATHOGEN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BY DETECTING QUORUM SENSING SIGNALS

Miss Rachatida Det-udom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Thesis Title	Development of determination methods for food pathogen *Vibrio parahaemolyticus* by detecting quorum sensing signals
By	Rachatida Det-udom
Field of Study	Food Technology
Thesis Advisor	Assistant Professor Cheunjit Prakitchaiwatthana, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Daris Kuakpetoon, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Assistant Professor Rommanee Sanguandeekul, PhD.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Cheunjit Prakitchaiwatthana, PhD.)

..... Thesis Co-advisor

(Daris Kuakpetoon, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Suwimon Keeratipibul, Ph.D.)

..... Member

(Kannika Duangmal, Ph.D.)

รัชธิดา เดชอุดม : การพัฒนาวิธีการตรวจจุลินทรีย์ก่อโรค *V.parahaemolyticus* โดยการตรวจสอบสัญญาณ ควอรัมเซนซิง. DEVELOPMEMT OF DETERMINATION METHODS FOR FOOD PATHOGEN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BY DETECTING QUORUM SENSING SIGNALS . ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร. ดริษ กวักเพชรัย 168 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *V.parahaemolyticus* โดยอาศัยคุณสมบัติในการสร้างสัญญาณ AHL การทดลองเริ่มจากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสัญญาณ AHL ด้วยวิธี colorimetry และประเมินประสิทธิภาพของวิธีตามหลักการพิสูจน์ความถูกต้อง (method validation) ของ USFDA guideline เมื่อประเมินวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้แก่ Procedure A ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบที่ประกอบด้วยขั้นตอนการสกัด AHL และการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีของ AHL ด้วย spectrophotometer (λ = 520 nm) และ Procedure B คือวิธีการตรวจสอบ AHL โดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด ผลการประเมินพบว่าประสิทธิภาพของทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากผลการประมวลผลทางสถิติของทุกพารามิเตอร์จากการพิสูจนความถูกต้อง พบว่า ทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการตรวจสอบ AHL ได้อย่างแม่นยำ เที่ยงตรง และมีความจำเพาะต่อ AHL และจากการประเมินความไว พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจสอบสัญญาณ AHL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ความเข้มข้นต่ำสุด 30 µM และสามารถใช้ตรวจวัดสัญญาณ AHL ที่สร้างจาก *V.parahaemolyticus* ใน NB ที่มีปริมาณเซลล์ต่ำสุดประมาณ 6 logCFU/ml อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาขั้นต่อไปได้เลือกใช้ Procedure B ในการตรวจสอบสัญญาณ AHL เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วมากกว่า

เมื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกต่อคุณสมบัติการสร้างสัญญาณ AHL ของ *V.parahaemolyticus* ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยวิธี colorimetry (Procedure B) และ HPLC ตามลำดับ ผลการทดลองชี้บ่งว่าสายพันธุ์และช่วงการเจริญของแบคทีเรีย รวมถึงภาวะการเลี้ยงได้แก่ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิไม่มีผลต่อการสร้างสัญญาณ AHL ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ แต่พบว่าปริมาณเกลือร้อยละ 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างสัญญาณ AHL ของ *V.parahaemolyticus* ให้เพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากกว่าภาวะการเลี้ยงอื่นๆ ถึงร้อยละ 28 แต่ปัจจัยนี้ไม่ส่งผลต่อการสร้างสัญญาณ AHL ในเชิงคุณภาพ ทำให้สามารถใช้ AHL ชนิด 3-hydroxy-C4-HSL เป็นตัวชี้บ่งลักษณะเฉพาะของ *V.parahaemolyticus* ได้

การทดลองขั้นตอนสุดท้าย คือการประยุกต์ใช้ Procedure B ร่วมกับการใช้ peptone water ที่มีเกลือร้อยละ 8 เป็น selective enrichment media สำหรับใช้ในการเลี้ยงและเหนี่ยวนำให้สร้าง AHL ในการตรวจสอบ *V.parahaemolyticus* และพบว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบ *V.parahaemolyticus* ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml ทั้งในภาวะที่มี *V.parahaemolyticus* เพียงชนิดเดียวและอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นได้ภายใน 20 ชั่วโมง ซึ่งถือเป็นวิธีทางเลือกแนวทางใหม่สำหรับใช้ในการตรวจสอบ *V.parahaemolyticus* อย่างง่ายและรวดเร็ว

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต.....รัชธิดา เดชอุดม.....
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2550	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4872430923: MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD: QUORUM SENSING / VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS / FOOD

RACHATIDA DET-UDOM : DEVELOPMENT OF DETERMINATION METHODS FOR FOOD PATHOGEN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BY DETECTING QUORUM SENSING. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHUENJIT J. PRAKITCHAIWATTANA, Ph. D., THESIS COADVISOR: DARIS KUAKPETOON, Ph. D., 168 pp.

This study aimed to develop the methods for *V.parahaemolyticus* determination based on its AHL production property. The first two experiments were the development of methods for AHL determination by colorimetry method, and evaluation of the method efficiency by validation following USFDA guideline. The methods including AHL extraction and determination of AHL coloring complex by spectrophotometry (λ_{max} = 520), called Procedure A, and determination of AHL existing in broth media without performing extraction step called Procedure B, were developed for AHL determination. The efficiency of both methods were not significantly different. Based on statistical analysis of validation parameters, both methods were accurate, precise and selective for AHL determination. Method sensitivity evaluation showed that, minimal AHL concentration could be detected by either procedure was 30 µM. These methods could detect AHL produced from *V.parahaemolyticus* cultured in NB containing minimal population approximately 6 logCFU/ml. However, the Procedure B was selected for the further works because it was more rapid and less laborious.

The influences of intrinsic and extrinsic factors on AHL production properties were investigated using colorimetry (Procedure B) and HPLC analysis. It was found that strains, cultivation times and cultivation conditions could not influence on both quality and quantity of AHL produced from *V.parahaemolyticus*. Interestingly, 8% NaCl in cultural media could induce *V.parahaemolyticus* to produce 28 folds larger amount of AHL than the other factors, whereas it had not influence on AHL quality. Therefore, AHL which was 3-hydroxy-C4-HSL could be one of the *V.parahaemolyticus* identity.

Finally, Procedure B and 8% NaCl peptone water as an enrichment selective media for growing *V.parahaemolyticus* and inducing its AHL production were investigated. It was found that this methodology could determine *V.parahaemolyticus* starting at 2 logCFU/ml within 20 hours both in single and co-cultured with other bacteria. Therefore, this new strategy could be an alternative for a simple and rapid identification of *V.parahaemolyticus*.

Department of Food technology Student's signature.....Rachatida Det-udom....

Field of study Food technology Advisor's signature.....

Academic year 2007 Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

First I would like to express my deepest appreciation and gratitude to Asst. Prof. Dr. Chuenjit Prakitchaiwattana and co-advisor Dr. Daris Kuakpetoon for their unfailing availability when ever problems arose during all the time of study which make work possible. Their wise guidance in the way of learning will always be grateful.

My appreciation is also passed to Asst. Prof. Dr. Rommanee Sanguandeekul, Assoc. Prof. Dr. Suwimon Keeratipibul, and Dr. Kannikar Duangmal serve as the thesis committee.

I would like to acknowledge Food microbiology laboratory unit, Department of Food technology, Faculty of Science for providing all instruments for my research.

Special thanks are also offered to Graduate school, Chulalongkorn University for the support of research fund.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my family for their encouragement, unlimited love, careness and support throughout my life.

CONTENT

chapter

chapter

chapter

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES