

การเกาะติดของ *Campylobacter jejuni* บนแผ่นชีวะที่ได้จาก โรงเรือนเลี้ยงไก่ 2 แห่งในประเทศไทย

ณัฐนนท์ ตราชู¹ ศศิณี กัญยาบุญ² และ มนต์ชัย ดวงจินดา³

Abstract

Trachoo, N¹, Kunyaboon, S¹ and Daungjinda, M.²

Attachment of *Campylobacter jejuni* on biofilms from two chicken houses in
Thailand

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(1) : 109-116

The attachment of *C. jejuni* on four gram negative biofilms (FBRL-C04, FBRL-B05, FBRL-F01 and FBRL-B06) isolated from two chicken houses were studied. It was found that *C. jejuni* attached to biofilm of FBRL-F01 at the highest rate (4.4 logCFU/cm²) compared ($P<0.05$) to FBRL-C04 FBRL-B05 and FBRL-B06 (4.0 4.0 and 4.1 logCFU/cm², respectively). Coaggregation between *C. jejuni* and biofilm organisms may indicate the ability of organisms to form biofilm together. Percent coaggregation between *C. jejuni* and biofilm organisms, FBRL-C04 and FBRL-F01 was 39.14% and 33.70%, respectively, higher ($P<0.05$) than that with FBRL-B05 and FBRL-B06 (-3.38% and 12.87%, respectively). Hydrophobicity of planktonic and biofilm

¹ Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Muang, Maha Sarakham 44000 Thailand. ²Asst. Prof., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khonkaen University, Muang, Khonkaen, 40002 Thailand.

¹Ph.D.(Food Science), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ่วท.บ. (เทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ), ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.เมือง จ. มหาสารคาม 44000, ³Ph.D.(Animal Breeding and Genetics), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อําเภอมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Corresponding email: nathanon.t@msu.ac.th

รับต้นฉบับ 7 พฤศจิกายน 2548 รับลงพิมพ์ 12 กรกฎาคม 2549

cells of *C. jejuni* and 4 biofilm producers were measured by the microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) method using hexadecane. FBRL-B06 showed the highest ($P<0.05$) hydrophobicity (68.95%) indicating more hydrophobic components on its cell surface. Planktonic cells had lower ($P<0.05$) hydrophobicity than biofilm cells. However, the degree of hydrophobicity of biofilm cells was not related to attachment of *C. jejuni* on biofilms.

Key words: *Campylobacter jejuni*, biofilm, chicken house

บทคัดย่อ

ณัฐนนท์ ตราฐุ ศศิณี กัญยาบุญ และ มนต์ชัย ดวงจินดา
การเกาะติดของ *Campylobacter jejuni* บนแผ่นชีวะที่ได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ 2 แห่ง
ในประเทศไทย

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(1) : 109-116

การศึกษาการเกาะติดของเชื้อ *C. jejuni* บนแผ่นชีวะของจุลินทรีย์ 4 ชนิด ที่แยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ 2 แห่ง คือ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 พบว่าแผ่นชีวะของเชื้อ FBRL-F01 สามารถส่งเสริมการเกาะติดของ *C. jejuni* ได้ดีที่สุด ($P<0.05$) คือเกาะติด $4.4 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ ในขณะที่เชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 และ FBRL-B06 สามารถเกาะติด 4.0 4.0 และ $4.1 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ การตกตะกอนรวมกลุ่ม (coaggregation) จุลินทรีย์ที่สามารถตกตะกอนร่วมกันได้แสดงถึงความสามารถในการเกิดเป็นแผ่นชีวะร่วมกันได้ดี การตกตะกอนร่วมระหว่างเชื้อแผ่นชีวะ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 กับ *C. jejuni* พบว่าเชื้อ FBRL-C04 และ FBRL-F01 สามารถตกตะกอนร่วมกับ *C. jejuni* ได้ดี ($P<0.05$) มีค่า %Coaggregation เท่ากับ 39.14% และ 33.70% เมื่อเทียบกับเชื้อ FBRL-B05 และ FBRL-B06 คือ -3.38% และ 12.87% และเมื่อทดสอบความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเซลล์แขวนลอยและแผ่นชีวะโดยวิธี Microbial Adhesion to Hexadecane (MATH) พบว่าแผ่นชีวะของเชื้อ FBRL-B06 มีค่าความไม่ชอบน้ำสูงสุด ($P<0.05$) 68.95% แสดงว่าเชื้อชนิดนี้มีองค์ประกอบบางชนิดบนผิวเซลล์ที่สามารถรวมตัวกับ hexadecane ได้ดีกว่าแผ่นชีวะของเชื้ออื่น แผ่นชีวะมีค่าความไม่ชอบน้ำสูง ($P<0.05$) กว่าเชื้อที่มีสภาพแขวนลอย (planktonic cell) แต่ความไม่ชอบน้ำของเชื้อแผ่นชีวะในการทดลองนี้ ไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการส่งเสริมการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นชีวะ

Campylobacter jejuni เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียว ขนาด $0.2-0.5 \times 0.5-5.0 \mu\text{m}$ และอาจมีความยาวได้ถึง $8 \mu\text{m}$ เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของเซลล์ ไม่สามารถทนต่อออกซิเจนในบรรยากาศ อณูภูมิห้อง และความแห้งแล้ง มีช่วงอุณหภูมิเจริญค่อนข้างจำกัดคือ 37 ถึง 42°C *C. jejuni* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในหลายประเทศ สัตว์ปีกโดยเฉพาะอย่างยิ่งไก่พบว่าเป็นแหล่งของเชื้อโรคชนิดนี้อันดับต้นๆ มูลไก่และน้ำในโรงเรือนเลี้ยงไก่ก็นับว่าเป็นแหล่งสำคัญที่ช่วยให้

เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *C. jejuni* ภายในโรงเรือนได้อย่างรวดเร็ว

แผ่นชีวะ (biofilm) คือชั้นของจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนผิววัสดุ การเกิดแผ่นชีวะเป็นปรากฏการณ์ที่จุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในธรรมชาติ จุลินทรีย์ที่อาศัยในแผ่นชีวะได้รับประโยชน์หลายประการเช่น เป็นแหล่งเก็บกักอาหารและความชื้น งานวิจัยหลายเรื่องชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ในแผ่นชีวะหรือในรูปแบบของแผ่นชีวะ จะมีอัตราการรอดชีวิตจากสารฆ่าเชื้อและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นานขึ้น จากรายงานของ

Buswell และคณะ (1998) พบว่า *C. jejuni* ที่อาศัยอยู่ในแผ่นชีวะของจุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ยาวนานขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นชีวะของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไก่ ทั้งนี้การเกาะติดในแผ่นชีวะได้มากสามารถบ่งบอกถึงการรอดชีวิตได้มาก และนอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถในการตกตะกอนร่วมและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ เนื่องจากเป็นสมบัติที่อาจส่งผลต่อการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการทดลอง

แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างแผ่นชีวะในน้ำจากโรงเรือนไก่ 2 แห่ง ในจังหวัดมหาสารคามที่เคยตรวจพบเชื้อ *C. jejuni* โดยใช้สำลีพันก้านไม้ปลอดเชื้อชุบด้วย 0.1% peptone กวาดเอาแผ่นชีวะจากแหล่งธรรมชาติมาจำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญร่วมกับเชื้อ *C. jejuni* ในธรรมชาติ แล้วขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชม. จากนั้นทำการทดสอบทางชีวเคมี (Table 1) เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ให้ชื่อเป็น FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01

และ FBRL-B06 ส่วนเชื้อ *C. jejuni* ATCC 29428 ได้รับจาก New Zealand Reference Culture Collection, Institute of Environmental Science and Research Limited, New Zealand ซึ่งแยกได้จากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยโรค Campylobacteriosis เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน 15% glycerol-brucella broth ที่อุณหภูมิ -35°C และนอกจากนี้ยังเก็บรักษาโดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งอีกด้วย

การศึกษาการเกาะติด

เตรียมเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 บนอาหารวุ้นเลี้ยง Tryptic Soy Agar (TSA, Criterion, U.S.A.) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลาเติม 0.1% peptone water แล้วเขย่าด้วยระบบสัน (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 หรือเชื้อเริ่มต้นประมาณ $9 \log_{10}$ CFU/ml ดูดสารแขวนลอยของแต่ละเชื้อลงในอาหาร Half Tryptic Soy Broth (HTSB:50% Tryptic Soy Broth) (เพื่อจำลอง

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

Symbol designation	Tentative genus identification	Colony on PCA	Gram stain	Cell shape	Catalase test	Oxidase test	Carbohydrate fermentation			
							Glucose	Sucrose	Lactose	Sorbitol
FBRL-C04	<i>Acetobacter</i>	circular convex white	negative	coccus	^a + ^b	-	acid, slight gas	acid, slight gas	acid, slight gas	acid, slight gas
FBRL-B05	<i>Pseudomonas</i>	circular convex white	negative	rod	+	+	acid, slight gas	acid, no gas	slight acid, no gas	no acid, slight gas
FBRL-F01	<i>Sphaerotilus</i>	circular convex pink circular	negative	rod	-	+	slight acid, slight gas	slight acid, slight gas	-	-
FBRL-B06	<i>Flavobacterium</i>	convex yellow	negative	rod	+	+	-	-	no acid, slight gas	-

^a Cell shape was determined under a microscope at 1000 magnification.

^b +, positive reaction; -, negative reaction.

สภาวะที่พบในแหล่งน้ำในธรรมชาติที่มีสารอาหารต่ำ) โดยบรรจุแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) ขนาด 1 x 4 x 0.1 ซม. อยู่ ปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชม. เพื่อให้เกิดการเกาะติด จากนั้นล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 10 วินาที เพื่อให้เชื้อที่ไม่สามารถเกาะติดแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมหลุดออกไป นำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมแผ่นดังกล่าวใส่ลงในหลอดอาหาร HTSB หลอดใหม่ ปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. ทำซ้ำเช่นนี้อีก 2 รอบ เพื่อให้เชื้อสร้างแผ่นชีวบนผิวเหล็กกล้าไร้สนิมจนหนาขึ้น จะได้แผ่นชีวที่มีอายุ 72 ชม. ล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำเช่นนี้ 2 ชุด โดยชุดแรกนำไปทำการลอกแผ่นชีวทันที เพื่อบันทึกปริมาณการเกาะติดของเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 ส่วนชุดที่ 2 นั้นใช้ในการศึกษาการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นชีว โดยนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีแผ่นชีวเจริญอยู่แล้วนั้น (with preformed biofilms) แล้วใส่ลงในอาหาร HTSB หลอดใหม่ เติมสารแขวนลอยของเชื้อ *C. jejuni* (ได้จากการขีตเชื้อ *C. jejuni* ลงบนวุ้นอาหารเลี้ยง Brucella ที่เติม FBP (ferrous sulfate 0.5 กรัม/ลิตร, sodium bisulfate 0.2 กรัม/ลิตร, pyruvic acid 0.5 กรัม/ลิตร) ปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อครบเวลาเติม 0.1% peptone water แล้วเขย่าด้วยระบบสั่น ซึ่งวัดค่า A_{600} ให้ได้ค่าในช่วง 0.70 - 0.74 หรือเชื้อเริ่มต้นประมาณ $9 \log_{10}$ CFU/ml แล้วปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชม. เพื่อให้ *C. jejuni* เกาะติดบนแผ่นชีวของเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 จากนั้นล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วทำการลอกแผ่นชีวเพื่อศึกษาการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นชีว นอกจากนี้ยังศึกษาการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมโดยตรง โดยไม่มีแผ่นชีวอยู่ก่อน (no preformed biofilm) เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (control)

การนับเชือบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม

การนับจำนวนเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 ที่สร้างเป็นแผ่นชีวบนเหล็กกล้าไร้สนิม ทำได้โดยล้างแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุทรายแม่น้ำ

ปลอดเชื้อขนาด 40 mesh ปริมาณ 5 กรัม และ 0.1% peptonewater ปริมาตร 10 มล. เขย่าด้วยระบบสั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้เซลล์หลุดลอกออกมา แล้วทำการกวาดสารแขวนลอยของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ปุ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม.

ส่วนการนับเชื้อ *C. jejuni* ในแผ่นชีวของเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมนั้น ทำการลอกด้วยทรายตามวิธีข้างต้น แล้วทำการกวาดสารแขวนลอยของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 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-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 50 มก./ลิตร (Sigma, St.Louis) ทำการกรองสารละลาย FBP และ TTC ผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 μm แล้วเติมลงใน brucella agar ภายหลังจากฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที การปุ่มเชื้อ *C. jejuni* ทำที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้อากาศ microaerobic ซึ่งประกอบด้วย ออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% และไนโตรเจน 85% (CampyGen™, Oxoid) นับเชื้อ *C. jejuni* ที่สามารถเกาะติดแผ่นชีว โดยนับเฉพาะโคโลนีที่มีสีแดงบนพื้นใส

เพื่อศึกษาลักษณะของแผ่นชีวบนผิวแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม นำแผ่นชีวที่เจริญบนผิวแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในอาหาร HTSB อายุ 72 ชม. มาย้อมสีด้วย 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 เชื่อมต่อกับ Olympus DP70 Digital camera) ด้วย excitation wavelength ที่ 595 นาโนเมตร และ emission wavelength ที่ 615 นาโนเมตร ถ่ายภาพที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การตกตะกอนร่วมและความไม่ชอบน้ำ

ทดสอบการตกตะกอนร่วม ตามวิธีของ Misawa (Misawa and Blaser, 2000) โดยขีตเชื้อ *C. jejuni* ลงบนอาหารวุ้นเลี้ยง Brucella ที่เติม FBP ปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิ

42°C เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้สภาวะบรรยากาศ micro-aerobic และทำการขีดเชื้อจุลินทรีย์แผ่นชีวะที่แยกได้บนอาหารวุ้นเอียง TSA ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเติม 10 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าระบบสั่นที่ความเร็วสูงสุด คูดสารแขวนลอยของแต่ละเชื้อวัด A_{600} ให้ได้ประมาณ 1.0 บันทึกเป็นค่า A_{600i} ใช้ PBS เป็น blank ในการวัดว่า A_{600} แล้วดูดเชื้อ *C. jejuni* ปริมาตร 3 มล. ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด เติมสารแขวนลอยของเชื้อทั้ง 4 ชนิดลงไปปริมาตร 3 มล. ชนิดละ 1 หลอด และสารแขวนลอยของ *C. jejuni* ปริมาตร 3 มล. ลงในหลอดที่ 5 เป็นชุดควบคุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 8°C เป็นเวลา 18 ชม. แล้ววัด A_{600} ของสารละลายส่วนบน โดยไม่เขย่า บันทึกเป็นค่า A_{600af} ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณ % coaggregation ของเชื้อทั้งสองชนิดดังนี้ % coaggregation = $[(A_{600i} - A_{600af}) / A_{600i}] \times 100$

ศึกษาความไม่ชอบน้ำโดยวิธี Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH test) (Bacon *et al.*, 2001, Misawa and Blaser, 2000) โดยขีดเชื้อ *C. jejuni* ลงบนอาหารวุ้นเอียง Brucella ที่เติม FBP ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้สภาวะบรรยากาศ micro-aerobic และทำการขีดเชื้อจุลินทรีย์แผ่นชีวะบนอาหารวุ้นเอียง TSA ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเติม 0.1% peptone water เขย่าด้วยเครื่องเขย่าระบบสั่นที่ความเร็วสูงสุด คูดสารแขวนลอยของแต่ละเชื้อวัด A_{600} ให้ได้ประมาณ 0.8 - 1.0 บันทึกเป็นค่า A_{600i} โดยใช้ 0.1% peptone เป็น blank ในการวัดว่า A_{600} จากนั้นนำสารแขวนลอยของแต่ละเชื้อนั้นมา 3 มล. เติม hexadecane (Fluka, Switzerland) ปริมาตร 3 มล. เพื่อศึกษาความสามารถในการเกาะติด hydrocarbon ของผิวเซลล์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าระบบสั่นเป็นเวลา 60 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น นำสารละลายที่อยู่ชั้นล่างมาวัดค่า A_{600} อีกครั้ง บันทึกเป็นค่า A_{600af} ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณ % hydrophobicity โดย % hydrophobicity = $[(A_{600i} - A_{600af}) / A_{600i}] \times 100$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ SAS software

ด้วยวิธี PROC GLM และ PROC ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลที่นำวิเคราะห์มาจากการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลอง ตัวอย่างชุดควบคุมในการทดลองคือชุดตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อแผ่นชีวะ (biofilm-free control)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างแผ่นชีวะ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างแผ่นชีวะในน้ำจากโรงเรือนเลี้ยงไก่มาจำนวน 10 ตัวอย่างแล้วทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์พบว่า มีเชื้อที่มีลักษณะเด่นอยู่จำนวน 4 ชนิด จึงให้ชื่อ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 เมื่อทำการทดสอบคุณลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเซลล์ catalase test, oxidase test และการหมักน้ำตาล glucose, sucrose, sorbitol และ lactose ดังที่ได้แสดงผลใน Table 1 และด้วยคุณสมบัติของเชื้อสร้างแผ่นชีวะ สามารถระบุสกุล (genus) ของ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 คือ *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphaerotilus* และ *Flavobacterium* ตามลำดับ (Holt *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามก็ตีเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ในแผ่นชีวะที่เก็บมาจากโรงเรือนควรจะมีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม coliform bacteria, เชื้อโรคต่างๆ เช่น *Enterobacter Klebsiella*, *Citrobacter* และ *Escherichia* (Berger *et al.*, 1992) แต่เนื่องจากว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มักจะอยู่ในสภาพจำศีลหรือ dormant cells จึงไม่สามารถเพาะเชื้อออกมาได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามก็ตีเชื้อจุลินทรีย์แผ่นชีวะที่แยกออกมาได้ในการทดลองนี้ เป็นตัวแทนของ active cells ที่สามารถสร้างแผ่นชีวะได้ดีที่อุณหภูมิห้อง (Table 2) จัดว่าเป็นเชื้อที่มีลักษณะเด่น จึงนำมาใช้ศึกษาต่อไป

การศึกษาการเกาะติด

ผลการศึกษาการเกาะติดของเชื้อ *C. jejuni* ในแผ่นชีวะ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์แผ่นชีวะ FBRL-C04 FBRL-B05 FBRL-F01 และ FBRL-B06 มีความสามารถสร้างแผ่นชีวะได้ดีไม่เท่ากัน โดยเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05

FBRL-F01 และ FBRL-B06 สามารถสร้างแผ่นชีวะได้ดีกว่าเชื้อ FBRL-F01 (Table 2) Figure 1 แสดงลักษณะการเกิดแผ่นชีวะของเชื้อที่แยกได้จากโรงเรือนไก่บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม พบว่าเชื้อ FBRL-F01 มีลักษณะเป็นสายยาวไม่เหมือนกับลักษณะของแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งเป็นลักษณะของ *Sphaerotilus* ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ sheathed bacteria นอกจากนี้ยังไม่มีการสร้าง micro colony ต่างจากเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 และ FBRL-B06 ที่เป็นแบคทีเรียรูปกลมและแท่ง สร้างแผ่นชีวะกระจายเป็นหย่อมๆ แต่ในทางตรงกันข้ามเชื้อ FBRL-F01 สามารถส่งเสริมการเกาะติดเชื้อ *C. jejuni* ได้ดีว่าทุกเชื้อที่นำมาทดสอบ จากรายงานการวิจัยพบว่าปริมาณของแผ่นชีวะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีผลต่อการเกาะติดของ *C. jejuni* ได้ เช่น *Pseudomonas* sp. สามารถสร้างแผ่นชีวะได้มาก จึงทำให้เชื้อ *C. jejuni* เกาะติดได้ดีกว่า (Trachoo et al., 2002) แต่ผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า ปริมาณแผ่นชีวะของเชื้อ FBRL-F01 ที่มีอยู่น้อย สามารถส่งเสริมการเกาะติดของเชื้อ *C. jejuni* ได้ดีกว่า ($P < 0.05$) แผ่นชีวะของเชื้อที่มีปริมาณการเกาะติดมากกว่า กล่าวคือ FBRL-F01 ทำให้ *C. jejuni* เกาะติดได้ 4.4 log CFU/cm² เมื่อเทียบกับเชื้อ FBRL-C04 FBRL-B05 และ FBRL-B06 ที่ *C. jejuni*

Table 2. Attachment of *C. jejuni* on biofilms isolated from chicken houses at 4 h of incubation at room temperature

Cultures	Attachment of biofilm producers on stainless steel ¹	Attachment of <i>C. jejuni</i> on biofilms
	(log CFU/cm ²)	
FBRL-C04	6.1 ^a	4.0 ^b
FBRL-B05	6.2 ^a	4.0 ^b
FBRL-F01	4.8 ^b	4.4 ^a
FBRL-B06	6.2 ^a	4.1 ^b
<i>C. jejuni</i>	3.9 ^c	3.9 ^b

¹ Average initial load of biofilm producers used to form biofilm on stainless steel was 9 log₁₀ CFU/ml

^{a, b, c, ...} Means in columns with no common letter differ at $P < 0.05$

เกาะติดได้ 4.0 4.0 และ 4.1 log CFU/cm² ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณของแผ่นชีวะไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่จะส่งเสริมการเกาะติดของ *C. jejuni* แต่ลักษณะทางเคมีกายภาพ เช่น ความไม่ชอบน้ำ ชนิดและปริมาณของโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ของแผ่นชีวะ อาจส่งผลต่อการเกาะติดได้ (Chmielewski and Frank, 2003)

การตกตะกอนร่วม

การตกตะกอนร่วมบ่งชี้ถึงความสามารถที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถร่วมกันตกตะกอนและเกาะบนพื้นผิวได้เร็ว ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงความสามารถในการเกิดเป็นแผ่นชีวะได้ (Buswell et al., 1997) โดย จุลินทรีย์ที่ตกตะกอนร่วมกันได้เป็นอย่างดีจะสามารถเกิดเป็นแผ่นชีวะร่วมกันได้ดี ผลการทดลองการตกตะกอนร่วมพบว่า เชื้อ FBRL-C04 และ FBRL-F01 สามารถตกตะกอนร่วมกับ *C. jejuni* ได้ดี ($P < 0.05$) มีค่า% coaggregation เท่ากับ 39.14% และ 33.70% เมื่อเทียบกับเชื้อ FBRL-B05 และ FBRL-B06 (Table 3) โดยเชื้อ FBRL-B06 มีค่าตกตะกอนร่วมพอกับการตกตะกอนโดยเชื้อ *C. jejuni* โดยลำพัง และการที่เชื้อ FBRL-F01 มีค่าการตกตะกอนร่วมกันสูงส่วนหนึ่งอาจเพราะเป็นเชื้อที่สามารถตกตะกอนด้วยตัวเองได้คืออยู่แล้ว (ข้อมูลได้จากการสังเกต ไม่ได้แสดงในตาราง) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหากเชื้อ *C. jejuni* อยู่ร่วมกับเชื้อ FBRL-B04 หรือ FBRL-B01 ในน้ำเชื้อทั้งสองนี้จะสามารถชักนำให้ *C. jejuni* ตกตะกอนและเริ่มเกาะติดได้ดีกว่าเชื้อ FBRL-B05 และ FBRL-B06 และหากเป็นเชื้อที่สามารถเกาะติดและสร้างแผ่นชีวะได้ดีก็จะทำให้ *C. jejuni* กลายเป็นส่วนหนึ่งของแผ่นชีวะได้เร็วยิ่งขึ้น การที่เชื้อ *C. jejuni* อยู่ในแผ่นชีวะอาจจะส่งผลให้สามารถรอดชีวิตได้นานขึ้น เนื่องจากออกซิเจนภายในแผ่นชีวะมีน้อยกว่าภายนอกแผ่นชีวะ (Xu et al., 1998) นอกจากนี้แผ่นชีวะยังสามารถลดผลกระทบจากสารฆ่าเชื้อได้ (Trachoo and Frank, 2002)

ความไม่ชอบน้ำ

โดยปกติจุลินทรีย์ที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจะสามารถสร้างแผ่นชีวะได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่มีความไม่ชอบน้ำต่ำ จาก

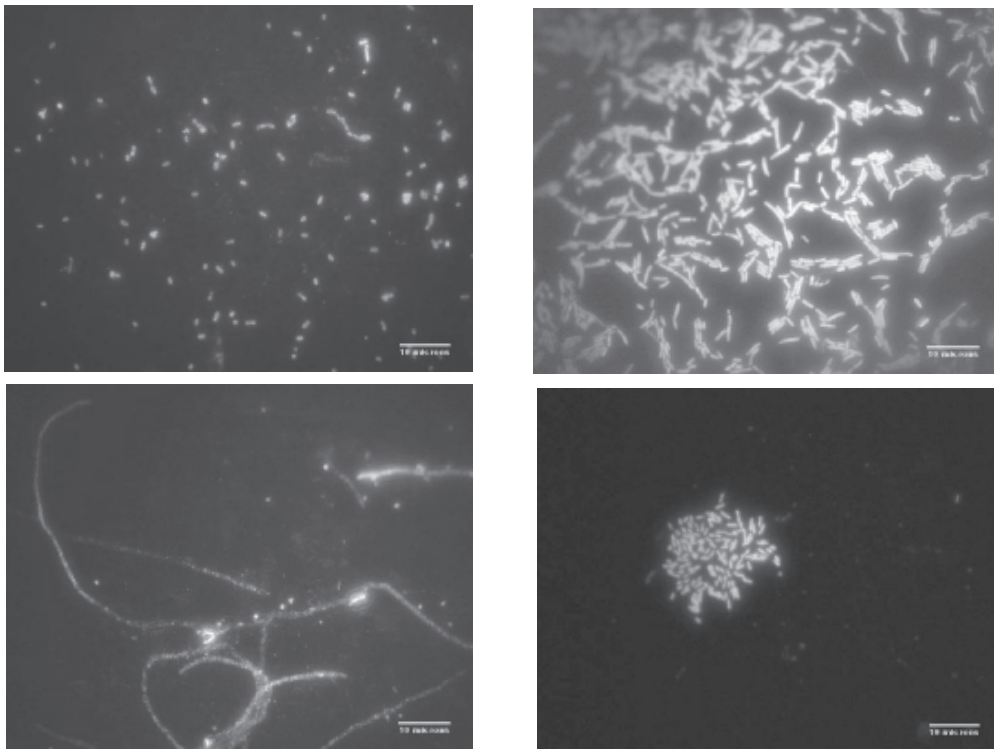


Figure 1. Biofilms grown on stainless steel after 72 h in HTSB. Image observed under Olympus BX51 epi-fluorescence microscope at 1000 magnification. (Scale bar is 10 µm)

Table 3. Coaggregation between *C. jejuni* and biofilm producers

Cultures	% Coaggregation
<i>C. jejuni</i> + FBRL-C04	39.51 ^a
<i>C. jejuni</i> + FBRL-B05	-3.38 ^b
<i>C. jejuni</i> + FBRL-F01	33.70 ^a
<i>C. jejuni</i> + FBRL-B06	12.84 ^{ab}
<i>C. jejuni</i> (control)	10.76 ^{ab}

a, b, c,..... Means in columns with no common letter differ at $P < 0.05$

Table 4. Hydrophobicity of biofilm producers and *C. jejuni*

cultures	%Hydrophobicity	
	Unattached cell	Biofilms
FBRL-C04	6.382 ^a	53.839 ^{ab}
FBRL-B05	-2.979 ^b	40.377 ^b
FBRL-F01	-2.78 ^b	54.483 ^{ab}
FBRL-B06	7.468 ^a	68.965 ^a
<i>C. jejuni</i>	-2.295 ^b	61.735 ^{ab}

a, b, c,..... Means in columns with no common letter differ at $P < 0.05$

การทดสอบหาความไม่ชอบน้ำของเชื้อแผ่นชีวะที่แยกมาได้ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ไฮโดรคาร์บอนคือ hexadecane พบว่าแผ่นชีวะของเชื้อ FBRL-B06 มีค่าความไม่ชอบน้ำสูงสุด ($P < 0.05$) คือ 68.95 (Table 4) แสดงว่าเชื้อมีองค์

ประกอบที่สามารถรวมตัวกับ hexadecane ได้ดีกว่าแผ่นชีวะของเชื้ออื่น นอกจากนี้พบว่าแผ่นชีวะของเชื้อทุกชนิดมีค่าความไม่ชอบน้ำสูงกว่าเชื้อที่มีสภาพแขวนลอย (unattached or planktonic cells) จึงอาจเป็นปัจจัยที่ตึง

ดูให้เชื้อ *C. jejuni* มาเกาะติดได้อีกทาง ผลการทดลองนี้ให้ผลคล้ายกับที่เคยมีรายงานมาก่อน (Dykes *et al.*, 2003) โดยแสดงให้เห็นว่าเมื่อจุลินทรีย์กลายเป็นแผ่นชีวจะ จะมีการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์ไป และส่งผลต่อลักษณะทางเคมีกายภาพของผิวเซลล์ อาทิเช่นความไม่ชอบน้ำได้ อย่างไรก็ตามความไม่ชอบน้ำของเชื้อแผ่นชีวจะในการทดลองนี้ไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการส่งเสริมการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นชีวจะ ได้มีรายงานการวิจัยบางฉบับแสดงว่า ความไม่ชอบน้ำอาจไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของจุลินทรีย์บนผิววัสดุหรือแผ่นชีวจะ (Frank, 2000)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเกาะติดของ *C. jejuni* บนแผ่นชีวจะที่แยกได้จากโรงเรือนไก่พบว่าแผ่นชีวจะของเชื้อ FBRL-F01 สามารถส่งเสริมการเกาะติดของเชื้อ *C. jejuni* ได้ดีที่สุด และแผ่นชีวจะในธรรมชาติบางชนิดเท่านั้นที่ส่งผลเพิ่มการเกาะติดของ *C. jejuni* ดังนั้นหากพบแผ่นชีวจะของเชื้อ FBRL-F01 ในโรงเรือนไก่ตลอดจนในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร แผ่นชีวจะนี้อาจส่งเสริมให้ *C. jejuni* เกาะติดและรอดชีวิต จนสามารถปนเปื้อนในอาหารก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

- Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A. and Guerry, P. 2001. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol. Microbiol.*, 40: 769-777.
- Berger, P. S., LeChevallier, M. W. and Reasoner, D. J. 1992. Control of biofilm growth in drinking water distribution systems. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., Mc Guigan, J. T., Marsh, P. D., Keevil, C. W. and Leach, S. A. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and-rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 733-741.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W. and Leach, S. A. 1997. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 477-484.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 22-32.
- Dykes, G. A., Sampathkumar, B. and Korber, D. R. 2003. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Int. J. Food Microbiol.*, 89: 1-10.
- Frank, J. F. 2000. Control of biofilms in the food and beverage industry. In J. Walker, S. Surman and J. Jass (ed.), *Industrial biofouling*. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Misawa, N. and Blaser, M. J. 2000. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*, 68: 6168-6175.
- Powers, E. M. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reaction of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3756-3758.
- 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.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. and McFeters, G. A. 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4035-4039.