รายงานการวิจัย

การรอดชีวิตของ *Campylobacter jejuni* ในแผ่นชีวะหลังการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน

ณฐนนท์ ตราชู[1] และ ศศิณี กันยาบุญ[2]

Abstract

Trachoo, N.[1] and Kunyaboon, S[2]

Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms after chlorine treatment

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2006, 28(5) : 991-998

Survival of *C. jejuni* in biofilms isolated from two chicken houses in Thailand (FBRL-C04, FBRL-B05 and FBRL-B06) after chlorine treatment was studied. Biofilm cultures were grown on stainless steel surface in 50% trypticase soy broth for 3 days, subsequently *C. jejuni* cells were allowed to attach to these biofilms for 4 h at 25ºC. Sodium hypochlorite was used to prepare sanitizing solution with active chlorine of 15 ppm and 25 ppm. Stainless steel coupons containing *C. jejuni* with and without biofilms were treated with chlorine for 30 sec and neutralized with 0.05% sodium thiosulfate. At both concentrations, *C. jejuni* were inactivated to lower than 1 $\log_{10}$CFU/cm^2 when initial attachment load was approximately 4 $\log_{10}$CFU/cm^2. However, *C. jejuni* in all samples treated with 15 ppm active chlorine were recovered in enrichment media. When treated with the higher concentration of chlorine, 25 ppm, *C. jejuni* in biofilm of FBRL-C04 (5/9), FBRL-B06 (1/9) and biofilm-free surface (1/9) could also be recovered. This indicates that chlorine treatment at 15 and 25 ppm could not completely inactivate *C. jejuni* attached to biofilms and biofilm-free surfaces. Biofilm of FBRL-C04 enhanced the survival of *C. jejuni* after chlorine treatment at 25 ppm although biofilm

Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Muang, Mahasarakham, 44000 Thailand.

[1]Ph.D.(Food Science) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ [2]วท.บ.(เทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์) ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

Corresponding e-mail: nathanon.t@msu.ac.th

รับต้นฉบับ 13 ธันวาคม 2548 รับลงพิมพ์ 15 มีนาคม 2549

initial attachment as determined by plate count method was similar to that of other biofilms. Attachment load of viable biofilm cells may not contribute to enhanced survival of *C. jejuni* in chlorine treatment.

Key words : *Campylobacter jejuni*, biofilm, chlorine

บทคัดย่อ

ณฐนนท์ ตราชู และ ศศิณี กันยาบุญ

การรอดชีวิตของ *Campylobacter jejuni* ในแผ่นชีวะหลังการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2549 28(5) : 991-998

การศึกษาการรอดชีวิตหลังการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนของ *Campylobacter jejuni* บนแผ่นชีวะของแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ 2 แห่งในประเทศไทย จำนวน 3 สายพันธุ์ (FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06) โดยนำ *C. jejuni* มาเกาะเป็นเวลา 4 ชม. ที่ 25°C บนแผ่นชีวะที่เลี้ยงใน 50% trypticase soy broth ที่มีอายุ 3 วัน แล้วทำการฆ่าเชื้อ *C. jejuni* โดยใช้สารฆ่าเชื้อคลอรีนเตรียมจาก sodium hypochlorite ให้ได้ความเข้มข้นของคลอรีนออกฤทธิ์ 15 ppm และ 25 ppm โดยการแช่เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดย 0.05% sodium thiosulfate จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของคลอรีนทั้งสองทำให้ *C. jejuni* ลดจำนวนลงจาก 4 $\log_{10}$ CFU/cm^2 เหลือต่ำกว่า 1 $\log_{10}$ CFU/cm^2 อย่างไรก็ตามภายหลังการ enrichment สามารถตรวจพบ *C. jejuni* ในตัวอย่างทั้งหมดที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้นข้น 15 ppm และในบางแผ่นชีวะที่ 25 ppm คือแผ่นชีวะ FBRL-C04 (5/9), FBRL-B06 (1/9) และตัวอย่างที่ไม่มีแผ่นชีวะ (control) (1/9) แสดงว่าที่ความเข้มข้นคลอรีนทั้งสองไม่สามารถทำลายเชื้อ *C. jejuni* ในแผ่นชีวะทั้งหมดได้ *C. jejuni* มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นเมื่อเกาะบนแผ่นชีวะ FBRL-C04 แม้ว่าผลจากการนับเชื้อจะพบว่า FBRL-C04 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในแผ่นชีวะไม่แตกต่างจากแผ่นชีวะ FBRL-B05 และ FBRL-B06 แสดงว่าจำนวนเซลล์แผ่นชีวะที่มีชีวิตไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการปกป้อง *C. jejuni* จากการทำลายด้วยคลอรีน

แผ่นชีวะ (biofilm) คือชั้นของจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนผิววัสดุ การเกิดแผ่นชีวะเป็นปรากฏการณ์ที่จุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในธรรมชาติ และพบได้เสมอในบริเวณที่มีความชื้นสูง ดังนั้นแผ่นชีวะสามารถพบได้เสมอในโรงเรือนเลี้ยงไก่และโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ปีก และ *C. jejuni* เป็นจุลินทรีย์เชื้อโรคก่อให้เกิดโรคท้องร่วงที่เป็นปัญหาอยู่มากในเนื้อสัตว์ปีก (Altekruse *et al*., 1999) จุลินทรีย์ที่อาศัยในแผ่นชีวะได้รับประโยชน์หลายประการ เช่น เป็นแหล่งเก็บกักอาหารและความชื้น งานวิจัยหลายเรื่องชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ในแผ่นชีวะหรือในรูปแบบของแผ่นชีวะ จะมีอัตราการรอดชีวิตจากสารฆ่าเชื้อและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้สูงขึ้น มีรายงานว่า *C. jejuni* ที่อาศัยอยู่ในแผ่นชีวะของจุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ยาวนานขึ้น (Trachoo *et al*., 2002) และรอดชีวิตจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ (Trachoo and Frank, 2002) อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานการศึกษากับจุลินทรีย์แผ่นชีวะที่นำมาจากโรงเรือนเลี้ยงไก่ในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเขตร้อน โรงเรือนเลี้ยงไก่จัดว่าเป็นแหล่งที่พบเชื้อ *C. jejuni* ได้ตามธรรมชาติ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตหลังการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนของ *C. jejuni* ในแผ่นชีวะที่แยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ 2 แห่งในประเทศไทย ซึ่งสารคลอรีน ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อและสารทำความสะอาดที่มีราคาถูกและมีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้ในประเทศและต่างประเทศอย่างแพร่หลาย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์และแผ่นชีวะ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการสร้างแผ่นชีวะเพื่อการเกาะติด

ของ *C. jejuni* นำมาจากตัวอย่างแผ่นชีวะในน้ำที่แยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ทั้ง 2 แห่ง โดยได้รับจากห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อโรคทางอาหารและแผ่นชีวะ (FBRL) ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ได้แก่ เชื้อ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 ซึ่งแยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ทั้ง 2 แห่งในประเทศไทย (Table 1) เชื้อเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างแผ่นชีวะได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ส่วนเชื้อ *C. jejuni* ATCC 29428 ได้มาจาก New Zealand Reference Culture Collection, Institute of Environmental Science and Research Limited, New Zealand ซึ่งแยกได้จากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยอาการอุจจาระร่วง เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน 15% glycerol-brucella broth ที่อุณหภูมิ -35ºC และการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การเกาะติด

ทำการขีดเชื้อ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 บนอาหารวุ้นเอียง Tryptic Soy Agar (TSA, Criterion, U.S.A.) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลาเติม 0.1% peptone water ปริมาตร 3 มล. แล้วเขย่าด้วยระบบสั่น (vortex mixer; Model G560E, Scientific Industries, INC., USA) ที่ความเร็วสูงสุด เพื่อให้เชื้อหลุดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จะได้สารแขวนลอยของเชื้อ (cell suspension) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A_{600}) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (PU8625 UV/VIS Spectrophotometer, Philips, England) ให้ได้ค่าในช่วง 0.70-0.74 หรือประมาณ 7 $\log_{10}$CFU/cm^2 ดูดสารแขวนลอยของแต่ละเชื้อ ปริมาตร 2 มล. ลงใน Half Tryptic Soy Broth (HTSB: 50% Tryptic Soy Broth) (เพื่อจำลองสภาวะที่พบในแหล่งน้ำในธรรมชาติที่มีสารอาหารต่ำ) ปริมาตร 18 มล. ที่มีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) ขนาด 1 x 4 x 0.1 ซม. บรรจุอยู่ 1 แผ่น/หลอด จำนวน 2 หลอด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมจาก HTSB หลอดที่ 1 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 30 มล. เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 10 วินาที แล้วทำการลอกแผ่นชีวะ โดยนำเหล็กกล้าไร้สนิม แผ่นดังกล่าวใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุทรายแม่น้ำปลอดเชื้อ ขนาด 40 mesh จำนวน 5 กรัม และ 0.1% peptone water ปริมาตร 10 มล. เขย่าด้วยระบบสั่นเป็นเวลา 30 วินาที ทำให้เจือจางใน 0.1% peptone water ปริมาตร 9 มล. แล้วทำการกวาดเชื้อ (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 24 ชม. นับเชื้อเพื่อศึกษาความสามารถในการเกาะติดแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมของเชื้อ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 ส่วนในหลอดที่ 2 ทำการเลี้ยงเชื้อต่อไป โดยล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำเหล็กกล้าไร้สนิมแผ่นดังกล่าวใส่ลงในหลอดอาหาร HTSB ปริมาตร 18 มล. หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 24 ชม. ทำซ้ำเช่นนี้อีก 2 รอบ เพื่อให้เชื้อสร้างแผ่นชีวะบนผิวเหล็กกล้าไร้สนิม จะ

Table 1. Characteristics of biofilm producers isolated from two chicken houses

Isolates	Colony on PCA	Gram Reaction[a]	Cell shape	Catalase test[b]	Oxidase test	Carbohydrate fermentation			
						Glucose	Sucrose	Lactose	Sorbitol
FBRL-C04	circular, convex, white	-	coccoid	+[b]	-	acid, slight gas	acid, slight gas	acid, slight gas	acid, slight gas
FBRL-B05	circular, convex, white	-	rod	+	+	acid, slight gas	acid, no gas	slight acid, no gas	no acid, slight gas
FBRL-B06	circular, convex, yellow	-	rod	+	+	-	-	acid, slight gas	-

[a] KOH method was used to determine Gram stain reactions.
[b] +, positive reaction; -, negative reaction.

ได้แผ่นชีวะที่มีอายุ 72 ชม. ล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วใส่ HTSB ปริมาตร 18 มล. หลอดใหม่ เติมสารแขวนลอยของเชื้อ *C. jejuni* ปริมาตร 2 มล. ซึ่งวัดค่า A_{600} ให้ได้ค่าในช่วง 0.70-0.74 หรือประมาณ 7 $\log_{10}$CFU/cm^2 แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 4 ชม.

การฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน

หลังจากที่เชื้อ *C. jejuni* เกาะติดแผ่นชีวะบนผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเป็นเวลา 4 ชม. ล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วจุ่มลงในสารละลายคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นของคลอรีนออกฤทธิ์ (active achlorine) 15 และ 25 ppm ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจุ่มลง 0.05% sodium thiosulphate-phosphate buffer ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยาของคลอรีน (neutralization) ก่อนนำไปทำการลอกแผ่นชีวะ

การเตรียมและวัดความเข้มข้นของคลอรีนออกฤทธิ์

สารละลายคลอรีนเตรียมโดยผสมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (7%) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 และ 290 นาโนเมตร คำนวณของคลอรีนออกฤทธิ์ (Chesney *et al*., 1991) ดังนี้ โดยฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของคลอรีนเกิดจากผลรวมของ hypochlorus (Uncharged) [HOCL] และ hypochlorite ion [OCL^-] จึงทำการคำนวณหา total molar ของ hypochlorus และ hypochlorite ดังนี้ [HOCL] = [(44.923 × A235) - A290]/4447.4385 และ [OCL^-] = -[(0.27 × A235) - A290] / 348.2934 เมื่อ A235 และ A290 คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และ 290 นาโนเมตร และ total active chlorine (ppm) เท่ากับ total molar × 52 × 1000

การลอกแผ่นชีวะ

ทำการลอกแผ่นชีวะ โดยนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุทรายแม่น้ำปลอดเชื้อขนาด 40 mesh ปริมาณ 5 กรัม และ Brucella Broth ที่เติม FBP ปริมาตร 10 มล. เขย่าด้วยระบบสั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที ทำการกวาดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brucella agar ดัดแปลง (BTTC-R) ซึ่งประกอบด้วย brucella agar 43 กรัม/ลิตร (Criterion, U.S.A.); ferrous sulfate 0.5 กรัม/ลิตร, sodium bisulfate 0.2 กรัม/ลิตร, pyruvic acid 0.5 กรัม/ลิตร (FBP) และ 2,3,5-triphenyl tretazolium chloride (TTC) 50 มก./ลิตร (Sigma, St. Louis) ทำการกรองสารละลาย FBP และ TTC ผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 μm แล้วเติมลงใน brucella agar ภายหลังจากฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที การบ่มเชื้อ *C. jejuni* ทำที่อุณหภูมิ 42ºC เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้สภาวะบรรยากาศ microaerobic ซึ่งประกอบด้วย ออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% และไนโตรเจน 85% (Campy*Gen*™, Oxoid) นับเชื้อ *C. jejuni* โดยนับเฉพาะโคโลนีที่มีสีแดงบนพื้นใส เพื่อเป็นการยืนยันว่า *C. jejuni* รอดชีวิตหรือถูกทำลายไปทั้งหมด จึงนำหลอดทดลองที่ผ่านการลอกแผ่นชีวะแล้วไปบ่มเชื้อต่อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (DK-SI001, DAIKI, Korea) ความเร็ว 90 รอบ/นาที อุณหภูมิ 42ºC เป็นเวลา 72 ชม. แล้วทำการยืนยันการรอดชีวิตของ *C. jejuni* โดยนำไปขีดบนอาหาร BTTC-R อีกครั้ง ตรวจดูโคโลนีที่สงสัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ (motility test) และวิธี latex agglutination (Oxoid)

แผ่นชีวะบนเหล็กกล้าไร้สนิมถูกนำมาย้อมสีด้วย acridine orange (0.01% in acetate buffer, pH 4.0) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้งในที่มืดแล้วนำมาส่องดูด้วยกล้อง epifluorescence microscope (Olympus BX51; 100W Halogen lamp and 100W Mercury Lamp เชื่อมต่อด้วย Olympus DP70 Digital camera) ด้วย excitation wavelength ที่ 595 นาโนเมตร และ emission wavelength ที่ 615 นาโนเมตร ถ่ายภาพที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ SAS software ด้วยวิธี PROC GLM และ PROC ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูล

ที่นำวิเคราะห์มาจากการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลอง ตัวอย่างชุดควบคุมในการทดลองคือชุดตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อแผ่นชีวะ (biofilm-free control)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เชื้อ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HTSB เป็นเวลา 3 วัน โดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชม. พบว่าสามารถสร้างแผ่นชีวะนับจำนวนเซลล์ได้ประมาณ 6 $\log_{10}$CFU/cm^2 เชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถสร้างแผ่นชีวะได้ดี นำมาจากตัวอย่างแผ่นชีวะของโรงเรือนเลี้ยงไก่ 2 แห่ง ซึ่งโรงเรือนเลี้ยงไก่จัดว่าเป็นแห่งที่พบเชื้อ *C. jejuni* ได้ตามธรรมชาติ (Pearson *et al*., 1993)

เมื่อนำ *C. jejuni* มาทำการเกาะติดบนแผ่นชีวะโดยการบ่มจุลินทรีย์ทั้งสองร่วมกันที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 4 ชม. พบว่า *C. jejuni* สามารถเกาะติดได้ในปริมาณใกล้เคียงกันในทุกแผ่นชีวะคือ 4 $\log_{10}$CFU/cm^2 จากนั้นทำการทดสอบว่า การล้างแผ่นชีวะที่มี *C. jejuni* เกาะติดอยู่ (ซึ่งเป็นขั้นตอนในการหยุดปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ของคลอรีน) ด้วย 0.05% sodium thiosulfate จะทำให้ *C. jejuni* บนแผ่นชีวะหลุดลอกหรือตายลงไปบ้างหรือไม่ จากผลการทดลองพบว่า การใช้ 0.05% sodium thiosulfate ล้างแผ่นชีวะนาน 30 วินาที ไม่ทำลายหรือลดการเกาะติดของ *C. jejuni* ในแผ่นชีวะของ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 แต่อย่างใด (Figure 1) จึงได้นำมาใช้ในการหยุดปฏิกิริยาของคลอรีนในการทดลองต่อไป

การทำลายเชื้อ *C. jejuni* ที่เกาะติดบนแผ่นชีวะ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 ด้วยการแช่ในคลอรีนที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm และ 25 ppm นาน 30 วินาที พบว่าสารละลายคลอรีนทั้งสองระดับความเข้มข้น สามารถลดจำนวน *C. jejuni* ลงจาก 4 logCFU/cm^2 เหลือต่ำกว่า 1 logCFU/cm^2 (Table 2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. jejuni* สามารถถูกทำลายด้วยสารละลายคลอรีนทั้งสองระดับความเข้มข้นได้ เมื่อทำการ enrichment เชื้อ *C. jejuni* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนดังกล่าวข้างต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified brucella broth ที่ผสมสารลดปริมาณออกซิเจน FBP (Stern, 1982) ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 42ºC นาน 72 ชม. เพื่อเป็นการตรวจสอบให้มั่นใจว่าเชื้อ *C. jejuni* นั้นได้ถูกทำลายลงไปหมดหรือไม่ ผลการทดลองพบว่า การฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm สามารถตรวจพบ *C. jejuni* ในตัวอย่างทั้งหมด (9/9 ตัวอย่าง) และเมื่อฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน

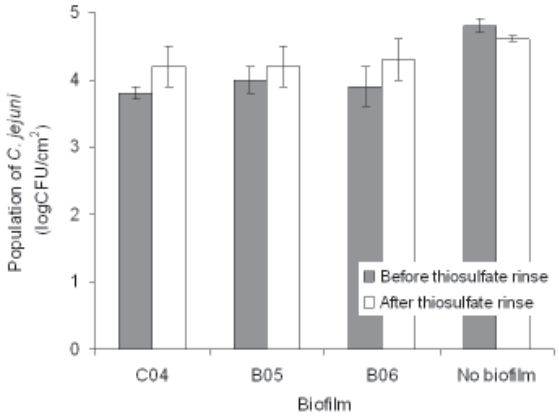

Figure 1. Effect of sodium thiosulfate rinse on attachment and viability of *C. jejuni* on biofilms isolated from chicken houses (FBRL-C04, FBRL-B05 and FBRL-B06) and biofilm-free surfaces. Samples containing biofilm were incubated with *C. jejuni* to allow attachment for 4 h and rinsed with 0.05% sodium thiosulfate for 30 sec. Viable count was determined on modified brucella agar incubated at 42ºC for 48 h under microaerobic conditions. Data are the means of three replications.

Table 2. Survival[1] of *C. jejuni* on biofilms isolated from chicken houses (FBRL-C04, FBRL-B05 and FBRL-B06) and biofilm-free surfaces after treatment with 15 ppm and 25 ppm chlorine for 30 sec.

Biofilm culture[2]	Concentration of active chlorine[3] (ppm)	
	15	25
	logCFU/cm^2	
FBRL-C04	< 1	< 1
FBRL-B05	< 1	< 1
FBRL-B06	< 1	< 1
No biofilm	< 1	< 1

[1]Data are the means of three replications
[2]Initial count of biofilm (attached) cells was 6 logCFU/cm^2 and initial attachment of *C. jejuni* was 4 logCFU/cm^2.
[3]pH of 15 and 25 ppm chlorine solution was 9 and 11, respectively.

Table 3. Survival of *C. jejuni* on biofilms isolated from chicken houses (FBRL-C04, FBRL-B05 and FBRL-B06) and biofilm-free surfaces after treatment with 15 ppm and 25 ppm chlorine for 30 sec and samples were enriched in a modified brucella broth at 42ºC for 72 hr.

Biofilm culture	Concentration of active chlorine (ppm)	
	15	25
	No. positive/total	
FBRL-C04	9/9	5/9
FBRL-B05	9/9	0/9
FBRL-B06	9/9	1/9
No biofilm	9/9	1/9

ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm สามารถตรวจพบ *C. jejuni* จากแผ่นชีวะ FBRL-C04 ซึ่งมีเชื้อ *C. jejuni* อยู่ถึง 5/9 ตัวอย่าง ส่วนในแผ่นชีวะ FBRL-B06 พบว่ามีเชื้อ *C. jejuni* อยู่ 1/9 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่มีแผ่นชีวะ (control) พบว่ามีเชื้อ *C. jejuni* อยู่ 1/9 ตัวอย่าง (Table 3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์ *C. jejuni* ที่รอดชีวิตจากการทำลายด้วยคลอรีน และผ่านกระบวนการ enrichment ในอาหารเหลวนี้สามารถซ่อมแซมตัวเอง และกลับมามีชีวิตและแบ่งเซลล์ได้อีกครั้ง กระบวนการ recovery นี้เกิดขึ้นเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ได้รับความเสียหายจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (sublethally injured cells) จะสามารถใช้เวลาระยะหนึ่งซ่อมแซมตัวเองได้หากได้รับสารอาหารและสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง (Doyle *et al*., 1997) ดังเคยมีรายงานเกี่ยวกับ sublethally injured cells กับจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารบางชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. (Doyle *et al*., 1997) รวมทั้ง *C. jejuni* (Mason *et al*., 1999) ดังนั้นการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง แล้วไม่พบโคโลนีที่น่าสงสัยขึ้น ไม่ได้แสดงถึงการไม่มีเชื้อชนิดนั้นในตัวอย่าง เพราะหากเชื้อนั้นอยู่ในสภาพ sublethally injured cells จะไม่สามารถแบ่งตัวและกลายเป็นโคโลนีได้ทันเวลาที่มีการตรวจนับเชื้อตาม

ปกติ เช่นเดียวกับเชื้อ *C. jejuni* เมื่ออยู่นอกลำไส้สัตว์พาหะย่อมมีความอ่อนแอ เนื่องจากความไม่เหมาะสมของอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่สูงในบรรยากาศ (Nachamkin *et al*., 1992) และเมื่อได้รับสารฆ่าเชื้ออย่างคลอรีนจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะกลายสภาพมาเป็น sublethally injured cells และไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ตามปกติ (non-culturable) ดังนั้นผลการทดลองจึงบ่งบอกว่าที่ความเข้มข้นคลอรีนทั้งสองไม่สามารถทำลายเชื้อ *C. jejuni* ในแผ่นชีวะทั้งหมดได้ เชื้อ *C. jejuni* ที่รอดชีวิตนี้ยังสามารถติดต่อไปยังสัตว์ และปนเปื้อนมาสู่คนและก่อโรคได้ในที่สุด ผลการทดลองที่น่าสนใจอีกประการคือ *C. jejuni* มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นเมื่อเกาะบนแผ่นชีวะ FBRL-C04 เปรียบเทียบกับแผ่นชีวะอื่นในการทดลองเดียวกัน แม้ว่าผลจากการนับเชื้อ (plate count method) จะพบว่า FBRL-C04 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในแผ่นชีวะไม่แตกต่างไปจำนวนเซลล์ในแผ่นชีวะ FBRL-B05 และ FBRL-B06 แสดงว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการปกป้อง *C. jejuni* ที่อาศัยในแผ่นชีวะจากการทำลายด้วยคลอรีน แต่อาจเป็นผลมาจากสารอินทรีย์จำพวก polysaccharides ซึ่งถูกขับออกมาจากเซลล์ของแผ่นชีวะอาจทำปฏิกิริยากับคลอรีนออกฤทธิ์ (Block, 1991) ส่งผลให้ความเข้มข้นและประสิทธิภาพของคลอรีนในการทำลายเชื้อลดลง

มีงานวิจัยรายงานว่าเชื้อ *C. jejuni* สามารถเกาะบนแผ่นชีวะของเชื้อ *Enterococcus faecium* (Trachoo and Brooks, 2005) โดยผู้วิจัยชี้ว่า แผ่นชีวะของเชื้อดังกล่าวอาจมีส่วนล่อให้ *C. jejuni* เกาะติดได้มากขึ้น อย่างไรก็ดี ใน Figure 2 ซึ่งแสดงถึงการเกาะของเชื้อ *C. jejuni* และจุลินทรีย์แผ่นชีวะ พบว่าเชื้อ *C. jejuni* สามารถเกาะบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้เอง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแผ่นชีวะที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีคุณสมบัติต่างไปจากแผ่นชีวะของเชื้อ *E. faecium* อย่างไรก็ดี การปรากฏของแผ่นชีวะร่วมกับเชื้อ *C. jejuni* ย่อมส่งผลให้ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเพิ่มและลดประสิทธิภาพของสารคลอรีนในการฆ่าเชื้อลงได้ นอกจากนี้เคยมีรายงานว่า *C. jejuni* สามารถสร้างแผ่นชีวะหรือเกาะติดพื้นผิวพลาสติกได้น้อย (Trachoo *et al*., 2002) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใช้วัสดุเกาะติดต่างกัน และเหล็กกล้าไร้สนิมนี้มีความชอบน้ำสูงกว่าพลาสติก

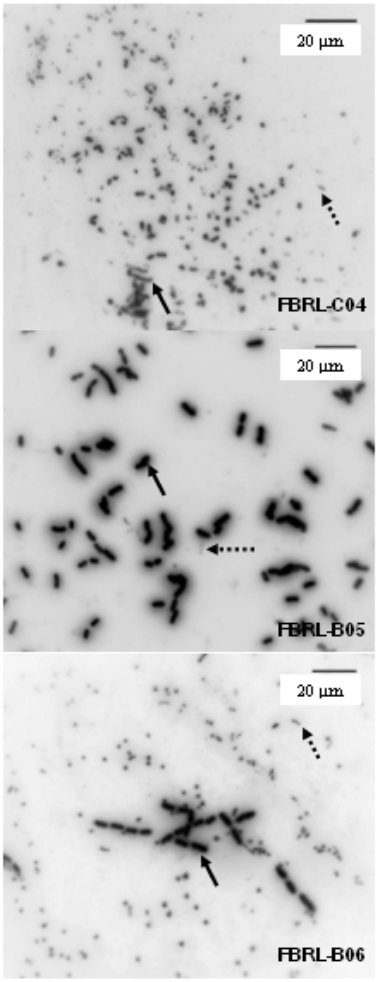

Figure 2. Attachment of *C. jejuni* (dotted arrows) and biofilm producers, FBRL-C04-B05 and B06, (solid arrows) on stainless steel surfaces. Scale bars= 20 µm.

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าการฆ่าเชื้อ *C. jejuni* ด้วยคลอรีนที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 25 ppm สามารถทำลายเชื้อ *C. jejuni* ได้ ลงถึง 3 $\log_{10}$CFU/cm^2 อย่างไรก็ตาม ภายหลังการ enrichment สามารถยังตรวจพบ *C. jejuni* ในตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 15 ppm และในบางแผ่นชีวะที่ฆ่าเชื้อด้วย 25 ppm แสดงว่าที่ความเข้มข้นคลอรีนทั้งสองไม่สามารถทำลายเชื้อ *C. jejuni* ในแผ่นชีวะทั้งหมดได้ จึงเป็นข้อควรระวังของการ

ใช้สารฆ่าเชื้อคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า *C. jejuni* มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นเมื่อเกาะบนแผ่นชีวะ FBRL-C04 เปรียบเทียบกับแผ่นชีวะ FBRL-B05 และ FBRL-B06 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นในแผ่นชีวะทั้ง 3 ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจำนวนเซลล์ FBRL-C04, FBRL-B05 และ FBRL-B06 ที่มีชีวิตในแผ่นชีวะอาจไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการปกป้อง *C. jejuni* จากการทำลายด้วยคลอรีน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BT-B-01-AM-53-4705 และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I. and Swerdlow, D.L. 1999. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. Emerg. Infect. Dis., 5: 28-35.

Block, S.S. 1991. Disinfection, sterilization, and preservation. Lea & Febiger, Philadelphia.

Chesney, J.A., Mahoney, J.R., Jr. and Eaton, J.W. 1991. A spectrophotometric assay for chlorine-containing compounds. Anal. Biochem., 196: 262-266.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. 1997. Food microbiology: fundamentals and fronteirs, 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.

Mason, M.J., Humphrey, T.J. and Martin, K.W. 1999. Isolation of sublethally injured campylobacters from poultry and water sources. Br. J. Biomed. Sci., 56: 2-5.

Nachamkin, I., Blaser, M.J. and Tomskins, L.S. 1992. *Campylobacter jejuni* - current status and future trends. ASM, Washington, D. C.

Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J. and Colwell, R.R. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol., 59: 987-996.

Stern, N.J. 1982. Methods for recovery of *Campylobacter jejuni* from foods. J. Food Protect., 45: 1332-1337.

Trachoo, N. and Brooks, J.D. 2005. Attachment and heat resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* biofilm. Pak. J. Biol. Sci., 8: 599-605.

Trachoo, N. and Frank, J.F. 2002. Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni* - containing biofilms. J. Food Prot., 65: 1117-1121.

Trachoo, N., Frank, J. F. and Stern, N. J. 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. J. Food Prot., 65: 1110-1116.