

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบอโตอินดิเคเตอร์ 2 ที่สร้างจาก *Salmonella* Typhimurium
โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี

นางสาวศิริลักษณ์ วัฒนวานิชกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF DETECTION METHOD OF AUTOINDUCER-2 PRODUCED FROM
Salmonella Typhimurium BASED ON CHEMICAL REACTION

Miss Siriluck Wattanavanitchakorn

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบอโตอินดิเคเตอร์ 2 ที่สร้างจาก
Salmonella Typhimurium โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี

โดย

นางสาวศิริลักษณ์ วัฒนวานิชกร

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณิตา ธรรมมงคลกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณิตา ธรรมมงคลกิจ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นสพ. ดร. ศุภชัย เนื้อนวนลสุวรรณ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ธัญญารัตน์ พงศ์ทรงกูร)

ศิริลักษณ์ วัฒนวานิชกร : การพัฒนาวิธีการตรวจสอบอโตอินดิวเซอร์ 2 ที่สร้างจาก *Salmonella Typhimurium* โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี (DEVELOPMENT OF DETECTION METHOD OF AUTOINDUCER-2 PRODUCED FROM *Salmonella Typhimurium* BASED ON CHEMICAL REACTION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.พัชณิตา ธรรมยงค์กิจ, 104 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการตรวจสอบสัญญาณ AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* อย่างง่าย โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี เริ่มต้นจากการพิสูจน์การสร้าง AI-2 ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง โดยตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้างและไม่สร้าง AI-2 โดยวิธี $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ *S. Typhimurium* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้าง AI-2 มีความคล้ายคลึงกันแต่แตกต่างกับสเปกตรัมของ *Sinorhizobium meliloti* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้าง AI-2 และเมื่อทดสอบด้วยวิธีทางชีวภาพพบว่าสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้าง AI-2 นั้นเห็นยวนำการเรืองแสงของ *Vibrio harveyi* BAA-1117 ในขณะที่สารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ไม่สร้าง AI-2 นั้นไม่เห็นยวนำการเรืองแสง ซึ่งบ่งชี้ว่าในสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้าง AI-2 มี AI-2 ละลายอยู่ เมื่อประเมินการตรวจสอบสัญญาณ AI-2 ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นด้วยการทำปฏิกิริยาเคมี พบว่าการทำปฏิกิริยา metal ion reduction โดยใช้ Fe(III)-1,10-phenanthroline พบว่าสารนี้จะทำปฏิกิริยากับสารในสารชะโคโลนี และสารในคัลเจอร์ของจุลินทรีย์ที่สร้าง AI-2 จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบสีที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร ในขณะที่สารชะโคโลนีและคัลเจอร์ของ *S. meliloti* ไม่มีผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติการดูดกลืนแสงดังกล่าว จึงใช้ปฏิกิริยานี้มาประเมินใช้ในการตรวจสอบ AI-2 ที่สร้างจากแบคทีเรียเพื่อพัฒนาเป็นวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีในการทดลองต่อไป เมื่อตรวจสอบสมบัติการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดในค่า OD₅₁₀ ของ *S. Typhimurium* จำนวน 4 สายพันธุ์ รวมทั้ง *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* และ *V. parahaemolyticus* อย่างละ 1 สายพันธุ์ ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี พบว่ามีความสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ นอกจากนี้ผลการศึกษายังบ่งชี้ว่าองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและเมทาบอไลต์อื่นๆไม่รบกวนปฏิกิริยา metal ion reduction ในระบบที่ทดสอบ จึงยืนยันได้ว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นนั้นน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง Fe(III)-1,10-phenanthroline กับ AI-2 ดังนั้นจึงนำวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* เปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า และวิธีทางชีวภาพ พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า และวิธีทางชีวภาพ เมื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ระหว่าง AI-2 กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ *S. Typhimurium* พบว่า AI-2 (OD₅₁₀) ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างฟิล์มชีวภาพและการเหนี่ยวนำการเจริญ ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรกับปริมาณการสร้าง AI-2 ทั้งในระบบอาหารเหนี่ยวนำการสร้าง AI-2 และ selective medium ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่า *S. Typhimurium* ทุกสายพันธุ์จะสร้าง AI-2 (OD₅₁₀) สูงสุดตามจำนวนประชากรสูงสุดที่มีอยู่ในระบบ และเวลาที่ตรวจพบ AI-2 (OD₅₁₀) สูงสุดจะขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* แต่ละสายพันธุ์

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ปีการศึกษา..... 2552.....

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072488923 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : AUTOINDUCER-2 / QUORUM SENSING / *S. Typhimurium*

SIRILUCK WATTANAVANITCHAKORN : DEVELOPMENT OF DETECTION
METHOD OF AUTOINDUCER-2 PRODUCED FROM *Salmonella* Typhimurium
BASED ON CHEMICAL REACTION. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. CHEUNJIT
PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. PATCHANITA
THAMYONGKIT, Ph.D., 104 pp.

This study aimed to evaluate a simple method for quantitative detection of AI-2 produced from *S. Typhimurium* based on chemical reaction. AI-2 produced from bacteria used in this study was determined by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and bioluminescence assay. The $^1\text{H-NMR}$ spectra of colony rinses of *S. Typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus*, AI-2 producing bacteria were similar but differed from the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of *Sinorhizobium meliloti*, non-AI-2 producing bacteria. With bioluminescence assay, the colony rinses of the *S. Typhimurium* and *V. parahaemolyticus* could also induce luminescence of *Vibrio harveyi* reporter strain BAA-1117 whereas colony rinses of non-producing bacteria could not induce the luminescence. This demonstrated that the colony rinses of AI-2 produced strains contained AI-2. When the determination of AI-2 produced from bacteria by chemical reaction was evaluated, metal ion reduction using Fe(III)-1,10-phenanthroline as reagent could react with substance in colony rinses and culture of AI-2 producing bacteria forming the coloring complex ($\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$). With the reaction in colony rinses and culture of non-AI-2 produced bacteria, there were no coloring complex observed. Therefore, this reaction was evaluated to detection of bacterial AI-2 in order to further develop as spectrophotometric method. When the AI-2 producing property of four strains of *S. Typhimurium* and one strains of *E. coli*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* and *S'bium. meliloti* were determined by spectrophotometric method expressed as OD_{510} value, the results were consistent to the bioluminescence determination. In addition, the result indicated that the other reducing agents possibly existing in the cultivation system, such as composition and the other metabolites from bacterial growth, did not significantly interfere the reduction of Fe(III)-1,10-phenanthroline. This demonstrated that the reduction of Fe(III)-1,10-phenanthroline in colony rinses and cultures was mainly caused by AI-2. Therefore, The spectrophotometric method was then applied to study of factors of AI-2 producing property of *S. Typhimurium* comparing to previous studies and bioluminescence assay. The results obtained from spectrophotometric method were consistent to previous research and bioassay. The relation between AI-2 (OD_{510}) and the expression of phenotype in *S. Typhimurium* was additionally studied. It demonstrated that AI-2 producing property neither associate with biofilm formation nor influence on the growth rate of *S. Typhimurium*. The relation of the cell population and the concentration of AI-2 produced from *S. Typhimurium* cultured in AI-2 –induced medium and selective medium was also studied. The results showed that maximal AI-2 (OD_{510}) produced could determine the maximal cell population in the system of all *S. Typhimurium* strains and detection time of miximal AI-2 value (OD_{510}) depended on the growth rate of *S. Typhimurium*.

Department : Food Technology

Student's Signature

Field of Study : Food Technology

Advisor's Signature

Academic Year : 2009

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณิดา ธรรมยงค์กิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รณณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นสพ.ดร. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ และอาจารย์ ดร.ธัญญารัตน์ พงศ์ทรงกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และทุน 90 ปี จุฬากองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (MAG-WII) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.สุวิทย์ ล้อประเสริฐ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Sinorhizobium meliloti* เพื่อมาใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง microplate reader

ขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ชาย ที่ได้ให้กำลังใจ และความห่วงใยพร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 ควอรัมเซนซิง.....	3
2.1.1 กลไกการทำงานของควอรัมเซนซิง.....	3
2.1.2 ประเภทของควอรัมเซนซิง.....	4
2.2 ควอรัมเซนซิงประเภท Autoinducer-2 (AI-2).....	8
2.2.1 กลไกการสร้าง AI-2.....	8
2.2.2 วิธีการตรวจสอบ AI-2.....	11
2.3 การสร้างสัญญาณ AI-2 ของ S. Typhimurium.....	15
2.4 งานวิจัยเกี่ยวกับ AI-2 กับด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์.....	16
2.5 งานวิจัยเกี่ยวกับ AI-2 กับความปลอดภัยทางอาหาร.....	17
2.6 ความสำคัญของ Salmonella และวิธีการตรวจสอบ.....	17
2.6.1 วิธีการตรวจสอบ Salmonella.....	18
3 การดำเนินงานวิจัย.....	24
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	80
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	90
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์.....	91
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี.....	94

บทที่	หน้า
ภาคผนวก ค วิธีเตรียมสารเคมี.....	96
ภาคผนวก ง วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	97
ภาคผนวก จ สเปกตรัมของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่ละลายอยู่ใน สารอะโคโดนี หรือคัลเจอร์กับ Fe(III)-1,10-phenanthroline.....	99
ภาคผนวก ง แหล่งที่มาของ S. Typhimurium	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ควอรัมเซนซิง.....	7
2.2	แบคทีเรียที่มียีนส์ <i>luxS</i>	9
2.3	การควบคุมพฤติกรรมกรรมการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ LuxS/AI-2.....	10
3.1	สารที่ใช้ในการตรวจสอบการแทรกแซงปฏิกริยากับ สารละลาย Fe(III)-1,10-phenanthroline.....	31
3.2	สภาวะการเพาะเลี้ยง <i>S. Typhimurium</i>	33
3.3	การเติม AI-2 จากแบคทีเรียในรูปแบบของสารชะโคโลนี และคัลเจอร์.....	34
4.1	การตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	40
4.2	การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย $KMnO_4$ ความเข้มข้น 0.01M จากการทำปฏิกริยากับตัวอย่างต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1.....	42
4.3	การตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้าง และไม่สร้าง AI-2 ด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	51
4.4	การตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์วิธีทางชีวภาพ	54
4.5	เมทาโบไลต์ที่ขับออกมานอกเซลล์ในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์.....	55
4.6	ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{510}) ของสารหลังจากทำปฏิกริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline.....	56
4.7	สมบัติการสร้าง AI-2 จากสารชะโคโลนีของ <i>S. Typhimurium</i> 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีทางชีวภาพเปรียบเทียบกับวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี.....	60
4.8	การสร้าง AI-2 จากคัลเจอร์ของ <i>S. Typhimurium</i> 4 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกันที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี.....	62
4.9	การสร้าง AI-2 จากคัลเจอร์ของ <i>S. Typhimurium</i> 4 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเปปโตน 1% ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างกันที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี	63
4.10	การสร้าง AI-2 จากคัลเจอร์ของ <i>S. Typhimurium</i> 4 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเปปโตน 1% ที่ความเข้มข้นเกลือต่างกันที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี.....	64
4.11	การเปรียบเทียบปริมาณการสร้างฟิล์มชีวภาพ และปริมาณการสร้าง AI-2 ที่ตรวจสอบด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี ของ <i>S. Typhimurium</i> 4 สายพันธุ์...	66
4.12	ความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มาของ <i>S. Typhimurium</i> 4 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลองกับปริมาณการสร้าง AI-2 บ่งชี้ในค่าของ OD_{510} ที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี.....	73

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	5
2.2	6
2.3	7
2.4	11
2.5	12
2.6	13
2.7	16
2.8	19
4.1	36
4.2	37
4.3	38
4.4	39
4.5	43
4.6	44
4.7	44
4.8	45

ภาพที่	ฎ หน้า
4.9	โครงสร้างทางเคมีของ Al-2 (A) Ascorbic acid (B)..... 47
4.10	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction โดย Fe(III)-1,10-phenanthroline (A1) และสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ascorbic acid และ Fe(III)-1,10-phenanthroline (A2)... 47
4.11	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction โดย Fe(III)-1,10-phenanthroline (A1) สารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารชะโคโลนีของ <i>S. Typhimurium</i> และ Fe(III)-1,10-phenanthroline (A2) และสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ascorbic acid และ Fe(III)-1,10-phenanthroline (A3)..... 48
4.12	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ตรวจสอบ Al-2 ในสารชะโคโลนีของ <i>V. parahaemolyticus</i> (A1) , <i>S. aureus</i> (A2), <i>S. Typhimurium</i> (A3), <i>E. coli</i> (A4) และ <i>S'biium. meliloti</i> (A5) ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี..... 50
4.13	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction อาหารเปปโตน 1% (A1) และของ Ascorbic acid (A2)..... 52
4.14	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction คัลเจอร์ของ <i>S. Typhimurium</i> (A1) และ <i>S'biium. meliloti</i> (A2)..... 53
4.15	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญกับการสร้าง Al-2 ของ <i>S. Typhimurium</i> DMST 28914 ที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี..... 58
4.16	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction ของสารชะโคโลนีของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 (A1), <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 (A2), <i>S. Typhimurium</i> DMST 28913 (A3) และ <i>S. Typhimurium</i> DMST 28914 (A4)..... 59
4.17	อัตราการเจริญของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 ที่เติมสารชะโคโลนีของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 (A) เติมคัลเจอร์ของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 (B)..... 68
4.18	อัตราการเจริญของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 ที่เติมสารชะโคโลนีของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 (A) เติมคัลเจอร์ของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 (B)..... 69
4.19	อัตราการเจริญของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 ที่เติมสารชะโคโลนีของ <i>E. coli</i> ATCC 4212 (A) เติมคัลเจอร์ของ <i>E. coli</i> ATCC 4212 (B)..... 71

ภาพที่	ฎ หน้า	
4.20	อัตราการใช้ของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 ที่เติมสารชะโคโคไลน์ของ <i>E. coli</i> ATCC 4212 (A) เติมหักเจอร์ของ <i>E. coli</i> ATCC 4212 (B).....	72
4.21	ผลการประเมินความจำเพาะของระบบ selective medium	75
4.22	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/mL) กับค่า OD ₅₁₀ ของ <i>S. Typhimurium</i> DMST 28914 ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml.....	76
4.23	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/mL) กับค่า OD ₅₁₀ ของ <i>S. Typhimurium</i> DMST 28914 ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4 logCFU/ml.....	77
4.24	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับค่า OD ₅₁₀ ของ <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml.....	78

บทที่ 1

บทนำ

Salmonella เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีรายงานว่าเป็นสาเหตุอันดับต้นของโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne salmonellosis) โดยพบว่า *S. Typhi* และ *S. Paratyphi* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) และ ไข้พาราไทฟอยด์ (paratyphoid fever) (Riemann และ Cliver, 2005) และ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคอาหารเป็นพิษ (Bibek, 2004) ซึ่งส่วนใหญ่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ ผลิตภัณฑ์นม (USFDA, 2008) จากปัญหาความรุนแรงในการก่อโรคของ *Salmonella* ดังกล่าวจึงทำให้มีงานวิจัยจำนวนมากพยายามที่จะศึกษาบทบาทของ *Salmonella* ในด้านต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาไปสู่งานวิจัยในด้านความปลอดภัยของอาหาร อันได้แก่ การป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร การสร้างสารต้านจุลินทรีย์ หรือแม้กระทั่งการพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีความน่าเชื่อถือ และรวดเร็ว รวมทั้งงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มุ่งเน้นการศึกษากลไกการเจริญ และการก่อโรคของจุลินทรีย์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตยาปฏิชีวนะ

ในช่วง 50 ปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบระบบการสื่อสารระหว่างเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เรียกกันว่า “ควอรัมเซนซิง” โดยการสร้างสัญญาณทางเคมีขนาดเล็กที่เรียกว่า “Autoinducer” ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดสร้างสัญญาณทางเคมีที่แตกต่างกันไป และที่สำคัญคือ ปริมาณของสัญญาณทางเคมีที่ถูกปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์ ต่อมา มีรายงานการค้นพบควอรัมเซนซิงชนิดใหม่ คือ Autoinducer-2 (AI-2) หรือ (2S, 4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate (S-THMF-borate) ใน *V. fisheri* ซึ่งในเวลาต่อมาพบว่า *S. Typhimurium* เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสัญญาณทางเคมีควอรัมเซนซิงประเภท AI-2 หรือ (2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (R-THMF) (Miller และคณะ, 2004) และมีรายงานวิจัยจำนวนมากมายกย่องว่า AI-2 อาจมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ที่สำคัญของแบคทีเรีย ได้แก่ การเรืองแสงชีวภาพ การการสร้างฟิล์มชีวภาพ การก่อโรค การแบ่งเซลล์ การสร้างสารพิษ เป็นต้น ทำให้มีนักวิจัยบางส่วนพยายามศึกษากลไกในการสร้าง AI-2 และหาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการสร้าง AI-2 กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่างๆของแบคทีเรีย เพื่อเป็นข้อมูลในงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการรักษา และป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งการผลิตยารักษาโรค รวมทั้งการศึกษาในงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การอาหาร เพื่อหาแนวทางป้องกันการปนเปื้อนในระบบการผลิตอาหาร เช่น ป้องกันการเกิดฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวของอุปกรณ์ที่สัมผัสอาหารในโรงงานอุตสาหกรรม หรือการผลิตสารไปยับยั้งกระบวนการ

สร้างควอรัมเซนซิงของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่ง *S. Typhimurium* เป็นหนึ่งในต้นแบบ การศึกษาดังกล่าว อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อสรุปชัดเจนว่า AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของฟีนไทป์อย่างไร ซึ่งส่วนหนึ่งของความไม่ชัดเจนอาจมาจากข้อจำกัด ในเรื่องของวิธีการตรวจสอบ AI-2 ซึ่งเป็นเครื่องมือหลักในการดำเนินการวิจัยด้านนี้ ซึ่งจนถึงปัจจุบัน มีเพียงวิธีการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioluminescence assay) นอกจากนี้จะเป็นวิธีที่ ซับซ้อนยังเป็นเพียงวิธีการทดสอบเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative determination) และมีข้อจำกัด บางประการที่ทำให้มีโอกาสเกิดผลบวกหลงได้ง่าย หากสามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์ AI-2 ที่จุลินทรีย์ สร้างขึ้นได้ในเชิงปริมาณ อย่างง่าย จะช่วยให้มีเครื่องมือในการดำเนินงานวิจัยเหล่านี้ในเชิงลึกทำ ได้ง่ายขึ้น ซึ่งจะทำได้ข้อมูลที่จะนำไปสู่การพัฒนางานด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และความ ปลอดภัยทางอาหารต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่ สร้างจากแบคทีเรียอย่างง่าย ด้วยการทำปฏิกิริยาเคมีให้เกิดสารประกอบสีที่ตรวจวัดเชิงปริมาณ ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยใช้ *S. Typhimurium* เป็นตัวแทนในการประเมิน

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 ควอรัมเซนซิง

ในช่วง 300 ปีที่ผ่านมา นับตั้งแต่ที่มีการให้คำจำกัดความถึงจุลินทรีย์โดย van Leeuwenhoek ว่า แบคทีเรียนั้นไม่มีการสื่อสารกันระหว่างเซลล์ข้างเคียงในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ แต่เมื่อปี 1960 ได้มีการค้นพบ "ควอรัมเซนซิง" ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันว่า แบคทีเรียมีระบบการสื่อสารโดยใช้การส่งและรับสารเคมี (Bassler และ Losick, 2006)

2.1.1 กลไกการทำงานของควอรัมเซนซิง

กลไกการทำงานของควอรัมเซนซิงของแบคทีเรีย เริ่มจากการสร้างสัญญาณทางเคมีขนาดเล็ก หรือ Autoinducer ซึ่งบางครั้งเรียกว่า bacterial pheromones แล้วขับออกนอกเซลล์ เพื่อปลดปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อม โดยจุลินทรีย์ที่มีการสื่อสารในระบบเดียวกันจะรับสัญญาณทางเคมีนี้เข้ามาในเซลล์ เมื่อมีการสะสมจนถึงระดับ threshold level ประชากรจุลินทรีย์จะร่วมกันดำเนินกิจกรรม เช่น การสร้างสารเรืองแสงชีวภาพ (bioluminescence) การสร้างสารพิษ หรือการสร้างฟิล์มชีวภาพ (biofilm) เป็นต้น (Redfield, 2002; Winzer และคณะ, 2003; Williams, 2006) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสัญญาณทางเคมีที่ถูกปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมกับความเข้มข้นของเซลล์ เนื่องจากการสร้าง และปลดปล่อยสัญญาณทางเคมีของจุลินทรีย์ ในการกระตุ้นการสื่อสารระหว่างเซลล์นั้นทำให้เซลล์เดี่ยวได้รับรู้ข่าวสาร หรือ คาดคะเนความหนาแน่นของประชากรในสิ่งแวดล้อมจากอัตราการแพร่ผ่านของสัญญาณทางเคมี (Surette, และ Bassler, 1999; Winzer และคณะ, 2003) กลไกการควบคุมควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Podbielski และ Kreikemeyer, 2004) ดังต่อไปนี้

- ก) การผลิตควอรัมเซนซิง สัญญาณทางเคมีที่ถูกสร้างจากยีนส์จำเพาะจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อออกสู่สิ่งแวดล้อม บางส่วนจะเชื่อมติดกับพื้นผิวของเซลล์
- ข) การสะสมควอรัมเซนซิง การสะสมควอรัมเซนซิงเกิดขึ้นเนื่องจากการสร้างสัญญาณทางเคมีด้วยอัตราคงที่ นอกจากนี้ช่องว่างระหว่างแบคทีเรียและ

สัญญาณทางเคมีลดลง หรือโครงสร้างที่ซึมผ่านไม่ได้ลดลง ทำให้ความเข้มข้นของสัญญาณทางเคมีเพิ่ม

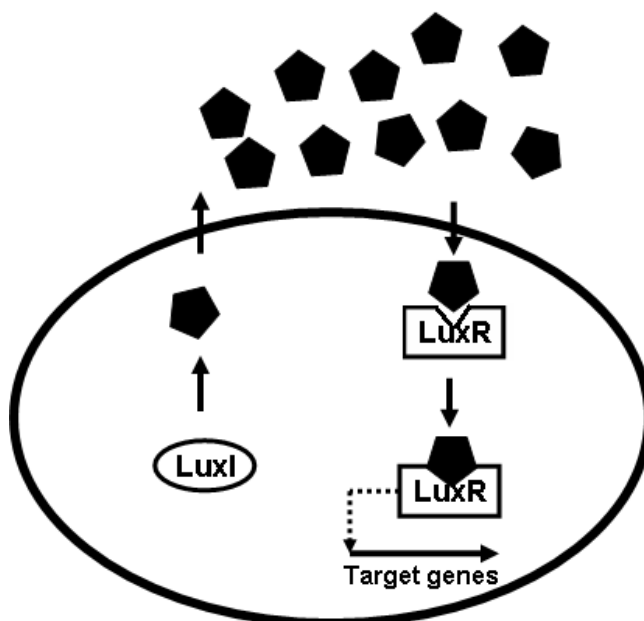
- ค) การรับสัญญาณควอรัมเซนซิง แบคทีเรียจะรับรู้สัญญาณจากภายนอกเซลล์ ซึ่งสัญญาณดังกล่าวจะเคลื่อนที่จากสิ่งแวดล้อมเข้ามาภายในเซลล์ด้วย 2 กลไก สัญญาณที่มีขนาดเล็กจะแพร่ผ่านเข้ามาภายในเซลล์ ส่วนสัญญาณที่มีขนาดใหญ่จะเข้ามาในเซลล์โดย active transport บางกรณีการรับสัญญาณจะเกิดขึ้นที่บริเวณพื้นผิวเซลล์โดยมีทรานส์เมมเบรนเป็นตัวรับสัญญาณ การรับสัญญาณของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นเมื่อสัญญาณถูกผลิตขึ้นมา แต่การควบคุมยีนส์จำเพาะจะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสัญญาณมาถึงระดับที่เป็น threshold level

2.1.2 ประเภทของควอรัมเซนซิง

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสร้างจะสัญญาณทางเคมีแตกต่างกันไป ได้มีการจำแนกระบบการสื่อสารระหว่างเซลล์ออกเป็น 3 ประเภท (Bassler, 2002) ได้แก่

- ก) ควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบ

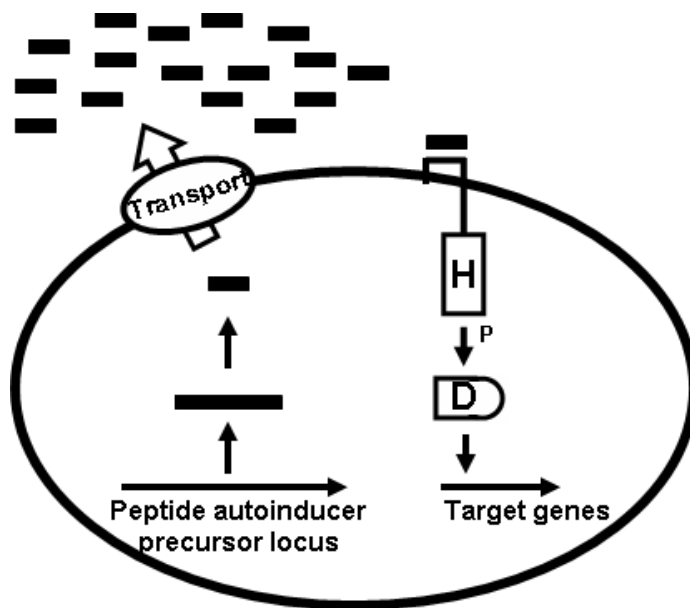
จากรูปที่ 2.1 ระบบการสื่อสารแบบนี้มีตัวส่งสัญญาณคือ acylated homoserine lactone (AHL) (ตารางที่ 2.1) สร้างขึ้นโดยเอนไซม์ LuxI กลไกการทำงานคือ ตัวส่งสัญญาณจะถูกส่งเข้า และออกเซลล์โดยผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะถูกสะสมอยู่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์โดยแปรผันตามปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย และเมื่อมีการสะสมจนกระทั่ง AHL มีความเข้มข้นถึงระดับ threshold level โปรตีน LuxR ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจะเชื่อมต่อกับ AHL เป็น LuxR-AHL complex จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวจะไปเชื่อมต่อกับ promoter ของยีนส์เป้าหมายที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างควอรัมเซนซิง เพื่อกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) พบว่า AHLเป็นควอรัมเซนซิงประเภทแรกที่มีการรายงานว่าเป็นสัญญาณที่ใช้ในการสื่อสารภายในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีแบคทีเรียแกรมลบมากกว่า 50 สายพันธุ์สร้างสัญญาณทางเคมีประเภท AHL ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะสร้าง AHL แตกต่างกันในส่วนของสายโซ่ acyl และโปรตีน LuxR ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจะจำเพาะกับ AHL



รูปที่ 2.1 กลไกการสื่อสารของควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบ
ที่มา : Bassler (2002)

ข) ควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวก

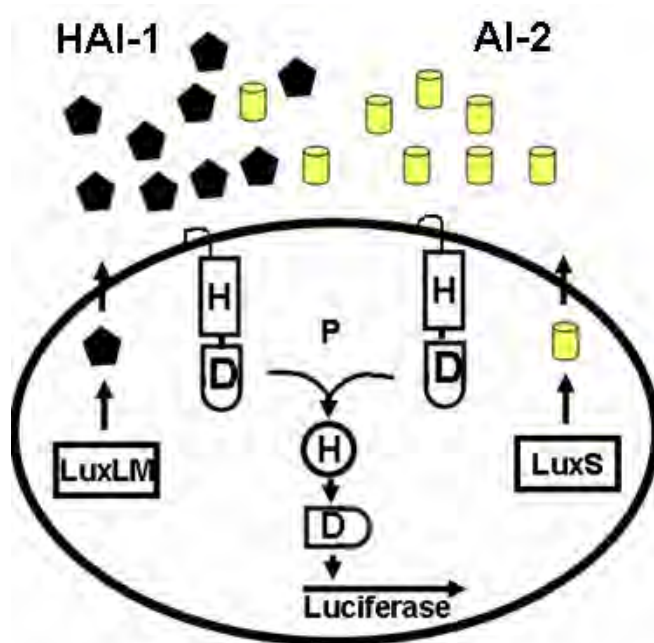
จากรูปที่ 2.2 ระบบการสื่อสารแบบนี้มีตัวส่งสัญญาณคือ modified peptides (ตารางที่ 2.1) พบในแบคทีเรียแกรมบวก โดยจะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ไปเชื่อมต่อกับโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่บริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์รับสัญญาณ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการ transduction โดย phosphorylation cascade ทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนเชื่อมโยงกับ DNA เพื่อควบคุมการถอดรหัสยีนส์เป้าหมาย ควอรัมเซนซิงระบบนี้มีความจำเพาะสูง ควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวกนี้คล้ายคลึงกับควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากควอรัมเซนซิงที่มีรูปแบบหลากหลาย



รูปที่ 2.2 กลไกการสื่อสารของควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวก
ที่มา : Bassler (2002)

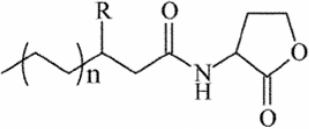
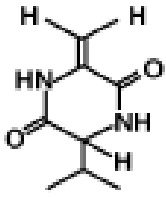
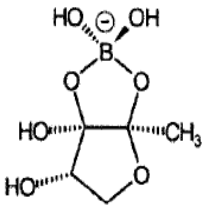
ค) ควอรัมเซนซิงของ *V. harveyi*

จากรูปที่ 2.3 ควอรัมเซนซิงระบบสุดท้ายนี้เป็นของ marine bacterium ชนิด *V. harveyi* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสารเรืองแสงชีวภาพ ซึ่งการเรืองแสงชีวภาพนั้นคือ แสงที่ถูกสร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตจากปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ luciferase ไปเร่งการเกิดออกซิเดชันของ luciferin ให้กลายเป็น oxyluciferin ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดแสงขึ้น (Lansing และคณะ, 1999) ควอรัมเซนซิงนี้มีระบบการสื่อสาร 2 ระบบ โดยระบบที่ 1 มีตัวส่งสัญญาณ คือ AI-1 เป็นสารประเภท N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone ซึ่งเป็นตัวส่งสัญญาณที่คล้ายคลึงกับ AHL ของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่ได้สร้างโดย เอนไซม์ LuxI และระบบที่ 2 มีตัวส่งสัญญาณ คือ AI-2 เป็นสารประเภท furanosyl borate diester (ตารางที่ 2.1) โดยจะเชื่อมต่อกับโปรตีน LuxP ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ (Bassler, 2002) โดยที่ระบบ AI-1 นั้นมีความจำเพาะสูง จึงถูกใช้เป็นระบบการสื่อสารภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecies communication) ในขณะที่ AI-2 นั้นเป็นระบบที่มีความจำเพาะน้อยกว่า และพบว่ามีการสื่อสารนี้ในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ จึงมีข้อสันนิษฐานว่าเป็นระบบที่ใช้ในการสื่อสารของแบคทีเรียข้ามสายพันธุ์ (interspecies communication) (Winzer และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.3 กลไกการสื่อสารของควอรัมเซนซิงของ *V. harveyi*
ที่มา : Bassler (2002)

ตารางที่ 2.1 ควอรัมเซนซิง

ประเภท	AHL	Cyclic dipeptides Oligopeptides	AI-2
โครงสร้าง			
แบคทีเรีย	แกรมลบ	แกรมบวก	แกรมลบ แกรมบวก
กลไก	การแพร่	Active transport	Active transport
ตำแหน่งรับ สัญญาณ	intracellular	extra/intracellular	Extra/intracellular

ที่มา : Podbielski และ Kreikermeier (2004)

2.2 ควอรัมเซนซิงประเภท Autoinducer-2 (AI-2)

การค้นพบควอรัมเซนซิง 2 ระบบครั้งแรกใน *V. harveyi* และ *V. fischeri* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเรืองแสงชีวภาพ (Bioluminescence) คือ Autoinducer-1 (AI-1) เป็นระบบที่มีความจำเพาะสูง ประกอบด้วยตัวรับสัญญาณ 1 และ AI-1 และ Autoinducer-2 (AI-2) เป็นระบบที่มีความจำเพาะน้อยกว่าประกอบด้วยตัวรับสัญญาณ 2 และ AI-2 พบว่ามีแบคทีเรียแกรมลบจำนวนมากที่มีระบบควอรัมเซนซิงคล้ายคลึงกับ *V. harveyi*

ระบบ AI-2 นั้นมีความเกี่ยวข้องกับยีน *luxS* เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อระบบการผลิตสัญญาณประเภท AI-2 และมีรายงานว่า AI-2 พบในแบคทีเรียมากกว่า 25 สายพันธุ์ จึงมีข้อสันนิษฐานว่า AI-2 ใช้ในการสื่อสารระหว่างสายพันธุ์ (interspecies) (Cloak และคณะ, 2002) โดยแบคทีเรียที่มีรายงานการสร้าง AI-2 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 และควอรัมเซนซิงประเภท AI-2 ที่พบในแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมีหน้าที่ในการควบคุมพฤติกรรม หรือการแสดงออกทางฟีโนไทป์แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3

2.2.1 กลไกการสร้าง AI-2

กลไกการสร้าง AI-2 (The activated methyl cycle) นั้นเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ 3 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Winzer และคณะ, 2003) คือ

ก. การเปลี่ยน SAM ไปเป็น SAH

ขั้นตอนแรกเริ่มต้นจากการเปลี่ยน S-adenosyl-L-methionine (SAM) เป็น S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) โดย SAM จะทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เมทิลด้วยปฏิกิริยา SAM-dependent methyltransferase

ข. การเปลี่ยน SAH ไปเป็น SRH

ขั้นตอนที่สองเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase หรือเรียกว่า Pfs เนื่องจากถูกสร้างมาจากยีน *pfs* ไปทำลายพันธะไกลโคซิดิก เปลี่ยนจาก SAH ซึ่งทำหน้าที่เป็นสับสเตรท เกิดเป็น adenine และ S-ribosyl-L-homocystein (SRH)

ค. การเปลี่ยน SRH ไปเป็น DPD

ขั้นตอนสุดท้ายเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ LuxS โดย SRH จะทำหน้าที่เป็นสับสเตรท เกิดเป็น homocystein และ AI-2

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่มียีนส์ *luxS*

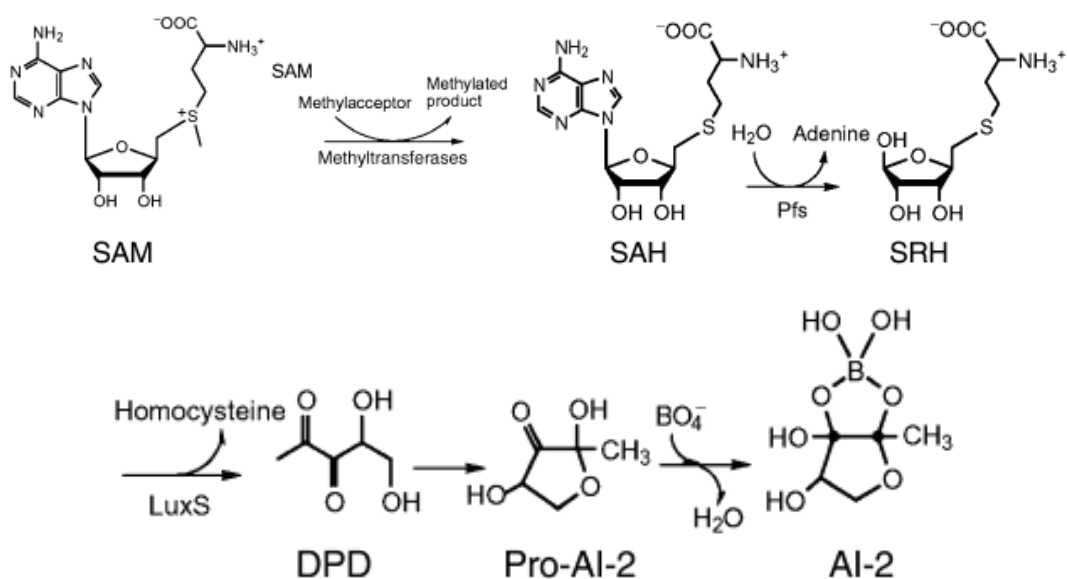
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium acetobolyticum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria meningitides</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>		

ที่มา : Federle และ Bassler (2003)

ตารางที่ 2.3 การควบคุมพฤติกรรมการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ LuxS/AI-2

แบคทีเรีย	การควบคุมการแสดงออกทางฟีโนไทป์
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Virulence, iron acquisition
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Pleiotropic protein expression
<i>Campylobacter jejuni</i>	Motility
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxin production
<i>Escherichia coli</i>	W3110 Cell division, motility, metabolism
<i>Escherichia coli</i> , EHEC and EPEC	Virulence, type III secretion
<i>Neisseria meningitidis</i>	Bacteremic infection
<i>Photobacterium luminescens</i>	Antibiotic production (carbapenem)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Biofilm formation, heme acquisition, protease production
<i>Salmonella typhi</i>	Biofilm formation
<i>Salmonella typhimurium</i>	ABC transporter expression
<i>Shigella flexneri</i>	Transcription factor associated with virulence
<i>Streptococcus mutans</i>	Biofilm formation
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virulence factor expression
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Virulence factor expression
<i>Vibrio cholerae</i>	Luminescence, protease production, type III secretion, colony morphology
<i>Vibrio harveyi</i>	siderophore production
<i>Vibrio vulnificus</i>	Virulence

ที่มา : Federle และ Bassler (2003)



รูปที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์ Autoinducer-2 ทางชีวภาพ

ที่มา : Federle และ Bassler (2003)

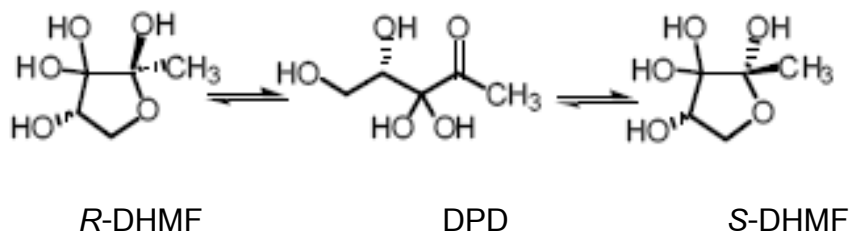
AI-2 ถูกสะสมในระหว่างการเจริญ และในบางกรณีจะถูกเคลื่อนย้ายออกนอกเซลล์ในภายหลัง อย่างไรก็ตามการยังไม่มีรายงานอธิบายชัดเจนถึงการควบคุมกลไกการทำงานของ Pfs/LuxS รวมถึงพารามิเตอร์ที่ควบคุมการนำเข้าเซลล์ และส่งออกนอกเซลล์ของ AI-2

2.2.2 วิธีการตรวจสอบ AI-2

ก) วิธีทางสเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$)

จนถึงปัจจุบันยังไม่สามารถตรวจสอบ AI-2, DPD หรือ สารประกอบอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ AI-2 ได้ แม้กระทั่งการใช้วิธีด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry(LC-MS) Gas Chromatography-Mass Spectrometry(LC-MS) Nuclear Magnetic Resonance(NMR) เป็นต้น เนื่องจาก AI-2 เป็นสารชีวภาพที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่มีความเป็นขั้วสูง ละลายน้ำได้ดี โครงสร้างไม่เสถียร ทำให้มีข้อจำกัดในการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการสกัด (Thiel และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตาม Keersmaecker และคณะ (2005) ได้สังเคราะห์ (S)-4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedion (DPD) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ AI-2 แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

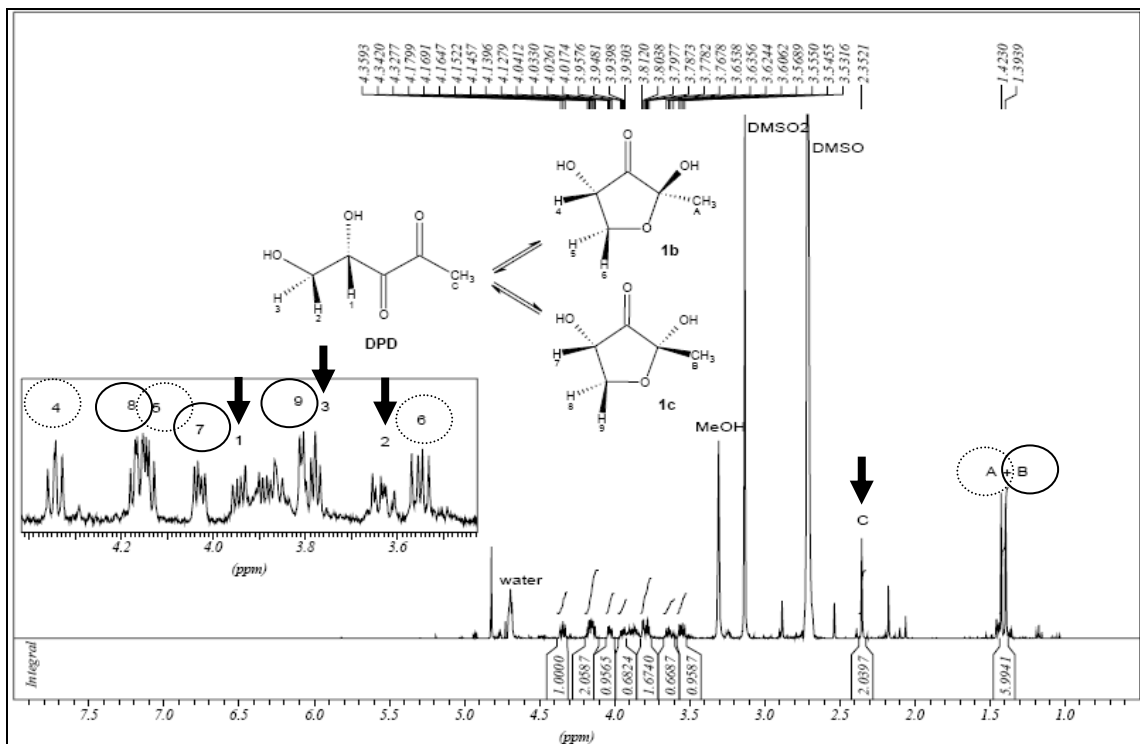
(one-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) พบว่า (4S)-4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้ด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน เป็นโครงสร้างที่ไม่เสถียร จึงเปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรมากกว่าซึ่งมีลักษณะเป็นวง (furan) นั่นคือ (2R,4S)-2,4-dihydroxy-2-methyldihydrofuran-3-one (*R*-DHMF) หรือ (2S,4S)-2,4-dihydroxy-2-methyldihydrofuran-3-one (*S*-DHMF) ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสัญญาณทางเคมี Autoinducer-2

ที่มา : Semmelhack และคณะ (2005)

พีกทั้งหมดที่พบบน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมจึงเกิดจากสาร DPD และอนุพันธ์ทั้งสอง คือ *R*-DHMF และ *S*-DHMF ซึ่งอธิบายได้ว่าแต่ละพีกเกิดจากสารประกอบใด โดย DPD พบพีกได้ที่ค่า chemical shift 3.94 (dd, $J = 3.8, 7.3$ Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.63 (dd, $J = 7.3, 11.8$ Hz, 1H), และ 2.35 (s, 3H) ในขณะที่ *R*-DHMF พบพีกได้ที่ค่า chemical shift 4.34 (dd, $J = 5.6, 6.9$ Hz, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.55 (dd, $J = 5.6, 9.4$ Hz, 1H) และ 1.39 (s, 3H) หรือ 1.42 (s, 3H) และ *R*-DHMF พบพีกได้ที่ค่า chemical shift 4.15 (m, 2H), 4.03 (dd, $J = 3.4, 6.1$ Hz, 1H), 3.79 (m, 2H) และ 1.39 (s, 3H) หรือ 1.42 (s, 3H) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 นอกจากนี้ Semmelhack และคณะ, (2005) ได้สังเคราะห์ DPD และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารดังกล่าวด้วย วิธีทางสเปกโตรสโกปีแบบ 1 มิติ (one-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Keersmaecker และคณะ (2005)



ที่มา : Keermaecker (2005)

รูปที่ 2.6 ¹H-NMR สเปกตรัมของสารสังเคราะห์ AI-2

- ↓ พิกของโครงสร้าง DPD
- พิกของโครงสร้าง 1b (R-DHMF)
- พิกของโครงสร้าง 1c (S-DHMF)

ข) วิธีทาง Fluorometry

เมื่อไม่นานมานี้ Zhu และ Pei (2008) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบ AI-2 ด้วยเทคนิค Fluorescent sensor โดยมี LuxP และ LsrB เป็น biosensors ที่จำเพาะกับ AI-2 เมื่อเกิดการเชื่อมต่อ (binding) ระหว่างโปรตีนกับ AI-2 จะทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่าง แล้วปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ AI-2 ทางอ้อม อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังเป็นไปได้ยากที่จะใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และมีข้อเสีย คือ ค่าใช้จ่ายสูง และ มีโอกาสที่สารประกอบอื่นจะมาเชื่อมต่อกับ sensor ได้เช่นเดียวกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ง่าย

ค) วิธีทางชีวภาพ (Bioluminescence)

จากที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าการตรวจสอบ DPD หรือ AI-2 ทำได้ยาก จนกระทั่งปัจจุบันการตรวจสอบ AI-2 ในงานวิจัยส่วนใหญ่ยังคงต้องอาศัยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณ AI-2 ที่อยู่ในรูปส่วนใสของคัลเจอร์ (supernatant) หรือที่ถูกสร้างขึ้นมาในระหว่างการเจริญสามารถตรวจสอบโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์จำเพาะ (reporter strain) คือ *V. harveyi* BB170 ซึ่งถูกดัดแปลงยีนส์ *luxN* โดย Bassler และคณะ (1994) เพื่อใช้ในการตรวจสอบการสร้าง AI-2 ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยที่ *V. harveyi* BB170 สายพันธุ์ดัดแปลงนั้นยังคงมีคุณสมบัติเหมือนกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ดั้งเดิมในด้านคุณสมบัติการเรืองแสงลูมิเนสเซนส์ (luminescence) ที่ขึ้นกับจำนวนเซลล์ *V. harveyi* ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Greenberg และคณะ (1979) ซึ่งสายพันธุ์ดั้งเดิมจะสร้าง และรับสัญญาณทั้ง AI-1 และ AI-2 แต่สายพันธุ์ BB 170 จะถูกดัดแปลงยีนให้ให้สร้าง และรับเฉพาะสัญญาณ AI-2 แต่ไม่รับสัญญาณ AI-1 เมื่อมีการเติม AI-2 จากภายนอกเซลล์ลงไปในคัลเจอร์ของ *V. harveyi* BB170 จะทำให้ไปกระตุ้นการเรืองแสงในช่วงแรกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติม AI-2 เพิ่มจากภายนอก จากข้อดีนี้เองทำให้สายพันธุ์จำเพาะนี้ถูกนำมาพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 ในเชิงกึ่งปริมาณ (semiquantitative) (DeLisa และคณะ, 2001; Schauder และคณะ, 2001; Winzer และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตามปัจจัยทางด้าน pH สภาพการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นของ borate นั้นมีอิทธิพลต่อผลการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ และสารประกอบบางชนิดที่สร้างจาก *V. harveyi* BB170 (reporter strain) สามารถแทรกแซงผลการตรวจสอบ (Thiel และคณะ, 2009) จากข้อเสียของวิธีทางชีวภาพ ทำให้มีนักวิจัยบางกลุ่มมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดย Ramiro Vilchez และคณะ (2007) ได้รายงานว่าการเติม trace element หลายชนิดมีผลกระทบต่อผลการทดสอบ เช่น เมื่อเติม Fe^{3+} ลงในอาหารเพาะเลี้ยงในช่วงการเตรียมเซลล์จะช่วยเพิ่มความเที่ยงตรงของผลการทดสอบ ในทางกลับกันถ้าเติมลงไปโดยตรงในระหว่างการตรวจสอบจะส่งผลยับยั้ง นอกจากนี้พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นมีความสำคัญมาก และ Turovskiy และ Chikindas (2006) ได้รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสในช่วงระดับความเข้มข้นหนึ่งจะมีผลต่อการยับยั้งการเรืองแสงซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่มีอยู่ในปัจจุบันยังมีข้อด้อยหลายประการ งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจสอบ AI-2 เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

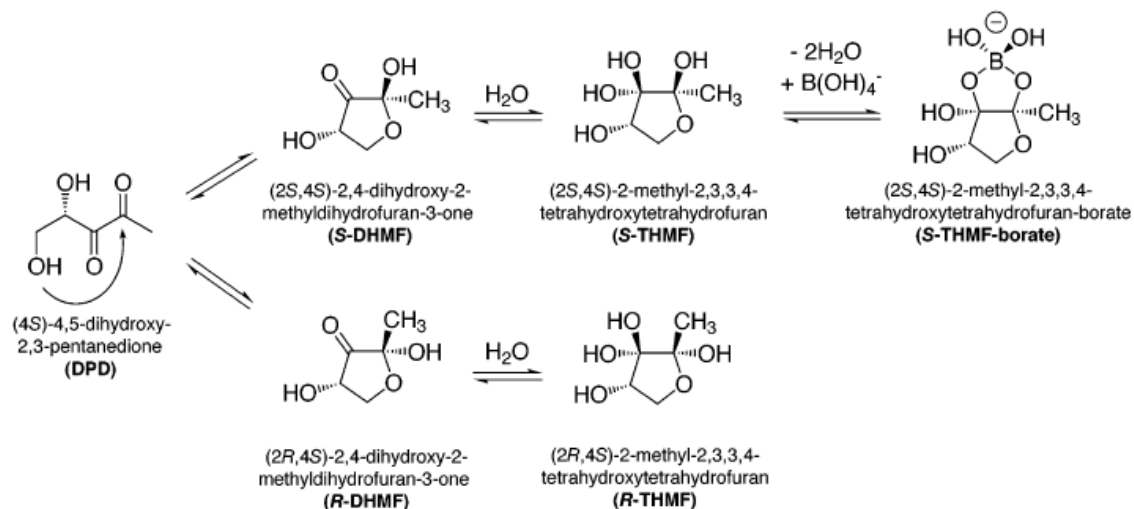
2.3 การสร้างสัญญาณ AI-2 ของ *S. Typhimurium*

มีรายงานว่าแบคทีเรียจำนวนมากมายที่สร้าง AI-2 ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่สร้าง AI-2 ในปริมาณน้อยกว่า ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ *S. Typhimurium* ในปี 1998 มีการค้นพบว่า *S. Typhimurium* สร้างควอรัมเซนซิงประเภท Autoinducer-2 (AI-2) (Surette and Bassler, 1998) และจากการตรวจสอบโครงสร้างด้วย x-ray crystallography และ $^{11}\text{B-NMR}$ พบว่าโครงสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* คือ (2R, 4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (*R*-THMF) ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้าง AI-2 ของ *V. harveyi* นั่นคือ (2S, 4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate (*S*-THMF-borate) (รูปที่ 2.7) โดยที่สารทั้งสองชนิดนั้นเป็น isomer กัน แต่ AI-2 ของ *V.harveyi* นั้นมี borate เกาะอยู่ที่ furanosyl ring เนื่องจากการเจริญตามธรรมชาติของ *V.harveyi* มักเจริญในสภาพแวดล้อมของน้ำทะเล ซึ่งมีความเข้มข้นของธาตุโบรอนสูง นอกจากนี้ก็มี AI-2 ต่างชนิดกัน ในส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณนั้นก็มีความแตกต่างกันด้วย โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่รับสัญญาณ AI-2 ของ *V.harveyi* คือ LuxP และ โปรตีนที่ทำหน้าที่รับสัญญาณ AI-2 ของ *S. Typhimurium* คือ LsrB (Miller และคณะ, 2004)

การตรวจสอบ AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* จะไม่พบในช่วงต้นของ log phase เนื่องจากการสะสม AI-2 จะเกิดขึ้นในระหว่างการเจริญ ดังนั้นจะตรวจพบ AI-2 สูงสุดในช่วงกลางจนถึงปลาย log phase และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ stationary phase (Surette และ Bassler, 1998)

การสะสม AI-2 ใน *S. Typhimurium* เป็นแบบชั่วคราว กล่าวคือ ปริมาณ AI-2 จะลดลงเมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase หรือเมื่อเข้าสู่ stationary phase อย่างไรก็ตามการสร้างและการสลายของ AI-2 นั้นขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญ โดยน้ำตาลกลูโคสจะมีอิทธิพลต่อการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ซึ่งในสภาวะที่ขาดน้ำตาลกลูโคส หรือในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสจำกัดจะตรวจพบ AI-2 ในช่วงเวลาสั้นๆของช่วงกลางของ log phase นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการสะสม AI-2 ของ *S. Typhimurium* เช่น pH, อุณหภูมิ และค่าออกซิโมลาริตี (Surette และ Bassler, 1998)

แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆที่มีอิทธิพลต่อการสร้าง AI-2 เช่นเดียวกับน้ำตาลกลูโคส คือ น้ำตาลในกลุ่ม PTS ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลกลูโคซามีน รวมทั้งน้ำตาลที่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม PTS ได้แก่ กาแลกโตส อะราบิโนส แต่ไม่พบว่าการสร้าง AI-2 ในสภาวะการเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรต ดังนี้ อะซิเตต กลีเซอรอล ซีเตรท ซีรีน (Surette และ Bassler, 1998)



รูปที่ 2.7 โครงสร้าง AI-2 ของ *V. harveyi* และ *S. Typhimurium*

ที่มา : Miller และคณะ (2004)

2.4 งานวิจัยเกี่ยวกับ AI-2 กับด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bassler และคณะ (1994) ได้ค้นพบควอรัมเซนซิงระบบใหม่ครั้งแรกใน *V. harveyi* ซึ่งก็คือ AI-2 ต่อมา มีรายงานว่า AI-2 เป็นระบบการสื่อสารระหว่างสายพันธุ์ (Interspecies communication) โดยมีแบคทีเรียจำนวนมากที่สร้างควอรัมเซนซิงประเภทนี้ และมีการแสดงออกทางฟีโนไทป์แตกต่างกันไป รวมถึงมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการก่อโรครุนแรงในแบคทีเรียหลายชนิด จึงทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มมีความสนใจในการศึกษากลไกการทำงานของ AI-2 และการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของ AI-2 (Keersmaecker และคณะ, 2006) เนื่องจากมีข้อสมมติฐานว่าหากมีสารประเภทหนึ่งที่สามารถไปรบกวนกลไกการสื่อสาร เช่น การยับยั้งการสร้างสัญญาณทางเคมี หรือ การไปกีดกันการรับสัญญาณ เป็นต้น สารนั้นอาจสามารถพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ได้ ซึ่งจะมีกลไกการทำงานในการป้องกันไม่ให้แบคทีเรียแสดงพฤติกรรมก่อโรครุนแรง แต่ไม่ฆ่าแบคทีเรีย โดยให้ระบบภูมิคุ้มกันของ host นั้นทำหน้าที่ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นเอง และอาจสามารถยับยั้งการสร้างฟิล์มชีวภาพที่สร้างจากจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งคาดว่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จากที่กล่าวข้างต้นว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดสร้าง AI-2 นั้นรวมถึงแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน จึงเป็นไปได้ว่าสารยับยั้ง (Inhibitors) ที่คาดว่าจะพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะนั้น จะสามารถใช้เป็นยาต้านจุลินทรีย์ได้หลายสายพันธุ์ ดังนั้นทิศทางการ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ AI-2 ในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาสารยับยั้งการสร้าง AI-2 (Pei และ Zhu, 2004)

2.5 งานวิจัยเกี่ยวกับ AI-2 กับความปลอดภัยทางอาหาร

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลรูปถึงบทบาทที่ชัดเจนของ AI-2 ที่สร้างจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร อย่างไรก็ตาม AI-2 อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของแบคทีเรีย การรอดชีวิต และการก่อโรคในอาหาร ทั้งนี้มีรายงานว่า LuxS มีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรคใน *Escherichia coli* (Sperandio และคณะ, 1999) จึงเป็นไปได้ว่า AI-2 อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรครุนแรงในแบคทีเรียอื่นๆ ดังนั้น Cloak และคณะ (2002) ได้ศึกษาการสร้าง AI-2 ของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Campylobacter jejuni* *Campylobacter coli* *Salmonella* Typhimurium และ *E. coli* O157:H7 ในอาหารหลายชนิด ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สร้าง AI-2 ในอาหารประเภทนม และซूपไก่ แต่ไม่พบการสร้าง AI-2 ในน้ำแอปเปิ้ล ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ AI-2 ในด้านความปลอดภัยอาหาร จึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสารที่มีกลไกในการยับยั้งการผลิตสัญญาณทางเคมีในอาหาร อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ AI-2 ในเชิงการประยุกต์ในระบบอาหารมากนัก อาจเนื่องจากยังไม่มีข้อมูลรูปที่ชัดเจนถึงกลไกการสร้างและบทบาทของ AI-2 ในการควบคุมการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียในหลายสายพันธุ์ รวมถึงข้อจำกัดในเรื่องวิธีการตรวจสอบ AI-2 ดังกล่าวข้างต้น

2.6 ความสำคัญของ *Salmonella* และวิธีการตรวจสอบ

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae ซึ่งมีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากกว่า 2000 serovars ซึ่งได้มีการจัดประเภทเป็น 6 subspecies ดังนี้ *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *bongori* (Bibek, 2004) *Salmonella* เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบมีรูปร่างเป็นท่อนขนาด 0.3-1.0 x 1.0-6.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ที่อุณหภูมิ 35-37°C เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน สร้างกรดและแก๊สในขณะที่เจริญในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ (Brenner, 1984)

มีรายงานกล่าวว่า *Salmonella* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne salmonellosis) โดยพบว่า serotype Typhimurium และ serotype Enteritidis ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม subsp. *enterica* เป็นสาเหตุหลัก (Bibek, 2004)

2.6.1 วิธีการตรวจสอบ *Salmonella*

การเสื่อมเสียของอาหาร และการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภคนั้น สาเหตุสำคัญมาจากจุลินทรีย์ ดังนั้นในการผลิตอาหารระดับอุตสาหกรรม การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหารจำแนกออกเป็น 2 ประเภท

ก) วิธีการตรวจสอบแบบดั้งเดิม (Conventional method)

วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 2.7 และ 2.8 ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 คือ Pre-enrichment เพื่อเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ที่อ่อนแอให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นเพื่อให้ง่ายต่อการตรวจหา

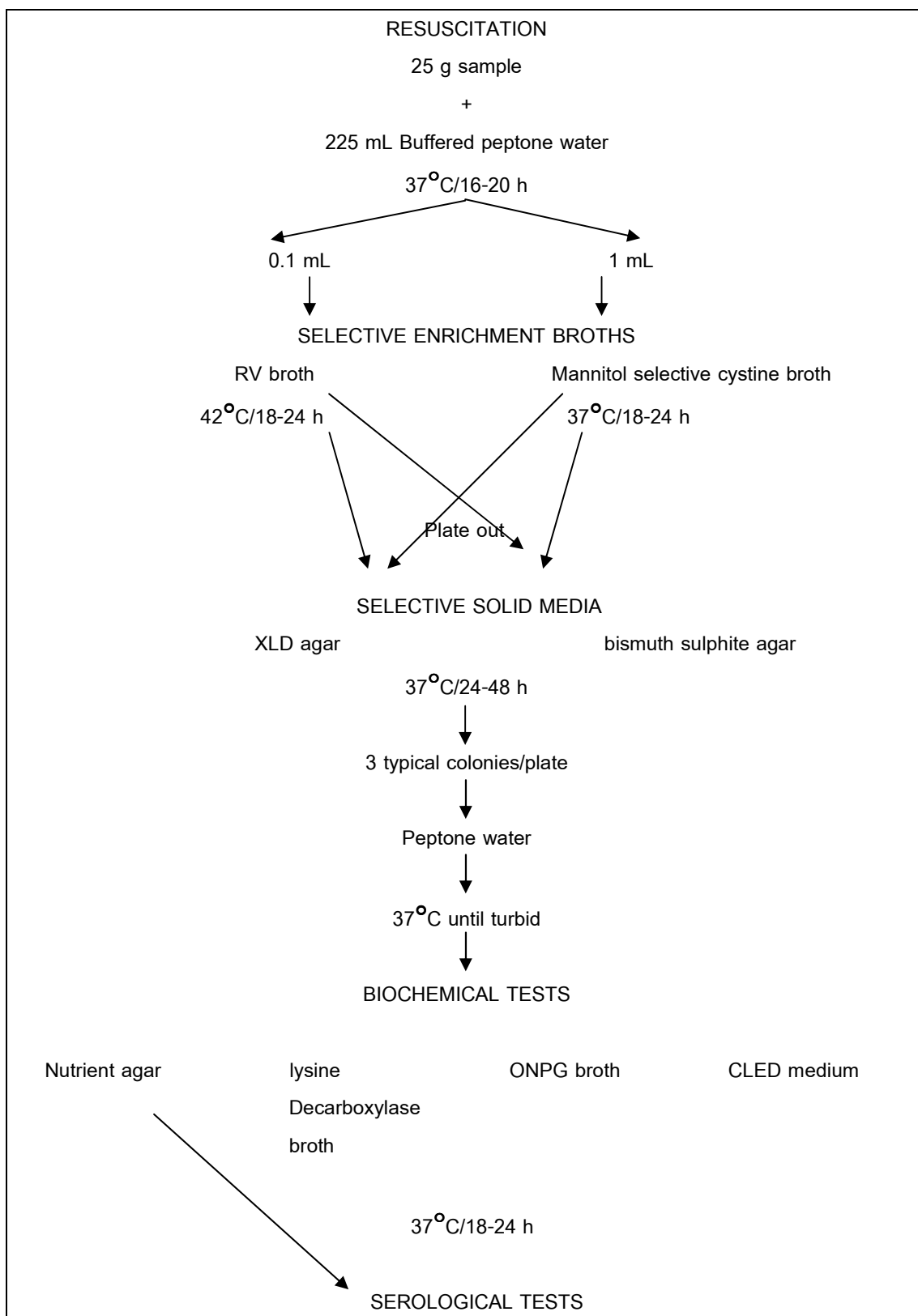
ขั้นตอนที่ 2 คือ Selective enrichment เป็นการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารที่จำเพาะกับจุลินทรีย์เป้าหมาย และมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในอาหาร

ขั้นตอนที่ 3 คือ Selective plating เป็นการแยกจุลินทรีย์โดยการเลี้ยงอาหารแข็งให้เจริญเป็นโคโลนีแล้วจึงแยกโคโลนีเพื่อนำไปตรวจสอบต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 คือ Biochemical identification เป็นการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ขั้นตอนที่ 5 คือ Serological confirmation เป็นการตรวจทางซีรัมวิทยา (Patel, 1994)

การตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิมนั้นต้องใช้เวลามากกว่า 5 วัน ซึ่งใช้เวลานานกว่าจะได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง



รูปที่ 2.8 แผนภาพขั้นตอนการตรวจหาลำโพง *Salmonella*

ที่มา : Jay และคณะ (2003)

ข) วิธีรวดเร็ว (Rapid method)

เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อให้การตรวจสอบรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งมีตัวอย่างดังนี้ Test kits เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อลดขั้นตอนในการตรวจสอบจุลินทรีย์ โดยตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ แต่อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาสูง และผลการวิเคราะห์ที่ได้นั้นมีความแม่นยำต่ำ เมื่อเทียบกับวิธีการดั้งเดิม ซึ่งนับว่าเป็นข้อเสียของวิธีการตรวจสอบนี้

1. Immunoassay เป็นวิธีการตรวจสอบซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีโดยติดฉลากเพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง และจากความจำเพาะสูงนี้เองจึงทำให้เกิดข้อเสียในการตรวจจุลินทรีย์ชนิดที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ เช่น *Salmonella* คือเกิดความยุ่งยากในการหาแอนติเจน แอนติบอดีที่มีความจำเพาะมาทำปฏิกิริยา

2. Molecular Methods เป็นวิธีการตรวจสอบ จุลินทรีย์โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์คุณสมบัติของสารชีวโมเลกุล แต่วิธีการนี้มีข้อเสียในด้านของหลักการการวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก และต้องมีความรู้เฉพาะทางจึงเหมาะสมในการใช้ตรวจสอบจุลินทรีย์ในระดับงานวิจัย จากวิธีแผนใหม่ที่ได้ยกตัวอย่างนั้น แสดงให้เห็นแนวโน้มว่า ส่วนใหญ่มักเป็นวิธีที่มีความซับซ้อน และค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ส่งผลให้การนำวิธีการแผนใหม่ที่พัฒนาขึ้นมาไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมมีไม่มากนัก

3. พัฒนา selective media หลักการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการตรวจสอบ *Salmonella* และแยก *Salmonella* ออกจาก non-*Salmonella* ซึ่งอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae อาศัยพื้นฐานการคัดแยกความแตกต่างทางชีวเคมี โดยทั่วไป Selective media ประกอบด้วยสารอาหารพื้นฐาน และ สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่ง เช่น dyes bile salts antibiotics เป็นต้น ระบบ selective media ที่พัฒนาเป็นอาหารสำหรับตรวจสอบ *Salmonella* ทางการค้าที่ใช้ทั่วไปไม่ใช่อาหารสำหรับใช้บ่งชี้

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

อาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนหนึ่งถูกที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจสอบ *Salmonella* โดยอาศัยคุณสมบัติการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น XLD (Taylor, 1965)

HE (King และ Metzger, 1968) lysine mannitol glycerol (LMG) agar (Cox, 1993) และ Miller-Mallinson (MM) agar (Miller และ Mallinson, 2000)

อาหารที่ใช้สำหรับการทดสอบการสร้างกรดจากการใช้

Propylene glycol

Rambach agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจสอบ non-Typhi *Salmonella* โดยอาศัยพื้นฐานการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ *Salmonella* ในการหมัก Propylene glycol แล้วเปลี่ยนเป็นกรดของ *Salmonella* การใช้ β -galactosidase เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลแลคโตส และการใช้ deoxycholate ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และสีแดงทำหน้าที่เป็น pH เป็นอินดิเคเตอร์ จากผลการทดสอบ non-Typhi *Salmonella* 100 สายพันธุ์ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ พบว่ามี 98 สายพันธุ์ที่สามารถหมัก Propylene glycol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RA เกิดเป็นโคโลนีสีแดงภายใน 16-24 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อทดสอบ *Salmonella* Typhi ในอาหาร RA พบว่าผลการทดสอบเป็นลบ ปรากฏโคโลนีไม่มีสี และ จุลินทรีย์อื่นๆที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสปรากฏโคโลนีสีฟ้า เช่น *Enterobacter*, *Escherichia* และ *Klebsiella* ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ทั้งน้ำตาลแลคโตส และ Propylene glycol จะปรากฏโคโลนีสีม่วง เช่น *Citrobacter* นอกจากนี้พบว่า *Proteus* และ *Shigella* จะปรากฏโคโลนีไม่มีสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RA (Rambach, 1990; Freydiere และ Gille, 1991; Gruenewald และคณะ, 1991; Dusch และ Altwegg, 1993; Pignato และคณะ., 1995a; Pignato และคณะ., 1995b; Cooke และคณะ, 1999)

Selective agents

ก) Bile salts เป็น Selective agent ชนิดหนึ่งที่ยิยมในการใช้เป็นสารยับยั้งใน Selective media เพื่อตรวจสอบ *Salmonella* เช่น *Salmonella-Shigella* agar และ Hektoen Enteric (HE) agar (Arroyo และ Arroyo, 1995) อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่ประกอบด้วย bile salts จำนวนเล็กน้อย (1.5 กรัม/ลิตร) และ crystal violet (0.001 กรัม/ลิตร) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (Fagerberg และ Avens, 1976) นอกจากนี้ยังพบว่า Bile salts เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้าหลายชนิด เช่น deoxycholate citrate agar ซึ่งเสนอไว้โดย Leifson (1935) SS agar HE agar และ XLD agar โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ deoxycholate citrate agar นั้นมี citrate เป็น selective agent ที่ทำหน้าที่หลัก ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ HE agar นั้นมี bile salts ทำหน้าที่หลัก (Busse, 1995)

ข) Brilliant green เป็นสารที่ที่สมบัติเป็นพิษต่อแบคทีเรียส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นคู่แข่งกับ *Salmonella* เช่น *Proteus* spp. (Arroyo และ Arroyo, 1995) อาหารเลี้ยงเชื้อ BGA (Kauffmann medium) เป็นอาหารที่นิยมใช้ทั่วไปในการแยก *Salmonella* (Jones และคณะ, 1984) ซึ่งมี Brilliant green เป็นส่วนประกอบมากกว่า modified BGA 3 เท่า กล่าวคืออาหารเลี้ยงเชื้อ modified BGA มี Brilliant green เท่ากับ 4.7 มิลลิกรัม/ลิตร (Busse, 1995) ถึงแม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA จะมี Brilliant green เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 10 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของคู่แข่ง *Salmonella* ได้สมบูรณ์ แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ Brilliant green เป็น 15-20 มิลลิกรัม/ลิตร จะสามารถยับยั้งคู่แข่งได้สมบูรณ์ ยกเว้น *Citrobacter* sp. (Moats และ Kinner, 1974) ดังนั้นไม่จำเป็นต้องใช้ Brilliant green ความเข้มข้นสูงเมื่อใช้ร่วมกับสารยับยั้งชนิดอื่น

ค) แมกนีเซียมคลอไรด์ อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport สูตรดั้งเดิมประกอบด้วย malachite green และ แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งพัฒนาขึ้นมาเพื่อเพิ่มปริมาณ (enrichment) *Salmonella* Paratyphi และ serotypes อื่นๆ และเป็นคู่แข่งกับ brilliant green Rappaport เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเนื่องจากมี malachite green เป็นส่วนประกอบมีค่า ionic strength สูง และมีค่า pH ต่ำ แมกนีเซียมคลอไรด์มีสมบัติในการลดความรุนแรงจากผลกระทบความพิษของ brilliant green สำหรับ *Salmonella* (Busse, 1995) อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport สูตรดัดแปลงนั้นมีส่วนประกอบของ brilliant green เพียง 1 ใน 3 จากความเข้มข้นในสูตรดั้งเดิม อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis (RV) ประกอบด้วย malachite green 41 ไมโครโมลาร์ และ แมกนีเซียมคลอไรด์ 141-177 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดสภาวะ hypertonic หรือ high osmotic pressure *Salmonella* มีคุณสมบัติเจริญได้ในสภาวะที่มีค่า osmotic pressure สูงจากแมกนีเซียมคลอไรด์ และมีสารอาหารต่ำ จากคุณสมบัตินี้เองจึงนำมาใช้พัฒนาเป็นอาหาร RV ที่มีความจำเพาะในการคัดแยกคู่แข่งของ *Salmonella* โดย Peterz และคณะ(1989) ได้เสนอแนะว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์ คือ 28.6 กรัม/ลิตร ในขณะที่ van Schothorst และคณะ (1987) แนะนำให้ใช้ 29 กรัม/ลิตร การบ่มที่อุณหภูมิ $42 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มความจำเพาะของอาหาร RV ในการตรวจสอบ *Salmonella*

ง) Niaproof 4 อาหารเลี้ยงเชื้อ XLT4 agar

ประกอบด้วย Niaproof 4 (Tergitol, 7-ethyl-2-methyl-4-undecanol-hydrogen sulfate, sodium tetradecyl sulfate) ช่วยเพิ่มความจำเพาะ หรือลดความผิดพลาดในการตรวจสอบ (false-positive) Niaproof 4 มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์คู่แข่ง เช่น *Proteus*, *Providencia* และ *Pseudomonas* ถึงแม้ว่า *Citrobacter* จะสามารถเจริญได้บนอาหาร XLT4 agar แต่จะไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ในเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นโคโลนีของ *Citrobacter* จะเป็นสีเหลือง และเหนียวยืด ส่วนโคโลนีของ *Salmonella* สายพันธุ์ที่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์จะมีสีดำ หรือดำตรงกลางโคโลนี เรียบ และลักษณะเหมือนครีม แต่ *Salmonella* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างจะมีโคโลนีสีเหลืองอมชมพูบนอาหาร XLT4 agar XLT4 agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยก *Citrobacter* ออกจาก *Salmonella* อาหาร xylose lysine agar มี Niaproof4 เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 4.6 มิลลิกรัม/ลิตร (Miller และคณะ, 1991; Sherrod และคณะ, 1995)

4. แนวทางอื่นๆ เช่น การตรวจวัดเมตาบอไลต์บางชนิดร่วมกับ selective media แล้วตรวจวัดสารจำเพาะจากเชื้อนั้น

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุ

- (1) Cotton swabs, Thai Gauze co., LTD., Thailand
- (2) 96 well microplate, white, SPL Life Sciences, Korea
- (3) 13 mm x 0.45 μ m Nylon Syringe filter, Phenomenex, USA
- (4) 13 mm x 0.2 μ m Nylon Syringe filter, Phenomenex, USA
- (5) 1 ml Syringe, BD, Singapore
- (6) 15 x 90 mm. Plastic Petri Dish, Hycon plastic, USA
- (7) UV Disposable Cuvette, Ocean Optics, USA
- (8) Micro tube, Hycon plastic, USA
- (9) TLC Silica gel Aluminum sheets, Merck, Germany
- (10) NMR tube, Brand, USA

อุปกรณ์

- (1) Biomedical freezer, Sanyo, Japan
- (2) Colony counter, Gallenkamp, Germany
- (3) Vortex mixer, Lab-line Instrument Inc., USA
- (4) Laminar flow hood, Issco, USA
- (5) Centrifuge, Tuttlingen, Germany
- (6) Microwave, Daewoo. Korea
- (7) Incubator shaker, SW23 Julabo, USA
- (8) Gyrotory shaker, Model G2 New Brunswick Scientific, USA
- (9) Spectrophotometer, Lambda 25 UV/VIS spectrometer, PerkinElmer, USA

- (10) Spectrophotometer, V530 Jasco, USA
- (11) NMR Spectrometer, Varian Mercury-400 MHz
- (12) Microplate reader, SpectraMax M5, USA
- (13) SpectroFluorometer, FP-6200, Jasco, Japan
- (14) Rotary evaporator, Eyela, SB 651, Japan
- (15) Autoclave, SS320 Tomy, USA
- (16) Hot-air oven, Binder, Germany
- (17) Autopipette 1-10 μ l, Gilson, France
- (18) Autopipette 10-100 μ l, Gilson, France
- (19) Autopipette 100-1000 μ l, Gilson, France

สารเคมี

- (1) Sodium chloride, analytical grade, Ajax Finechem, USA
- (2) Glucose, analytical grade, Merck, Germany
- (3) Galactose, analytical grade, Merck, Germany
- (4) Arabinose, analytical grade, Merck, Germany
- (5) Potassium permanganate, analytical grade, Sigma-Aldrich, Germany
- (6) L-Ascorbic Acid, analytical grade, Merck, Germany
- (7) Boron trifluoride diethyletherate, analytical grade, Merck, Germany
- (8) Triethylamine (TEA), analytical grade, Sigma-Aldrich, Germany
- (9) Ferric ammonium sulfate, analytical grade, Sigma-Aldrich, Germany
- (10) 1,10-Phenanthroline, analytical grade, Sigma-Aldrich, Germany
- (11) Ammonium Acetate, analytical grade, Merck, Germany
- (12) *N*-(β -ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C6-AHL),
HPLC grade, Sigma-Aldrich, Germany
- (13) Hydrochloric, Analytical grade, J.T Baker, USA
- (14) Sodium hydroxide, analytical grade, Merck, Germany
- (15) Propylene glycol, analytical grade, Sigma-Aldrich, Germany
- (16) Brilliant green, analytical grade, Merck, Germany

- (17) Magnesium chloride hexahydrate, Analytical grade, J.T Baker, USA
- (18) Niaproof4, A.C.S. reagent, Aldrich, Germany
- (19) water, HPLC grade, Merck, Germany
- (20) Deuterium Oxide, 99.9% atom D, Sigma-Aldrich, Germany
- (21) Methanol, HPLC grade, Merck, Germany
- (22) Dichloromethane, Analytical grade, Merck, Germany
- (23) Triethylamine, Analytical grade, Merck, Germany

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- (1) Nutrient Broth (NB), Himedia, India
- (2) Nutrient Agar (NA), Himedia, India
- (3) Peptone from casein, Himedia, India
- (4) Marine broth, Difco, France
- (5) Agar, Himedia, India
- (6) Tryptone, Merck, Germany
- (7) Yeast extract, Difco, France

จุลินทรีย์

- (1) *Escherichia coli* ATCC 4212 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข)
- (2) *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข)
- (3) *Salmonella* Typhimurium DMST 28913 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข)
- (4) *Salmonella* Typhimurium DMST 28914 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข)
- (5) *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

nylon syringe filter ขนาด 0.2 μ m ถ่ายสารละลายตัวอย่างลงใน NMR tube ให้สูงจากก้นหลอด ประมาณ 3-4 เซนติเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$)

3.1.2 การตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioluminescence assay)

เตรียมสารชะโคโลนีเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1.1 แต่ใช้ 0.85% NaCl แทนดิเวเทอร์เรียม ออกไซด์ นำสารชะโคโลนีที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยปิเปตสารชะโคโลนี 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีคัลเจอร์ของ *V. harveyi* BAA-1117 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร โดยมีเซลล์ เริ่มต้น 5 logCFU/ml (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) หรือในอัตราส่วน 1: 9 บ่มคัลเจอร์ต่อ ที่ 30°C ให้อากาศโดยการเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปิเปต คัลเจอร์ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate ชนิดที่บ่งแสงสีขาว นำไปตรวจวัดค่าการ กระตุ้นการเรืองแสงด้วยเครื่อง Microplate Luminometer (SpectraMax M5) ตามวิธีที่รายงาน โดย Surette and Bassler (1998) ทุกการทดลองทำการทดลอง 2 ซ้ำ

คำนวณ % การกระตุ้นการเรืองแสง ตามสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Activity} = \frac{\text{Light Unit ของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ}}{\text{Light Unit ของตัวอย่างควบคุม}} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

Light Unit ของตัวอย่างควบคุม

3.2 ประเมินวิธีการตรวจสอบ AI-2 โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี

ประเมินวิธีการตรวจสอบ AI-2 โดยอาศัยความสามารถในการทำปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชัน ชนิด 1,2-diol หมู่อะซิดัล และ/หรือ หมู่เฮมิอะซิดัล มุ่งเน้นไปที่ปฏิกิริยาการแทนที่ และการเกิด สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับอะตอมของออกซิเจนในโครงสร้างของ AI-2

3.2.1 การทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4)

สารที่ใช้ในการทดลองทำปฏิกิริยา คือ สารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่ผ่านการตรวจสอบการสร้าง AI-2 จากข้อ 3.1 (เตรียมสารชะโคโลนีเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2) สารละลายกลูโคส 0.5% และอาหาร NB ทดสอบ ปฏิกิริยาโดยปิเปตสารที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate

ที่เติมสาร KMnO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (วิธีการเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายทันที

3.2.2 การทำปฏิกิริยากับ Boron trifluoride etherate ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$)

สารที่ใช้ในการทดลองทำปฏิกิริยา คือ Ascorbic acid ทดสอบปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล และ ไดคลอโรมีเทน (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติมส่วนผสมลงในขวดก้นกลมที่มี $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 5.07 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Triethylamine (TEA) 5.58 มิลลิลิตร

นำขวดก้นกลมติดตั้งเข้ากับชุด Reflux กวนด้วย magnetic stirrerควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 42°C ประมาณ 24 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยการเปิดสารไปตรวจสอบค่า R_f ด้วย Thin layer Chromatography (TLC) (วิธีการทำ TLC แสดงในภาคผนวก ข) บันทึกค่า R_f ของสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยา

เติม TEA 5.58 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมเมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุด แล้วระเหยตัวทำละลายใน Rotary evaporator จากนั้นนำไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer และค่าการเรืองแสง Fluorescence ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer

นำสารที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ข) ตรวจสอบสารละลายที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ (eluent) ด้วย TLC เลือกละลายที่มีค่า $R_f = 0.7$ มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี ($^{13}\text{C-NMR}$) ตามวิธีของ Kee และคณะ (2005)

3.2.3 การทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

สารที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา คือ สารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (วิธีการเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ค) และสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในการทดสอบปฏิกิริยากับ Ascorbic acid โดยเติมสารละลาย Fe(III)-1,10-phenanthroline ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับเป็นรีเอเจนต์ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารที่ต้องการทดสอบ 1 มิลลิลิตร ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสง ภายใน 3 นาที เพื่อหาความยาวคลื่นที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้ Fe(III)-1,10-phenanthroline ที่มีความเข้มข้นเท่ากันเป็น Blank ตามวิธีของ Besada

(1987) ในการทดสอบสารชะโคโลนีจะเจือจางในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และกรองผลิตภัณฑ์ที่ได้ผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.3 การประเมินวิธีการตรวจสอบ AI-2 ของจุลินทรีย์ด้วยปฏิกิริยาเคมีเพื่อพัฒนาเป็นวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

นำปฏิกิริยาเคมีที่ประเมินจากข้อ 3.1.2.3 ในที่นี้คือการทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline มาประเมินประสิทธิภาพ เพื่อพัฒนาเป็นวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีสำหรับการตรวจสอบ AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* ประเมินการตรวจวัดในระบบสารชะโคโลนี และส่วนในคัลเจอร์

3.3.1 การตรวจสอบ AI-2 จากสารชะโคโลนีของแบคทีเรีย

สารที่ใช้ในการทดลองทำปฏิกิริยา คือ สารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311, *V. parahaemolyticus* DMST 22093, *S. aureus* ATCC 65388, *E. coli* ATCC 4212 และ *S'biium. meliloti* SM1021 นำสารชะโคโลนีเหล่านี้มาตรวจสอบ AI-2 โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe(III)-1,10-phenanthroline เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที กรองผลิตภัณฑ์ที่ได้ผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร เมื่อทำปฏิกิริยาครบ 3 นาที นำไปตรวจสอบความยาวคลื่นที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้รีเอเจนต์ที่เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับตัวอย่างทดสอบเป็น Blank

นำสารชะโคโลนีที่ใช้ในการทดสอบนี้ไปตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อเปรียบเทียบผล ตามวิธีในข้อ 3.1.2

3.3.2 การตรวจสอบ AI-2 จากส่วนใสคัลเจอร์ของแบคทีเรีย

สารที่ใช้ในการทดลองทำปฏิกิริยา คือ สารละลาย Ascorbic acid ในเปปโตน 1% คัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และคัลเจอร์ของ *S'biium. meliloti* SM1021 เตรียมคัลเจอร์โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้มีเซลล์เริ่มต้น 7 logCFU/ml (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) ในเปปโตน 1% ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% และ เกลือ 0.5% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ

37°C ที่ 200 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Surette and Bassler ,1999) นำคัลเจอร์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 15000 xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนใสผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบ AI-2 โดยเติมสารละลาย Fe(III)-1,10-phenanthroline (รีเอเจนต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีคัลเจอร์ที่ต้องการทดสอบ 1 มิลลิลิตร ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น กรองผลิตภัณฑ์ที่ได้ผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร นำไปตรวจสอบความยาวคลื่นที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ภายใน 3 นาที โดยใช้สารละลายที่ผสมระหว่างรีเอเจนต์กับอาหาร เปปโตน 1 % ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน เป็น Blank นำส่วนใสของคัลเจอร์ที่ใช้ในการทดสอบนี้ไปตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อเปรียบเทียบผล ตามวิธีในข้อ 3.1.2

3.3.3 การตรวจสอบสารแทรกแซงปฏิกิริยา (Interference)

สารที่ใช้ในการทดลองทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe(III)-1,10-phenanthroline เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ใช้รีเอเจนต์ที่มีความเข้มข้นเท่ากันเป็น Blank สำหรับการตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อให้กรองผลิตภัณฑ์ที่ได้ผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3.1 สารที่ใช้ในการตรวจสอบการแทรกแซงปฏิกิริยากับสารละลาย Fe(III)-1,10-phenanthroline

		ความเข้มข้น
เมทาบอลไลท์	Ammonium acetate	0.52 M
	Sodiumhydroxide	0.50 M
	<i>N</i> -(β-ketocaproyl)-homoserine lactone	
	Glucose	0.5%
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Nutrient Broth (NB)	
	Luria Bertani (LB)	
	Peptone water1%	
องค์ประกอบของ	Sodium chrolide	0.5%
Peptone water1%	Glucose	0.5%

3.4 การประยุกต์ใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีในการศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium*

3.4.1 ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium*

3.4.1.1 ระยะเวลาเจริญกับการสร้าง AI-2

ตรวจสอบสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ในระยะเวลาเจริญต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* DMST 28914 ที่มีเซลล์เริ่มต้น $2 \log\text{CFU/ml}$ ในเปปโตน 1% ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% และเกลือ 0.5% 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C ให้อากาศโดยการเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามจำนวนประชากรด้วยวิธี Spread plate บนอาหาร NA (ตามวิธีการที่แสดงในภาคผนวก ข) ทุกๆ 2 ชั่วโมง และนำ Inoculum ที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 ไปตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีตามวิธีที่ประเมินจากข้อ 3.3.2

3.4.1.2 สายพันธุ์ *S. Typhimurium* กับการสร้าง AI-2 เชิงปริมาณ

เปรียบเทียบสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ โดยนำสารชะโคโลนีอายุ 24 ชั่วโมงของ *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* DMST 28913 และ *S. Typhimurium* DMST 28914 มาตรวจสอบปริมาณ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีตามวิธีข้อ 3.3.1 และนำสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ไปตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบผลตามวิธีในข้อ 3.3.1

3.4.1.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงกับสมบัติการสร้าง AI-2

ศึกษาสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอนในอาหาร Peptone water 1% และความเข้มข้นเกลือ ต่อการเจริญและการสร้าง AI-2 โดยนำคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* DMST 28913 และ *S. Typhimurium* DMST 28914 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

เพาะเลี้ยงให้มีเซลล์เริ่มต้น $7 \log\text{CFU/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C ที่ 200 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนประชากรด้วยวิธีการ spread plate ที่ชั่วโมงที่ 6 และนำ Inoculum ที่เตรียม เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 ไปตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีตามวิธีในข้อ 3.3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะการเพาะเลี้ยง S. Typhimurium

สภาวะที่ศึกษา	การแปรสภาวะ
ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	Nutrient Broth
	Luria Bertani
	Peptone water
ชนิดแหล่งคาร์บอนในอาหาร Peptone water 1% โดยแปรชนิดน้ำตาล	น้ำตาลกลูโคส 0.5% น้ำตาลกาแลกโตส 0.5% น้ำตาลอะราบิโนส 0.5%
ความเข้มข้นเกลือ	0.1M
ในอาหาร Peptone water 1%	0.4M

3.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง AI-2 กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ S. Typhimurium

3.4.2.1 การสร้างฟิล์มชีวภาพ

ศึกษาสมบัติการสร้างฟิล์มชีวภาพกับการสร้าง AI-2 ของ S. Typhimurium 4 สายพันธุ์ คือ S. Typhimurium ATCC 13311, S. Typhimurium ATCC 14028, S. Typhimurium DMST 28913 และ S. Typhimurium DMST 28914 โดยนำคัลเจอร์ของ S. Typhimurium ที่เพาะเลี้ยงใน NB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาเติมลงใน NB 10 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $8 \log\text{CFU/ml}$ จุ่มแผ่นสแตนเลสที่ผ่านการทำความสะอาด และฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดทดลองเป็นเวลา 1 วินาที แล้วล้างแผ่นสแตนเลสทันทีด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง นำแผ่นสแตนเลสหลังล้างใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่มีอาหาร NB 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณฟิล์มชีวภาพ ด้วยการใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อป้ายบนพื้นผิวทดสอบ ขนาดพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร นำไม้พันสำลีใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.85% NaCl 10 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย Vortex ประมาณ 1 นาที แล้วตรวจสอบจำนวนประชากรด้วยวิธี spread plate (Sharms และคณะ, 2002)

3.4.2.2 การมี AI-2 นอกเซลล์กับอัตราการเจริญ

ศึกษาผลของการมี AI-2 นอกเซลล์อยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงต่ออัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* 2 สายพันธุ์ คือ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และ *S. Typhimurium* ATCC 14028 โดยใช้ AI-2 จากแหล่งต่างๆ ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 3.3 การเติม AI-2 จากแบคทีเรียในรูปแบบของสารชะโคโลนี และคัลเจอร์

จุลินทรีย์	รูปแบบการเติมสาร AI-2	ร้อยละของสารที่เติม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
<i>S. Typhimurium</i> ATCC13311	สารชะโคโลนี ¹	1
	คัลเจอร์ ²	5
<i>S. Typhimurium</i> ATCC14028	สารชะโคโลนี ¹	1
	คัลเจอร์ ²	5
<i>E. coli</i> ATCC 4212	สารชะโคโลนี ¹	1
	คัลเจอร์ ²	5

¹ เตรียมสารชะโคโลนีเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

² เตรียมคัลเจอร์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2

เพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* ใน เปปโตน 1% ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% และเกลือ 0.5% 50 มิลลิลิตร ให้มีเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml แล้วเติม AI-2 ดังรูปแบบที่แสดงในตารางที่ 3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ 200 rpm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดตามจำนวนประชากรด้วยวิธี spread plate ทุก 2 ชั่วโมง และประเมินอัตราการเจริญในค่าของอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ) ตามสมการ (1) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

$$\begin{aligned}
 u &= \frac{n}{t} \\
 &= \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301 \times t} \quad \text{-----(2)}
 \end{aligned}$$

N_0	เป็นจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น
N_t	เป็นจำนวนแบคทีเรียเมื่อทำการแบ่งตัวเป็นเวลา t
t	เป็นเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเจริญ
n	เป็นจำนวนครั้งที่แบ่งตัวเมื่อใช้เวลา t
u	อัตราการเจริญจำเพาะ

3.4.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน *S. Typhimurium* กับ AI-2 ที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

3.4.3.1 การดัดแปร selective medium และความจำเพาะต่อ *Salmonella*

ศึกษาความจำเพาะของ selective medium ที่ดัดแปรต่อ *Salmonella* โดยเฉพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* DMST 28914, *S. Typhimurium* 13311, *E. coli* ATCC 4212, *S. aureus* ATCC 65388 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $2 \log\text{CFU}/\text{mL}$ ใน selective medium ซึ่งประกอบด้วย เปปโตเนน 1% น้ำตาลกลูโคส 0.5% เกลือ 0.5% และ Selective agent ได้แก่ Brilliant green 0.00047% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.90 % และ Niaproof4 ปริมาตร 2.21 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร (ดัดแปลงจาก Arroyo และ Arroyo, 1995; Miller และคณะ, 1991; Sherrod และคณะ, 1995; Busse, 1995; Peterz และคณะ, 1989) (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ง) ที่ 43°C ติดตามจำนวนประชากรด้วยวิธี Spread plate ชั่วโมงที่ 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง

3.4.3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน *S. Typhimurium* กับค่า OD_{510}

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน *S. Typhimurium* กับ AI-2 ใน Selective medium โดยเฉพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* DMST 28914 และ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ให้มีเซลล์เริ่มต้น $2 \log\text{CFU}/\text{ml}$ และ $4 \log\text{CFU}/\text{ml}$ ใน Selective medium 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 43°C ให้อากาศโดยการเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามจำนวนประชากรด้วยวิธี Spread plate ทุกๆ 2 ชั่วโมง และนำ Inoculum ที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 ไปตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีตามวิธีข้อ 3.3.2

บทที่ 4

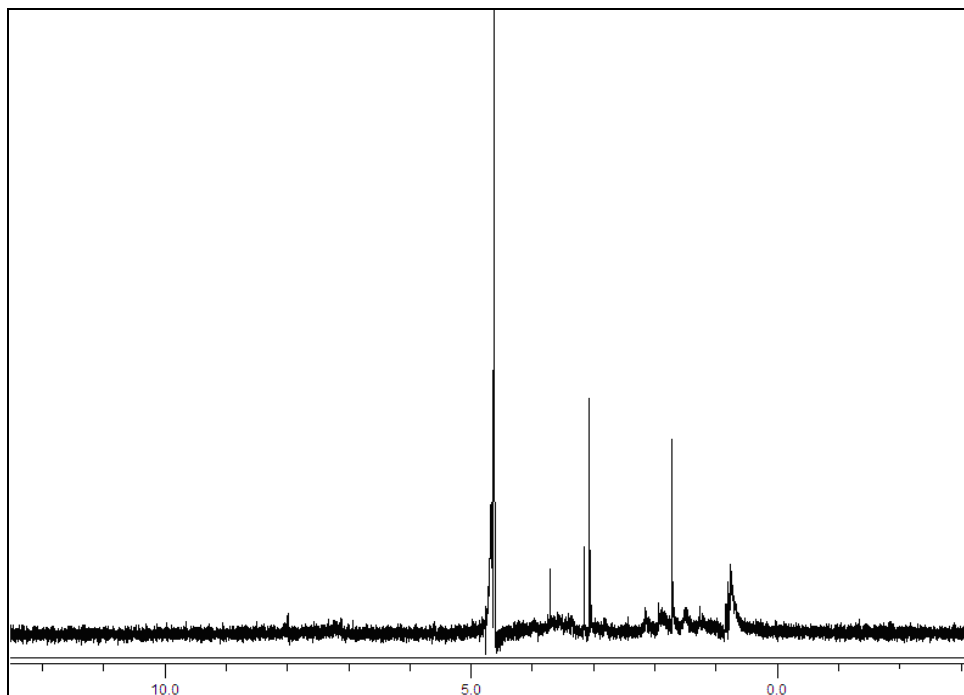
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบยืนยันการสร้างสัญญาณ AI-2 จากจุลินทรีย์

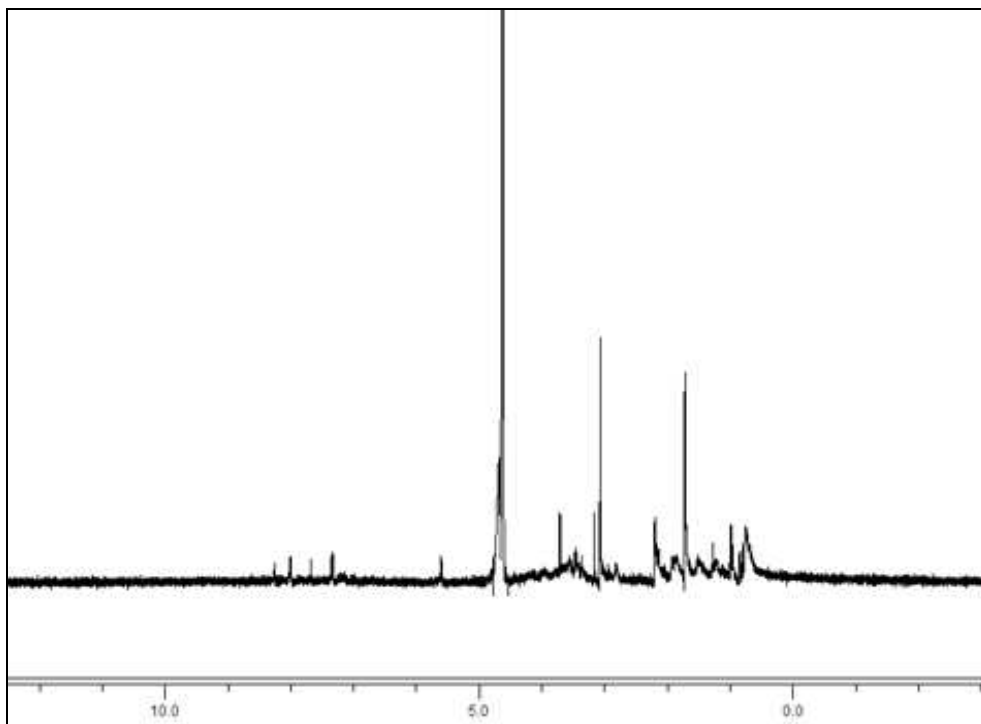
การตรวจสอบยืนยันการสร้าง AI-2 จากจุลินทรีย์เพื่อพิสูจน์ว่าสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนั้นสร้าง AI-2 โดยเตรียม AI-2 ที่สร้างจากจุลินทรีย์ในรูปแบบของสารชะโคโลนี

4.1.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$)

เมื่อนำสารชะโคโลนีสดด้วยดิฟเฟอเรนเชียลรีเอเจนต์ความเข้มข้น 20% (w/v) อายุ 24 ชั่วโมง ของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้านโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (one-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าพีกของ $^1\text{H-NMR}$ พบได้ที่ค่า chemical shift 3.74 (s, 1H), 3.11 (s, 2H), 1.75 (s, 3H) เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* เป็นสองเท่าหรือมีความเข้มข้นเท่ากับ 40% (w/v) พบว่ายังคงพบพีกในตำแหน่งเดียวกันแต่มีความสูงเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของสารชะโคโลนีที่เพิ่มขึ้น

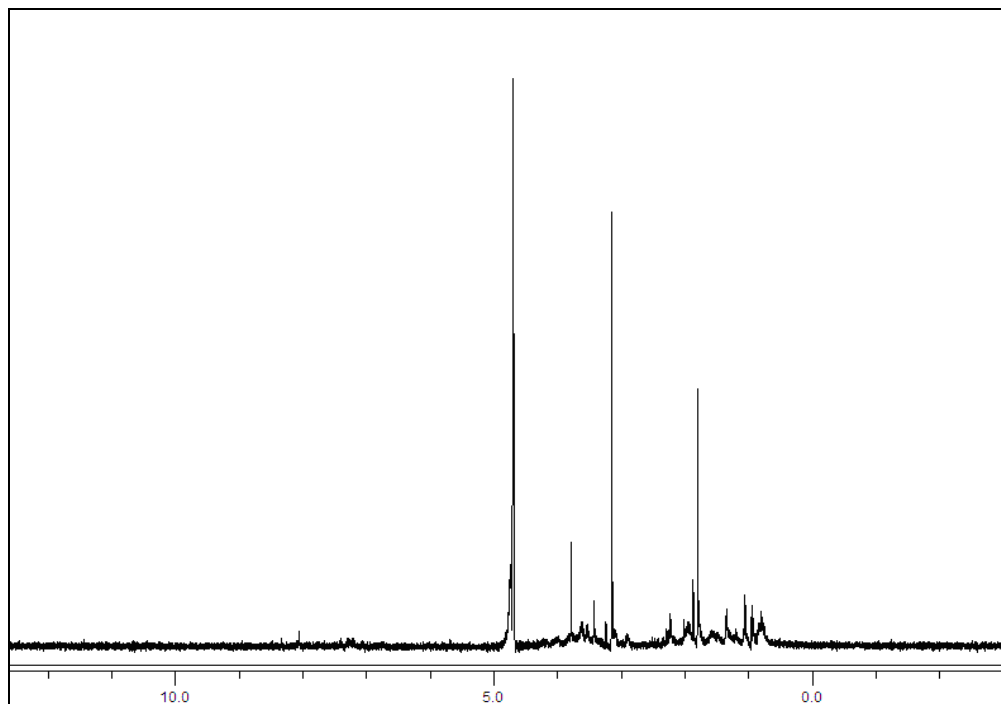


รูปที่ 4.1 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารชะโคโลนีที่มีความเข้มข้น 20% (w/v) ในตัวทำละลายดิฟเฟอเรนเชียลรีเอเจนต์ *S. Typhimurium* ATCC 13311



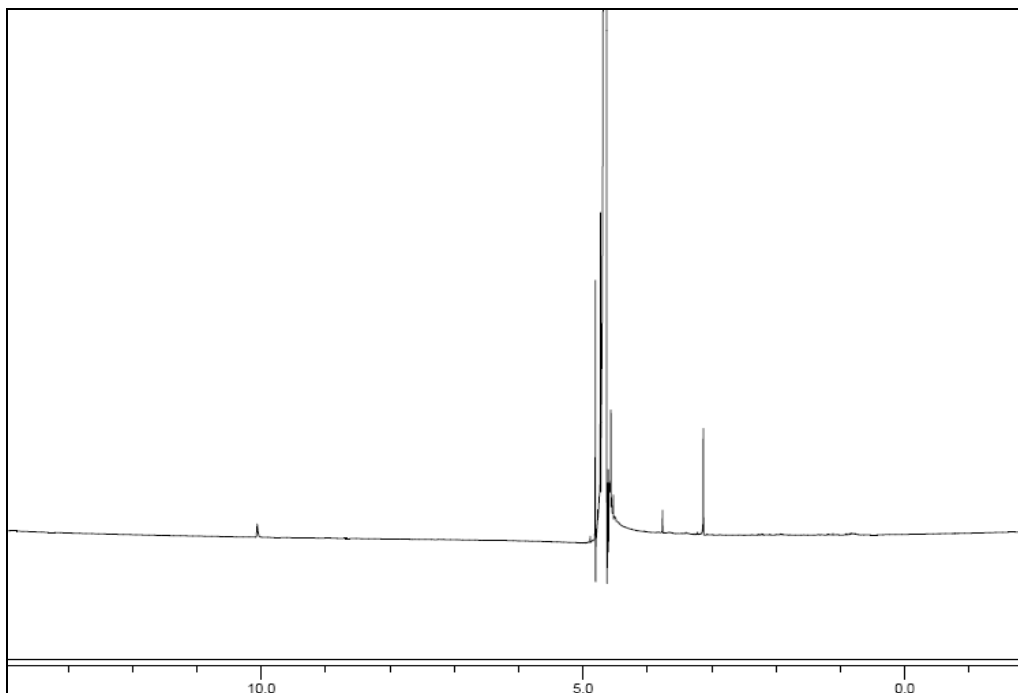
รูปที่ 4.2 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารชะโคโลนีที่มีความเข้มข้น 40% (w/v) ในตัวทำละลายดีทเทอร์เรียมออกไซด์ *S. Typhimurium* ATCC 13311

ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าพีกต่างๆ เหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับ AI-2 หรือไม่ จึงทดลองนำสารชะโคโลนีของแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าสร้าง AI-2 คือ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 (Bassler, 1997) และสารชะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีรายงานว่าไม่สร้าง AI-2 คือ *S'bium. meliloti* SM1021 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้านโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี (one-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ ซึ่งสเปกตรัมของสารชะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* มีความคล้ายคลึงกับสเปกตรัมของสารชะโคโลนีจาก *S. Typhimurium* คือ พบพีกได้ที่ค่า chemical shift 3.74 (s, 1H), 3.11 (s, 2H) ,1.75 (s,3H) เช่นเดียวกัน ในขณะที่สเปกตรัมของสารชะโคโลนีของ *S'bium. meliloti* แตกต่างจากสเปกตรัมของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* กล่าวคือพบพีกได้ที่ค่า chemical shift 3.7 (s,1H) และ 3.1 (s, 2H) แต่ไม่พบพีกที่ 1.75 ppm จากผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ให้เห็นว่าสเปกตรัมที่พีกตำแหน่ง 1.75 ppm ได้จากสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* น่าจะเกี่ยวข้องกับ AI-2



รูปที่ 4.3 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารชะโคโลนีที่มีความเข้มข้น 20% (w/v) ในตัวทำละลายดีวเทอร์เรียมออกไซด์ *V. parahaemolyticus* DMST 22093

จากรายงานวิจัยต่างๆ ที่ยืนยันได้ว่า *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างควอรัมเซนซิงประเภท AI-2 (Bassler และคณะ, 1997; Bassler, 1999) และ *S'biu. meliloti* ไม่สร้าง AI-2 (Pereira และคณะ., 2008) ซึ่งผลการตรวจสอบสารที่ละลายในสารชะโคโลนีของทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าในแบคทีเรียที่สร้าง AI-2 ทั้ง 2 ชนิด จะมีสเปกตรัมที่แตกต่างจากแบคทีเรียที่ไม่สร้าง AI-2 อย่างเด่นชัด คือ พีคที่ตำแหน่ง 1.75 ppm ในขณะที่พีคดังกล่าวไม่ปรากฏในสารชะโคโลนีของ *S'biu. meliloti* ซึ่งบ่งชี้ว่าพีคที่ตำแหน่งดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับสาร AI-2 ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าในสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* น่าจะมี AI-2 ละลายอยู่



รูปที่ 4.4 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารชะโคโลนีที่มีความเข้มข้น 20% (w/v) ในตัวทำละลาย ดิวเทอร์เรียมออกไซด์ *S'biom. meliloti* SM1021

อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบสัญญาณ AI-2 ในสารชะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จึงนำสารชะโคโลนีที่ได้ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการสร้าง AI-2 ของจุลินทรีย์ต่อไป

4.1.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ

วิธีทางชีวภาพ (Bioluminescence assay) เป็นวิธีมาตรฐานที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจสอบเฉพาะสัญญาณ AI-2 โดย *V. harveyi* BAA-1170 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ AI-2 (reporter strain) และตรวจสอบการเรืองแสง luminescence เมื่อนำสารชะโคโลนีมาทดสอบ หากในสารชะโคโลนีของแบคทีเรียที่มี AI-2 เป็นองค์ประกอบหลัก ค่าการเรืองแสง luminescence ของ *V. harveyi* ที่วัดในหน่วยของ Light Unit ด้วยเครื่อง multiplate reader mode luminescence จะมีค่ามากกว่าค่าการเรืองแสงของตัวอย่างควบคุม (negative control) ซึ่งรายงานในหน่วยของ % Activity ดังนั้นถ้าตัวอย่างที่ต้องการทดสอบนั้นสร้าง AI-2 ได้จริง % Activity จะมีค่ามากกว่า 100%

เมื่อนำสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ซึ่งได้ตรวจสอบด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปีว่าอาจมี AI-2 ละลายอยู่แล้วนั้น ตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพแสดงค่าการทดสอบเป็น % Activity ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า % Activity ของสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* มีค่าเท่ากับ 110.24% และ 115.59% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารชะโคโลนีที่สร้างจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มี AI-2 ละลายอยู่ในปริมาณที่สามารถกระตุ้นการเรืองแสงของ *V. harveyi* BAA-1117 (reporter strain) ได้ ในขณะที่สารชะโคโลนีของ *S'biium. meliloti* SM1021 ไม่แสดงผลการกระตุ้นการเรืองแสงของ *V. harveyi* BB170 พบว่า % Activity มีค่าต่ำกว่า 100% คือเท่ากับ 87.09% กล่าวได้ว่าในสารชะโคโลนีของ *S'biium. meliloti* SM1021 ไม่มี AI-2 ละลายอยู่ หรือ แบคทีเรียนี้ไม่สร้าง AI-2 ข้อสันนิษฐานเรื่องการปรากฏของฟีกที่ 1.75 ppm ดังนั้นผลการทดสอบด้วยวิธีทางชีวภาพสามารถใช้ในการสนับสนุน $^1\text{H-NMR}$ ได้ และยืนยันได้ว่าในสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* มี AI-2 ละลายอยู่

ตารางที่ 4.1 การตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์	% Activity
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	102.20 \pm 2.86
<i>V. parahaemolyticus</i> DMST 22093	115.59 \pm 1.46
<i>S'biium. meliloti</i> SM1021	87.09 \pm 2.11

4.2 ประเมินวิธีการตรวจสอบ AI-2 โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี

การทดลองนี้เพื่อประเมินหาสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ AI-2 เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีที่ตรวจวัดได้ เพื่อใช้เป็นปฏิกิริยาหลักที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี การประเมินนั้นอาศัยหลักการที่ว่าโครงสร้างที่สำคัญทางเคมีของ AI-2 นั้นมีหมู่ฟังก์ชันที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งได้แก่ 1,2-diol หมู่อะซิเตล และ/หรือ หมู่เอมีอะซิเตล ดังนั้นการประเมินวิธีการตรวจสอบ AI-2 นั้น จึงมุ่งเน้นไปที่การทำปฏิกิริยาการแทนที่หมู่ฟังก์ชันดังกล่าว และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับอะตอมของออกซิเจนในโครงสร้างของ AI-2 โดยที่ปฏิกิริยานั้นจะต้องให้ผลิตภัณฑ์สีที่สามารถตรวจวัดได้

อย่างรวดเร็วด้วย ซึ่งจะใช้เป็นเกณฑ์ในการเลือกเป็นปฏิกิริยาหลักสำหรับนำไปใช้เป็นวิธีตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีต่อไป

4.2.1 การทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4)

สารละลาย KMnO_4 เป็นสารพื้นฐานทั่วไปที่ใช้ในการตรวจสอบสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์ เนื่องจากสมบัติการเป็นตัวออกซิไดส์ (Oxidizing agent) จึงคาดว่า AI-2 ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์จะถูกออกซิไดส์โดยสารละลาย KMnO_4 ทำให้สีของสารละลาย KMnO_4 เปลี่ยนแปลง (คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์, 2548)

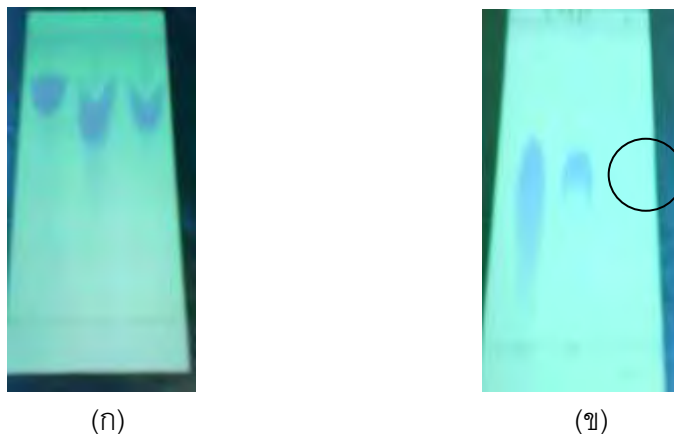
เมื่อทดลองทำปฏิกิริยาระหว่างสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 หรือ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ซึ่งได้ตรวจสอบด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) และวิธีทางชีวภาพก่อนหน้านี้แล้วว่ามี AI-2 ละลายอยู่ กับสารละลาย KMnO_4 โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย KMnO_4 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าสีม่วงของสารละลาย KMnO_4 เปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง และเมื่อพิจารณาว่าเมทาโบไลต์อื่นที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนีอาจเป็นตัวแทรกแซง หรือเป็นคู่แข่งในการทำปฏิกิริยา จึงทดลองนำน้ำตาลกลูโคส 0.5% มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย KMnO_4 พบว่าสีม่วงของสารละลาย KMnO_4 ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ได้ทดลองนำ AHL ซึ่งเป็นควอรัมเซนซิงที่ *V. parahaemolyticus* สร้างและขับออกมา นอกเซลล์มาทดลองทำปฏิกิริยาเดียวกันนี้ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม น้ำตาลกลูโคส และ AHL นั้นเป็นเพียงตัวแทนของเมทาโบไลต์ที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนี จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสีม่วงของสารละลาย KMnO_4 ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเกิดจากการทำปฏิกิริยา redox ระหว่างสารละลาย KMnO_4 กับ AI-2 ที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนี และเมื่อพิจารณาถึงแนวทางที่จะนำปฏิกิริยานี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ AI-2 ในระบบคัลเจอร์ จึงทดลองตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* ด้วยปฏิกิริยาเดียวกันนี้ พบว่าสีม่วงของสารละลาย KMnO_4 เปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงเช่นเดียวกับเมื่อทำปฏิกิริยากับสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* อาจเนื่องจาก KMnO_4 เมื่อทำปฏิกิริยากับไขมันไม่อิ่มตัว สีม่วงของสารละลาย KMnO_4 เปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง บ่งชี้ให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยากับสารละลาย KMnO_4 ที่ใช้ในการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์นั้น ไม่จำเพาะต่อ AI-2 จึงเป็นไปได้ยากที่จะพัฒนาเป็นวิธีการตรวจ AI-2 ในระบบคัลเจอร์ จึงต้องหาทางเลือกใหม่ในการศึกษาความเป็นไปได้ ต่อไป

ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย KMnO_4 ความเข้มข้น 0.01M จากการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างต่างๆ ในอัตราส่วน 1: 1

ปัจจัยหลัก	สภาวะที่ศึกษา	สีของสารละลาย
สารชะโคโลนี	<i>S. Typhimurium</i>	ชมพูแดง
	<i>V. parahaemolyticus</i>	ชมพูแดง
	<i>S'ibium. melliloti</i>	ชมพูแดง
เมทาโบไลต์	Glucose	ม่วง
	AHL	ม่วง
อาหารเลี้ยงเชื้อ	NB	ชมพูแดง

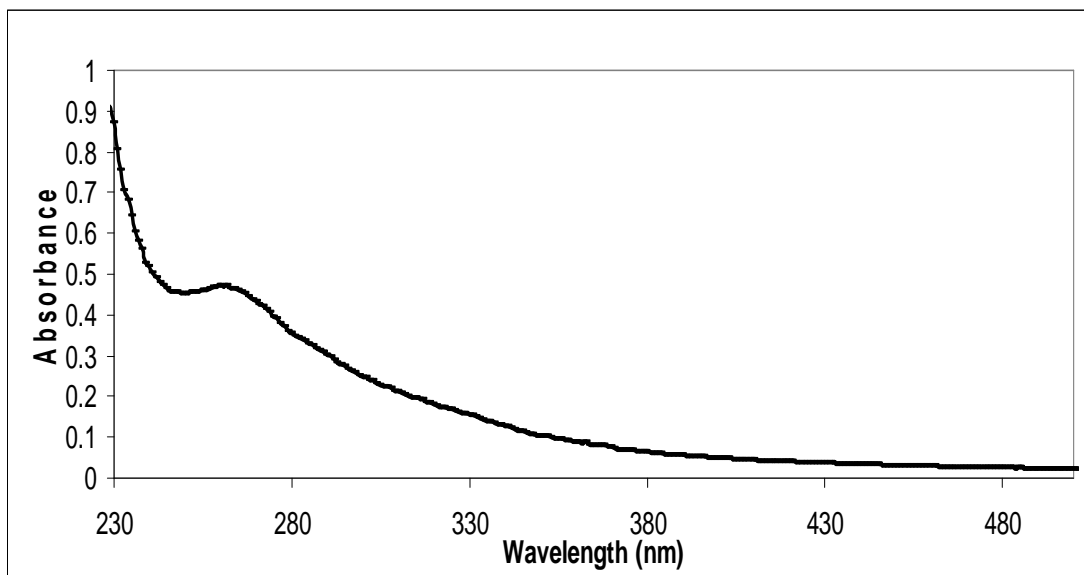
4.2.2 การทำปฏิกิริยากับ Boron trifluoride diethyletherate ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$)

Semmelhack et al (2004) ได้รายงานการสังเคราะห์สารประกอบ S-THMF-Borate ซึ่งเป็นควอร์มเซนซิงประเภท AI-2 ของ *V. harveyi* ดังได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 หน้า 21 ว่าควอร์มเซนซิงประเภท AI-2 ของ *S. Typhimurium* นั้นคือ R-THMF ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีไม่แตกต่างกันมาก ในการทดลองนี้จึงมีแนวคิดที่จะประเมินปฏิกิริยาระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ AI-2 เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโบรอนกับอะตอมของออกซิเจนในโครงสร้างของ AI-2 แล้วติดตามการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวจากสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ของโบรอน อย่างไรก็ตามในขั้นตอนของการประเมินปฏิกิริยานั้นจำเป็นต้องใช้สารชะโคโลนีที่มี AI-2 ละลายอยู่ปริมาณมาก และต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จึงเลือก Ascorbic acid เป็นสารต้นแบบในการประเมินปฏิกิริยานี้ เนื่องจาก Ascorbic acid นั้นมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ AI-2 และมีหมู่ฟังก์ชันที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ดังกล่าวไปข้างต้น เมื่อทดลองทำปฏิกิริยาระหว่าง Ascorbic acid กับ $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ โดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC (รูปที่ 4.5) พบว่าปฏิกิริยาสิ้นสุดลงที่ 24 ชั่วโมง โดยสังเกตได้จากจุด (spot) ของสารละลายที่กำลังดำเนินปฏิกิริยา จะหายไปที่ชั่วโมงที่ 24 แสดงให้เห็นว่าสารตั้งต้นได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ทั้งหมดแล้ว

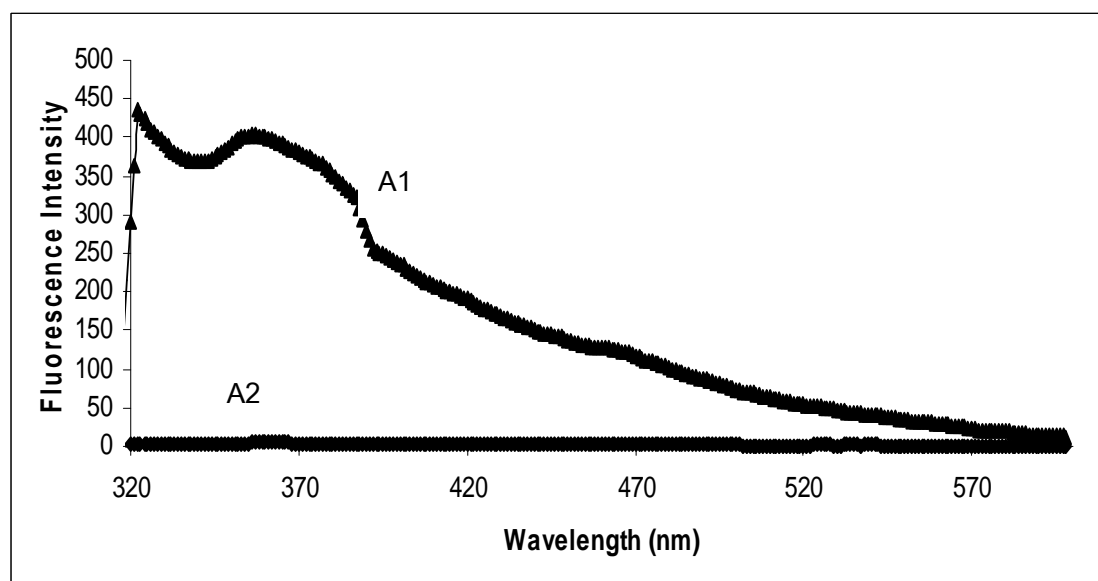


รูปที่ 4.5 การตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี TLC (ก) 30 นาที (ข) สิ้นสุดปฏิกิริยา (24 ชั่วโมง)

เมื่อนำสารละลายที่ได้ซึ่งผ่านการระเหยตัวทำละลายไปตรวจสอบการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต และวิธีเบ็ด ปรากฏสเปกตรัมการดูดกลืนแสงดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบพีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร และเมื่อตรวจสอบการเรืองแสง Fluorescence โดยกระตุ้นที่ความยาวคลื่น (excitation wavelength) 260 นาโนเมตร ปรากฏสเปกตรัมการเรืองแสง Fluorescence ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ Ascorbic acid นั้นมีสมบัติการเรืองแสง Fluorescence ซึ่งเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร จากผลการทดลองดังกล่าวนี้บ่งชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจสอบ AI-2 โดยวัดการเรืองแสง Fluorescence ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ AI-2

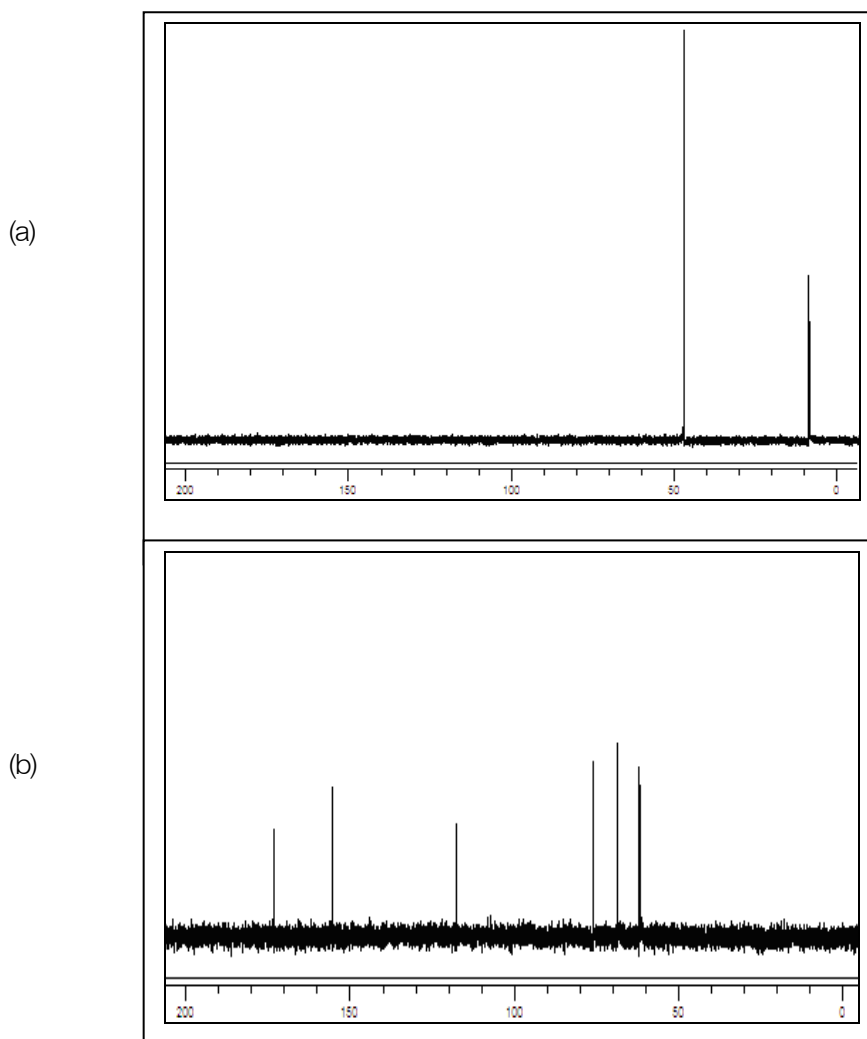


รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น UV-VIS ของสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ Ascorbic acid โดยมีตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล และ ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลาย



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมการเรืองแสง Fluorescence ของสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ Ascorbic acid โดยมีตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล และ ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลาย และ Excitation wavelength ที่ 260 นาโนเมตร (A1) และ สเปกตรัมของ Ascorbic acid (A2) ซึ่งไม่พบค่าการเรืองแสง fluorescence

อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารละลายนี้ไปแยกสารให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมโครมาโทกราฟี (Column chromatography) เพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกโตรสโกปีปรากฏสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.8 (a) พบพีคที่ค่า chemical shift 47.92 และ 9.87 ppm และเมื่อนำสเปกตรัมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของ Ascorbic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นดังแสดงในรูปที่ 4.8 (b) พบพีคที่ค่า chemical shift 173.10, 155.22, 117.77, 76.12, 68.85 และ 62.03 ppm

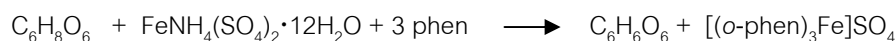


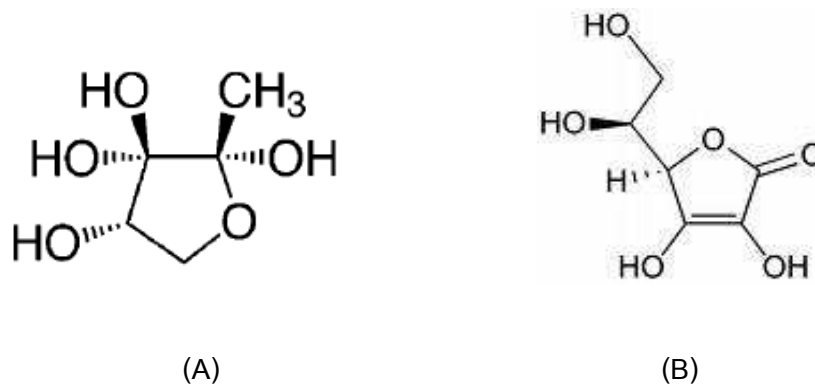
รูปที่ 4.8 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา ระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ Ascorbic acid (a) และ Ascorbic acid (b) ในตัวทำละลาย D_2O

Bayon และคณะ (2000) รายงานการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโบรอนกับอะตอมออกซิเจนของ catechol (catecholborane) และ Semmelhack และคณะ (2005) รายงานการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโบรอนกับอะตอมออกซิเจนของ tetrahydroxytetrahydrofuran (tetrahydroxytetrahydrofuran-borate) ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ Ascorbic acid ในการทดลองนี้จึงคาดว่าจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโบรอนกับอะตอมออกซิเจนในโครงสร้างของ AI-2 ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นนั้นต้องมีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 6 อะตอม ซึ่งจะต้องเท่ากับจำนวนคาร์บอนของ Ascorbic acid โดยเมื่อพิจารณา $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของ Ascorbic acid นั้นพบพีค 6 พีค และตำแหน่งของแต่ละพีคนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Albertino และคณะ (2009) ซึ่งรายงานว่าสเปกตรัมของ Ascorbic acid จะมีพีคของคาร์บอนจำนวน 6 พีค แต่เมื่อพิจารณา $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ กับ Ascorbic acid พบพีคเพียง 2 พีค รวมทั้งตำแหน่งพีคที่ปรากฏแตกต่างจากสารตั้งต้น จากผลการพิสูจน์โครงสร้างบ่งชี้ได้ว่าสารประกอบที่เกิดขึ้นนั้นไม่เป็นไปตามสมมติฐาน นอกจากนี้การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ascorbic acid กับโบรอนต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมง จึงเป็นไปได้ยากในการนำวิธีการนี้ไปพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 ให้เป็นวิธีแบบง่ายและรวดเร็ว จึงหาทางเลือกใหม่ในการศึกษาความเป็นไปได้ต่อไป

4.2.3 การทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

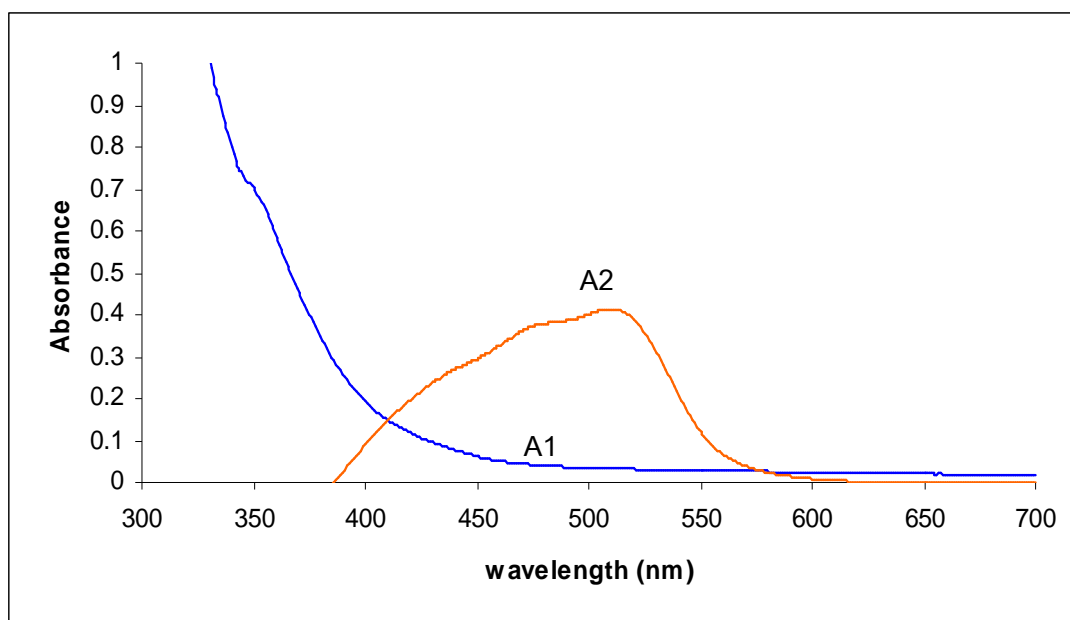
เมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างจะเห็นได้ว่า AI-2 มีความคล้ายคลึงกับ Ascorbic acid ดังแสดงในรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าสารทั้ง 2 ชนิดมีโครงสร้างแบบ furanone และมีหมู่ไฮดรอกซิล (dihydroxy) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่จะเกิดปฏิกิริยาการแทนที่กับโลหะในระนาบเดียวกัน (one-dimension) เป็นผลให้สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีความเสถียร จึงคาดว่า AI-2 น่าจะมีสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่นเดียวกับ Ascorbic acid ดังนั้นจึงเลือกวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ Ascorbic acid โดยการทำให้ปฏิกิริยา metal ion reduction ที่รายงานโดย Besada (1987) มาประเมินเป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ระหว่าง Ascorbic acid กับ Ferric ammonium sulfate ในสภาวะที่มี 1,10-phenanthroline ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่เป็นสารละลายสีน้ำตาลเหลือง โดย Ascorbic acid รีดิวซ์ Fe(III) ไปเป็น Fe(II) ในรูปของ Ferriin ($[(o\text{-phen})_3\text{Fe}]\text{SO}_4$) ที่มีสมบัติการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง





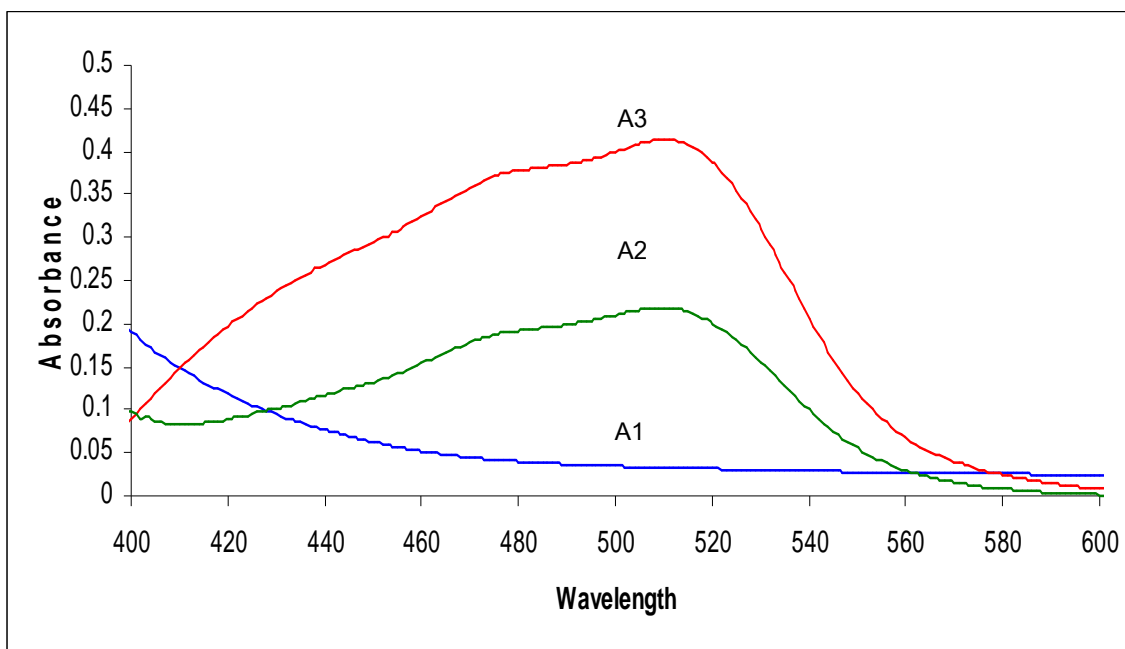
รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของ AI-2 (A) Ascorbic acid (B)

เมื่อประเมินปฏิกิริยาเบื้องต้นโดยการผสม Ascorbic acid กับ Fe (III)-1,10-phenanthroline พบว่าสารละลายสีน้ำตาลเหลืองของ Fe (III)-1,10-phenanthroline เปลี่ยนเป็นสีส้มแดงภายใน 1-2 นาที และเมื่อนำสารละลายดังกล่าวมาตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ปรากฏสเปกตรัมที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (สเปกตรัม A2 รูปที่ 4.10) ในขณะที่สเปกตรัมของรีเอเจนต์นั้นไม่พบสารประกอบที่มีสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าว (สเปกตรัม A1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Onishi และคณะ (1964)



รูปที่ 4.10 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction โดย Fe(III)-1,10-phenanthroline (A1) และสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ascorbic acid และ Fe(III)-1,10-phenanthroline (A2)

เมื่อทดลองนำสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าน่าจะมี AI-2 ละลายอยู่ด้วย $^1\text{H-NMR}$ สเปกโตรสโกปี และ วิถีทางชีวภาพเบื้องต้นจากข้อ 4.1 มาทดลองทำปฏิกิริยา metal ion reduction ตามที่ประเมินโดยใช้ Ascorbic acid เป็นสารตัวแทนข้างต้น ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าสารประกอบที่เกิดขึ้นนั้นมีสมบัติการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร (สเปกตรัม A2) เช่นเดียวกับ Ascorbic acid (สเปกตรัม A1) จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากปฏิกิริยาของ Fe (III)-1,10-phenanthroline กับสารที่มีสมบัติใกล้เคียงกับ Ascorbic acid นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการสร้าง หรือไม่สร้าง Ascorbic acid ของแบคทีเรีย (Rao และ Sureshkumar, 2000) ดังนั้นบ่งชี้ได้ว่าปฏิกิริยา metal ion reduction น่าจะสามารถนำไปพัฒนาต่อไปเป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่สร้างจากจุลินทรีย์ได้



รูปที่ 4.11 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา metal ion reduction โดย Fe(III)-1,10-phenanthroline (A1) สารประกอบที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ Fe(III)-1,10-phenanthroline (A2) และสารประกอบที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ascorbic acid และ Fe(III)-1,10-phenanthroline (A3)

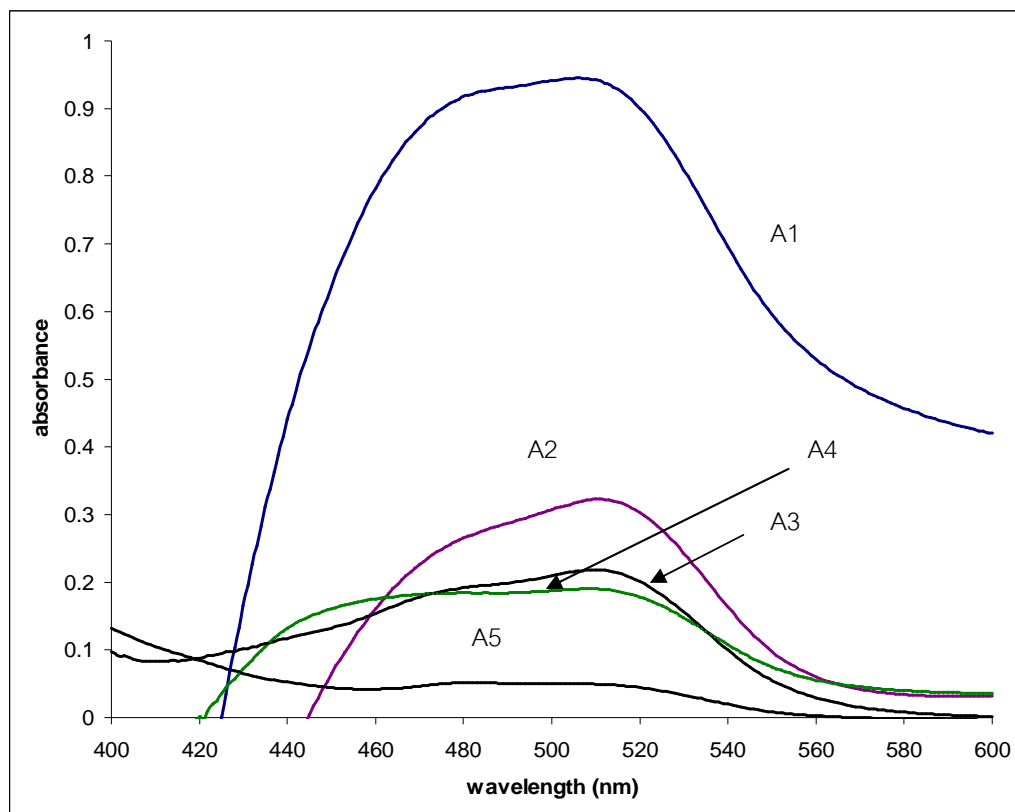
4.3 พัฒนาการตรวจสอบ AI-2 จาก *S. Typhimurium* ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

จากการประเมินปฏิกิริยาเคมีที่จะใช้ในการตรวจสอบ AI-2 จากจุลินทรีย์ พบว่าปฏิกิริยา metal ion reduction โดยใช้ Fe(III)-1,10-phenanthroline ทำปฏิกิริยากับ AI-2 เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีที่ตรวจวัดได้ จึงนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่สร้างจากจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยเริ่มต้นจากการตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยากับ AI-2 โดยนำสารชะโคโลนี และคัลเจอร์ของแบคทีเรียที่สร้าง และไม่สร้าง AI-2 มาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาดังกล่าว เปรียบเทียบกับวิธีทางชีวภาพ ดังการทดลองต่อไปนี้

4.3.1 ปฏิกิริยา metal ion reduction กับสารชะโคโลนีของแบคทีเรีย

เมื่อนำสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่า AI-2 ละลายอยู่ด้วยวิธีทางชีวภาพ และ $^1\text{H-NMR}$ รวมทั้งสารชะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการสร้าง AI-2 (Winzer และคณะ, 2003; Bassler, 1999) มาทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline และตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Fe(III)-1,10-phenanthroline กับสารที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้าง AI-2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* มีค่า OD_{510} เท่ากับ 0.95 (A1), 0.33 (A2), 0.22 (A3) และ 0.19 (A4) ตามลำดับ

เพื่อเป็นการยืนยันว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้เกิดเนื่องจากเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงได้ทดลองนำสารชะโคโลนีของ *S. *bium. meliloti** ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าไม่สร้าง AI-2 (Pereira et al., 2008) มาทดลองทำปฏิกิริยาเดียวกันนี้ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.12 (A5) พบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร



รูปที่ 4.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ตรวจสอบ AI-2 ในสารชะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* (A1) ,*S. aureus* (A2), *S. Typhimurium* (A3), *E. coli* (A4) และ *S'biium. meliloti* (A5) ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ประเมินนี้สามารถตรวจสอบ AI-2 ที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนีได้จริง จึงนำสารชะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้าง และไม่สร้าง AI-2 ชุดเดียวกันมาตรวจสอบยืนยันการมี AI-2 ละลายอยู่ด้วยวิธีทางชีวภาพ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า % Activity ของสารชะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* มีค่าเท่ากับ 115.59%, 108.44%, 102.20% และ 100.77% ตามลำดับ เห็นได้ว่าสารชะโคโลนีจากแบคทีเรียที่มีรายงานว่าจะสร้าง AI-2 มีค่า % Activity มากกว่า 100% ทั้งหมด และที่น่าสนใจคือ ค่า % Activity ที่ตรวจวัดได้กับค่า OD₅₁₀ มีความสัมพันธ์กัน *V. parahaemolyticus* สร้าง AI-2 ได้ % Activity สูงสุด 115.59% และวัดค่า OD₅₁₀ ก็ได้ค่าสูงสุด คือ 0.95 ในขณะที่ *S. aureus* และ *S. Typhimurium* สร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้รองลงมาตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบสารชะโคโลนีของ *S'biium. meliloti* จะเห็นได้ว่าค่า %Activity ต่ำกว่า 100% ในทำนองเดียวกัน

เมื่อตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา metal ion reduction ไม่พบสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ OD₅₁₀ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสารชะโคโลนีของแบคทีเรียที่ไม่มี AI-2 ละลายอยู่ (หรือแบคทีเรียที่ไม่สร้าง AI-2)

ตารางที่ 4.3 การตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้าง และไม่สร้าง AI-2 ด้วยวิธีทางชีวภาพ

สมบัติการสร้าง	ชนิดจุลินทรีย์	% Activity
สร้าง AI-2	<i>V. parahaemolyticus</i> DMST 22093	115.59 ± 1.46
	<i>S. aureus</i> ATCC 65388	108.44 ± 4.37
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	102.20 ± 2.86
	<i>E. coli</i> ATCC 4212	100.77 ± 2.07
ไม่สร้าง AI-2	<i>S'biium. melloti</i> SM1021	87.09 ± 2.11

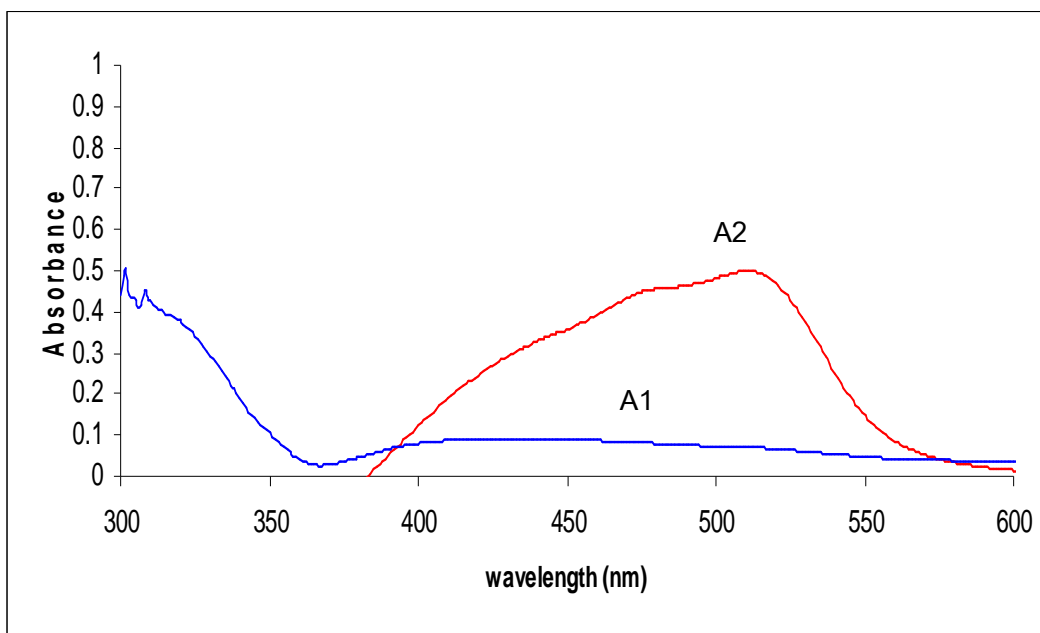
จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นแนวโน้มที่ชัดเจนว่าสารที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนีที่มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา metal ion reduction น่าจะเกิดจาก AI-2 เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา metal ion reduction ในระบบสารชะโคโลนีมีความจำเพาะกับ AI-2 เพียงพอที่จะใช้ในการตรวจสอบ ได้ว่าปฏิกิริยาดังกล่าวน่าจะมีความจำเพาะกับ AI-2 เพียงพอที่จะใช้ในการตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

4.3.3 ปฏิกิริยา metal ion reduction กับ AI-2 ที่สร้างในระบบคัลเจอร์ของแบคทีเรีย

จากการพิสูจน์ข้างต้นแล้วว่าปฏิกิริยา metal ion reduction สามารถใช้ในการตรวจสอบ AI-2 ที่ละลายอยู่ในสารชะโคโลนีได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* มักจะศึกษาในระบบการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้วนำคัลเจอร์ของเชื้อมาตรวจสอบ AI-2 (Surette และ Bassler, 1998) ดังนั้นในการทดสอบนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ปฏิกิริยา metal ion reduction ในการตรวจสอบ AI-2 ในระบบคัลเจอร์ที่แยกเซลล์ออกแล้ว การทดลองนี้เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีทางสเปกโตรโฟเมทรีที่พัฒนาขึ้นมาสามารถตรวจสอบ AI-2 ในระบบคัลเจอร์ได้

ในงานวิจัยนี้การตรวจสอบ AI-2 ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะตรวจสอบในระบบคัลเจอร์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเปปโตเนน 1% ดังนั้นจึงทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Fe(III)-1,10-phenanthroline กับ AI-2 โดยละลาย Ascorbic acid ในอาหารเปปโตเนน 1% เป็นตัวทดสอบก่อนเมื่อนำสารละลาย Ascorbic acid ในอาหารเปปโตเนน 1% มาทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-

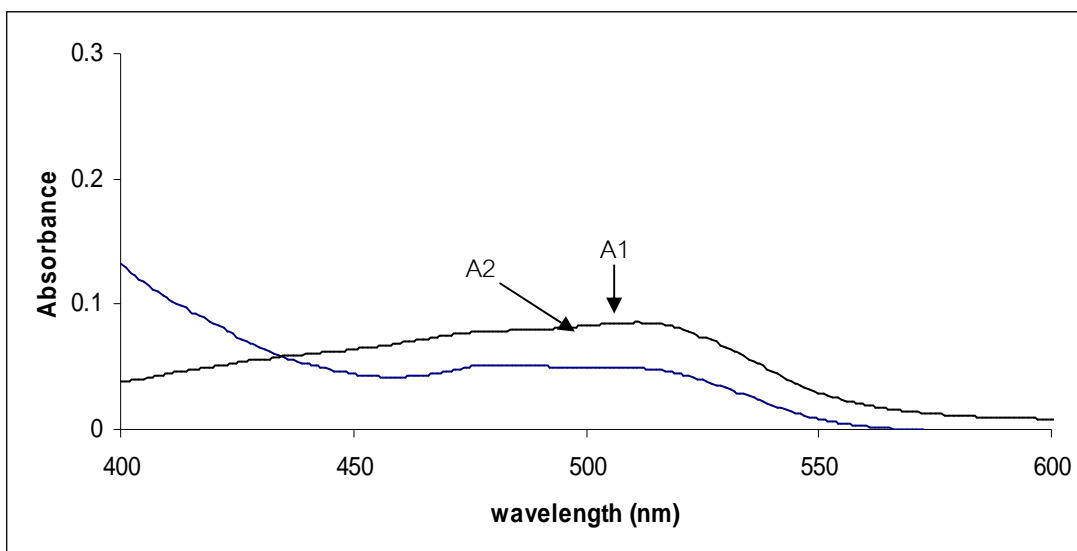
phenanthroline พบว่า Ascorbic acid ที่ละลายอยู่ในอาหารเปปโติน 1% สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ผลิตภัณฑ์สีส้มแดง และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13 ปราบกฏสเปกตรัมที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (สเปกตรัม A2) เช่นเดียวกับการตรวจสอบ Ascorbic acid ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น และเมื่อนำอาหารเปปโติน 1% มาทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline โดยตรง พบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร แต่สเปกตรัมที่ได้มีลักษณะเป็นเนินสูงกว่า Baseline (สเปกตรัม A1) ซึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ AI-2 สามารถตัดค่าดูดกลืนแสงดังกล่าวออกได้ด้วยระบบ set blank ของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าปฏิกิริยานี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้



รูปที่ 4.13 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction อาหารเปปโติน 1% (A1) และของ Ascorbic acid (A2)

เมื่อนำส่วนใสคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* มาทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline โดยใช้ เปปโติน 1% ที่ทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline เป็น blank และตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร ซึ่งมีค่า OD เท่ากับ 0.09 ในขณะที่เมื่อนำ

คัลเจอร์ของ *S'biium. melliloti* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้าง AI-2 มาทำปฏิกิริยาเดียวกันนี้ พบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร



รูปที่ 4.14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction คัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* (A1) และ *S'biium. melliloti* (A2)

เมื่อนำส่วนใสคัลเจอร์ของแบคทีเรียทั้งสองนี้ไปตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อเป็นการยืนยันว่าในส่วนใสของคัลเจอร์ของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมี AI-2 อยู่หรือไม่ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า % Activity ของคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* มีค่าเท่ากับ 126.52 ซึ่งมีค่ามากกว่า 100% กล่าวคือในคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* มี AI-2 ละลายอยู่ในขณะที่ % Activity ของคัลเจอร์ของ *S'biium. melliloti* มีค่าเท่ากับ 82.97 ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 100% แสดงว่าในคัลเจอร์ของ *S'biium. melliloti* ไม่มี AI-2

จากผลการตรวจสอบ AI-2 ในการทดลองนี้ สามารถยืนยันได้ว่าวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ประเมินได้นี้สามารถตรวจสอบ AI-2 ในระบบคัลเจอร์ได้เช่นเดียวกับการตรวจสอบ AI-2 ในระบบของสารชะโคโลนี แม้ว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบ AI-2 ในระบบสารชะโคโลนี เนื่องจากสารชะโคโลนีถูกเตรียมในลักษณะของการชั่ง (หน่วยเป็นกรัม) ย่อมมีเซลล์จำนวนมากกว่าหลายเท่าเมื่อเทียบกับการเตรียมส่วนใสของคัลเจอร์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพียง 10^9

ถึงแม้ว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นในระบบคัลเจอร์จะมีสมบัติการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร ซึ่งบ่งชี้ว่าการทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline มีความจำเพาะกับ AI-2 และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้เกิดเนื่องจากเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งบ่งชี้จากผลการทดสอบในคัลเจอร์ของ *S' bium. meliloti* อย่างไรก็ตามได้ทดลองพิสูจน์เพิ่มเติมว่าไม่มีเมตาบอไลต์ใดแทรกแซงปฏิกิริยาการตรวจสอบในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 4.4 การตรวจสอบสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์วิธีทางชีวภาพ

สมบัติการสร้าง AI-2	ชนิดจุลินทรีย์	% Activity
สร้าง AI-2	S. Typhimurium ATCC 13311	126.52 ± 0.37
ไม่สร้าง AI-2	<i>S' bium. meliloti</i>	82.97 ± 2.58

4.3.4 การตรวจสอบสารแทรกแซงปฏิกิริยาของสารที่มีในระบบคัลเจอร์ (Interference)

การทดลองนี้เพื่อพิสูจน์เพิ่มเติมว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่ละลายในสารชะโคโลนี หรือคัลเจอร์ของจุลินทรีย์ที่สร้าง AI-2 ซึ่งให้การดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตรไม่ได้เกิดจากการเข้าทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline ของเมตาบอไลต์ของจุลินทรีย์ในระหว่างการเจริญ รวมทั้งสารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ มักได้แก่

Acetate, Alpha-ketoglutarate, Homoserine lactone (AHL), Keto acids, glucose และ Amino acid (Surette และคณะ, 1998; Lansing และคณะ, 1999) ซึ่งเมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ (ตารางที่ 4.5) จะเห็นได้ว่าเป็นสารประกอบที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) จึงทดลองนำ Ammonium acetate ซึ่งเป็นตัวแทนของ เมตาบอไลต์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ เมตาบอไลต์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล รวมถึงสัญญาณควอร์มเซนซิงชนิดอื่น ได้แก่ AHL ซึ่งเป็นสารที่ถูกขับออกมาออกเซลล์ในแบบที่เรียบง่ายชนิด มาทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าไม่มีสารใดที่ทำปฏิกิริยาแล้วให้สารผสมที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

เมื่อนำสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปปโตน 1% ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0.5% โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5% และ เปปโตนความเข้มข้น 1% มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดจาก น้ำตาล

กลูโคส และ โซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลึกพันธ์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ในขณะที่เปปโติน นั้นพบว่ามีการดูดกลืนแสงเกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 370-600 นาโนเมตร แต่สเปกตรัมที่ปรากฏนั้นไม่มีลักษณะเป็นพีคสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร กล่าวคือมีเนินสูงกว่า baseline แต่สามารถแก้ไขได้โดย set blank (เหมือนดังกล่าวในข้อ 4.3.3) เมื่อตรวจสอบ AI-2 ในคัลเจอร์ที่เพาะเลี้ยงเปปโติน 1%

ตารางที่ 4.5 เมทาโบไลต์ที่ขับออกมานอกเซลล์ในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์

เมทาโบไลต์	โครงสร้าง
acetate	
glucose	
alpha-ketoglutarate	
homoserine lactone (AHL)	
keto acids pyruvate	
amino acid	

ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{510}) ของสารหลังจากทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

สารที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา	OD_{510}	
สารที่ใช้เป็นตัวแทนสาร	Ammonium acetate	0
เมทาบอลไลท์	Sodium hydroxide	0
	<i>N</i> -(β -ketocaproyl)-homoserine	0
	lactone	0
	Glucose	0
สารที่เป็นองค์ประกอบของ	Sodium chloride	0
เปปโตน 1%	Glucose	0
	Peptone	0.1

นอกจากนี้ Guclu และคณะ (2005) ได้นำสารประกอบ ได้แก่ Oxalate, Tannia acid, riboflavin, Uric acid, Citrate, Pyrogallol, Glutamic acid, Nitrite, Acetyl, Salicylic acid ซึ่งอาจเป็นสารที่ปรากฏในคัลเจอร์ มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับ Fe(III)-1,10-phenanthroline พบว่าสารต่างๆเหล่านี้ไม่มีผลแทรกแซงปฏิกิริยาดังกล่าว ดังนั้นจากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสามารถใช้วิธีการตรวจสอบ AI-2 ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยอาศัยปฏิกิริยา metal ion reduction ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Fe(III)-1,10-phenanthroline กับ AI-2 ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นได้ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้ ปิเปต Fe(III)-1,10-phenanthroline (รีเอเจนต์) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีคัลเจอร์ที่แยกเซลล์ออกแล้ว ผสม ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วกรองสารประกอบสีที่เกิดขึ้นด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ภายใน 3 นาที โดยมีสารประกอบที่เกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อกับรีเอเจนต์เป็น blank

4.4 การประยุกต์ใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีในการศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium*

การทดลองนี้นำวิธีการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัย ดังสรุปไว้ในข้อ 4.3 มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* โดยเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวภาพ หรือเปรียบเทียบผลกับรายงานวิจัยก่อนหน้า เพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการ

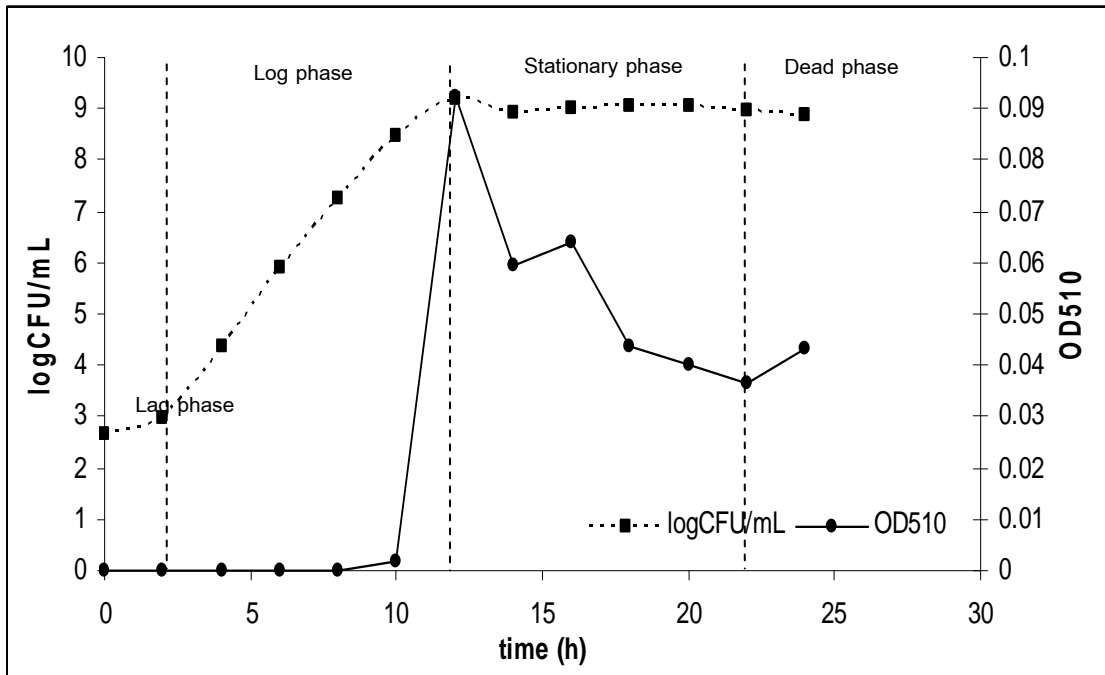
ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนา รวมทั้งเพื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงหน้าที่ของ AI-2 ต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์บางประการของ *S. Typhimurium* ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

4.4.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium*

4.4.1.1 ระยะเวลาเจริญกับการสร้าง AI-2

การทดลองนี้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาเจริญกับการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า โดยเฉพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* DMST 28914 ในอาหาร เปปโตน 1% ที่มีน้ำตาล 0.5% และเกลือ 0.5% ซึ่งเป็นภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรายงานว่าเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* เพื่อให้สร้าง AI-2 (Surette และ Bassler, 1999) ให้มีเซลล์เริ่มต้น $2 \log\text{CFU/ml}$ ติดตามการสร้าง AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี และจำนวนประชากรทุก 2 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 โดยพบว่าในระหว่างการเจริญของ *S. Typhimurium* จะเริ่มตรวจวัด AI-2 ได้เมื่อเซลล์ของ *S. Typhimurium* มีจำนวนประชากรเท่ากับ $8.45 \log\text{CFU/ml}$ ซึ่งเจริญอยู่ในช่วงกลางของ log phase (ชั่วโมงที่ 10) โดยมีค่า OD_{510} เท่ากับ 0.0016 ± 0.000 หลังจากนั้น *S. Typhimurium* มีจำนวนประชากรขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ $8.94 \log\text{CFU}$ โดยมีค่า OD_{510} เท่ากับ 0.0922 ± 0.012 ซึ่งเป็นช่วงปลายของ log phase และเมื่อเจริญเข้าสู่ stationary phase ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Surette และ คณะ (1999) ที่พบการสร้าง AI-2 ในช่วงกลาง log phase (ตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ) และเพิ่มขึ้นไปสูงสุดจนถึงช่วงปลายของ log phase และเมื่อเข้าสู่ stationary phase AI-2 ลดลงทันที ทั้งนี้เนื่องจาก AI-2 เป็นควอรัมเซนซิงประเภทที่ถูกสร้างแบบสะสมแบบชั่วคราว (Temporary accumulation) โดยในสภาวะขาดน้ำตาลซึ่งปกติจะอยู่ในช่วงปลายของ log phase จะหยุดกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ใช้ในช่วงแรกของการเจริญเพื่อประหยัดพลังงาน แล้วเปลี่ยนเส้นทางเข้าสู่เมตาบอลิซึมหลัก เพราะการสร้าง AI-2 นั้นขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์โบไฮเดรต และข้อสันนิษฐานอีกข้อหนึ่ง คือ เพื่อป้องกันการสะสมสารพิษภายในเซลล์ เนื่องจากในระหว่างกระบวนการสร้าง AI-2 นั้นจะมีการสร้าง 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (MHF)/ 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF) ก่อน ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นในระหว่างเส้นทางการเปลี่ยนไปเป็น AI-2 และ DMHF เป็น DNA-damaging agents และ mutagenic ต่อ *S. Typhimurium* ดังนั้นเมื่อสร้าง AI-2 สะสมในเซลล์ปริมาณเพิ่มมากขึ้น ก็อาจจะเป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงต้องยุติการสร้าง AI-2 ในขณะเดียวกันสารที่ถูกส่งออกไปก็ถูกใช้

หมด ค่า AI-2 จึงลดลงทันที ดังที่ปรากฏในผลการทดลองนี้ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้าง AI-2 กับระยะการเจริญที่ตรวจสอบด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีนั้นสอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้าง AI-2 กับระยะการเจริญที่ตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพราะฉะนั้นบ่งชี้ได้ว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบ AI-2 ในระหว่างระยะการเจริญได้เช่นเดียวกับวิธีมาตรฐาน

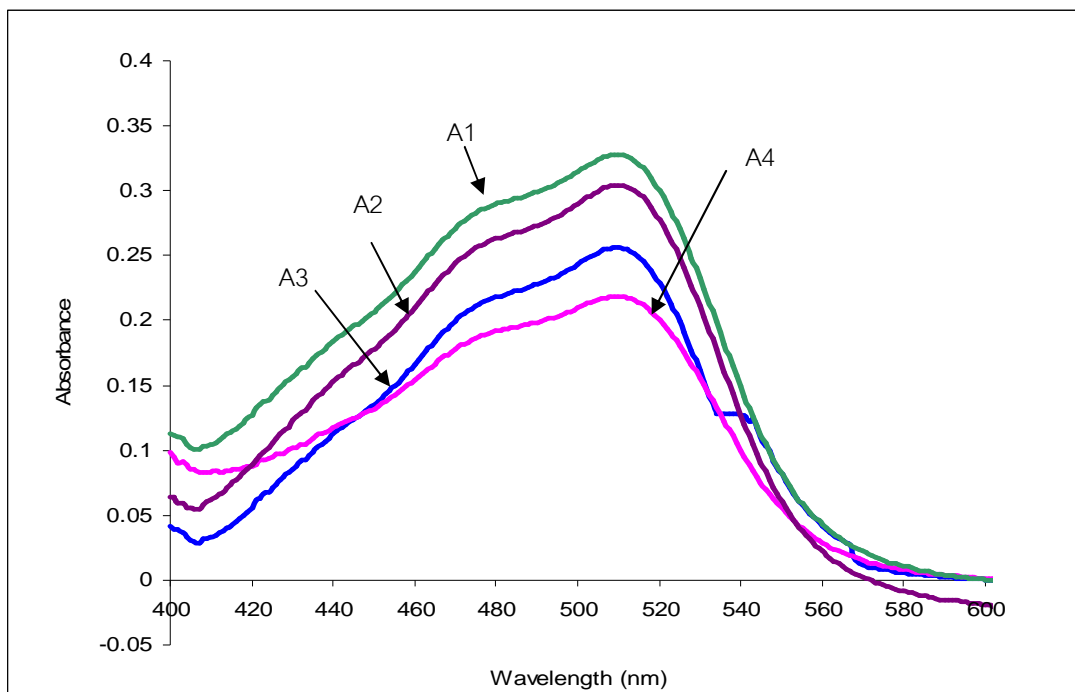


รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญกับการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* DMST 28914 ที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

4.4.1.2 สายพันธุ์ *S. Typhimurium* กับการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้

การทดลองนี้เพื่อเปรียบเทียบสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบผลกับวิธีทางชีวภาพ เมื่อนำสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่มีความเข้มข้น 20% (w/v) มาตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทาง สเปกโตรโฟโตเมทรี ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่าสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ กล่าวคือ ปริมาณ AI-2 ในสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ที่ตรวจวัดในค่า OD₅₁₀ มีค่าสูงสุด คือ 0.33 และ สารชะโคโลนีของ

S. Typhimurium ATCC 14028 , S. Typhimurium DMST 28913 และ S. Typhimurium DMST 28914 มีค่าต่ำกว่า คือ 0.30, 0.26 และ 0.22 ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา metal ion reduction ของสารชะโคโลนีของ S. Typhimurium ATCC 13311 (A1), S. Typhimurium ATCC 14028 (A2), S. Typhimurium DMST 28913 (A3) และ S. Typhimurium DMST 28914 (A4)

เมื่อนำสารชะโคโลนีดังกล่าวนี้มาตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางชีวภาพ พบว่าปริมาณ AI-2 ที่วัดในค่า % Activity มีความสอดคล้องกับ OD₅₁₀ โดยพบว่าสารชะโคโลนีของ S. Typhimurium ATCC 13311 กระตุ้นการเรืองแสงของจุลินทรีย์สายพันธุ์จำเพาะที่ตอบสนองต่อเฉพาะสัญญาณทางเคมีประเภท AI-2 ได้สูงสุดถึงประมาณ 119.38% และ สารชะโคโลนีของ S. Typhimurium ATCC 14028 , S. Typhimurium DMST 28913 และ S. Typhimurium DMST 28914 มีค่าเท่ากับ 108.04%, 104.91% และ 102.20% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 สมบัติการสร้าง AI-2 จากสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีทางชีวภาพเปรียบเทียบกับวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

จุลินทรีย์	% Activity	OD ₅₁₀ ^E
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	119.38 ± 3.75 ^a	0.33 ± 0.011 ^a
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	108.04 ± 3.83 ^b	0.30 ± 0.008 ^b
<i>S. Typhimurium</i> DMST 28913	104.91 ± 1.47 ^{bc}	0.26 ± 0.011 ^c
<i>S. Typhimurium</i> DMST 28914	102.20 ± 2.86 ^c	0.22 ± 0.004 ^d

^E ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

a,b,c,d ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากผลการตรวจสอบสมบัติการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้ ของ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่ามีความสอดคล้องกับวิธีทางชีวภาพ ผลการทดลองจึงมีความน่าเชื่อถือเพียงพอที่จะสรุปได้ว่า *S. Typhimurium* แต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่างๆกันของ *S. Typhimurium* ที่กำลังได้รับความสนใจอยู่ในปัจจุบัน

4.4.1.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงกับสมบัติการสร้าง AI-2

มีรายงานว่านอกเหนือจากจำนวนประชากรที่มีผลต่อการสร้าง AI-2 แล้ว สภาวะการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการสร้าง AI-2 ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์โบไฮเดรต และความเข้มข้นของเกลือ นั้นก็มีผลต่อการสร้าง AI-2 ใน *S. Typhimurium* (Surette และ Bassler, 1999)

ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาปัจจัยของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* โดยประยุกต์ใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีในการตรวจวัด AI-2

4.4.1.3.1 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกันที่มีจำนวนประชากรเท่ากับ $9 \log\text{CFU/mL}$ ซึ่งได้แก่ LB NB และ เปปโตเน 1% มาตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่าค่า OD_{510} ที่บ่งชี้ปริมาณของ AI-2 จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร LB และ NB มีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด *S. Typhimurium* สร้างในปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีได้ในขณะที่ค่า OD_{510} ที่ตรวจในคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* DMST 28913 และ *S. Typhimurium* DMST 28914 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Peptone 1% มีค่าเท่ากับ 0.12, 0.09, 0.07 และ 0.10 ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *S. Typhimurium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NB และ LB นั้นไม่สร้าง AI-2 แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาอิทธิพลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้าง AI-2 ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แต่เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลองพบว่า มีเพียงอาหาร เปปโตเน 1% เท่านั้นที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% ซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ ในขณะที่อาหาร LB และ NB ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก Surette และ Bassler (1999) รายงานว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตนั้นมีอิทธิพลโดยตรงต่อการสร้าง AI-2 โดยในสภาวะที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อเกินพอจะตรวจพบการสร้าง AI-2 ในคัลเจอร์ แต่เมื่อเข้าสู่สภาวะที่แหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด จะตรวจไม่พบการสร้าง AI-2 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการตรวจไม่พบการสร้าง AI-2 ในคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร LB และ NB อาจเนื่องจากในอาหารทั้งสองชนิดนี้ไม่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตมากเพียงพอที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ

ซึ่งผลการทดลองนี้จึงตรวจพบการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เปปโตเน 1% เพียงชนิดเดียว ประกอบกับสีของ NB และ LB มีความเข้มกว่า Peptone ซึ่งจะทำให้ background ของระบบสูงขึ้น Sensitivity ของการตรวจวัดจึงลดลง ซึ่งก็เป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งของวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี และผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานดังกล่าว อย่างไรก็ตามดังที่กล่าวในข้างต้นการตรวจไม่พบ AI-2 ที่บ่งชี้ในค่า OD_{510} เท่ากับ 0 ไม่ได้แสดงว่า *S. Typhimurium* ไม่สร้าง AI-2 ใน NB และ LB เท่านั้น แต่เป็นไปได้ว่า AI-2 ถูกสร้างในปริมาณน้อยจนวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีตรวจสอบไม่ได้

ตารางที่ 4.8 การสร้าง AI-2 จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกันที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ^E			
	ATCC 13311	ATCC 14028	DMST 28913	DMST 28914
Luria Bertani (LB)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Nutrient Broth (NB)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
เปปโตน 1%	0.12 ± 0.09	0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01

^E ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

4.4.1.3.2 ชนิดแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร เปปโตน 1% ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างกัน 0.5% ซึ่งได้แก่ กลูโคส อะราบิโนส และ กาแลกโตส มาตรวจสอบ AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าค่า OD₅₁₀ ที่ตรวจวัดได้จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Peptone 1% ที่เติมกลูโคส อะราบิโนส และกาแลกโตสไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยมีค่าเท่ากับ 0.12, 0.08 และ 0.09 ตามลำดับ ส่วนค่า OD₅₁₀ ที่ตรวจวัดได้จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Peptone 1% ที่เติมกลูโคส อะราบิโนส มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยมีค่าเท่ากับ 0.09 และ 0.06 ตามลำดับ แต่การเพาะเลี้ยงในกาแลกโตสพบการสร้าง AI-2 สูงกว่าน้ำตาลอะราบิโนส แต่ไม่ต่างจากการเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า OD₅₁₀ สูงถึง 0.14 เมื่อตรวจวัดค่า OD₅₁₀ จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* DMST 28913 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคส มีค่าเท่ากับ 0.07 ซึ่งสูงกว่าใน อะราบิโนส และกาแลกโตส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการตรวจวัดการสร้าง AI-2 จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* DMST 28914 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลต่างชนิดกันก็พบว่าการสร้าง AI-2 ในค่า OD₅₁₀ ที่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.9 การสร้าง AI-2 จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเปปโตน 1% ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างกันที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ^E			
	ATCC 13311	ATCC 14028	DMST 28913	DMST 28914
กลูโคส	0.12 ± 0.08 ^a	0.09 ± 0.00 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
อะราบิโนส	0.08 ± 0.05 ^a	0.06 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.02 ^b
กาแลกโตส	0.09 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.05 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.02 ^a

^E ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a,b} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันมีอิทธิพลต่อการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำตาลแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน แต่พบแนวโน้มว่าโดยส่วนใหญ่ *S. Typhimurium* จะสร้าง AI-2 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ และ Surette และ Bassler (1998) ซึ่งรายงานว่ากลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อการสร้าง AI-2 รวมทั้งน้ำตาลชนิดอื่นๆ ซึ่งได้แก่ แมนโนส แมนนิทอล ฟรุคโตส กลูโคซามีน ซูโครส และ มอลโทส เป็นต้น ก็มีความสำคัญต่อการสร้าง AI-2 เช่นเดียวกัน ซึ่งจัดเป็นน้ำตาลในระบบ PTS (phosphotranferase) โดยอะราบิโนสและกาแลกโตสนั้นมีรายงานว่าเป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อการสร้าง AI-2 ใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส Beeston และ Surette (2002)

4.4.1.3.3 ความเข้มข้นเกลือ

เมื่อนำคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวนประชากรเท่ากับ $9 \log \text{CFU/mL}$ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร เปปโตน 1% ที่เติมเกลือที่มีความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ 0.1M และ 0.4M มาตรวจวัด AI-2 ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่าค่า OD_{510} ที่ตรวจวัดได้จากคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* ATCC 14028 และ *S. Typhimurium* DMST 28914 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Peptone 1% ที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.1M เท่ากับ 0.12, 0.09, 0.07 และ 0.10 ตามลำดับ และ 0.04M เท่ากับ 0.04, 0.05, 0.08 และ 0.02 ตามลำดับ ที่จำนวนประชากรเท่ากัน จากผลการทดลองพบแนวโน้มว่า *S. Typhimurium*

ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่ำกว่าจะสร้าง AI-2 ในปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* (Thayer และคณะ, 1987) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Surette และ Bassler (1999) ที่ได้กล่าวว่าการเพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูง (ไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4M) จะมีผลให้การสร้าง AI-2 มีปริมาณสูงกว่าในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำ (ไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1M) แต่นักวิจัยยังไม่สามารถอธิบายถึงเหตุผลของปรากฏการณ์ดังกล่าวได้ และเมื่อพิจารณาสภาวะการทดลองพบว่ามีความแตกต่างจากงานวิจัยนี้ กล่าวคือ Surette และ Bassler (1999) ได้ทำการทดลองโดยเตรียมเซลล์ในอาหาร LB แล้วแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1M และ 0.4M แล้วตรวจวัดค่า AI-2 ด้วยวิธีทางชีวภาพ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าผลการทดลองอาจแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 การสร้าง AI-2 จากเซลล์เจอร์ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเปปโตน 1% ที่ความเข้มข้นเกลือต่างกันที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ^E			
	ATCC 13311	ATCC 14028	DMST 28913	DMST 28914
0.1M NaCl	0.12 ± 0.08 ^a	0.09 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
0.4M NaCl	0.04 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^b

^E ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a,b} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองในการประยุกต์ใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* สรุปได้ว่าปัจจัยภายใน ได้แก่ ระยะเวลาเจริญ และ สายพันธุ์ และปัจจัยภายนอก ได้แก่ สภาวะการเลี้ยง นั้นมีผลต่อการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ที่สอดคล้องกับการรายงานวิจัยก่อนหน้ารวมถึง มีความสอดคล้องกับวิธีทางชีวภาพที่ทดลองเปรียบเทียบในการศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้เป็นวิธีการตรวจสอบ AI-2 ได้ไม่แตกต่างจากวิธีทางชีวภาพ

4.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง AI-2 กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ *S. Typhimurium*

จากรายงานของ Surette และ Bassler (1998) ที่กล่าวว่า *S. Typhimurium* สร้างควอรัมเซนซิงประเภท AI-2 ซึ่งพบครั้งแรกใน *Vibrio fisheri* โดยที่บทบาทของ AI-2 ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Federle และ Bassler, 2003) ทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มพยายามจะพิสูจน์ว่า AI-2 นั้นมีบทบาทอย่างไรต่อ *S. Typhimurium* โดย Surette และ Bassler (1999) ได้ตั้งสมมติฐานว่า AI-2 น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับยีนส์ก่อโรคใน *S. Typhimurium* นอกจากนี้ Winzer และคณะ (2002) ได้รายงานที่สร้างจาก *S. Typhimurium* อาจจะเป็นเพียงเมทาโบไลต์ตัวหนึ่งที่ถูกขับออกมาในระหว่างการเจริญของเซลล์ ซึ่งไม่ได้ทำหน้าที่เป็นควอรัมเซนซิง นอกจากนี้ (Taga และคณะ, 2001) รายงานว่า AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ ATP binding cassette (ABC) Transporter ซึ่งเป็นกลไกการขนส่ง หรือเคลื่อนย้าย AI-2 เข้ามาภายในเซลล์ รวมถึง Keersmaecker และคณะ (2005) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้าง AI-2 กับการสร้างฟิล์มชีวภาพของ *S. Typhimurium* อย่างไรก็ตามจากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่มีข้อสรุปชัดเจนว่า AI-2 มีบทบาทอย่างไรต่อ *S. Typhimurium*

การทดลองนี้เพื่อนำวิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้าง AI-2 กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ *S. Typhimurium* ในเรื่องการสร้างฟิล์มชีวภาพ การเหนี่ยวนำการเจริญ ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการสร้าง AI-2 เชิงปริมาณของ *S. Typhimurium* กับแนวโน้มในการก่อโรค

4.4.2.1 การสร้างฟิล์มชีวภาพ

การสร้างฟิล์มชีวภาพคือการเจริญของประชากรจุลินทรีย์บนพื้นผิว (Donlan 2002) มีรายงานว่า *Salmonella* สามารถสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตหลากหลายชนิด รวมทั้ง พลาสติก โลหะ แก้ว (Hood และ Zottola, 1997; Momba และ Kaleni, 2002). จึงเป็นเหตุผลที่อธิบายได้ว่าทำไม *Salmonella* จึงมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะที่อยู่นอกโฮสต์ (Host) และการสร้างฟิล์มชีวภาพในกระบวนการผลิตอาหารเป็นปัญหาที่ร้ายแรงเนื่องจากฟิล์มชีวภาพจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำมาสะอาด และการฆ่าเชื้อลดลง (Bower and Daeschel 1999; Joseph และคณะ, 2001). ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ แล้วทำให้อาหารเสื่อมเสีย และการก่อโรคอาหารเป็นพิษ (Stepanovic และคณะ, 2004; Teplitzki และ

คณะ, 2006) นอกจากนี้มีรายงานว่า *Salmonella* สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ เมื่ออาศัยอยู่ในโฮสต์ และสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวของมันในอุ้งน้ำดี จะไม่แสดงอาการ ทำให้รอดพ้นจากการถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะ (Prouty และคณะ, 2002)

เมื่อตรวจสอบการสร้างฟิล์มชีวภาพของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่า *S. Typhimurium* สายพันธุ์ที่สร้างฟิล์มชีวภาพ สูงสุดโดยบังชี้เป็นจำนวนเซลล์ต่อตารางเซนติเมตรที่เกาะติดกับแผ่นสแตนเลส คือ DMST 28913 มีค่าเท่ากับ $5.58 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ และ ATCC 13311, ATCC 14028 และ DMST 28914 มีค่าเท่ากับ $4.78 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$, $4.57 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ และ $4.37 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ รองลงมาตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบปริมาณการสร้าง AI-2 ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในเปปโตน 1% ที่มีจำนวนเซลล์ $9 \log\text{CFU}/\text{mL}$ ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่า *S. Typhimurium* สายพันธุ์ที่สร้าง AI-2 สูงสุด คือ ATCC 13311 มีค่าเท่ากับ 0.10 และ ATCC 14028, DMST 28913 และ DMST 28914 มีค่าเท่ากับ 0.07, 0.05 และ 0.05 รองลงมาตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบปริมาณการสร้างฟิล์มชีวภาพ และปริมาณการสร้าง AI-2 ที่ตรวจสอบด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ของ *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์

จุลินทรีย์	ปริมาณการสร้างฟิล์มชีวภาพ ($\log\text{CFU}/\text{cm}^2$) ^E	ปริมาณการสร้าง AI-2 (OD_{510}) ^E
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	4.78 ± 0.56^a	0.10 ± 0.01^a
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	4.57 ± 0.18^a	0.07 ± 0.01^b
<i>S. Typhimurium</i> DMST 28913	5.58 ± 0.05^a	0.05 ± 0.01^c
<i>S. Typhimurium</i> DMST 28914	4.37 ± 0.40^b	0.05 ± 0.00^c

^E ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a,b,c} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้างฟิล์มชีวภาพกับปริมาณการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่พบความสัมพันธ์ใดๆ จึงอาจกล่าวได้ว่า AI-2 ไม่น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างฟิล์มชีวภาพของ *S. Typhimurium* การทดลองนี้สามารถยืนยันสมมติฐานของ Keersmaecker และคณะ (2005) ซึ่งทำการศึกษาเรื่องคุณสมบัติของสารสังเคราะห์ AI-2 แต่ไม่สามารถพิสูจน์ได้โดยตรง เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีตรวจวัด AI-2 จึงได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่า AI-2 ไม่น่าจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมพฤติกรรมกรรมการสร้างฟิล์มชีวภาพ

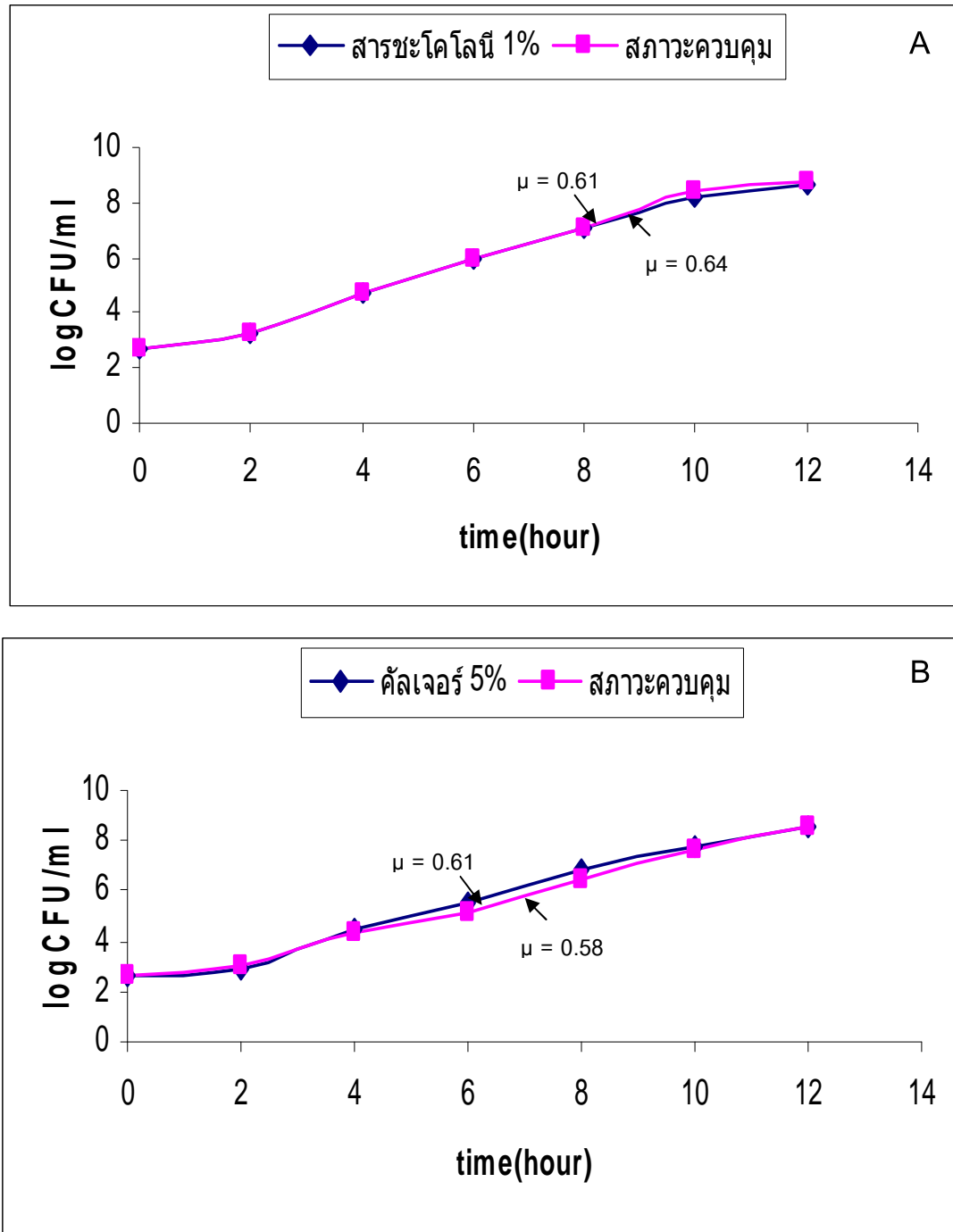
4.4.2.2 การมี AI-2 นอกเซลล์กับอัตราการเจริญ

Surette และ Bassler (1999) ได้รายงานว่ามีปริมาณการสร้าง AI-2 ขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์ที่มีการสื่อสารด้วยควอรัมเซนซิง ระบบเดียวกันจะสร้างและรับสัญญาณทางเคมีนี้เข้ามาภายในเซลล์ จนกระทั่งมีจำนวนประชากรมากถึงระดับหนึ่ง (threshold level) ประชากรจุลินทรีย์ดังกล่าวจะร่วมกันดำเนินกิจกรรมการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่างๆกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย (Redfield, 2002; Winzer, 2003; Williams, 2006)

จากรายงานเหล่านี้มีความน่าสนใจว่าหากมี AI-2 อยู่ในระบบก่อนที่ *S. Typhimurium* จะเริ่มสร้าง AI-2 เองนั้น เซลล์ของ *S. Typhimurium* จะสามารถรับ AI-2 เข้าไปในเซลล์หรือไม่ และจะส่งผลอย่างไรต่ออัตราการเจริญของ *S. Typhimurium*

การศึกษานี้จึงทดลองเติม AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และ ATCC 14028 ในรูปแบบของสารชะโคโลนี ซึ่งมี AI-2 อยู่ในปริมาณสูง ($OD_{510} = 0.33$ และ 0.30 ตามลำดับ) และในรูปแบบของคัลเจอร์ ซึ่งมี AI-2 อยู่ในปริมาณต่ำกว่า ($OD_{510} = 0.10$ และ 0.07 ตามลำดับ) โดยแปรปริมาณเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1% และ 5% ตามลำดับ ทั้งนี้ AI-2 ที่ใช้ในแต่ระบบเป็น AI-2 ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบอัตราการเจริญ

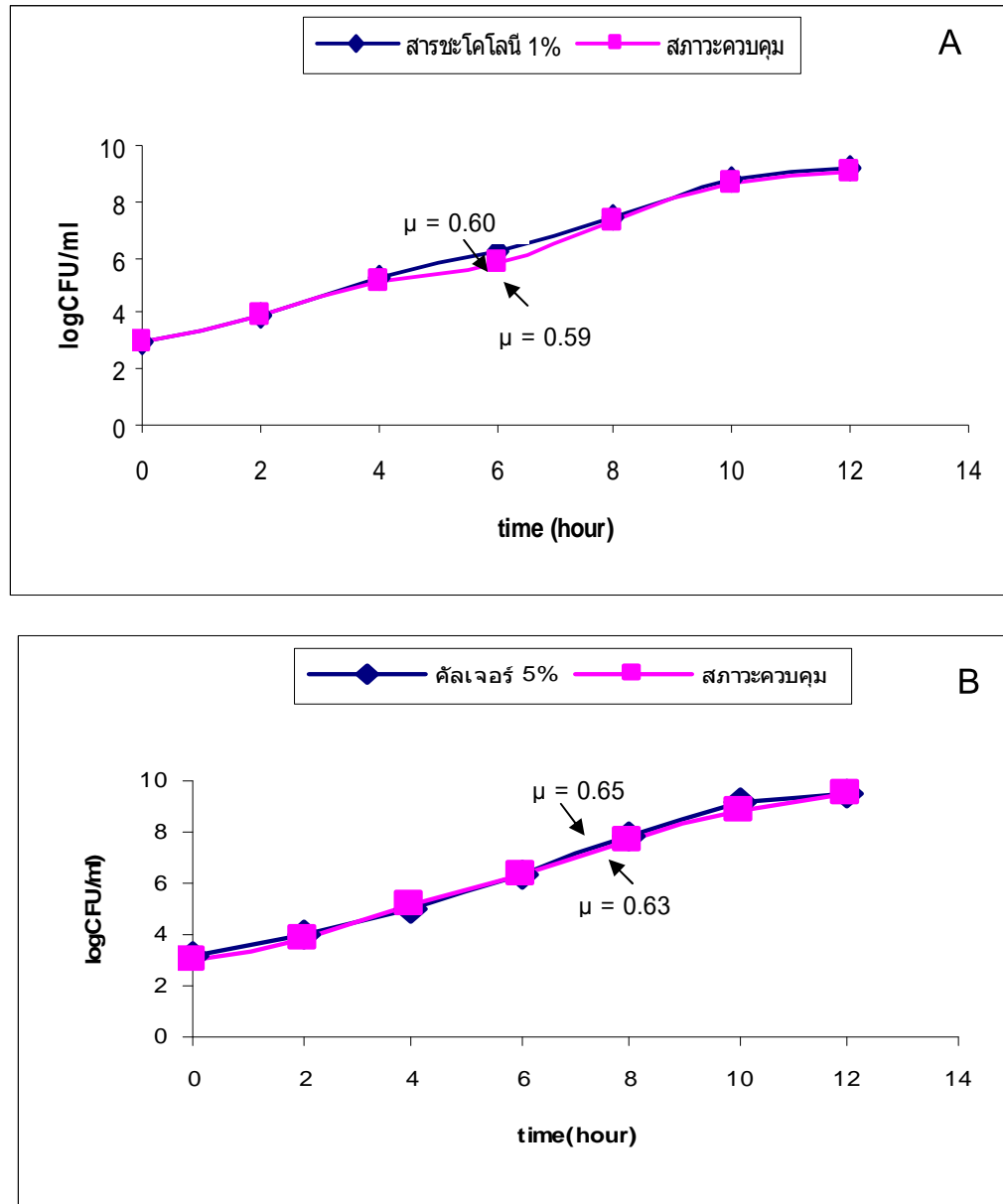
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่าอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ที่เติมสารชะโคโลนี และไม่เติมสารชะโคโลนี (สภาวะควบคุม) โดยแสดงในค่า specific growth rate (μ) มีค่าเท่ากับ 0.61 และ 0.64 generation/hour ตามลำดับ โดยค่า μ จากทั้ง 2 ระบบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ที่เติมคัลเจอร์ และสภาวะควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.61 และ 0.58 generation/hour ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.17 อัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ที่เติมสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 (A) เติมคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 (B)

อัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ที่เติมสารชะโคโลนี และไม่เติมสารชะโคโลนี (สภาวะควบคุม) (รูปที่ 4.18) โดยแสดงในค่า specific growth rate (μ) มีค่าเท่ากับ 0.60 และ 0.59 generation/hour ตามลำดับ โดยค่า μ จากทั้ง 2 ระบบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ที่เติมคัลเจอร์

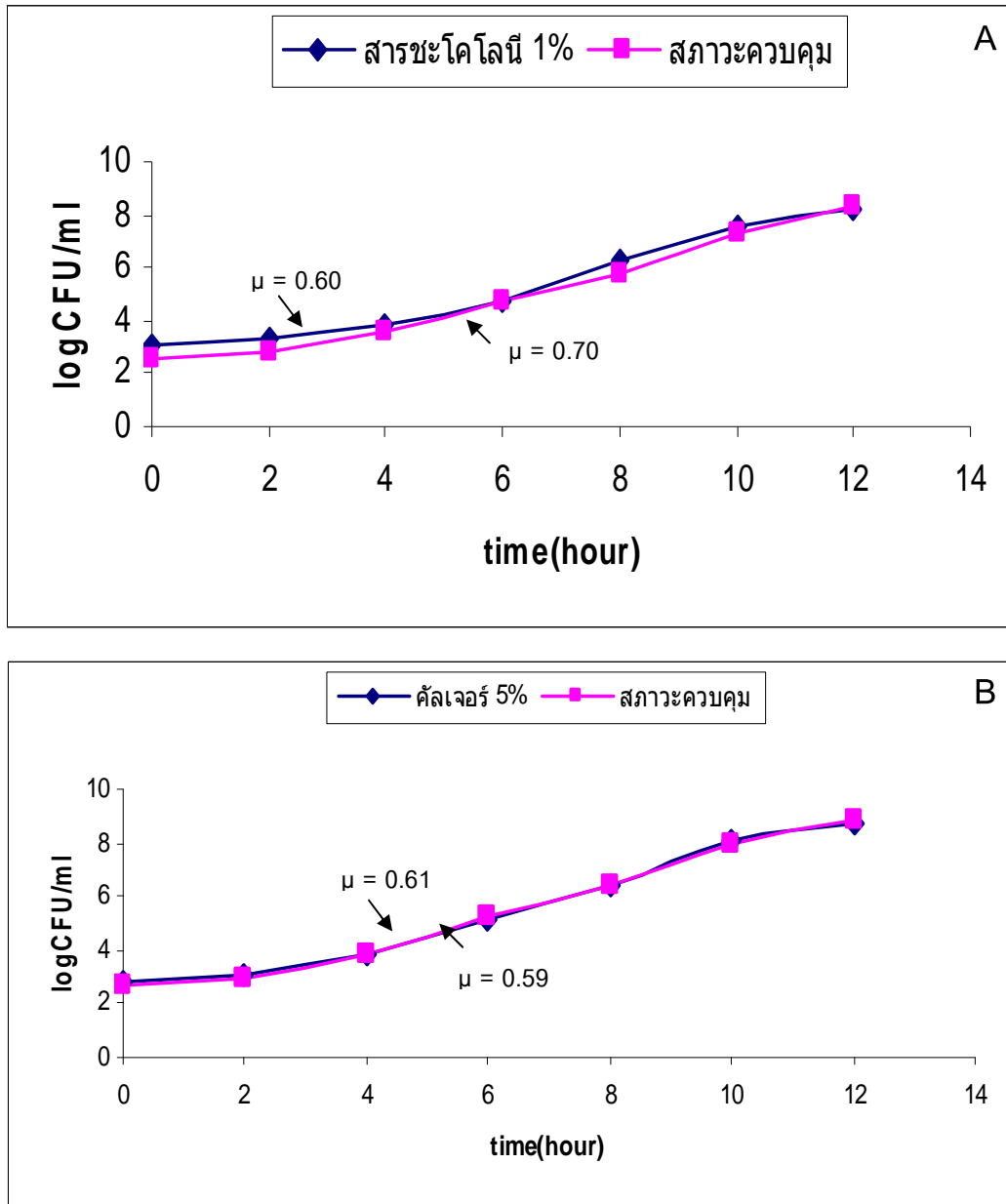
และสภาวะควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.65 และ 0.63 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเติม AI-2 ทั้งรูปแบบของสารชะโคโลนี และ คัลเจอร์นั้นไม่มีต่อการเหนี่ยวนำอัตราการเจริญของ *S. Typhimurim*



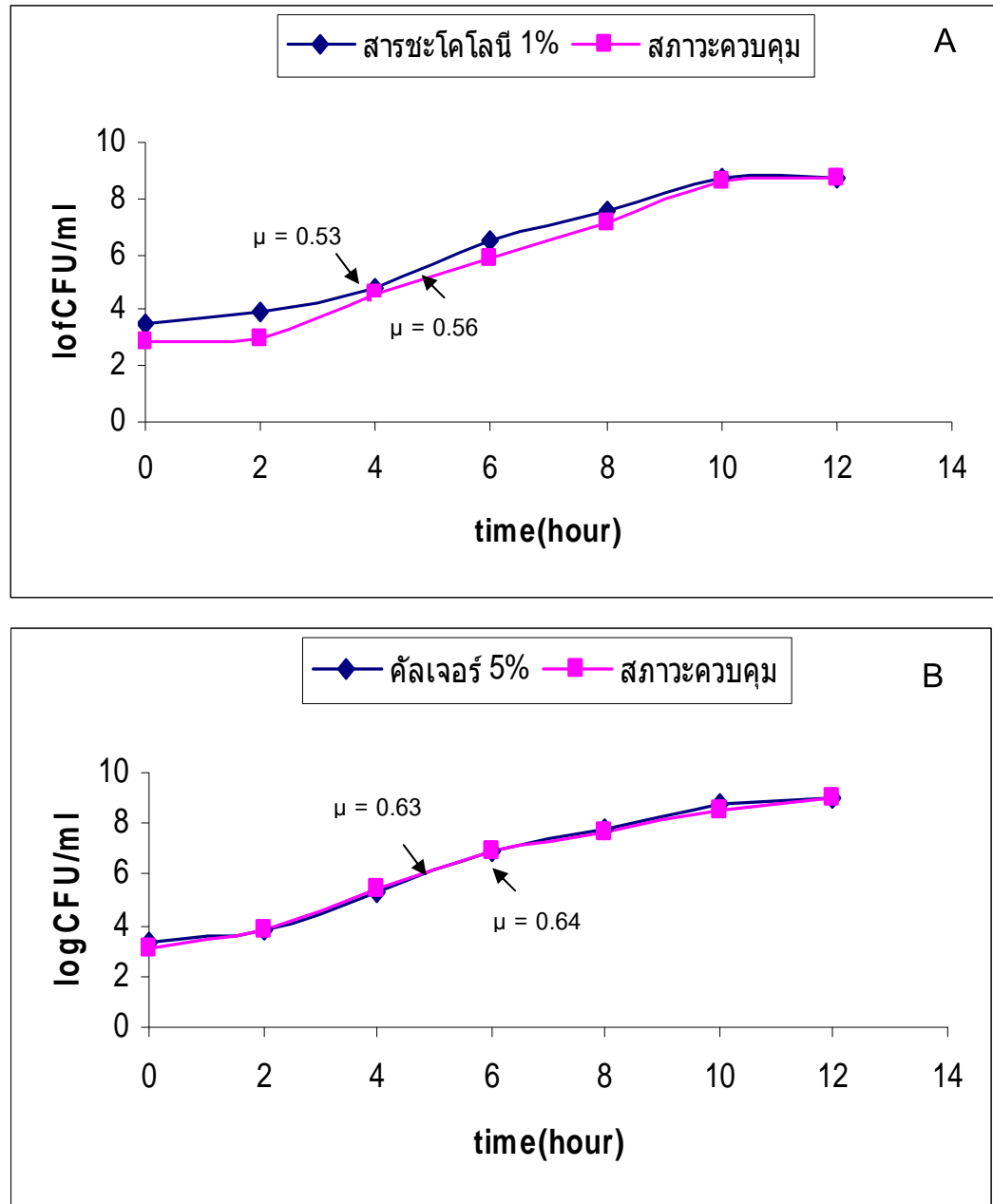
รูปที่ 4.18 อัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ที่เติมสารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 (A) เติมคัลเจอร์ของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 (B)

นอกจากนี้ยังได้ทดลองใช้ AI-2 ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นมาเหนี่ยวนำ การเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และ *S. Typhimurium* ATCC 14028 โดยใช้ AI-2 ที่สร้างจาก *E. coli* ATCC 4212 ในรูปแบบของสารชะโคโลนี ($OD_{510} = 0.19$) และ คัลเจอร์ความเข้มข้น 1% และ 5% ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ พบว่า อัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ที่เติมสารชะโคโลนี และสภาวะควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.60 และ 0.70 ตามลำดับ และอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ที่เติมคัลเจอร์ และสภาวะควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.61 และ 0.59 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และ ATCC 14028 ที่มีการเติม AI-2 ที่สร้าง *E. coli* ทั้งในลักษณะของสารชะโคโลนี และคัลเจอร์ กับสภาวะควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นแนวโน้มว่า AI-2 อาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน เนื่องจากในการทดลองนั้นความเข้มข้นของ AI-2 ที่เติมเพิ่มลงไปในรูปแบบของสารชะโคโลนี และคัลเจอร์นั้นอาจมีความเข้มข้นไม่มากพอถึงระดับ threshold ที่จะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกทางฟีโนไทป์ อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของ AI-2 ที่เติมเพิ่มลงไปนั้นมากพอถึงระดับดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้ว่า AI-2 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* กล่าวคือ AI-2 ที่เติมเพิ่มลงไปนั้นอาจไม่มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการแสดงออกทางฟีโนไทป์ ซึ่งบ่งชี้ได้จากอัตราการเจริญ และหากมีการแสดงออกทางฟีโนไทป์อื่น อาจเห็นการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเจริญลดลง



รูปที่ 4.19 อัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ที่เติมสารชะโคโลนีของ *E. coli* ATCC 4212 (A) เติมคัลเจอร์ของ *E. coli* ATCC 4212 (B)



รูปที่ 4.20 อัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ที่เติมสารชะโคโลนีของ *E. coli* ATCC 4212 (a) เติมคัลเจอร์ของ *E. coli* ATCC 4212 (b)

4.4.2.3 แหล่งของ S. Typhimurium กับสมบัติการสร้าง AI-2

Surette และ Bassler (1999) ได้กล่าวว่า AI-2 อาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ในเรื่องการก่อโรคของ S. Typhimurium แต่ยังไม่มียางานใดยืนยันสมมุติฐานดังกล่าวได้ จากผลการทดลองที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ว่าความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มีผลต่อการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้ แตกต่างกัน และเมื่อสืบค้นแหล่งที่มาของ S. Typhimurium ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง พบว่า S. Typhimurium สายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันคือ จากอุจจาระผู้ป่วย ทั้ง 3 สายพันธุ์กลับพบว่าสมบัติการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้ของทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ในขณะที่เดียวกัน S. Typhimurium ที่แยกได้จากสัตว์ (เนื้อเยื่อไก่) กลับมีการสร้าง AI-2 ที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่แยกจากอุจจาระคนป่วยบางสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.12) จากข้อมูลนี้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบ่งชี้ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการสร้าง AI-2 กับความรุนแรงในการก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามการโยงความสัมพันธ์นี้เป็นเพียงข้อสันนิษฐานเบื้องต้น ประกอบกับแหล่งที่มาของ S. Typhimurium ไม่ได้บ่งชี้ถึงความรุนแรงในการก่อโรคได้โดยตรง ดังนั้นหากต้องการศึกษาข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับเรื่องนี้โดยตรงอาจสามารถประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นเครื่องมือในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ AI-2 และ/หรือ kinetic การสร้าง AI-2 กับความรุนแรงในการก่อโรคของ S. Typhimurium โดยตรวจสอบลักษณะความรุนแรงในการก่อโรคในทางคลินิกวิทยา หรือตรวจสอบคุณสมบัติของ virulence gene ของ S. Typhimurium ของแต่ละสายพันธุ์โดยตรง

ตารางที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มาของ S. Typhimurium 4 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง กับปริมาณการสร้าง AI-2 บ่งชี้ในค่าของ OD_{510} ที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

สายพันธุ์ของ S. Typhimurium	แหล่งที่มา	AI-2 (OD_{510}) ^E
ATCC 13311	อุจจาระของคนป่วย	0.33 ± 0.011^a
ATCC 14028	เนื้อเยื่อไก่	0.30 ± 0.008^b
DMST 28913	อุจจาระของคนป่วย	0.26 ± 0.011^c
DMST 28914	อุจจาระของคนป่วย	0.22 ± 0.004^d

^E ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a,b,c,d} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.4.3 การศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ใน Selective medium

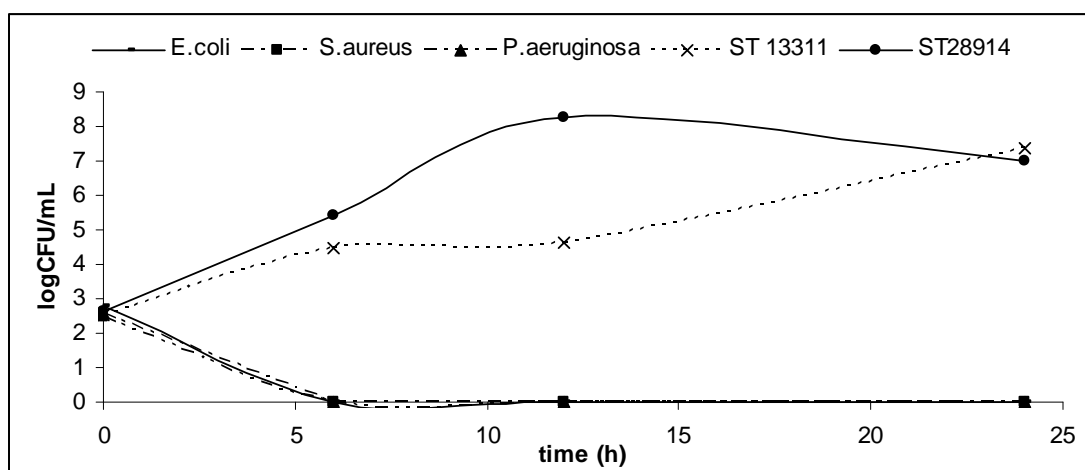
จากผลการศึกษาเรื่องระยะเวลาการเจริญกับการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ที่เพาะเลี้ยงในเปปโตน 1% (อาหารสำหรับเหี่ยวเน่าการสร้าง AI-2) (Surette และ Bassler, 1998) พบว่า *S. Typhimurium* จะสร้าง AI-2 ได้ในปริมาณสูงสุดเมื่อมีประชากรเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง $9 \log \text{CFU/mL}$ ในช่วงต้นของ stationary phase โดยค่า OD_{510} มีค่าเท่ากับ 0.1 (หัวข้อ 4.4.1.1) จึงมีความน่าสนใจว่าปริมาณ AI-2 ที่วัดในค่า OD_{510} สูงสุด อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้จำนวนประชากรของ *S. Typhimurium* ได้ ซึ่งหากศึกษาต่อไปแล้วพบแนวโน้มที่น่าสนใจ อาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเชิงปริมาณอย่างรวดเร็วได้ อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Salmonella* มักจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ อยู่ในระบบ จึงต้องใช้ระบบการเพาะเลี้ยงในระบบ selective medium เพื่อเพิ่มความจำเพาะ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทดลองดัดแปร selective medium สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยง *Salmonella* เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการสร้าง AI-2 ในระบบดังกล่าวต่อไป

4.4.3.1 การดัดแปร selective medium และความจำเพาะต่อ *Salmonella*

selective medium ที่ประเมินดัดแปรโดยใช้อาหารเหี่ยวเน่าการสร้าง AI-2 คือ เปปโตน ร้อยละ 1 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 0.5 และ เกลือ ร้อยละ 0.5 (Surette และ Bassler, 1999) จากที่กล่าวไว้ในเรื่องปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ว่าน้ำตาล และเกลือนั้นมีอิทธิพลต่อการสร้าง AI-2 ดังนั้นสูตรอาหารนี้จึงดัดแปลงมาเพื่อเหี่ยวเน่าการสร้าง AI-2 และ selective agent เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์คู่แข่งของ *Salmonella* ที่อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae ซึ่งประกอบด้วย (1) Brilliant green เป็นสารที่มีสมบัติเป็นพิษต่อแบคทีเรีย ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นคู่แข่งกับ *Salmonella* เช่น *Proteus* spp. (Arroyo และ Arroyo, 1995) (2) Niaproof4 (Tergitol, 7-ethyl-2-methyl-4-undecanol-hydrogen sulfate, sodium tetradecyl sulfate) เป็นสารที่มีสมบัติช่วยเพิ่มความจำเพาะ หรือลดความผิดพลาดในการตรวจสอบ (false-positive) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLT4 agar และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์คู่แข่ง เช่น *Proteus*, *Providencia* และ *Pseudomonas* (Miller และคณะ, 1991; Sherrod และคณะ, 1995) และ (3) แมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งมีสมบัติในการลดความรุนแรงจากผลกระทบความเป็นพิษของ brilliant green สำหรับ *Salmonella* (Busse, 1995) แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดสภาวะ hypertonic หรือ high osmotic pressure แต่ *Salmonella* มีคุณสมบัติเจริญได้ในสภาวะ high osmotic

pressure และมีสารอาหารต่ำ จากคุณสมบัตินี้เองจึงนำมาใช้พัฒนาเป็นอาหาร Rappaport-Vassiliadis (RV) ที่มีความจำเพาะในการคัดแยกคู่แข่งของ *Salmonella* (Peterz และคณะ, 1989) อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มสภาวะ selective ต่อ *Salmonella* อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงระบบ selective medium นี้ต้องควบคุมให้อยู่ที่ 43°C (Busse, 1995)

เมื่อเพาะเลี้ยง *S. Typhimurium* DMST 28914, *S. Typhimurium* 13311 (ตัวแทนของ *Salmonella*), *E. coli* ATCC 4212 (ตัวแทนของแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae), *S. aureus* ATCC 65388 (ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก) และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ) ใน selective medium ที่ 43°C ซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.5 logCFU/ml ติดตามการเจริญที่ชั่วโมงที่ 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.21 พบว่ามีเพียง *S. Typhimurium* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ใน selective medium นี้ ในขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่ใช้ในการทดสอบไม่เจริญใน selective medium นี้



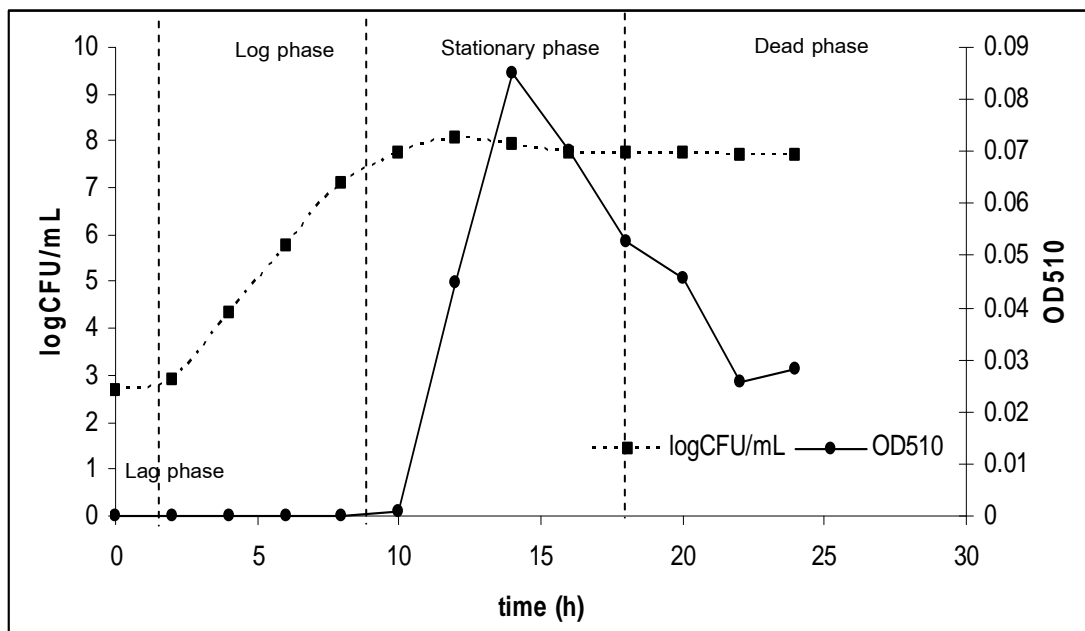
รูปที่ 4.21 ผลการประเมินความจำเพาะของระบบ selective medium

จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่า selective medium ที่ดัดแปรนี้มีความจำเพาะต่อ *Salmonella* จึงนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อระบบ selective medium ต้นแบบเพื่อศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium โดยประเมินจากความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรกับค่า OD₅₁₀

4.4.3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน *S. Typhimurium* กับค่า OD₅₁₀

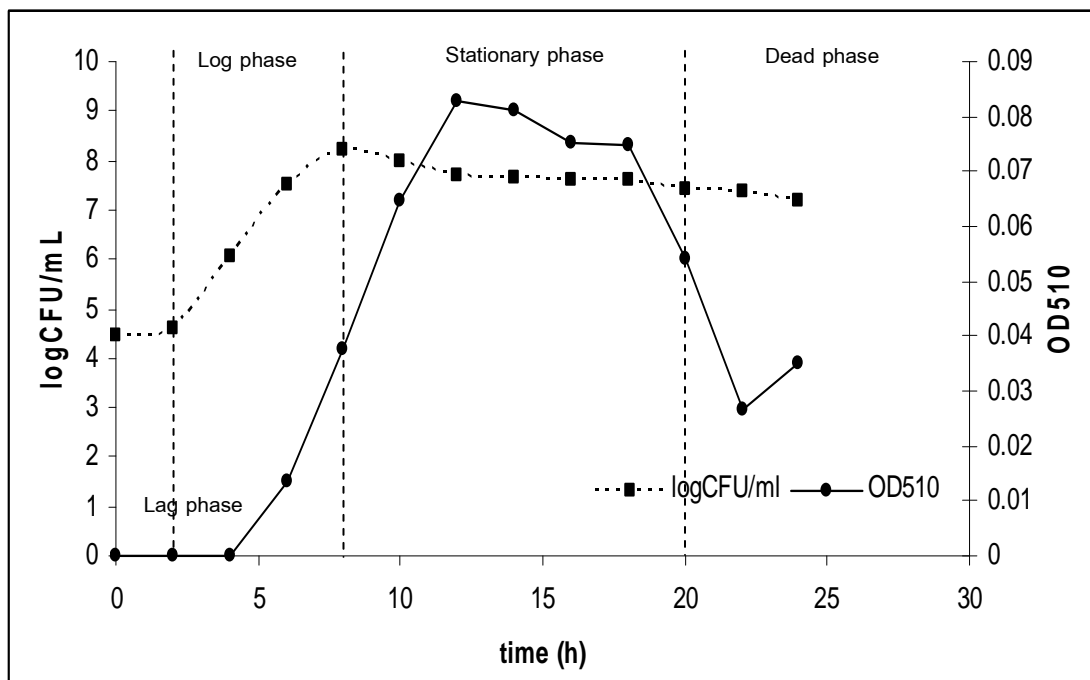
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรของ *S. Typhimurium*

ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium กับการสร้าง AI-2 ที่แสดงในค่าของ OD_{510} ดังแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่า *S. Typhimurium* จะเจริญจนกระทั่งสร้างเซลล์ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 (ปลาย log phase) โดยมีจำนวนประชากรสูงสุดเพียงประมาณ 8 logCFU/mL แต่จะวัดค่า OD_{510} สูงสุดได้ที่ ชั่วโมง 14 (ชั่วโมงที่ 4 ของ stationary phase) โดยค่า OD_{510} ที่วัดได้สูงสุดเท่ากับ 0.085 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหนียวน้ำ (รูปที่ 4.15) จะพบว่า *S. Typhimurium* จะเจริญในระบบ selective medium ได้จำนวนประชากรสูงสุดมีค่าต่ำกว่าถึง 1 log ทำให้ค่า OD_{510} สูงสุดที่วัดได้ ต่ำกว่าค่า OD_{510} ที่ตรวจวัดได้ในระบบอาหารเหนียวน้ำ แต่ที่น่าสนใจคือ ค่า OD_{510} ที่ตรวจวัดได้สูงสุดในระบบอาหารเหนียวน้ำจะอยู่ที่ปลาย log phase ในขณะที่ในระบบ selective medium ค่า OD สูงสุดจะอยู่ที่ชั่วโมงที่ 4 ของ stationary phase อาจเนื่องจาก *S. Typhimurium* เจริญได้ไม่ดีนักในระบบ selective medium ทำให้มีน้ำตาลคงเหลือในระบบ ดังนั้นเมื่อเลยช่วง log phase ไป AI-2 จึงยังไม่สลายตัว เนื่องจากยังมีน้ำตาลเหลือที่จะใช้ในการสร้าง AI-2 ต่อได้จนถึงชั่วโมงที่ 4 ของ stationary phase (บทที่ 2 หน้า 21) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่จำนวนประชากรเท่ากัน พบว่าในระบบอาหารเหนียวน้ำที่จำนวนประชากร 8log ค่า OD_{510} ที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.085 เช่นเดียวกัน จึงบ่งชี้ได้ว่า ค่า OD_{510} มีความสัมพันธ์กับจำนวนประชากรของ *S. Typhimurium*



รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/mL) กับค่า OD_{510} ของ *S. Typhimurium* DMST 28914 ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml

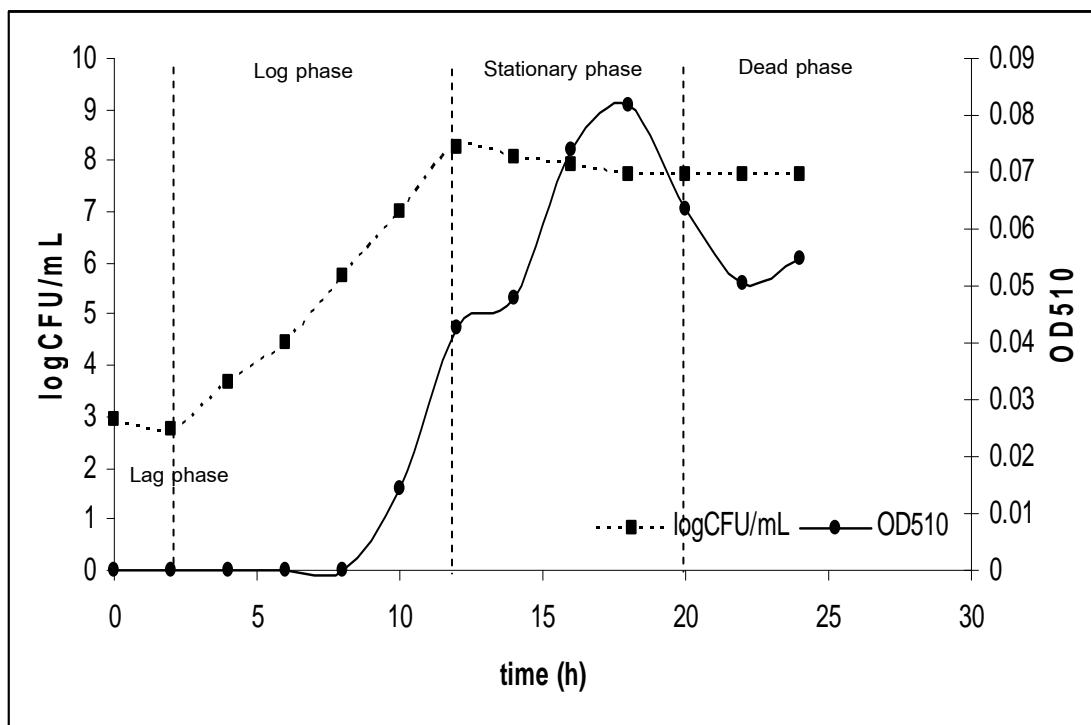
เมื่อทดลองเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *S. Typhimurium* เป็น 4 logCFU/mL และเพาะเลี้ยงใน selective medium ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่า *S. Typhimurium* จะเจริญได้เร็วขึ้น โดยเจริญจนมีประชากรสูงสุดได้ในชั่วโมงที่ 8 และจำนวนประชากรสูงสุดยังคงมีเพียงประมาณ 8 logCFU/mL โดยค่า OD₅₁₀ ที่วัดได้สูงสุด 0.085 และยังคงอยู่ที่ชั่วโมงที่ 4 ของ stationary phase (ชั่วโมงที่ 12 ของการเจริญ) จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ได้ว่า selective medium มีผลต่ออัตราการเจริญ และ/หรือสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ซึ่งอาจเกิดจากภาวะเครียด อันเนื่องมาจากความเป็นพิษ หรือการรบกวนของ selective agent ดังได้กล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าค่า OD₅₁₀ ที่วัดได้ในทุกระบบการเพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์กับจำนวนประชากร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของ selective agent เหล่านี้ไม่ได้ส่งผลต่อสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* DMST 28914



รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/mL) กับค่า OD₅₁₀ ของ *S. Typhimurium* DMST 28914 ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4 logCFU/ml

อย่างไรก็ตามข้อมูลการทดลองนี้เป็นเพียงการประเมินเริ่มต้น ซึ่งได้จากการประเมิน *S. Typhimurium* เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น แต่จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.1.2 พบว่าสมบัติการสร้าง AI-2 ซึ่งปริมาณของ *S. Typhimurium* แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงนำ *S. Typhimurium* ATCC 14028 มาศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 ในระบบ selective

medium โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/mL ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.24 พบว่า *S. Typhimurium* สายพันธุ์นี้เจริญใน selective medium ได้เร็วกว่า *S. Typhimurium* DMST 28914 (รูปที่ 4.22) ถึง 4 ชั่วโมง กล่าวคือจะเจริญจนได้ประชากรสูงสุดถึง 8 log ในชั่วโมงที่ 12 และตรวจวัดค่า OD₅₁₀ สูงสุดได้ในชั่วโมงที่ 18 (ชั่วโมงที่ 6 ของ stationary phase) ในขณะที่สายพันธุ์ DMST 28914 จะตรวจวัด OD₅₁₀ สูงสุดได้ที่ชั่วโมงที่ 4 ของ stationary phase เสมอ บ่งชี้ได้ว่าอัตราการเจริญอาจมีผลต่อสมบัติการสร้าง AI-2 ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น การเจริญของ *S. Typhimurium* ใน selective medium ได้ช้า ทำให้น้ำตาลถูกใช้ไปน้อยส่งผลให้ยังมีน้ำตาลคงเหลือในระบบมากจนถึงชั่วโมงที่ 6 ของ stationary phase จึงทำให้เซลล์สามารถสร้างและสะสม AI-2 ได้สูงสุดจนถึงชั่วโมงที่ 6 ของ stationary phase ดังกล่าว



รูปที่ 4.24 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับค่า OD₅₁₀ ของ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ที่เพาะเลี้ยงใน selective medium ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml

อย่างไรก็ตามค่า OD₅₁₀ ดังกล่าวยังสอดคล้องกับจำนวนประชากร 8 log คือมีค่าเท่ากับ 0.085 เช่นเดิม จากการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าปริมาณ AI-2 ที่แสดงในค่า OD₅₁₀ ที่ *S. Typhimurium* สร้างขึ้นสูงสุดจะขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรสูงสุดที่มีในระบบ ดังนั้นค่า OD₅₁₀ สูงสุดที่ตรวจวัดได้จึงสามารถใช้ในการบ่งชี้จำนวนประชากรสูงสุดได้ นอกจากนี้พบว่าเวลา

ในการสร้าง AI-2 จนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดจะขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติในการเจริญใน selective medium แตกต่างกัน ทำให้เวลาในการตรวจวัด AI-2 ได้สูงสุดแตกต่างกัน จากข้อมูลที่ได้ อาจสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับพัฒนาเป็นวิธีตรวจสอบอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* โดยทำนายการสร้าง AI-2

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์สารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* ด้วย $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสเปกตรัมของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสร้าง AI-2 มีความคล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกับสเปกตรัมของ *S'ibium. meliloti* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้าง AI-2 และเมื่อนำสารชะโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงบนผลด้วยวิธีทางชีวภาพ พบว่า สารชะโคโลนีของ *S. Typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* กระตุ้นการเรืองแสงของ *V. harveyi* BAA-1117 โดยให้ค่า % Activity สูงกว่า 100% ในขณะที่สารชะโคโลนีของ *S'ibium. meliloti* SM1021 ไม่แสดงผลการกระตุ้นการเรืองแสงของ *V. harveyi* BAA-1117 จึงยืนยันได้ว่าแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองสามารถสร้าง AI-2 ได้จริง จึงสามารถนำสารชะโคโลนีไปใช้เป็นตัวอย่างสารละลาย AI-2 ที่สร้างจากแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดสอบต่อไปได้

เมื่อประเมินหาสารเพื่อทำปฏิกิริยากับ AI-2 แล้วให้ผลผลิตเป็นสารประกอบสีที่ตรวจวัดได้ พบว่าการทำปฏิกิริยา metal ion reduction โดยใช้ Fe(III)-1,10-phenanthroline เป็นรีเอเจนต์ สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ AI-2 ที่สร้างจากแบคทีเรียทั้งในระบบสารชะโคโลนี และ คัลเจอร์ให้สารประกอบสีที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 510 นาโนเมตร ($\lambda_{\text{max}}=510$) และวิธีนี้สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นวิธีตรวจสอบ AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีได้

เมื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยการนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* แล้วเปรียบเทียบกับผลงานการวิจัยก่อนหน้านี้นี้ และวิธีทางชีวภาพ พบว่าผลการตรวจสอบมีความสอดคล้องกัน โดยพบว่าทั้งปัจจัยภายใน ซึ่งได้แก่ ระยะการเจริญ และ สายพันธุ์ และปัจจัยภายนอก ซึ่งได้แก่ สภาวะการเลี้ยงมีผลต่อการสร้าง AI-2 ของ *S. Typhimurium* ตามที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ หรือเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวภาพ และเมื่อทดลองนำวิธีการตรวจสอบ AI-2 ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ศึกษาเพิ่มเติมเรื่องความสัมพันธ์ระหว่าง AI-2 กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ *S. Typhimurium* ได้ข้อมูลใหม่ที่บ่งชี้ว่า AI-2 ที่สร้างจาก *S. Typhimurium* ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างฟิล์มชีวภาพ การเหนี่ยวนำการเจริญ และการก่อโรค

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรกับปริมาณการสร้าง AI-2 ทั้งในระบบอาหารเหนี่ยวนำการสร้าง AI-2 และ selective medium บ่งชี้ว่า *S. Typhimurium* ทุกสายพันธุ์

จะสร้าง AI-2 สูงสุดตามจำนวนประชากรสูงสุดที่มีอยู่ในระบบ และเวลาที่ตรวจพบ AI-2 สูงสุดจะขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* แต่ระยะสายพันธุ์ AI-2 ที่ตรวจได้สูงสุดจะขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรสูงสุดในระบบการเพาะเลี้ยง แต่เวลาที่ตรวจพบ AI-2 สูงสุดจะขึ้นกับอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium*

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยได้พิสูจน์ว่าวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกในการศึกษาสมบัติการสร้าง AI-2 แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังไม่ได้ผ่านการประเมินความถูกต้องของวิธี (Method Validation) เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐาน AI-2 สำหรับใช้ในการประเมิน ดังนั้นอาจจะต้องสังเคราะห์สารมาตรฐานสำหรับการประเมิน เพื่อให้เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และจากข้อสรุปที่พบความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ตรวจพบ AI-2 ในค่า OD_{510} สูงสุดกับอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับพัฒนาเป็นวิธีตรวจสอบอัตราการเจริญของ *S. Typhimurium* โดยการทำนายจากการสร้าง AI-2 ต่อไปได้ และอาจพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบจำนวน *S. Typhimurium* แนวทางใหม่ได้ในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

วิจิตร เชื้อประเสริฐ. 2548. คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Albertino, A., Barge, A., Cravotto, G., Genzini, L., Gobetto, R. and Vincenti, M. 2009. Natural origin of ascorbic acid: validation by ¹³C NMR and IRMS. Food Chemistry. 112 : 715-720.

Arroyo, G. and Arroyo, J.A. 1995. Selective action of inhibitors used in different culture media on the competitive microflora of *Salmonella*. Journal of Applied Microbiology. 78 : 281-289.

ATCC The Global Bioresource Center. Product Description[online]. (n.d.). Available from : <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid>. [2010, May 5].

Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other:regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology. 2 : 582-587.

Bassler, B.L. 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. Cell. 109 : 421-424.

Bassler, B.L., Greenberg, E.P. and Stevens, A.M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology. 17 : 4043-4045.

Bassler, B.L. and Losick, R. 2006. Bacterially speaking. Cell 125 : 237-246.

Bassler, B.L., Wright, M. and Silverman, M.R. 1994. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. Molecular Microbiology. 13 : 273-286.

- Bayon, P., March, P., Figueredo, M., Font, J. and Medrano, J. 2000. Use of chiral B(III) complexes in the cycloaddition of C,N-diphenylnitrone to tert-butyl vinyl ether. Tetrahedron: Asymmetry. 11 : 4269-4278.
- Beeston, A.L. and Surette, M.G. 2002. *pfs*-Dependent regulation of autoinducer -2 production in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology. 184 : 3450-3456.
- Besada, A. 1987. A facile and sensitive spectrophotometric determination of Ascorbic acid. Talanta. 34 : 731-732.
- Bibek, R. 2004. Fundamental food microbiology. 3rd ed. Boca Raton : CRC Press.
- Bower, C.K. and Daeschel, M.A. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. International Journal of Food Microbiology. 50 : 33–44.
- Brenner, D.J. 1984. Facultatively anaerobic gram-negative rods-family I Enterobacteriaceae. Journal of Applied Bacteriology. 23 : 499-509.
- Busse, M. 1995. Media for *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology. 26 : 117-131.
- Cloak, O.M., Solow, B.T., Briggs, C.E., Chen, C. and Fratamico, P.M. 2002. Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Foods. Applied and Environmental Microbiology. 68 : 4666-4671.
- Cooke, V.M., Miles, R.J., Price, R.G. and Richardson, A.C. 1999. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *salmonellae*. Applied and Environmental. 65 : 807-812.
- Cox, J.M. 1993. Lysine-mannitol-glycerol agar, a medium for the isolation of *Salmonella* spp., including *S.typhi* and atypical strains. Applied and Environmental Microbiology. 59 : 2602-2606.
- DeLisa, M.P., Valdes, J.J. and Bentley, W.E. 2001. Mapping stress-induced changes in autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12. The Journal of Bacteriology. 183 : 2918–2928.
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Infectious Diseases. 8 : 881–890.

- Dusch, H. and Altwegg, M. 1993. Comparison of Rambach agar, SM-ID medium and Hektoen Enteric agar for primary isolation of non-Typhi *salmonellae* from stool samples. Journal of Clinical Microbiology. 31 : 410-412.
- Fagerberg, D.J. and Avens, J.S. 1976. Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in foods. Journal of Milk and Food Technology. 39 : 628-646
- Federle, M.J. and Bassler, B.L. 2003. Interspecies communication in bacteria. The journal of Clinical Investigation. 112 : 1291-1299.
- Freydiere, A.M. and Gille, Y. 1991. Detection of *salmonellae* by using Rambach agar and by a C8 esterase spot test. Journal of Clinical Microbiology. 29 : 2357-2359.
- Greenberg, P., Hastings, J.W., and Ulitzur, S. 1979. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. Archives of Microbiology. 120 : 87-91.
- Gruenewald, R., Henderson, R.W. and Yappow, S. 1991. Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. Journal of Clinical Microbiology. 29 : 2354-2356.
- Guclu, K., Sozgen, K., Tutem, E., Ozyurek, M. and Apak, R. 2005. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. Talanta. 65 : 1226-1232.
- Hood, S.K. and Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. International Journal of Food Microbiology. 37 : 145-153.
- Jay, S., Davos, D., Dundas, M., Frankish, E. and Lightfoot, D. 2003. Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed. NSW : Food Microbiology Group.
- Jones, P.W., Collins, P. and Hayle, A.J. 1984. The effect of sodium sulphacetamide and sodium mandelate in brilliant green agar on the growth of *salmonellae*. Journal of Applied Bacteriology. 57 : 423-428.
- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology. 64 : 367-372.

- Kee H.L., Kirmaier C., Yu L., Thamyongkit P., Youngblood J.W., Calder M.E., Ramos L., Noll B.C., Bocian D.F., Scheidt W.R., Birge R.R., Lindsey J.S. and Holten D. 2005. Structural control of the photodynamics of boron-dipyrrin complexes. The Journal of Physical Chemistry B. 109 : 20433-20443.
- Keersmaecker, S.C.J.D., Varszegi, C., Boxel, N.V., Habel, L.W., Metzger, K., Daniels, R., Marchal, K., Vos, D.D. and Vanderleyden, J. 2005. Chemical synthesis of (S)-4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione, a bacterial signal molecule precursor, and validation of its activity in *Salmonella typhimurium*. The Journal of Biological Chemistry. 280 : 19563-19568.
- Keersmaecker, S.C.J.D., Sonck, K. and Vanderleyden, J. 2006. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. Trends in Microbiology. 14 : 114-119.
- King, S. and Metzger, W.I. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. Applied Microbiology. 16 : 57-578.
- Lansing, P., Harley, J.P. and Klein, D.A. 1999. Microbiology. 4th ed. Boston : McGraw- Hill.
- Leifson, E. 1935. New culture media based on sodium deoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of the colon bacillus in milk and water. Journal of Pathology and Bacteriology. 40 : 581-599.
- Miller, R.G. and Mallinson, E.T. 2000. Improved detection of nontyphoid and typhoid *salmonellae* with balanced agar formulations. Journal of Food Protection. 63 : 1443-1446.
- Miller, R.G., Tate, C.R. Mallison, E.T. and Scherrer, J.A. 1991. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. Poultry Science. 70 : 2429-2432.
- Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L. and Hughson, F.M. 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacteria quorum-sensing signal AI-2. Molecular. 15 : 677-687.
- Moats, W.A. and Kinner, J.A. 1974. Factors affecting selectivity of brilliant green-phenol red agar for *salmonellae*. Applied Microbiology. 27 : 118-123.
- Momba, M. N. and Kaleni, P. 2002. Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. Water Res. 36 : 3023–3028.

- Onishi, I. and Hara, T. 1964. The spectrophotometric determination of a small amount of L-Ascorbic acid with the iron(III)-1,10-phenanthroline reagent. Talanta. 37 : 1314-1317.
- Patel, P.D. 1994. Rapid Analysis Techniques in Food microbiology. 1st ed. Glasgow : Blackie Academic and Professional.
- Pei, D. and Zhu, J. 2004. Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS). Current Opinion in Chemical Biology. 8 : 492-497.
- Pereira, C.S., MaAuley, J.R., Taga, M.E., Xavier, K.B. and Miller, S.T. 2008. *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the autoinducer-2 (AI-2) synthase, responds to AI-2 supplied by other bacteria. Molecular Microbiology. 70 : 1223-1235.
- Peterz, M., Wiberg, C. and Norberg, P. 1989. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in heme-made and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. Journal of Applied Bacteriology. 66 : 523-528.
- Pignato, S., Giammanco, G. and Giammanco, G. 1995a. Rambach agar and SM-ID medium sensitivity for presumptive identification of *Salmonella* subspecies I-VI. Journal of Medical Microbiology. 43 : 68-71.
- Pignato, S., Marino, A.M., Emanuele, M.C., Iannotta, V., Caracappa, S. and Giammanco, G. 1995b. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *salmonellae* in foods. Applied and Environmental Microbiology. 61 : 1996-1999.
- Prouty, A. M., Schwesinger, W. H. and Gunn, J. S. 2002. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. Infect Immun. 70 : 2640-2649.
- Podbielski, A and Kreikemeyer, B. 2004. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of gram-positive cocci. Journal of Infectious Diseases. 8 : 81-95.
- Rambach, A. 1990. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Applied and Environmental. 56 : 301-303.
- Vilchez, R., Lemme, A., Thiel, V., Schulz, S., Sztajer, H. and Wagner-Döbler, I. 2007. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. Anal Bioanal Chem. 387 : 489-496.

- Rao, Y.M. and Sureshkumar, G.K. 2000. Direct biosynthesis of ascorbic acid from glucose by *Xanthomonas campestris* through induced free-radicals Biotechnology Letters. 22 : 407-411.
- Redfield, R.J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?. Trends in Microbiology. 10 : 365–370.
- Riemann, H.P. and Cliver, D.O. 2005. Foodborne infections and intoxications. 3rd ed. Amsterdam : Elsevier.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., and Bassler, B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. Molecular Microbiology. 41 : 463–476.
- Semmelhack, M.F., Campagna, S.R., Federle, M.J. and Bassler, B.L. 2005. An expeditious synthesis of DPD and boron binding studies. Organic Letters. 7 : 569-572.
- Sharma, M. and Anand, S.K. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry-a case. Food Control. 13 : 469-477.
- Sherrod, P.S., Amaguana, R.M., Andrews, W.H., June, G.A. and Hammack, T.S. 1995. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* species from selected high-moisture foods. Journal of AOAC International. 78 : 679-690.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L. and Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in applied Microbiology. 38 : 428-432.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods. 40 : 175–179.
- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96 : 15196–15201.

- Surette M.G., and Bassler B.L. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Proceedings the National Academy of Sciences. 95 : 7046-7050.
- Surette M.G., and Bassler B.L. 1999. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology. 31 : 585-595.
- Taga, M.E. Semmelhack, J.L. and Bassler, B.L. 2001. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology. 42 : 777-793.
- Taylor, W.F. 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose-lysine agars: new media for the isolation of enteric pathogens. American Journal of Clinical Pathology. 44 : 471-475.
- Teplitski, M., Al-Agely, A. and Ahmer, M.M.B. 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 152 : 3411–3423.
- Thayer, D.W., Muller, W.S., Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. 1987. Effect of NaCl, pH, temperature, and atmosphere on growth of *Salmonella typhimurium* in glucose-mineral salts medium. Applied and Environmental Microbiology. 53 : 1311-1315.
- Thiel, V. Vilchez, R. Sztajer, H., Dobler, I.W. and Schulz, S. 2009. Identification, quantification, and determination of the absolute configuration of the bacterial quorum-sensing signal autoinducer-2 by gas chromatography-mass spectrometry. ChemBioChem. 10 : 479-485.
- Turovskiy, Y. and Chikindas, M.L. 2006. Autoinducer-2 bioassay is a qualitative, not quantitative method influenced by glucose. Journal of Microbiological Methods. 66 : 497-503.
- USFDA. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook: *Salmonella* spp[online]. (n.d.). Available from : <http://www.cfsan.fda.gov>. [2008, May 20]
- Schothorst, M., Redaud, A. and van Beek, C. 1987. *Salmonella* isolation using RVS broth and MLCB agar. Food Microbiology. 4 : 11-18.

- Vilchez, R., Lemme, A., Thiel, V., Schulz, S., Sztajer, H. and Döbler, I.W. 2007. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 387 : 489–496.
- Williams, P. 2006. Quorum sensing. International Journal of Medical Microbiology. 96 : 57-59.
- Winzer, K., Hardie, K.R., Burgess, N., Dhoherty, N., Kirke, D., Holden, M.T.G., Linforth, R., Cornell, K.A., Taylor, A.J., Hill, P.J., and Williams, P. 2002. LuxS: Its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. Microbiology. 148 : 909–922.
- Winzer, K., Hardie, K.R. and Williams, P. 2003. LuxS and Autoinducer-2: Their contribution to quorum sensing and metabolism in Bacteria. Advances in Applied Microbiology. 53 : 329-296.
- Zhu, J. and Pei, D. 2008. A LuxP-based fluorescent sensors for bacterial autoinducerII. ACS chemical biology. 110-119.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ก.1 การเตรียมเซลล์ข้ามคืน (Overnight-grown cultures), 12 ชั่วโมง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. loop
3. เครื่อง Vortex mixer
4. เครื่อง shaker

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Broth (NB)
2. Marine Broth (สำหรับ *V. harveyi* BAA-1117)

วิธีการ

1. เผา loop ให้ร้อนแดงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความยาว ที่ให้เย็นสักครู่ (10-15 วินาที)
2. ลนปากหลอดทดลองอย่างรวดเร็วด้วยเปลวไฟ แล้วถ่ายเชื้อจากหลอดเชื้อมาตรฐาน (stock culture) ด้วย sterile loop ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. นำหลอดอาหาร NB ที่ถ่ายเชื้อแล้วไปให้อากาศโดยการเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ก.2 การเตรียมเซลล์เริ่มต้น (Initial cultures)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. เครื่อง Vortex mixer
4. Autopipette
5. เครื่อง shaker

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Peptone 1% ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% และโซเดียมคลอไรด์ 0.5%
2. Marine Broth (สำหรับ *V. harveyi*)

วิธีการ

1. เจือจางเซลล์ข้ามคืน (Overnight-grown cultures) ที่วัดค่าความขุ่นเท่ากับ 0.1 ($OD_{600}=0.1$) ลำดับส่วนแบบ 10 เท่า โดยนำคัลเจอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีอาหารเหลวปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำเจือจางตามลำดับ
2. ถ้าต้องการเตรียมเซลล์เริ่มต้น 2 log ให้ปิเปตคัลเจอร์ที่มีระดับการเจือจาง $1:10^5$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร หรือ ถ้าต้องการเตรียมเซลล์เริ่มต้น 5 log ให้ปิเปตคัลเจอร์ที่มีระดับการเจือจาง $1:10^3$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสมการดังนี้

$$C_1V_1 = C_2(V_1+V_2)$$

เมื่อ	C_1	=	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (logCFU/mL)
	C_2	=	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ต้องการ (logCFU/mL)
	V_1	=	ปริมาตรของเซลล์เริ่มต้น (มิลลิลิตร)
	V_2	=	ปริมาตรของอาหารปลอดเชื้อ (มิลลิลิตร)

3. นำขวดรูปชมพู่ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นตามต้องการไปให้อากาศโดยการเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

ก.3 การตรวจหาจำนวนประชากรของ *S. Typhimurium* ด้วยเทคนิค Spread plate

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลอง
3. เครื่อง Vortex mixer
4. Autopipette
5. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA)
2. Peptone from casine 0.1%

วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างลำดับส่วนแบบ 10 เท่า โดยนำคัลเจอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายเปปโติน 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำเจือจางตามลำดับ
2. ปิเปตคัลเจอร์ที่มีระดับการเจือจางตามต้องการปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร NA
3. เคลี่ยตัวอย่างบนผิวหน้าอาหาร NA ด้วย Sterile spreader ให้กระจายทั่วทั้งจาน กลับจานเพาะเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง
4. ดูผลปฏิบัติการ โดยสังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะของ colony และนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. TLC plate
2. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. กระดาษนาฬิกา
4. หลอดแสง UV

สารเคมี

1. ไดคลอโรมีเทน
2. เมทานอล

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายที่ต้องการติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาว่าเปลี่ยนแปลงไปถึงขั้นตอนใดบน TLC plate ประมาณ 5 ไมโครลิตร ด้วยหลอดแคปิลารี บนปลายสไลด์
2. นำแผ่นสไลด์นี้ไปใส่ในบีกเกอร์ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร
3. ปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิมมิดีด้วยไอของตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมผ่านขึ้นมาข้างบนตามแนวตั้งผ่านจุดที่มีสารที่แต้มไว้ จะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วต่างกันตามธรรมชาติของสารตัวทำละลาย
4. หาดำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสี โดยนำแผ่นสไลด์ดังกล่าวไปส่องภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
5. สารชนิดเดียวกันในระบบตัวทำละลายที่เหมือนกัน ที่อุณหภูมิ และสภาวะเดียวกันจะมีค่า retention factor หรือค่า R_f คงที่โดยค่า R_f คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ข.2 Column chromatography

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. คอลัมน์แก้ว
2. สำลี
3. หลอดแสง UV
4. ปีกเกอร์เก็บตัวอย่าง

สารเคมี

1. ไดคลอโรมีเทน
2. เมทานอล
3. Triethylamine
4. ซิลิกา
5. ททราย (sea sand)

วิธีการ

1. ชูดำลี และทรายที่ปลายคอลัมน์แก้ว แล้วเทตัวทำละลายลงไปคอลัมน์ ซึ่งตัวทำละลายทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ คือ ไดคลอโรมีเทน กับ เมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 และ Triethylamine 1% ของปริมาตรตัวทำละลาย
2. เตรียมซิลิกาเจลโดยละลายซิลิกาในตัวทำละลายในข้อ 1 บรรจุซิลิกาเจลในคอลัมน์แก้วในข้อ 1 เพื่อทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่
3. ไขก๊อกให้ตัวทำละลายไหลออก เพื่อไม่ให้มีช่องอากาศแทรกอยู่ในซิลิกาเจล รอจนซิลิกาเจลเกาะตัวกันแน่นจึงปิดก๊อก
4. หยดสารละลายผสมที่ต้องการแยกลงบนเฟสคงที่ ซึ่งชุ่มด้วยตัวทำละลาย ชนิดเดียวกัน
5. ปิดปลายคอลัมน์อีกด้านด้วยสำลี แล้วเทตัวทำละลายตามลงไป
6. ตัวทำละลายจะค่อยๆชะสารต่างๆที่ต้องการแยกออกจากกัน ผ่านคอลัมน์ ซ้ำๆ โดยในระหว่างการเก็บตัวอย่าง fraction ให้ตรวจสอบสารที่ต้องการแยก ด้วย TLC

ภาคผนวก ค

วิธีเตรียมสารเคมี

ค.1 โพลแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (0.01M KMnO_4)

การเตรียม KMnO_4 ความเข้มข้น 0.01M โดยการละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 0.158 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ค.2 Ascorbic acid (50 mM Ascorbic acid)

การเตรียม Ascorbic acid ความเข้มข้น 50mM โดยการละลาย Ascorbic acid 0.088 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ค.3 Fe (III)-1,10-phenanthroline (รีเอเจนต์)

สารเคมี

1. 1,10- phenanthroline
2. 1M กรดไฮโดรคลอริก
3. Ferric ammonium sulphate

ขั้นตอนการเตรียม

1. ละลาย 1,10- phenanthroline 0.198 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย 1M กรดไฮโดรคลอริก โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริก 2 มิลลิลิตรลงไปนในสารละลายข้อ 1
3. เติม Ferric ammonium sulphate 0.16 กรัม ลงในสารละลายข้อ 2 เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดของขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ง.1 LB broth

ส่วนประกอบ (1 ลิตร)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

ง.2 อาหารเหนียวสำหรับการสร้าง AI-2 (เปปโตน 1%)

ส่วนประกอบ (1 ลิตร)

Peptone	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	5	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

๓.3 selective medium

ส่วนประกอบ (1 ลิตร)

Peptone	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	5	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.70	มิลลิลิตร
Brilliant green	5.2	มิลลิลิตร
Niaproof4	2.21	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม selective agent

1. MgCl₂·6H₂O

การเตรียม MgCl₂·6H₂O ความเข้มข้น 40% โดยละลาย MgCl₂·6H₂O 40 กรัม ในน้ำกลั่น 125.48 มิลลิลิตร

2. Brilliant green

การเตรียม Brilliant green ความเข้มข้น 0.1% โดยละลาย Brilliant green 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

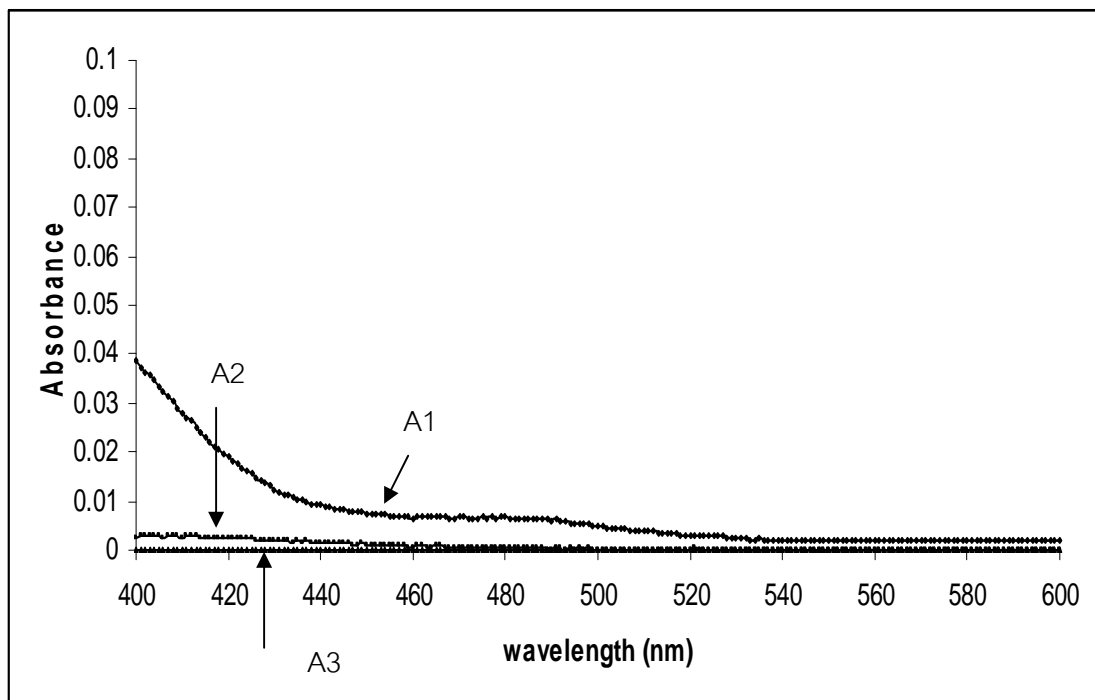
วิธีการเตรียม selective medium

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น Brilliant green และ Niaproof4 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซ้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 60°C แล้วเติม Brilliant green และ Niaproof4 ที่กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอนเมตร เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในสารดังกล่าว ลงในอาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

ภาคผนวก จ

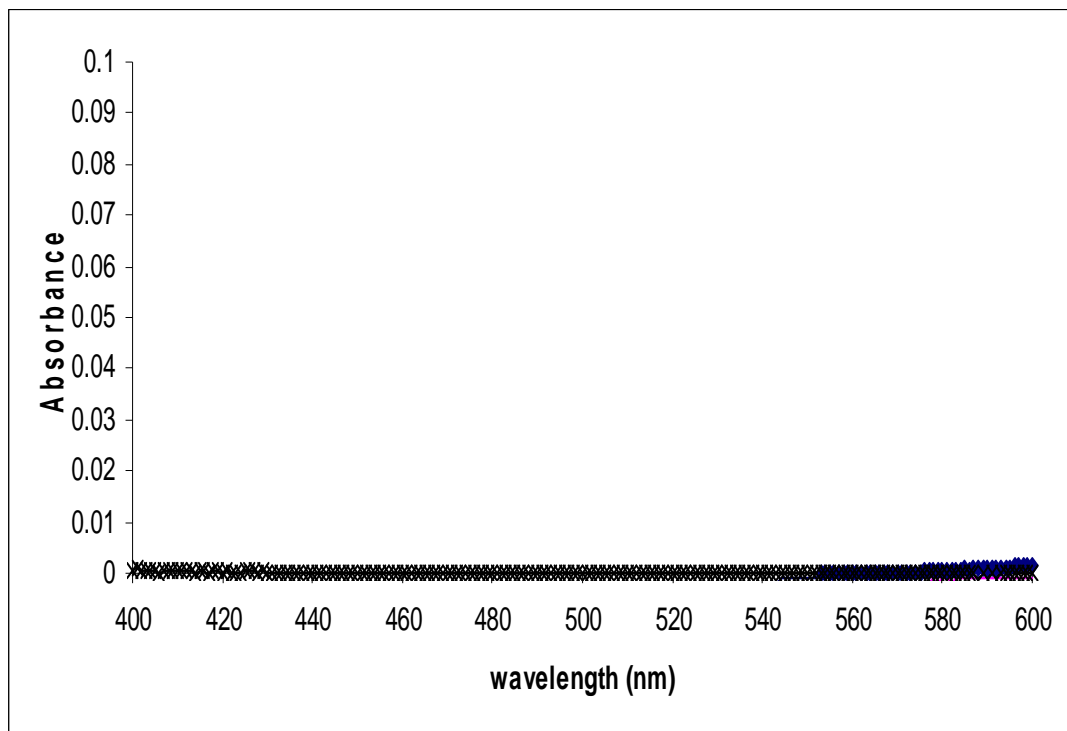
สเปกตรัมของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่ละลายอยู่ใน
สารอะซิโตน หรือคัลเจอร์กับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

จ. 1 สารประกอบที่เป็นตัวแทนเมทาบอลไลท์ของจุลินทรีย์



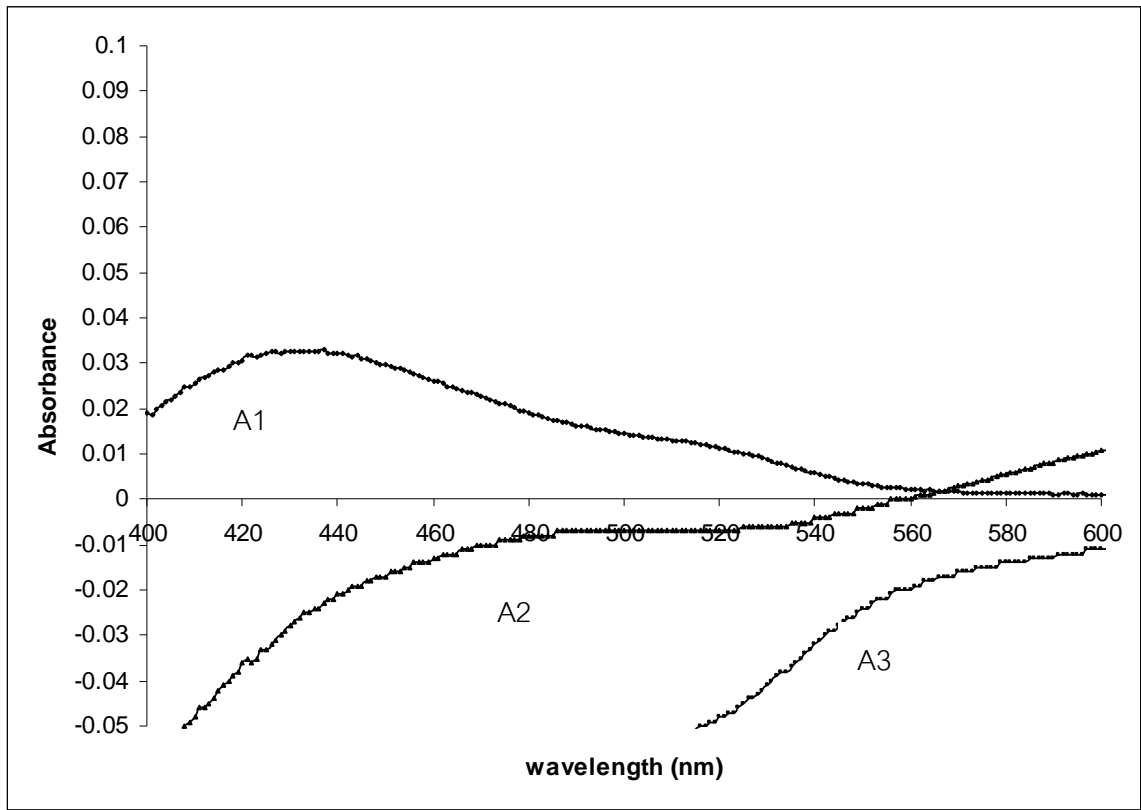
รูปที่ จ.1 สเปกตรัมของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ammonium Acetate (A1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (A2) และ AHL (A3) กับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

จ. 2 องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหนียวนำการสร้าง AI-2 (เปปโตนิค 1%)



รูปที่ จ.2 สเปกตรัมของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมคลอไรด์ กลูโคส กาแลกโตส และอะราบิโนส กับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

จ. 3 Selective agent



รูปที่ จ.3 สเปกตรัมของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (A1) Brilliant green (A2) และ Niaproof4 (A3) กับ Fe(III)-1,10-phenanthroline

ภาคผนวก จ

แหล่งที่มาของ *S. Typhimurium*จ.1 *S. Typhimurium* ATCC 13311

Bacteria

ATCC® Number: 13311™

Organism:

Salmonella enterica subsp. *enterica* (ex. Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium deposited as *Salmonella typhimurium* (Loeffler) Castellani and Chalmers

Designations:

NCTC 74

Isolation:

feces, human ([180719] food poisoning in man)

Isolation date: 1911

Depositor:

NCTC

Biosafety Level

2

Shipped:

freeze-dried

Growth Conditions:

ATCC medium3: Nutrient agar or nutrient broth

ที่มา : (ATCC, 2010 : online)

๑.2 S. Typhimurium ATCC 14028



Bacteria

ATCC® Number: 14028™

Organism: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex. Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium deposited as *Salmonella typhimurium* (Loeffler) Castellani and Chalmers
 Designations: CDC 6516-60

Isolation: tissue, animal ([172299] pools of heart and liver from 4-week-old chickens)

Depositor: CDC

History CDC University of Missouri

Biosafety Level 2

Shipped: freeze-dried

Growth Conditions: [ATCC medium3](#): Nutrient agar or nutrient broth

Temperature: 37.0°C

Atmosphere: Aerobic

ที่มา : (ATCC, 2010 : online)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริลักษณ์ วัฒนวาณิชกร เกิดวันที่ 28 พฤษภาคม 2525 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจากวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อใน หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

ศิริลักษณ์ วัฒนวาณิชกร, ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา และ พัชณิตา ธรรมมงคลกิจ. 2553. การประเมินวิธีการตรวจสอบสัณฐาน Autoinducer-2 ที่สร้างจาก *Salmonella* Typhimurium โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี. ใน การประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 16 (ภาคบรรยาย). วันที่ 11 มีนาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.