



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของสภาวะเครียดต่อการสร้างโปรตีนชนิดเครียดและความสามารถในการต้านทานข้าม
ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ *Vibrio parahaemolyticus* พาราฮีโมไลติคัส

Effects of Various Stresses on Stressed Proteins Production and Cross Protection Against
Hydrogen Peroxide of *Vibrio parahaemolyticus*

นามผู้วิจัย นางสาวทิพย์ฤทัย ปอน้อย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ยรรวภา มหากาญจนกุล, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุดสาย ตีรวานิช, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์พูลทรัพย์ วิรุพหกุล, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนธิ์ ดุ้ยเต็มวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสภาวะเครียดต่อการสร้างโปรตีนชนิดเครียดและความสามารถ
ในการต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ของไวรัสโอ พาราฮีโมไลติคัส

Effects of Various Stresses on Stressed Proteins Production and
Cross Protection Against Hydrogen Peroxide of *Vibrio parahaemolyticus*

โดย

นางสาวทิพย์ฤทัย ปอน้อย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรจารย์การอาหาร)
พ.ศ. 2550

ทิพย์ฤทัย ปอน้อย 2550: ผลของสภาวะเครียดต่อการสร้างโปรตีนชนิดเครียดและความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ *Vibrio parahaemolyticus* พาราฮีโมไลติคัส ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์วรภา มหากาญจนกุล, Ph.D. 95 หน้า

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบจากการบริโภคอาหารทะเล ในกระบวนการผลิตอาหารมีขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ แต่พบว่าเซลล์บางส่วนสามารถรอดชีวิตและต้านทานต่อสภาวะเครียด ทำให้พบการปนเปื้อนในอาหารได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายในเซลล์เครียดของ *V. parahaemolyticus* ที่คาดว่าเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตได้ ทั้งนี้ได้ศึกษาความสามารถของเซลล์เครียด *V. parahaemolyticus* ในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย

เมื่อนำเซลล์ thermostable direct hemolysin (TDH) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 และ vp-330 และเซลล์ thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-004, FS-006 และ FS-015 ที่ผ่านสภาวะเครียด 4 สภาวะ ได้แก่ ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส 30 นาที การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) 12 ชั่วโมง สารเปอร์ออกซิไดคแอซิด 1.0 ppm 15 นาที และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.17 ppm 15 นาที พบว่ากระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนชนิดเครียด (stressed protein) ในแบคทีเรียชนิดนี้ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีนในเซลล์เครียดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติพบว่ามีการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นหลายชนิด โปรตีนส่วนใหญ่ที่สร้างขึ้นมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนในกลุ่ม heat shock proteins (HSPs) ได้แก่ DnaK, GroEL, DnaJ, HSP90 และ RpoH รวมถึงโปรตีนในกลุ่ม general stress proteins นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เครียดดังกล่าวแสดงความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาทีได้ พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดทั้ง 4 สภาวะข้างต้นมีค่า-D (D-values) มากกว่าเซลล์ปกติ โดยเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหารมีค่า-D สูงที่สุด เซลล์เครียดจากการขาดอาหารของสายพันธุ์ vp-293 ที่เป็นตัวแทนของ TDH *V. parahaemolyticus* มีค่า-D เป็น 27.6 นาที และเซลล์เครียดสายพันธุ์ FS-015 ตัวแทนของ TRH *V. parahaemolyticus* มีค่า-D เป็น 17.2 นาที ซึ่งให้ค่า-D มากกว่าเซลล์ปกติถึง 3-4 เท่า การที่เซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดทั้ง 4 สภาวะ สามารถแสดงความสามารถต้านทานและต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้คาดว่าเกิดจากโปรตีนชนิดเครียดต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นช่วยให้เซลล์รอดชีวิตและสร้างการต้านทานต่อสภาวะเครียดอื่น ๆ ได้ ดังนั้นกรรมวิธีการผลิตอาหารทะเลจึงควรให้ความสำคัญต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในวัตถุดิบและระหว่างการผลิตเพื่อป้องกันไม่ให้มีเซลล์เครียดที่ต้านทานต่อปัจจัยการผลิตและการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ซึ่งเซลล์เหล่านี้นั้นมีโอกาสรอดชีวิตและก่อให้เกิดความเสี่ยงกับการบริโภคอาหารทะเลแปรรูปได้

Tip-ruthai Pornoi 2007: Effects of Various Stresses on Stressed Proteins Production and Cross Protection Against Hydrogen Peroxide of *Vibrio parahaemolyticus*. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Warapa Mahakarnchanakul, Ph.D. 95 pages

Vibrio parahaemolyticus is the foodborne bacteria known as the cause of gastroenteritis disease from seafood consumption. Although, the food processing has many steps for reduce this bacteria but some cells can survive and become to stress state. The stressed cells have been shown that cells can resist better to stress conditions, thus cells have found in food. The objectives of this study aim to study the protein profile of *V. parahaemolyticus* from various stress conditions which expect to be part of the mechanism of cells survive. In addition, the study of stressed *V. parahaemolyticus* cells to express cross protection against hydrogen peroxide are demonstrated.

The 2 strains of thermostable direct hemolysin (TDH) *V. parahaemolyticus* (vp-293 and vp-330) and 3 strains of thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) *V. parahaemolyticus* (FS-004, FS-006 and FS-015) were subjected to 4 stress conditions as heat shock at 42 °C for 30 minutes, glucose starvation for 12 hours, exposed to peracetic acid 1.0 ppm for 15 minutes and hydrogen peroxide 0.17 ppm for 15 minutes. The profile of stressed protein production in cells were examined by 1-dimensional gel electrophoresis and found that many stressed proteins were increased. Those proteins molecular weight were similar to heat shock proteins (HSPs) including DnaK, GroEL, DnaJ, HSP90 and RpoH and also similar to general stress proteins. Moreover, TDH and TRH *V. parahaemolyticus* stressed cells were able to present cross-protection when exposed to 30 ppm of H₂O₂ for 30 minutes. D-value of all stressed cells were higher than normal cell. Among them starved cell showed that highest D-value. The starved cell of strain vp-293 (represented as TDH *V. parahaemolyticus*) had a D-value 27.6 minutes and starved cell of strain FS-015 (represented as TRH *V. parahaemolyticus*) had a D-value 17.2 minutes. These starved cells had a D-value 3 to 4-fold higher than normal cells. Results showed that TDH and TRH *V. parahaemolyticus* stressed cells could better resist and express cross-protection to H₂O₂ due to the increasing of stressed proteins. Therefore, seafood process should be emphasized in the reduction of *V. parahaemolyticus* contamination in raw materials and during process to prevent the stressed cells, which resist better in process and storage, and possible cause risk in seafood consumption.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร. วราภา มหากาญจนกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. สุธาสัย ศรีวานิช และอ.ดร. พูลทรัพย์ วิรุพหกุล กรรมการที่ปรึกษาสาขา
วิชาเอก ผศ.ดร. ฆรมณี ดุ้ยเต็มวงศ์ กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาการ และผ.ศ. มยุรี จัยวัฒน์ ผู้แทน
บัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อาภัสสร ฐิตะ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทย
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และข้อเสนอแนะในการใช้โปรแกรมสำหรับ
วิเคราะห์เจลอิลีกโตริฟิซิส

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารทุกท่านที่ให้ความ
ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณกนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล คุณวราภรณ์ สุทธิวิชัยพร คุณวราทิพย์
ประสิทธิ์นารายณ์ คุณณพล พงษ์ไพโรจน์ รวมทั้งพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ
และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมเลี้ยงดูและเป็นกำลังใจที่ดีอยู่เสมอ
เคียงข้างข้าพเจ้าตลอดมา

ทิพย์ฤทัย ปอน้อย

มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	30
สถานที่ทำการวิจัย	35
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย	35
ผลและวิจารณ์	36
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
สรุป	58
ข้อเสนอแนะ	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	71
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	76
ภาคผนวก ค วิธีศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ	81
ภาคผนวก ง ข้อมูลการทดลอง	86
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความแตกต่างระหว่าง <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>Vibrio</i> spp.	5
2	การปนเปื้อนของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ในอาหาร	7
3	ชนิดและสัดส่วนของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ไม่ผ่านและผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน	15
4	การตอบสนองต่อสภาวะเครียดกระตุ้นการสร้างโปรตีนชนิดเครียด	21
5	ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียด	22
6	เปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันโดยวิธี SDS-PAGE	24
7	ค่า-ดี(นาที) ของเซลล์ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 และ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-015 ที่ผ่านสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียด	56
ตารางผนวกที่		
ง1	ค่าความชันจากเส้นแนวโน้มของกราฟแสดงจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่รอดชีวิตหลังจากสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 30±2 °C	88
ง2	จำนวนเซลล์ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm	89
ง3	จำนวนเซลล์ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-015 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง4	ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	91
ง5	ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-015 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	92

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างสรีระของเซลล์แบคทีเรียในสภาวะเครียดที่ระดับความเครียดต่างกัน	10
2	ภาพจำลองการทำงานของ heat shock proteins เมื่อเซลล์แบคทีเรียเผชิญสภาวะเครียด	13
3	กระบวนการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อสภาวะเครียดจากความร้อน	20
4	ตัวอย่างรูปแบบของโปรตีนจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE	25
5	ภาพจำลองวิธีการแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค isoelectric focusing (IEF)	26
6	การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293	43
7	การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-330	44
8	การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-004	45
9	การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-006	46
10	การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-015	47
11	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 ที่สร้างความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลา 0-30 นาที	54
12	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-015 ที่สร้างความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลา 0-30 นาที	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เจลอิลีกโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ	85
ง1 เส้นแนวโน้ม (linear regression) ของกราฟจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสถานะเครียดจากสารฆ่าเชื้อเปอร์แอซิดิกแอซิด ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C และเวลา 0-30 นาที	87
ง2 จำนวนเซลล์รอดชีวิตของ TDH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ vp-293 ที่สร้างความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลา 0-30 นาที	93
ง3 จำนวนเซลล์รอดชีวิตของ TRH <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ FS-015 ที่สร้างความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลา 0-30 นาที	94

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CDM	=	chemical defined medium
CFU	=	colony forming unit
°C	=	degree Celsius
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
g	=	gram
HS	=	heat stress
HSP	=	heat shock protein
kHz	=	kilohertz
kDa	=	kilodaltons
M	=	molar
ml	=	milliliter
μM	=	micromolar
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
NaCl	=	sodium chloride
PAA	=	peracetic acid stress
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	phosphate buffer solution
ppm	=	part per million
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
ST	=	starvation stress
TSA	=	trypticase soy agar
TSB	=	trypticase soy broth
TSBS	=	trypticase soy broth supplemented with 3 % sodium chloride
TCBS	=	thiosulfate citrate bile sucrose agar
TDH	=	thermostable direct hemolysin
TRH	=	thermostable direct hemolysin-related hemolysin

**ผลของสภาวะเครียดต่อการสร้างโปรตีนชนิดเครียดและความสามารถ
ในการต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ของไวรัสโ พาราฮีโมไลติคัส**

**Effects of Various Stresses on Stressed Proteins Production and
Cross Protection Against Hydrogen Peroxide of *Vibrio parahaemolyticus***

คำนำ

การส่งออกอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลต่าง ๆ ทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งในการส่งออกสินค้าอาหารนั้นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเนื่องจากอาหารเป็นพาหะ การปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ทำให้เกิดโรคเจ็บป่วย เสียสุขภาพ มีผลต่อสุขภาพอนามัยโดยตรง และมีผลต่อการส่งออก ทำให้เกิดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจและความเชื่อถือของประเทศคู่ค้า *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญและมีอุบัติการณ์ก่อโรคจากการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์แปรรูป (Oliver and Kaper, 1997; Vuddhakul *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามปัจจัยในการเกิดโรคนอกจากการปนเปื้อนของเชื้อแล้วยังเกิดจากพฤติกรรมของผู้บริโภค ได้แก่ การเลือกรับประทานอาหารทะเลสดหรือผ่านความร้อนไม่เพียงพอ นอกจากนั้นยังเกิดจากสุขลักษณะที่ไม่ดีพอในการเตรียมอาหารทำให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) และสุดท้ายคือการเก็บรักษาอาหารทะเลที่อุณหภูมิต่ำไม่เพียงพอ ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมีจำนวนมากพอหรือทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการบริโภคและการเก็บรักษาอาหารนั้น (Beuchat, 1982; Ray, 1996; Jay, 2000)

ในกระบวนการผลิตอาหารมีขั้นตอนต่าง ๆ ที่ช่วยลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ได้แก่ การลวก การล้างด้วยกรด การล้างด้วยสารฆ่าเชื้อ หรือการล้างทำความสะอาดเครื่องมือและภาชนะอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต แต่ก็ยังพบเซลล์แบคทีเรียก่อโรคเหล่านั้นหลงเหลือในอาหาร ซึ่งแบคทีเรียบางสายพันธุ์เมื่อเซลล์เผชิญกับสภาวะเครียดในขั้นตอนการผลิตอาหาร พบว่าความเครียดที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียนั้นจะกระตุ้นให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์เครียด (stressed cell) และสามารถต้านทานต่อระดับความเครียดนั้นได้เพิ่มขึ้น เซลล์

เครียดยังสามารถแสดงความสามารถในการต้านทานข้าม (cross protection) ต่อสภาวะเครียดอื่นๆ ได้ ทำให้ยังมีเซลล์รอดชีวิตปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และก่อให้เกิดความเสี่ยงในการบริโภคอาหารทะเลแปรรูปได้ กลไกหนึ่งที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตจากสภาวะเครียดต่างๆ ได้เพิ่มขึ้นคือ การสร้างโปรตีนชนิดพิเศษที่เรียกว่า stressed protein มีรายงานว่า การให้ความร้อน 42 องศาเซลเซียส 30 นาที มีผลกระตุ้นให้เซลล์ *V. parahaemolyticus* อยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสมากกว่าเซลล์ปกติ และเซลล์นั้นยังมีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษที่มีส่วนช่วยให้เซลล์อยู่รอดได้ดีขึ้น (Wong *et al.*, 2002) ในสภาวะเครียด เช่น การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ *V. parahaemolyticus* มีความสามารถในการต้านทานความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน (ชินจิต, 2548) และเซลล์ที่ผ่านสภาวะนั้นยังถูกกระตุ้นให้สร้างความต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 μM ได้อีกด้วย (Koga and Takumi, 1995)

อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ต่อการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารในประเทศไทยยังมีข้อมูลไม่มากนัก ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนภายในเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ ได้แก่ ความร้อน การขาดสารอาหาร และสารฆ่าเชื้อ โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการต้านทานของเซลล์เครียดต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้งนี้เพื่ออธิบายว่า เหตุใดเซลล์จึงสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะเครียดหรือรอดจากปัจจัยเช่นสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ข้อมูลที่ได้จักมีประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล และช่วยเสริมสร้างประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับอุตสาหกรรมการผลิตอาหารทะเลต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนภายในเซลล์ TDH และ TRH *Vibrio parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารฆ่าเชื้อเปอร์แอซติกแอซิด และสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ
2. ศึกษาความสามารถในการต้านทานและการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ TDH และ TRH *Vibrio parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารฆ่าเชื้อเปอร์แอซติกแอซิด และสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของ *Vibrio parahaemolyticus*

1.1 ลักษณะทั่วไปของ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curved rod) ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่อยู่บริเวณขั้วเซลล์ (polar flagella) เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีแหล่งธรรมชาติในน้ำทะเลและน้ำกร่อย หรือตามแนวชายฝั่งทะเล สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดสได้ เจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสโดยไม่สร้างแก๊ส แต่ไม่สามารถเฟอร์เมนต้น้ำตาลแลคโตสหรือซูโครส เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 5 ถึง 42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส ส่วนค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการเจริญคืออยู่ในช่วง 7.6 ถึง 8.6 แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มชอบเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือ halophilic bacteria เซลล์สามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 – 5 % แต่เจริญไม่ดีถ้ามีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10 % เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเซลล์สามารถแบ่งตัวในเวลาประมาณ 15 นาที แบคทีเรียชนิดนี้มักไม่ทนต่อความแห้ง ความร้อน และความเย็น ซึ่งอุณหภูมิในระดับการแช่เย็น (refrigeration) หรือแช่แข็ง (freezing) ที่ต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียสอาจทำให้เซลล์ตายได้ (Ray, 1996; Jay, 2000)

Oliver and Kaper (1997) กล่าวว่า มีการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยแบ่งเป็นซีโรไทป์ (serotype) ตามชนิดแอนติเจนซึ่งโดยปกติแอนติเจนแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

1.1.1 O-antigen เป็นแอนติเจนที่ผนังเซลล์ เป็นสารประกอบในกลุ่ม lipopolysaccharide (LPS)

1.1.2 K-antigen เป็นแอนติเจนที่แคปซูล เป็นสารในกลุ่ม acidic polysaccharide มีสมบัติไม่ทนต่อความร้อน

1.1.3 H-antigen เป็นแอนติเจนที่แฟลกเจลลา

การแบ่งซีโรไทป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าปัจจุบัน O-antigen มี 13 ชนิด และ K-antigen มี 71 ชนิด การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อจึงต้องบอกทั้งชนิดของ O-antigen และ K-antigen เช่น อุบัติการณ์การเกิดโรคระบาดในปี พ.ศ. 2539 ที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดีย มีการระบาดทั้งทวีป (pandemic) ของซีโรไทป์ O3:K6 ทำให้เกิดโรคระบาดอย่างต่อเนื่องในอีกหลาย ๆ ประเทศในทวีปเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน รวมทั้งในประเทศอเมริกาด้วย จากข้อมูลจัดได้ว่า O3:K6 นี้เป็น pandemic strain และพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งเดียวกัน (ศรีวรรณ, 2548) ข้อแตกต่างของลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือการทดสอบทางชีวเคมีระหว่าง *V. parahaemolyticus* และเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* sp. ชนิดอื่น ๆ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่าง *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* sp.

ลักษณะที่ใช้ศึกษา	<i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i>	<i>V.</i> <i>alginolyticus</i>	<i>V.</i> <i>vulnificus</i>	<i>V.</i> <i>cholerae</i>
Lateral flagella on solid media	+	+	-	-
Rod shape	S	S	C	d
VP	-	+ ^a	-	v
Growth in 10% NaCl	-	+	-	-
Growth in 6% NaCl	+	+	+	-
Swarming	-	+	-	-
Production of acetoin/diacetyl	-	+	-	+
Sucrose	-	+	-	+
Cellobiose	-	-	+	-
Utilization of putrescine	+	D	-	-
Color on TCBS	G	Y	G	Y

หมายเหตุ ^a = ให้ผลบวกในเวลา 24 ชั่วโมง; S = รูปตรง; C = รูปโค้ง; G = สีเขียว; Y = สีเหลือง;
d = 11-90% ของสายพันธุ์ให้ผลบวก; v = ผลทดสอบแปรผันได้ตามแต่สายพันธุ์
ที่มา: ดัดแปลงจาก Jay (2000)

1.2 การก่อให้เกิดโรคของ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) แต่ทุกสายพันธุ์ไม่ได้เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค สายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้นั้นต้องมีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีการสร้างสารฮีโมไลซินที่ทนต่อความร้อน (heat-stable hemolysin) มีสมบัติย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ฮีโมไลซินนี้เป็นสารจำพวกโปรตีนที่ทนต่อความร้อน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 23 kDa มีชื่อเรียกเฉพาะว่า thermostable direct hemolysin (TDH) ซึ่ง TDH นี้จัดเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค (virulence factor) ของเชื้อชนิดนี้ (Ray, 1996) การระบาดของโรคจาก *V. parahaemolyticus* พบเป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1950 ที่เมืองโอซากาประเทศญี่ปุ่น ในครั้งนั้นมีผู้ป่วยจำนวน 272 ราย และมีผู้เสียชีวิตถึง 20 ราย สาเหตุเกิดจากการรับประทานปลาสดที่มีการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว (Su and Liu, 2007)

การตรวจสอบหาปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคนี้สามารถตรวจสอบได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma agar ซึ่งมีเม็ดเลือดแดงผสมอยู่ในอาหาร ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ TDH นี้เรียกว่า kanagawa phenomenon (KP) ซึ่งมีรายงานพบว่าเป็นลักษณะทั่วไปของเชื้อชนิดนี้ที่แยกได้จากผู้ป่วย แต่มักไม่พบสมบัติเช่นนี้ในเชื้อที่แยกได้จากในสิ่งแวดล้อม (Joseph *et al.*, 1982) จากผลการตรวจสอบดังกล่าวถ้าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสาร TDH ได้ คือ สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารนี้แสดงว่าให้ผลบวก เรียกว่า kanagawa-positive reaction (K^+) แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารแสดงว่าให้ผลลบ เรียกว่า kanagawa-negative reaction (K^-) (Bradshaw *et al.*, 1984) สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากธรรมชาติมักเป็นสายพันธุ์ที่เป็น K^- แต่อย่างไรก็ตามมีการพบว่า บางสายพันธุ์ที่เป็น K^+ มีความเกี่ยวข้องกับการระบาดที่มีอาหารเป็นพาหะด้วยเหมือนกัน โดยปกติสายพันธุ์ที่เป็น K^+ มีการสร้าง TDH สำหรับสายพันธุ์ที่เป็น K^- จะมีการสร้างฮีโมไลซินที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile hemolysin) แต่พบว่าบางสายพันธุ์สามารถสร้างได้ทั้ง TDH และฮีโมไลซินที่ไม่ทนความร้อน (Jay, 2000)

นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้บางสายพันธุ์มีการสร้างสาร thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) ซึ่งมีความสำคัญเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคด้วย (Ray, 1996; Jay, 2000) ในธรรมชาติเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้างสาร TDH ได้นั้นมีจำนวนไม่มาก ในสภาพแวดล้อมทั่วไปและในอาหารทะเลนั้นพบแบคทีเรียชนิดนี้ที่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 1 % (Oliver and Kaper, 1997)

ถ้าในอาหารมีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้จำนวนมาก ความร้อนจากการปรุงอาหาร
 สุก ๆ ดิบ ๆ อาจไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมด มีรายงานว่า การรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน
 อยู่ประมาณ $10^5 - 10^7$ เซลล์จะทำให้เกิดโรคได้ (Ray, 1996; Jay, 2000) ซึ่งอาการของโรคที่เกิดจาก
 เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ ท้องเสีย อาเจียน คลื่นไส้ ตะคริวบริเวณหน้าท้อง
 ปวดหัว มีไข้ อ่อนเพลีย การเกิดโรคส่วนใหญ่มักพบว่าเกิดจากผู้ป่วยบริโภคอาหารทะเลสุก ๆ ดิบ ๆ
 ที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้เข้าไป โดยอาหารทะเลที่เป็นพาหะสำคัญในการระบาดของ
 โรค เช่น หอยนางรม กุ้ง ปู ล็อบสเตอร์ เป็นต้น ซึ่งนอกจากอาหารทะเลจะเป็นสาเหตุหลักที่นำ
 เชื้อโรคนี้นามาสู่คนแล้ว ยังพบว่าอาหารชนิดอื่น ๆ ตลอดจนอุปกรณ์ประกอบอาหาร สิ่งแวดล้อม
 บริเวณที่ประกอบอาหารก็สามารถทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามของแบคทีเรียนี้ รวมถึงพฤติกรรม
 บริโภคสามารถทำให้เกิดโรคได้เช่นกัน ในประเทศญี่ปุ่นประชาชนนิยมบริโภคอาหารทะเลสดดิบ ๆ
 หรือผ่านการปรุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ พบว่ามีการป่วยจากแบคทีเรียชนิดนี้กว่า 40 – 60 % ส่วนประเทศ
 ไต้หวันในปี 2001 มีรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษซึ่งในจำนวนผู้ป่วย 86 ราย มี 52 ราย
 ที่พบว่าเกิดโรคจากแบคทีเรียชนิดนี้ (Ray, 1996; Chang *et al.*, 2004) รายงานการตรวจพบการ
 ปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารชนิดต่าง ๆ ได้รวบรวมและแสดงในตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 2 การปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

ประเทศ	อาหาร	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ / จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	อ้างอิง
มาเลเซีย	กุ้ง	22 / 433 (5.08 %)	Elhadi <i>et al.</i> , 2004
	ปู	3 / 50 (6 %)	Elhadi <i>et al.</i> , 2004
	หมึก	5 / 135 (3.7 %)	Elhadi <i>et al.</i> , 2004
	หอยแครง	6 / 100 (6 %)	Elhadi <i>et al.</i> , 2004
ญี่ปุ่น	กุ้ง	3 / 10 (30 %) ^a	Dileep <i>et al.</i> , 2003
	กุ้ง	8 / 10 (80 %) ^b	Dileep <i>et al.</i> , 2003
	ปู	0 / 12 (0 %) ^a	Dileep <i>et al.</i> , 2003
	ปู	8 / 12 (66.67 %) ^b	Dileep <i>et al.</i> , 2003
	ปลากระดุกแข็ง	4 / 18 (22.22 %) ^a	Dileep <i>et al.</i> , 2003
ญี่ปุ่น	ปลากระดุกแข็ง	7 / 18 (38.89 %) ^b	Dileep <i>et al.</i> , 2003
	หอยกาบ	76 / 80 (95 %)	Hara-kudo <i>et al.</i> , 2003
	ปลาอินทรี	14 / 15 (93.33 %)	Hara-kudo <i>et al.</i> , 2003

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ประเทศ	อาหาร	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ / จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	อ้างอิง
สหรัฐอเมริกา	สัตว์น้ำเปลือกแข็ง	39 / 662 (5.9 %) ^c	Cook <i>et al.</i> , 2002a
	สัตว์น้ำเปลือกแข็ง	41 / 656 (6.2 %) ^d	Cook <i>et al.</i> , 2002a
สหรัฐอเมริกา	หอยนางรม	41 / 347 (11.80 %) [*]	Cook <i>et al.</i> , 2002b

หมายเหตุ * = ค่าที่ได้มาจากการตรวจพบเชื้อที่ระดับมากกว่า 10^4 MPN/g, การตรวจสอบโดยวิธี

^a = conventional method, ^b = PCR, ^c = direct plating, ^d = enrichment

2. สถานการณ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในการก่อโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย

ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา ประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2540-2545 พบเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งคิดเป็น 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 % ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในช่วง 5 ปีดังกล่าว ตามลำดับ (ศรีวรรณ, 2548)

ข้อมูลจากศูนย์เฝ้าระวังการกระจายของเชื้อต่อต้านจุลชีพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขในการเพาะเชื้อจากผู้ป่วยกลุ่มอุจจาระร่วงใน 32 โรงพยาบาลเครือข่ายพบว่า ในปี พ.ศ. 2543 พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ของโรคอุจจาระร่วงพบเชื้อนี้ในผู้ป่วย 1,310 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 5,337 ราย (24.5 %) ส่วนในปี พ.ศ. 2544 จนถึงปี พ.ศ. 2546 พบว่าเป็นสาเหตุอันดับ 2 รองจากเชื้อ *Salmonella* sp. โดยในปี 2544 พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในผู้ป่วย 1,148 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 6,897 ราย คิดเป็น 16.6 % ในปี 2545 พบในผู้ป่วย 805 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 4,219 ราย คิดเป็น 19.1 % และในปี 2546 พบในผู้ป่วย 636 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 4,081 ราย คิดเป็น 15.6 % (ศรีวรรณ, 2548)

ผลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขระหว่างปี พ.ศ. 2543-มิ.ย. 2547 แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารและสิ่งแวดล้อมจำนวนรวมทั้งสิ้น 629 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วย 543 สายพันธุ์ จากอาหารทะเล 78 สายพันธุ์ และจากน้ำ 8 สายพันธุ์ เป็นที่น่าสังเกตว่าพบซีโรไทป์ O3:K6 มากในผู้ป่วยเป็นอันดับหนึ่งคิดเป็น 27.6 %

ส่วนในอาหารได้แก่ปลาชะบะสด พบซีโรไทป์ O3:K6 จำนวน 1 สายพันธุ์ คิดเป็น 1.3 % และเป็นสายพันธุ์ที่มีสมบัติสร้างสาร TDH อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำไม่พบซีโรไทป์ที่ทำให้เกิดโรคคือ O3:K6 ดังกล่าว (ศรีวรรณ, 2548)

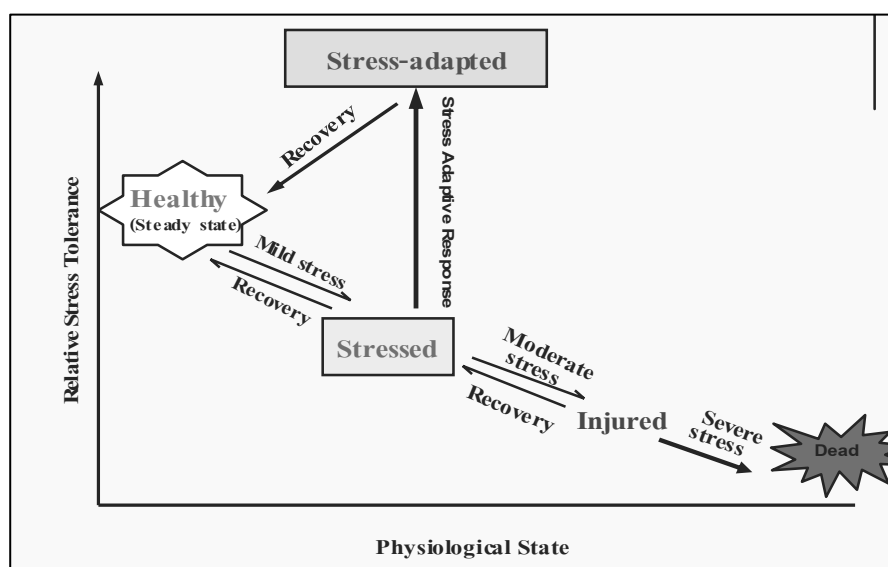
ในปี พ.ศ. 2543 เกิดอุบัติการณ์การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่โรงเรียนไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี มีผู้ป่วยจำนวน 63 ราย พบว่า 54 % ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นซีโรไทป์ O3:K6 ส่วนที่เหลือเป็นซีโรไทป์ O3:KUT (UT คือ untypeable) และ O4:K8 (ศรีวรรณ, 2548)

ในปี พ.ศ. 2547 (เดือนเมษายน) เกิดอุบัติการณ์การระบาดของอาหารเป็นพิษที่เมืองทองธานี กรุงเทพมหานคร มีผู้ป่วยจำนวน 51 ราย พบว่า 76 % เกิดจากซีโรไทป์ O3:K6 ถัดมาในเดือนสิงหาคมเกิดการระบาดของอาหารเป็นพิษที่จังหวัดร้อยเอ็ด ผู้ป่วยจำนวน 125 ราย โรงพยาบาลร้อยเอ็ดตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* 3 รายจากผู้ป่วย 63 ราย และจากตัวอย่างกุ้งสด 1 ราย ผลการตรวจหาซีโรไทป์ พบว่าทั้งจากผู้ป่วยและจากอาหารเป็นซีโรไทป์ O1:K25 และในเดือนกันยายนปี พ.ศ. 2547 เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่โรงเรียนแห่งหนึ่งในจังหวัดตรัง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ตรังตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้จากผู้ป่วย ผลการตรวจหาซีโรไทป์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขจากผู้ป่วย 26 ราย พบซีโรไทป์ O4:K9 ในผู้ป่วย 24 ราย (92.3 %) ซีโรไทป์ O1:KUT ในผู้ป่วย 1 ราย และ O3:K6 ในผู้ป่วย 1 ราย (ศรีวรรณ, 2548)

จากข้อมูลรายงานสถานการณ์ข้างต้นของศรีวรรณ (2548) จะเห็นได้ว่า แนวโน้มการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยมีมากขึ้น โดยพบซีโรไทป์ที่เคยมีรายงานว่าเป็น pandemic strain มากขึ้น และพบว่าการเปลี่ยนแปลงซีโรไทป์ของเชื้อในการก่อโรคระบาด รวมทั้งการพบสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษชนิดทนความร้อนที่เรียกว่า TDH ในอาหารทะเลด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vuddhakul *et al.* (2000) ที่มีการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่เป็น pandemic strain ได้จากหอยกาบ ซึ่งหลังจากนั้นได้มีการสำรวจจากโรงพยาบาล 2 แห่งของเมืองหาดใหญ่พบว่า สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากสิ่งส่งตรวจที่อาจเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง 317 ตัวอย่าง โดยที่โรงพยาบาลหาดใหญ่พบ 276 ตัวอย่าง จาก 8,281 ตัวอย่าง คิดเป็น 3.33 % และที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์พบ 43 ตัวอย่าง จาก 3,193 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.35 % (Laohaprerththisan *et al.*, 2003)

3. สถานะเครียดในแบคทีเรีย

สถานะเครียด (stress) คือปัจจัยหรือสภาวะใด ๆ ที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรีย แต่สภาวะนั้นไม่ทำให้แบคทีเรียตาย (lethal) เซลล์แบคทีเรียยังอยู่ในภาวะเซลล์กึ่งตาย (sublethal cells) หรือเซลล์บาดเจ็บ (injured cells) ซึ่งแบคทีเรียจะมีกลไกการตอบสนองโดยการปรับตัว (adaptation) ให้รอดชีวิตในสภาวะเครียดนั้น ในที่สุดเซลล์อาจเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในที่สุด (Yousef and Courtney, 2002) ซึ่งในการปรับตัวของเซลล์ดังกล่าวนี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสรีระของเซลล์ (physiological state) คือเป็นการเปลี่ยนแปลงชั่วคราวเท่านั้น เมื่อสภาวะเครียดนั้นหายไปหรือเซลล์กลับเข้าสู่สภาวะปกติ ลักษณะทางสรีระดังกล่าวจะเหมือนเดิม การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสรีระต่าง ๆ เมื่อเซลล์แบคทีเรียเผชิญกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระดับต่าง ๆ กันอธิบายและแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างสรีระของเซลล์แบคทีเรียในสภาวะเครียดที่ระดับความเครียดต่างกัน ที่มา : ดัดแปลงจาก Yousef and Courtney (2002)

จากภาพที่ 1 แสดงความเครียดหลายระดับที่เกิดกับแบคทีเรียและทำให้เกิดผลต่อเซลล์ที่แตกต่างกันไปเช่น ที่สภาวะเครียดระดับไม่รุนแรง (mild stress) เป็นสภาวะเครียดที่ทำให้เซลล์อยู่ในระดับกึ่งตาย (sublethal stress) ไม่มีผลในการมีชีวิตของเซลล์ (viability) แต่ทำให้เซลล์ไม่มีอัตราการเจริญ หรือมีอัตราการเจริญที่ลดลง ทำให้เซลล์กลายเป็นเซลล์เครียด (stressed cells) ในที่สุด ส่วนที่สภาวะเครียดระดับปานกลาง (moderate stress) ไม่ได้มีผลแค่เพียงหยุดการเจริญของเซลล์

เท่านั้น แต่ยังมีผลทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการรอดชีวิตไปบางส่วนด้วย และในสภาวะเครียดระดับรุนแรง (severe stress) เป็นสภาวะเครียดในระดับที่ทำให้เซลล์เดิมที่อยู่ในสภาวะปกติตายได้ (lethal stress) ซึ่งมีผลทำให้แบคทีเรียกลุ่มหลัก ๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้นตายลงไปได้ สำหรับเซลล์ปกติที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เครียดนั้นจะมีการตอบสนองต่อความเครียดโดยการปรับตัว ทำให้เซลล์สามารถต้านทานต่อสภาวะเครียดนั้น ๆ หรือต่อสภาวะเครียดประเภทอื่น จนสามารถรอดชีวิตกลับมาเป็นเซลล์ปกติได้เช่นเดิม

4. การตอบสนองต่อสภาวะเครียดของแบคทีเรีย

เมื่อเซลล์แบคทีเรียเผชิญกับสภาวะเครียดต่าง ๆ จะมีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดนั้นได้ในหลายลักษณะ เช่น มีการสร้างโปรตีนเพื่อช่วยซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหาย โปรตีนดังกล่าวช่วยรักษาสภาพของเซลล์ หรือช่วยในการกำจัดสารหรือการกระทำที่ทำให้เกิดความเครียด (stress agent) เซลล์แบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานต่อปัจจัยหรือสภาวะเครียดที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้เพิ่มขึ้น หรือเซลล์บางสายพันธุ์อาจมีการเปลี่ยนแปลงสรีระของเซลล์ไปจากเดิม เช่น มีการสร้างสปอร์ หรือการเข้าสู่สภาวะรอดชีวิตแต่ไม่เพิ่มจำนวนในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเรียกว่าสภาวะ viable but non-culturable (VBNC) หรือท้ายที่สุดเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ถ้าเซลล์ปรับตัวโดยการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม (genetic materials) แต่ลักษณะนี้ทำให้สมบัติบางประการของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปอย่างถาวร (Yousef and Courtney, 2002)

การตอบสนองต่อสภาวะเครียดของแบคทีเรียอาจแบ่งได้ 2 ระดับคือ ระดับแรกเรียกว่าการปรับตัว (adaptation) เมื่อแบคทีเรียถูกกระตุ้นด้วยความเครียดเซลล์จะมีการปรับตัวและป้องกันตัวเอง โดยมีการต้านทานต่อความเครียดที่กระตุ้นหรือต้านทานต่อความเครียดชนิดอื่น ๆ ทำให้แบคทีเรียทนทานและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียดได้ซึ่งเรียกว่า stress adaptation หรือ stress adaptive response ส่วนระดับที่สองเรียกว่าการสร้างความต้านทาน (tolerance) เป็นการต้านทานต่อปัจจัยที่เป็นอันตราย ซึ่งหมายถึงความสามารถของแบคทีเรียในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะเครียดนั้น โดยปกติแล้วแบคทีเรียแต่ละชนิดมีการต้านทานต่อสภาวะเครียดได้แตกต่างกัน และแตกต่างกันหลายระดับ แต่บางสายพันธุ์อาจถูกชักนำให้เกิดการต้านทานต่อสภาวะเครียดที่รุนแรงมากกว่าเดิมสมบัตินี้จะคงอยู่ได้ในแบบชั่วคราว (transient tolerance) ซึ่งอาจใช้คำว่า resistance หรือ tolerance ในความหมายเดียวกัน (Yousef and Courtney, 2002)

4.1 สภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress)

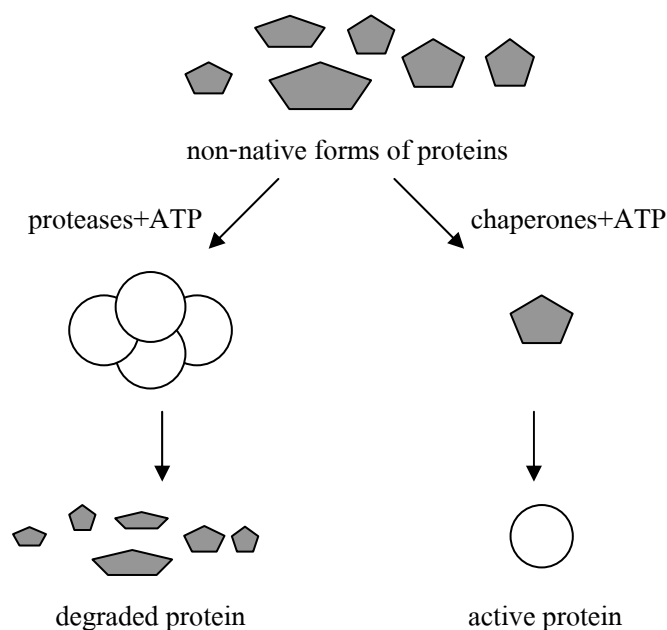
สภาวะเครียดประเภทนี้พบได้มากในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องมีการใช้ความร้อนในการทำลายหรือลดปริมาณจุลินทรีย์ เช่น การใช้น้ำร้อนลวกวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการอื่น ๆ จุดประสงค์เพื่อทำลายเอนไซม์ หรือเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ การลวกทำให้เซลล์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่าการช็อกเซลล์ด้วยความร้อนหรือ heat shock ซึ่งความร้อนดังกล่าวอาจทำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายบางส่วน ส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตได้พบว่ามีความสามารถในการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น (Linton *et al.*, 1990)

นอกจากนี้ยังมีอาหารบางชนิดที่ใช้ความร้อนระดับต่ำ (mild heat) ในกระบวนการผลิต เช่น sous vide อาหารกลุ่มนี้เป็นกระบวนการผลิตอาหารที่มีกระบวนการใช้ความร้อนต่ำที่สุด (minimally processed) เพื่อรักษาคุณภาพของอาหารให้ใกล้เคียงอาหารสด ซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบันมากขึ้น (Abee and Wouters, 1999) โดยในกระบวนการผลิตอาจให้ความร้อนอุณหภูมิต่ำลงเป็นเวลานานขึ้นหรือให้ความร้อนในอัตราที่ช้าลง มี come-up times ที่นานขึ้นจากสภาวะดังกล่าวทำให้จุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนในอาหารต้องเผชิญกับสภาวะที่คล้ายกับการ heat shock ซึ่งมีผลทำให้เซลล์สามารถต้านทานความร้อนได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Juneja and Novak, 2002)

กลไกสำคัญที่ทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เนื่องจากการผ่านความร้อนเป็นระยะเวลาดำเนินการสันนิษฐานว่าในเซลล์เกิดการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนชนิดพิเศษคือ heat shock proteins (HSPs) พบว่าโปรตีนเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณเพิ่มขึ้น โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนชนิดเครียด หรือ stressed proteins (Linton *et al.*, 1990) ซึ่ง HSPs ส่วนใหญ่จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณเล็กน้อยเมื่ออยู่ในสภาวะปกติ (non-stress conditions) แต่เมื่อเซลล์เผชิญกับความเครียดจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น เซลล์จะถูกกระตุ้นให้สร้าง HSPs เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และการสร้างโปรตีนตลอดจนปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นจะคงอยู่ในช่วงเวลาดำเนินการ (Abee and Wouters, 1999)

เนื่องจากความร้อนเป็นสาเหตุให้สาร โมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญภายในเซลล์ เช่น โปรตีน และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เกิดความเสียหายได้ ดังนั้น HSPs ที่สร้างขึ้นจะมีหน้าที่หลัก 2 ประการด้วยกันคือ ซ่อมแซม หรือทำลายองค์ประกอบของโปรตีนที่เสียหายเหล่านั้นเพื่อไม่ให้ไปขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Yousef and

Courtney, 2002) ซึ่ง HSPs แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ chaperones และ proteases ซึ่งการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้ช่วยรักษาสภาพโปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรียให้การทำงานได้ปกติ ซึ่งการทำงานของ HSPs 2 กลุ่มนี้จะถูกกระตุ้นจากการที่โปรตีนภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเนื่องจากความเครียดหรือความร้อน (conformation shift) เช่น โปรตีนมีการซ้อนพับผิดพลาด (misfolded) หรือมีการซ้อนพับเพียงบางส่วน (partially-folded) รวมถึงโปรตีนมีอัตราการซ้อนพับ (folded) ของโครงสร้างหรือการประกอบเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ (assembly) ช้าลง (Gottesman *et al.*, 1997) การทำงานของ HSPs 2 กลุ่มคือ proteases และ chaperones เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะเครียดคือ proteases มีหน้าที่ในการสลายหรือทำลายโปรตีนที่มีรูปร่างผิดปกติเหล่านั้นให้เสียสภาพและกำจัดออกไปนอกเซลล์ ส่วน chaperones มีหน้าที่เป็นเหมือนตัวปกป้องโปรตีนที่มีสภาพไม่เสียหายมากนัก ให้มีรูปร่างที่อยู่ในรูปที่ทำงานได้ ไม่ถูกสลายหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป (Abee and Wouters, 1999)



ภาพที่ 2 ภาพจำลองการทำงานของ heat shock proteins เมื่อเซลล์แบคทีเรียเผชิญสภาวะเครียด
ที่มา : ดัดแปลงจาก Abee and Wouters (1999)

Wong *et al.* (2002) พบว่าเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถูกกระตุ้นให้สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส มีค่า-D (D-values) มากกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านความร้อน ค่า-D เพิ่มขึ้นจาก 2.03 นาที เป็น 3.33 นาที จากการศึกษาพบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการสร้างโปรตีนชนิด HSPs ที่มีมวลโมเลกุล 47.6 kDa ซึ่งพบโปรตีนชนิดพิเศษนี้ในส่วนของ total cellular fraction และโปรตีนมวลโมเลกุล 62.3 kDa ซึ่งพบในส่วนของ periplasmic และ extracellular fraction มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค immunoblotting พบว่า โปรตีนดังกล่าวคือ โปรตีน DnaJ และโปรตีน GroEL ซึ่งมีมวลโมเลกุล 41 และ 63 kDa ตามลำดับ จึงคาดว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีส่วนสำคัญช่วยให้เซลล์สามารถอยู่รอดที่สภาวะอุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น

กลไกอีกประการหนึ่งที่คาดว่าทำให้เซลล์สามารถเจริญและอยู่รอดได้ในสภาวะเครียดจากการ heat shock หรือในกระบวนการผลิตอาหารที่ใช้ความร้อนระดับต่ำคือ การที่องค์ประกอบของไขมันที่บริเวณผนังเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความเครียดจากความร้อน ซึ่งความร้อนดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรียมีการปรับตัวที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) มีปริมาณกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและสายยาวเพิ่มมากขึ้น เพื่อรักษาสภาพการไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ และให้โปรตีนยังคงมีกิจกรรมได้ต่อไป (Russell and Fukunaga, 1990) พบว่าในเซลล์แบคทีเรียที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวชนิดสายยาว (long chain saturated fatty acid) เป็นองค์ประกอบ มีความสามารถในการต้านทานความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียที่มีไขมันซึ่งมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดสายสั้น (shortchain unsaturated fatty acid) เนื่องจากกรดไขมันอิ่มตัวชนิดสายยาวจะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดสายสั้น จึงทำให้เซลล์สามารถคงสภาพอยู่ได้ที่อุณหภูมิสูง (Beuchat and Worthington, 1976)

Chiang *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาลักษณะองค์ประกอบของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* 690 ที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาทีพบว่าเซลล์หลังผ่านความร้อนมีส่วนของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid : SFA) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ในทางกลับกันสัดส่วนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid : USFA) มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวคาดว่าเป็นกลไกสำคัญที่สนับสนุนให้เซลล์ *V. parahaemolyticus* สามารถต้านทานความร้อนได้เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3 ชนิดและสัดส่วนของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ผ่านและผ่านสถานะเครียดจากความร้อน

กรดไขมัน	เซลล์ปกติ	เซลล์ที่ผ่านความร้อน
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFA), %	53.38	59.48
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว(USFA), %	46.62	40.52
สัดส่วนของ SFA : USFA	1.15	1.47

ที่มา: คัดแปลงจาก Chiang *et al.* (2005)

4.2 สภาวะเครียดจากการขาดสารอาหาร (starvation stress)

ในสภาพแวดล้อมทั่วไปในธรรมชาติแบคทีเรียอาจพบกับสภาวะเครียดจากการขาดสารอาหารได้มากเท่า ๆ กับสภาวะเครียดทางกายภาพ ซึ่งเป็นที่เชื่อกันว่าความสามารถของเซลล์ที่รอดชีวิตจากการขาดสารอาหารและความสามารถในการทนทานต่อปัจจัยต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมที่เซลล์เผชิญในระหว่างการเจริญนั้น เป็นผลมาจากการสังเคราะห์โปรตีนบางอย่างร่วมกับกลไกในการป้องกันหลายกลไกที่แสดงออกร่วมกัน ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ ได้ (Jenkins *et al.*, 1990)

มีรายงานว่าสภาวะเครียดจากการขาดอาหารของเซลล์ *E. coli* โดยเฉพาะการขาดแหล่งคาร์บอน มีผลกระทบให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนจำเพาะอย่างน้อย 30 ชนิด ซึ่งในบรรดาโปรตีนที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นนั้น มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดอื่น ๆ ถูกสร้างขึ้นด้วย ได้แก่ heat shock proteins 11 ชนิด oxidative stress 6 ชนิด และ osmotic stress 5 ชนิด กลุ่มของโปรตีนเหล่านี้ยังมีรายงานว่า สัมพันธ์กับความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสภาวะเครียดจากความร้อน สารออกซิไดส์ และออสโมติกด้วย โดยความสามารถในการต้านทานความเครียดที่กล่าวมาขึ้นอยู่กับสภาวะความรุนแรงของการขาดสารอาหารนั้น ๆ (Reeve *et al.*, 1984; Jenkins *et al.*, 1990)

ก่อนหน้านี้ Jenkins *et al.* (1988) พบว่าการเลี้ยง *E. coli* ในสภาวะที่ขาดกลูโคส หรือขาดไนโตรเจน เซลล์แบคทีเรียเหล่านั้นสามารถต้านทานต่อความร้อนที่ 57 องศาเซลเซียส หรือสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 15 mM ได้มากกว่าเซลล์ปกติซึ่งเลี้ยงในสภาวะไม่ขาดสารอาหารดังกล่าว ซึ่งความสามารถในการต้านทานของเซลล์เครียดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการอยู่ใน

สภาวะขาดสารอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเซลล์มีการสร้างโปรตีนที่ช่วยให้เกิดการป้องกันข้าม ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะช่วยให้เซลล์ต้านทานต่อความร้อน และสารออกซิไดส์ด้วย

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของแบคทีเรีย แสดงความสามารถในการต้านทานความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น โดยเซลล์รอดชีวิตได้มากกว่าเซลล์ปกติ (เช่นจิต, 2548) ส่วน Koga and Takumi (1995) พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถต้านทานความร้อนที่ 47 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตได้มากกว่าเซลล์ปกติถึง 3 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์แสดงความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสาร ไฮโดรเจน 200 ppm และสภาวะออสโมติกจากโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น

4.3 สภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อกลุ่มเปอร์ออกไซด์ (oxidative stress)

ปัจจุบันในโรงงานแปรรูปอาหารต่าง ๆ นิยมใช้สารฆ่าเชื้อหลายชนิดเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนในวัตถุดิบ หรือฆ่าเชื้อบนพื้นผิววัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตหลังการล้างทำความสะอาดแล้ว สารฆ่าเชื้อชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในกลุ่มเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเปอร์ออกซีแอซิติกแอซิด เป็นต้น

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นเป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรงชนิดหนึ่ง เป็นสารฆ่าเชื้อกลุ่มเปอร์ออกไซด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ สามารถออกซิไดส์หมู่ซัลไฮดริล (-SH group) ของโปรตีนทำให้ความสามารถของเอนไซม์บางชนิดถูกยับยั้ง และยังมีผลในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์หลายชนิด ในอุตสาหกรรมผลิตถั่น้ำนมมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับความร้อนในการพาสเจอร์ไรซ์นม ส่วนในกระบวนการผลิตน้ำตาลก็มีการใช้สารฆ่าเชื้อชนิดนี้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย (Banwart, 1989; Jay, 2000) ส่วนเปอร์ออกซีแอซิติกแอซิดเป็นสารออกซิไดส์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อกลุ่มเปอร์ออกไซด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ เปอร์ออกซีแอซิติกแอซิดเป็นสารประกอบระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดแอซิติก มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรีย และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการนำสารผ่านเข้าออกเซลล์ (Cords and Dychala, 1993)

Farr and Kogoma (1991) พบว่าเซลล์ *Salmonella* sp. และ *E. coli* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น สภาวะเครียดดังกล่าวยังกระตุ้นการสร้าง heat shock proteins ทำให้เกิดการต้านทานข้ามต่อความร้อนได้เพิ่มขึ้น ส่วน Zook *et al.* (2001) พบว่า *E. coli* O157:H7 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์แอซิดิกแอซิดที่ความเข้มข้นระดับต่ำ แสดงความสามารถในการต้านทานข้ามต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความร้อนได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพบว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.17 ppm และสารเปอร์แอซิดิกแอซิด 1.0 ppm กระตุ้นให้เซลล์ *V. parahaemolyticus* รอดชีวิตได้ดีกว่าเซลล์ปกติเมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ชินจิต, 2548)

4.4 สภาวะเครียดจากกรด (acid stress)

สภาวะเครียดประเภทนี้พบได้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมกรดเพื่อปรับปรุงรสชาติ หรือเพื่อเป็นการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ เช่น ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องที่มักปรับสภาวะกรด (acidification) ให้มีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามต้องการ สำหรับสภาวะการเพิ่มของปริมาณกรดนี้อาจเกิดได้จากการเติมกรดในกระบวนการผลิตโดยตรง หรือปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์ (fermentation) ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร รวมถึงสภาวะในระบบทางเดินอาหารซึ่งเซลล์ต้องทนกับสภาวะที่เป็นกรดสูงมากในกระเพาะอาหาร ในบางครั้งปริมาณของกรดที่เดิมในอาหารนั้น ยังมีปริมาณไม่มากพอที่จะทำให้จุลินทรีย์ตายทันที กรดอาจกระตุ้นและทำให้จุลินทรีย์นั้นเกิดการปรับตัวสร้างสภาวะ acid tolerance response (ATR) ได้ (Foster and Hall, 1990) ภาวะกรดปริมาณสูงนั้นจะกระตุ้นทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างกลไกต้านทานสภาวะเครียดบางอย่างในเซลล์ และยังผลให้เซลล์ทนต่อความเข้มข้นของกรดที่เพิ่มขึ้น และที่สำคัญอย่างยิ่งคือ ทนต่อสภาพเครียดอื่น ๆ ได้ ถ้าหากจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตนั้นเป็นชนิดที่สามารถก่อให้เกิดโรคเนื่องจากอาหารเป็นพาหะก็จะเป็นการเพิ่มโอกาสเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคเนื่องจากการบริโภคอาหารได้ (กมลวรรณ, 2544)

โดยปกติจุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม ซึ่งถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบสภายนอกเซลล์ เช่น ในอาหารหรือสารละลายเซลล์ เซลล์จะมีกลไกในการควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสตามธรรมชาติเรียกว่า pH homeostasis ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบสภายนอกเซลล์ (pH_o) จุลินทรีย์จะใช้กลไก pH homeostasis เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์ (pH_i) ให้คงที่หรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

โดยการควบคุมระบบ H^+ antiport เพื่อให้ค่า pH_i ใกล้เคียงกับค่าของเซลล์ในภาวะปกติ (Foster, 1991) แล้วมีกลไกการตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากกรดอีกระบบที่เรียกว่า ATR ซึ่งกระบวนการนี้มีอยู่ 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเรียกว่า pre-acid shock เซลล์จะอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน (ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 – 6.0) ซึ่งขั้นแรกนี้เซลล์จะตอบสนองด้วยกลไก pH homeostasis จนเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสของ pH_i และ pH_o ต่างกันมากกว่า 1.5 ระบบนี้จะหยุดทำงาน และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดต่ำกว่า 4.5 ซึ่งจะเป็นขั้นตอนที่สองเรียกว่า post acid shock เซลล์จะมีกลไกต่อมาในการตอบสนองเฉพาะ ซึ่งได้แก่ การสร้าง acid shock proteins (ASPs) ภายในเซลล์ ซึ่งเชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่คล้ายกับโปรตีนในกลุ่ม heat shock proteins (HSPs) (Foster, 1993)

Wong *et al.* (1998) ศึกษาเซลล์ *V. parahaemolyticus* ST550 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากกรด 2 วิธีคือ 1. single-phase adaptation โดยเซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 60 นาที และ 2. two- phase adaptation โดยให้เซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 5.8 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอยู่ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 อีกเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากกรดทั้ง 2 วิธีไปทดสอบการรอดชีวิตที่สภาวะกรด 4.4 พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากกรดทั้ง 2 วิธีมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าเซลล์ปกติ และพบว่าเซลล์เครียดเหล่านั้นมีการสร้างโปรตีนขนาด 47.6 และ 58.1 kDa เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวพบว่ามียีนขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน DnaJ (41 kDa) และโปรตีน GroEL (63 kDa) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม HSPs

จากรายงานของกมลวรรณ (2544) พบว่าเซลล์ *E. coli* ATCC 8739 ที่ผ่านการปรับสภาพเซลล์ด้วยกรดทาร์ทาริกที่ค่าความเป็นกรด-เบส 4 เซลล์สามารถรอดชีวิตและเจริญบน TSA ที่เติมกลีเซอรอล 0-22 % ($a_w = 0.94-0.99$) ได้ (ปริมาณเซลล์ 3.9-4.4 logCFU/ml) และเมื่อปรับสภาพกรดที่ค่าความเป็นกรด-เบสสูงขึ้นคือ 4.5 และ 5 เซลล์มีการรอดชีวิตและเจริญมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้มีการปรับกรด (ปริมาณเซลล์ 7.5-8.5 logCFU/ml)

4.5 สภาวะเครียดอื่น ๆ

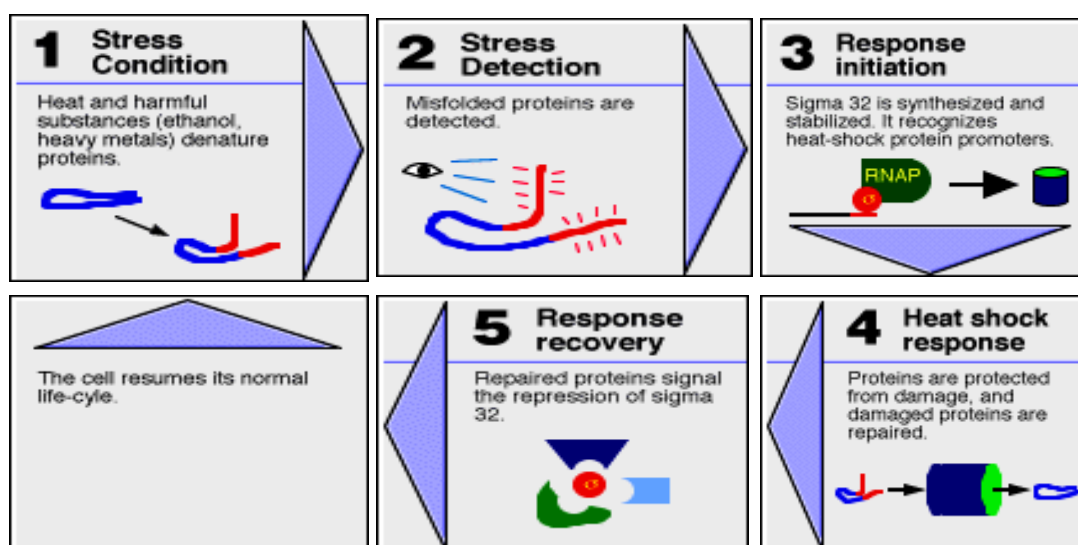
นอกจากสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร และสารฆ่าเชื้อกลุ่มเปอร์ออกไซด์แล้ว ในอุตสาหกรรมกระบวนการแปรรูปอาหารยังสามารถทำให้เกิดสภาวะเครียดได้อีกหลายประการด้วยกัน เช่น การแช่เย็น การแช่แข็ง การทำแห้ง การฉายรังสี เป็นต้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้จุลินทรีย์บางส่วนที่ผ่านสภาวะเครียดรอดชีวิต มีผลให้เซลล์ทนต่อสภาวะเครียด

นั้น ๆ ได้เพิ่มขึ้น หรือแสดงการต้านทานข้ามต่อปัจจัยในกระบวนการแปรรูปอื่นได้มากขึ้น (Yousef and Juneja, 2002)

5. ความสัมพันธ์ของสถานะเครียดกับการสร้างโปรตีนและชนิดของโปรตีนที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียด

โดยทั่วไปแล้วโปรตีนที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดหรือ stressed protein มักจะมีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันไปตามแต่สถานะเครียดที่เซลล์นั้นเผชิญ โปรตีนชนิดเครียดที่มีผู้ศึกษากันกว้างขวางคือ โปรตีนในกลุ่มของ HSPs โปรตีนชนิดพิเศษนี้ไม่ได้สร้างขึ้นเฉพาะสถานะเครียดจากความร้อนเท่านั้น พบว่าสถานะเครียดหลายสถานะสามารถกระตุ้นและชักนำให้มีการสร้างโปรตีนกลุ่มนี้ได้ด้วย ได้แก่สถานะเครียดจากการกด สารออกซิไดส์ และการขาดอาหาร ซึ่งกลไกในการสร้าง HSPs นั้นถูกควบคุมโดย sigma factor ชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่ในระหว่างกระบวนการ transcription คือ sigma 32 (σ^{32}) โดยขั้นตอนของการตอบสนองต่อสถานะเครียดจากความร้อนแสดงในภาพที่ 3 อธิบายได้ดังนี้

ขั้นตอนแรก เมื่อเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะปกติเผชิญกับสถานะเครียดจากความร้อนหรือจากสารเคมี สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์ทำให้โปรตีนต่าง ๆ บางส่วนภายในเซลล์เสียสภาพไป โปรตีนที่เสียสภาพแม้มีลักษณะผิดปกติ (misfolded proteins) แต่มีโอกาสเพิ่มจำนวนมากขึ้นยิ่งเมื่อสถานะเครียดเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถตรวจพบได้ ในเซลล์แบคทีเรียบางชนิดจะมีกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดโดยเริ่มขึ้นจาก sigma 32 ที่มีสมบัติเสถียรในสภาวะเครียด sigma 32 จะถูกสร้างเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากตามอุณหภูมิหรือสถานะเครียดที่เพิ่มขึ้น ทำให้ภายในเซลล์มีปริมาณ sigma 32 เป็นจำนวนมาก ต่อมา sigma 32 จะไปจับกับ RNA polymerase (RNAP) ได้เป็น sigma 32-RNAP holoenzyme ที่ประกอบด้วย 5 หน่วยย่อยคือ alpha 2 หน่วย, beta 1 หน่วย, beta' 1 หน่วยและ sigma factor 1 หน่วย โดยที่ sigma 32-RNAP holoenzyme นี้จะจดจำบริเวณ heat shock promoter ที่เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษ HSPs จึงอาจกล่าวได้ว่าปริมาณ sigma 32 ที่ถูกสร้างขึ้นมีผลโดยตรงต่อการตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อน (Straus *et al.*, 1990)



ภาพที่ 3 กระบวนการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อสภาวะเครียดจากความร้อน
ที่มา : Steve *et al.* (1996)

HSPs ที่ถูกสร้างขึ้นจากการตอบสนองต่อความร้อนจะช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียด ช่วยซ่อมแซมโปรตีนและองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เสียหาย โปรตีนที่ถูกซ่อมแซมแล้วส่งสัญญาณยับยั้งไม่ให้มีการสร้าง sigma 32 เพิ่มขึ้น จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่สภาวะปกติและพยายามรักษาสภาพของเซลล์ไว้ถ้าสภาวะเครียดดังกล่าวไม่รุนแรงมากขึ้นกว่าเดิม (Steve *et al.*, 1996)

สำหรับ HSPs นั้นแบ่งออกได้เป็น 4 subclasses คือ HSP90, HSP70, HSP60 และ small HSPs การตั้งชื่อโปรตีนที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดนั้นมักเกี่ยวข้องกับสภาวะที่กระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนนั้น ส่วนตัวเลขที่อยู่ด้านหลังบอกถึงขนาดโมเลกุลของโปรตีน แต่ทั้งนี้การสร้างโปรตีนชนิดใด ขนาดเท่าใดขึ้นอยู่กับสภาวะเครียดที่ไปกระตุ้นเซลล์ sigma factor หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ ด้วย (Abee and Wouters, 1999)

นอกจาก heat shock proteins แล้วยังมีโปรตีนกลุ่มอื่นที่เกิดจากการตอบสนองความเครียดชนิดต่าง ๆ ชนิดของโปรตีนที่เคยมีการศึกษาไว้ได้แก่ cold shock proteins (CSPs), cold-stress induced proteins (CIPs) หรือ acid shock proteins (ASPs) เป็นต้น โปรตีนชนิดเครียดที่กล่าวมานี้ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างได้จากหลายสภาวะและพบได้ในเซลล์แบคทีเรียหลายชนิด ได้สรุปและแสดงในตารางที่ 4 และ 5 ดังนี้

ตารางที่ 4 การตอบสนองต่อสภาวะเครียดกระตุ้นการสร้างโปรตีนชนิดเครียด

สภาวะการตอบสนอง ต่อสภาวะเครียด	สภาวะที่กระตุ้น	ชนิดโปรตีน
heat-shock response	เพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว	DnaJ, DnaK, GroEL, GroES, HtpG
cold-shock response	ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว	Hsc66, HscB, CsdA, CspA
acid shock response	สภาวะความเป็นกรดที่ 2.0 – 5.5	GroEL, DnaK, HtpG, HtpM
osmotic shock response	osmotic pressure สูง	GroEL, GroES, DnaK
starvation response	ขาดสารอาหารเช่น แหล่งคาร์บอน	GroEL, GroES, GrpE, DnaK, HtpG
oxidative stress response	สภาวะที่มี H_2O_2 หรือ O_2^-	GroEL, GroES, DnaK

ที่มา : ดัดแปลงจาก Yousef and Juneja (2002)

จากตารางจะเห็นได้ว่ามีโปรตีนที่สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นได้จากสภาวะเครียดที่แตกต่างกัน เช่น โปรตีน GroEL ที่อยู่ในกลุ่ม HSP60 หรือโปรตีน DnaK ที่อยู่ในกลุ่ม HSP70 จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่อยู่ในแต่ละ subclass มีการตั้งชื่อที่แตกต่างกันไปอีก ซึ่งมีรายงานว่าในการตั้งชื่อของโปรตีนนั้นเป็นการอธิบายถึงปัจจัยความเครียด หรือหน้าที่ของโปรตีนชนิดนั้น ๆ เช่น โปรตีน DnaK (HSP70) เกี่ยวข้องกับการมีส่วนร่วมของมันในกระบวนการจำลอง DNA (DNA replication) หรือโปรตีน Hsc ย่อมาจาก heat shock cognates ซึ่งการตั้งชื่อนี้ใช้เป็นตัวแทนของโปรตีนที่มีองค์ประกอบรวมกันเป็นรูปแบบหรือลักษณะของ HSP ในเวลาต่อมา (Kopecek *et al.*, 2001)

ตารางที่ 5 ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อ
สภาวะเครียด

แบคทีเรีย	สภาวะเครียด	ชนิดโปรตีน	ขนาดโมเลกุล (kDa)	อ้างอิง
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ความร้อน : 25 °C เป็น 42 °C	GroEL	62	Wong <i>et al.</i> , 2002
		GroES	12	Wong <i>et al.</i> , 2002
		DnaJ	47	Wong <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ความร้อน : 30 °C เป็น 45 °C	DnaK	76	Allan <i>et al.</i> , 1988
		GroEL	61	Allan <i>et al.</i> , 1988
<i>Lactococcus lactis</i>	ความร้อน : 30 °C เป็น 40 °C เกลือ : 2.5 % NaCl	DnaK	70	Mogens <i>et al.</i> , 1997
		GroEL	60	Mogens <i>et al.</i> , 1997
		GroES	11	Mogens <i>et al.</i> , 1997
<i>Vibrio cholerae</i>	ความเย็น : 37 °C เป็น 15 °C	CspA	7.7	Datta and Bhadra, 2003
		CspV	7.5	Datta and Bhadra, 2003
<i>Salmonella enteritidis</i>	ความเย็น : 37 °C เป็น 5 และ 10 °C	CspA	7.4	Amanda <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>	ความเย็น : 37 °C เป็น 10 °C	CspA	7	Jones <i>et al.</i> , 1987
<i>Bacillus subtilis</i>	ความเย็น : 35 °C เป็น 20 °C	CspC	8	Fujii and Fulco, 1977

6. การศึกษาการสร้างและการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านสภาวะเครียด

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของแบคทีเรียและความสามารถในการต้านทานต่อสภาวะเครียดของแบคทีเรียเกิดจากปัจจัยบางประการที่ส่งเสริมให้เซลล์อยู่รอดได้ กลไกการตอบสนองต่อความเครียดประการหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจกันมากคือ การสร้างโปรตีนชนิดเครียด หรือ stressed protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง ป้องกันการเสียสภาพของเซลล์ ช่วยให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย และอยู่รอดได้ในสภาวะเครียด (Yousef and Juneja, 2002) เทคนิคหรือวิธีที่พบว่ามีใช้ในการศึกษาการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษดังกล่าวกันมากคือ เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (gel electrophoresis)

เจลอิเล็กโตรโฟริซิสเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก มีตัวกลางก้ำจุน (supporting medium) ได้หลายชนิด ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ตัวกลางก้ำจุนได้แก่ สตาร์ช พอลิอะคริลาไมด์ อะกาโรส และอะกาโรส-พอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งในการหาโปรตีนชนิด

เกรียนั้นนิยมใช้วิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) หรือ PAGE ซึ่งวิธีนี้มีด้วยกัน 2 แบบคือ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE และ discontinuous gel electrophoresis หรือ disc gel electrophoresis (อาภัสสร, 2537)

โดยส่วนใหญ่แล้วนักวิจัยมักเลือกใช้ SDS-PAGE ซึ่งมีข้อดีตรงที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์โปรตีนไม่นานมาก และสามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละหลายตัวอย่างในเจลแผ่นเดียวกัน โดยผลของการแยกโปรตีนจากการใช้เทคนิคนี้โปรตีนจะถูกแยกออกจากกันตามน้ำหนักหรือมวลโมเลกุล และสามารถมองเห็นเป็นแถบ (band) เมื่อถูกย้อมด้วยสีย้อมชนิด coomassie blue ที่จับกับโปรตีน ซึ่งการศึกษาด้วยเทคนิคนี้เรียกว่า การแยกในแบบ 1 มิติ หรือ one-dimensional gel electrophoresis (อาภัสสร, 2537)

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้การแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน สารละลายบัฟเฟอร์ทั้งที่ใช้เตรียมสารตัวอย่างและอยู่ในอ่าง reservoir ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นแอนไอออนิกดีเทอร์เจนต์ที่มีประจุลบ สามารถจับกับสายพอลิเพปไทด์ แล้วแยกสายพอลิเพปไทด์ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยว และมีโครงสร้างเป็นรูปแท่ง อัตราส่วนของปริมาณ SDS ที่จับต่อน้ำหนักของโปรตีนจะคงที่เสมอ (SDS 1.4 กรัม/กรัม โปรตีน) ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อน SDS ของพอลิเพปไทด์ที่มีอัตราส่วนประจุต่อมวลที่คงที่และมีรูปร่างที่เหมือนกัน ดังนั้นขนาดของโมเลกุลเท่านั้นที่มีอิทธิพลต่อการเคลื่อนที่ของสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน โดยตัวกลางค้ำจุนที่ใช้คือ สารอะคริลาไมด์ซึ่งจะมีการเกิดพอลิเมอร์ได้เป็นแผ่นเจลขึ้น ขนาดรูพรุนของแผ่นเจลจะขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่เลือกใช้ ซึ่งในการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ตารางที่ 6) อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล ด้วยเหตุนี้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า และเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลกว่าในเวลาที่กำหนด (อาภัสสร, 2537)

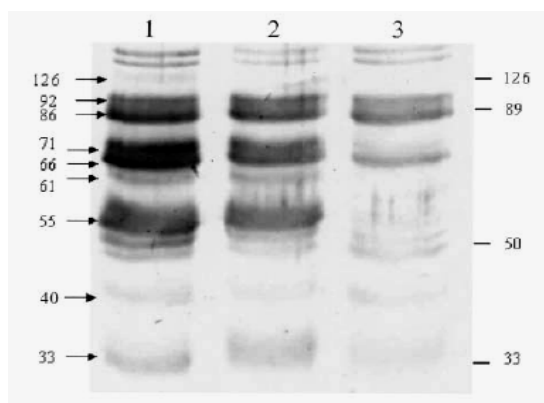
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันโดยวิธี SDS-PAGE

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (Da)	อะคริลาไมด์ (%)
200,000 – 60,000	5.0
120,000 – 30,000	7.5
75,000 – 18,000	10.0
60,000 – 15,000	12.5
45,000 – 12,000	15.0

ที่มา: อากัสตรา (2537)

ตัวอย่างของงานที่มีการใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย โดย Wong and Chen (2003) ทำการศึกษาในเซลล์ *V. parahaemolyticus* ST550 ซีโรไทป์ O4:K13 โดยให้เซลล์ผ่านการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE จากภาพที่ 4 แสดงแถบโปรตีนในแถวที่ 1 2 และ 3 คือ แถบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านการ heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียส แถบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านการ heat shock ที่ 37 องศาเซลเซียส และแถบโปรตีนของเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านการ heat shock จากการศึกษาพบว่าการให้ความร้อนที่ 2 ระดับ สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างโปรตีนขนาดโมเลกุล 33, 55, 61, 66, 71, 86 และ 92 kDa แต่พบโปรตีนขนาดโมเลกุล 126 kDa จากเซลล์ที่ heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียสเท่านั้น ต่อมาคณะผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค immunoblotting ที่มีความจำเพาะทำให้ทราบว่าโปรตีนที่ตรวจพบทั้งหมดนั้นเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ของเซลล์

รูปแบบของโปรตีนที่ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE จะปรากฏเป็นแถบแต่ละแถบที่มีขนาดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในสารละลายนั้น ๆ โดยแถบที่อยู่ด้านล่างเป็นแถบของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าแถบโปรตีนที่อยู่ด้านบนขึ้นไป ขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ต้องการศึกษานั้นเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานหรือ standard marker band ซึ่งทราบชนิดและน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน

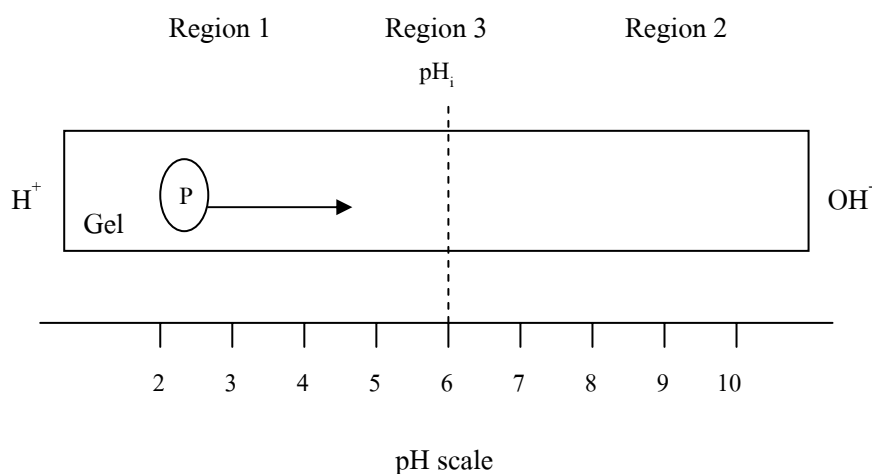


ภาพที่ 4 ตัวอย่างรูปแบบของโปรตีนจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ที่มา : Wong and Chen (2003)

แต่การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE นี้ก็มีข้อเสียอยู่บ้างเพราะบางครั้งไม่สามารถแยกโปรตีนบางชนิดที่มีน้ำหนักหรือมวลโมเลกุลเท่ากันออกจากกันได้ จึงได้มีการคิดค้นวิธีการแยกโปรตีนให้มีประสิทธิภาพในการแยกที่สูงมากขึ้น โดยการใช้เทคนิคการแยกในแบบ 2 มิติ หรือ two-dimensional gel electrophoresis โดยจะทำการแยกตัวอย่างโปรตีนด้วยเทคนิคการแยกโปรตีน 2 เทคนิครวมกัน คือ isoelectric focusing (IEF) และ SDS-PAGE ซึ่งการแยกแบบ 2 มิตินี้จะช่วยให้มีการแยกโปรตีนได้ละเอียดมากยิ่งขึ้น เนื่องจากสามารถแยกโปรตีนออกจากกันด้วยคุณสมบัติประจุสุทธิ (net charge) และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (molecular weight)

สำหรับเทคนิค isoelectric focusing (IEF) นี้เป็นอิเล็กโตรโฟริซิสอีกวิธีหนึ่งที่สำคัญที่ใช้แยกโปรตีนโดยแยกตามประจุสุทธิ หลักของการแยกอาศัยการสร้างเจลตัวกลางให้มีระดับของค่าความเป็นกรด-เบสไล่ระดับไปจากระดับที่เป็นกรดไปจนถึงระดับที่เป็นเบส ซึ่งโปรตีนจะเคลื่อนที่ผ่านไปจนถึงส่วนที่พีเอชมีค่าเท่ากับ isoelectric pH (pH_i) ของโปรตีน ซึ่งโปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ทำให้โปรตีนที่เข้มข้นที่จุดนั้น เช่น โปรตีนชนิดหนึ่งมี pH_i 6 จะเคลื่อนที่ไปหยุดที่ pH 6 ส่วนอีกชนิดหนึ่งมี pH_i 8 จะไปหยุดที่ pH 8 ภาพที่ 5 แสดงการทำ IEF โดยกรดอยู่ทางด้านซ้าย และเบสอยู่ทางด้านขวามือ และทำให้เจลตัวกลางที่อยู่ระหว่างขั้วทั้งสองมีค่าความเป็นกรด-เบสค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 10



ภาพที่ 5 ภาพจำลองหลักการแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค isoelectric focusing (IEF)

ที่มา : อภัสสร (2537)

แม้ว่าการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 2 มิตินี้จะให้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อเสียคือ วิธีการในการวิเคราะห์มีความซับซ้อนและยุ่งยากค่อนข้างมาก ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละชนิดใช้เวลานานและให้ผลการวิเคราะห์ได้เพียงแค่ครั้งละ 1 ตัวอย่างต่อแผ่นเจลเท่านั้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* 5 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ที่สร้างสาร thermostable direct hemolysin (TDH) 2 สายพันธุ์ คือ vp-293 และ vp-330 และสายพันธุ์ที่สร้างสาร thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) 3 สายพันธุ์ คือ FS-004, FS-006 และ FS-015 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. อรษา สุตเชิธรกุล ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 trypticase soy agar (TSA, Merck, Germany) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (ภาคผนวก ก)
- 2.2 trypticase soy broth (TSB, Merck, Germany) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (ภาคผนวก ก)
- 2.3 thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS, Merck, Germany) (ภาคผนวก ก)
- 2.4 motility test medium (ภาคผนวก ก)
- 2.5 chemical defined medium (CDM)(ภาคผนวก ก)
- 2.6 peptone 0.1 %, (Merck, Germany) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (ภาคผนวก ก)

3. สารเคมี

- 3.1 โซเดียมคลอไรด์ (Merck, Germany)
- 3.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (PBS+3 % NaCl) (ภาคผนวก ข)
- 3.3 เอทานอล 70 และ 95 %
- 3.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35 % (Asia Pacific Specially Chemical Limited, Australia)
- 3.5 เปอร์แอซิดิกแอซิด (สาร Tsunami 100, บ. เอ็กโคแล็บ จำกัด, ประเทศไทย)
- 3.6 cell extraction buffer (ภาคผนวก ข)
- 3.7 สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ

- 3.7.1 glacial acetic acid (Merck, Germany)
- 3.7.2 methanol (Merck, Germany)
- 3.7.3 acrylamide (Amersham Biosciences, Sweden)
- 3.7.3 bis-methylene acrylamide (Amersham Biosciences, Sweden)
- 3.7.4 Tris (hydroxy methyl) aminomethane (USB Corporation, USA)
- 3.7.5 glycine (USB Corporation, USA)
- 3.7.6 sodium dodecyl sulfate (USB Corporation, USA)
- 3.7.7 TEMED (N, N, N', N' – Tetramethylethylenediamine USB Corporation, USA)
- 3.7.8 ammonium persulfate (USB Corporation, USA)
- 3.7.9 bromophenol Blue (APS Ajax FineChem)
- 3.7.10 coomassie blue R-250 (USB Corporation, USA)
- 3.7.11 2 – mercaptoethanol (Amersham Biosciences, Sweden)
- 3.7.12 สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (protein molecular weight markers, Full Range Rainbow™, Amersham Biosciences, Sweden)
- 3.8 ชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Coomassie® Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology Inc., USA)

4. เครื่องมือ

- 4.1 ตู้เพาะเชื้อ (Oven, Memmert model 700, Germany)
- 4.2 ตู้เชื้อเชื้อ (Bio Safety Cabinet, Gelman Sciences model CF435, Australia)
- 4.3 ตู้อบ (Oven, Memmert model 800, Germany)
- 4.4 ตู้เย็น (Refrigerator, Sharp model SJ-51G, Japan)
- 4.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, Hirayama model HA-300MII, Japan)
- 4.6 เครื่องย่อยเซลล์จุลินทรีย์ (Ultrasound disintegrator, Sanyo soniprep 150, Gallenkamp plc, UK)
- 4.7 เครื่องวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini-PROTEAN II electrophoresis cell, Bio-rad laboratories, USA)
- 4.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Labomed, Inc Spectro 22, USA)
- 4.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Biofuge Primo, Kendro Laboratory Product,

- 4.10 เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Colony counter, IUL instruments, Spain)
- 4.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter, Jenco Electronics model 6071N, China)
- 4.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath, Memmert model WB29, Germany)
- 4.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking waterbath, Labnet SWB 5050, USA)
- 4.14 เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 2 ตำแหน่ง (Balance, Ohaus Model GT4100, USA)
- 4.15 เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง (Balance, Ohaus Model AP2105, Switzerland)
- 4.16 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer, Vortex GenieII, Scientific industries, Inc., USA)
- 4.17 นาฬิกาจับเวลา (Timer, Heathrow Scientific LLC, USA)
- 4.18 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 4.19 เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่จำเป็น
- 4.20 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ผลเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วิธีการ

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ของ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสถานะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) และสารฆ่าเชื้อโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ

1.1 การเตรียมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

ถ่ายเชื้อจาก semisolid media จาก stock culture (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. อรษา สุตเธียรกุล ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อจำนวน 1 หลอด เขี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (TSBS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีเขียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 5 มิลลิเมตร จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ motility test medium และเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้เป็น stock culture ทำการถ่ายเชื้อทุก 3 เดือนระหว่างทำการทดลอง (ชินจิต, 2548)

1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

1.2.1 การเตรียมเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ผ่านสถานะเครียดหรือเซลล์ปกติ

ถ่ายเชื้อจาก stock culture จำนวน 1 หลอด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อด้วยวิธีเดียวกันและเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงปิเปตสารละลายที่มีเซลล์เจริญ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBS 50 มิลลิลิตร เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพิ่มอีก 3 ชั่วโมง ได้เชื้อที่มีอายุ 15 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วง stationary phase (ชินจิต, 2548) ปรับให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร จะได้เชื้อบริสุทธิ์และกล้าเชื้อ (inoculum) สำหรับทำการทดลอง ทำเช่นนี้ทั้ง 5 สายพันธุ์

1.2.2 การเตรียมเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน (heat shock)

นำพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBS 90 มิลลิลิตร แช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยให้ระดับน้ำอยู่เหนือจากระดับอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 1 นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสจริง จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในพลาสติก ดังกล่าว ผสมเชื้อให้เข้ากับ TSBS ให้ความร้อนแก่เซลล์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำพลาสติกที่บรรจุเซลล์ที่ผ่าน heat shock มาแช่ในอ่างน้ำแข็งผสมน้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ใช้มือเขย่าพลาสติกอย่างสม่ำเสมอเพื่อให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วจะได้เซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านความร้อน (ชินจิต, 2548)

1.2.3 การเตรียมเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (starvation stress)

ถ่ายเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ chemical defined medium CDM (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.02 % และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 3% (Koga and Takumi, 1995) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (เซลล์ *V. parahaemolyticus* จะใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะอยู่ในสภาวะขาดอาหาร คือ ขาดน้ำตาลกลูโคสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง) (ดัดแปลงจาก ชินจิต, 2548)

1.2.4 การเตรียมเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อเปอร์แอซติกแอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ถ่ายเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBS 90 มิลลิลิตร ซึ่งมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารฆ่าเชื้อเปอร์แอซติกแอซิด (สาร Tsunami 100) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ppm หรือเติมสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.17 ppm (ภาคผนวก ข) เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 125 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (ดัดแปลงจาก ชินจิต, 2548)

1.3 วิธีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ของ TDH และ TRH

V. parahaemolyticus ที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด และผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) และสารฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบหนึ่งมิติ

1.3.1 การเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 และ 1.2.4 มาศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายในเซลล์ โดยปั่นสารละลายเซลล์ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tubes) จากนั้นเหวี่ยงสารละลายเซลล์ด้วยความเร็ว $5,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 (PBS+3 % NaCl) แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปเหวี่ยงแยกอีกครั้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อดึงตะกอนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ให้ปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีน (ดัดแปลงจาก Wong *et. al*, 1998)

1.3.2 การสกัดโปรตีนในเซลล์

เมื่อได้ตะกอนเซลล์ *V. parahaemolyticus* สภาวะต่างๆ จากข้อ 1.3.1 นำมาสกัดโปรตีนภายในเซลล์ (total cellular fraction) โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับวิธีกล เริ่มจากปั่นสารละลายสำหรับสกัดเซลล์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข) ความเจือจาง 1:100 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องผสมสารละลายเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกอีกครั้งด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound disintegration) ที่ 23 kHz เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำรอบละ 5 นาที และพัก 5 นาทีสลับกันไป เมื่อครบเวลาจึงนำสารละลายดังกล่าวไปเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและเศษเซลล์ที่เกิดจากการสกัดเซลล์ออกให้เหลือเพียงโปรตีนและสารภายในเซลล์ *V. parahaemolyticus* เท่านั้น โดยใช้ความเร็ว $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้ชุดทดสอบ Coomassie® Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology Inc., USA) (ดัดแปลงจาก Wong *et. al*, 1998)

1.3.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ

นำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* หลังผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) และสารฆ่าเชื้อในกลุ่มเปอร์ออกไซด์ มาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีนภายในเซลล์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ (1-dimensional SDS-PAGE) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก ค) ซึ่งโปรตีนจากเซลล์เครียดแต่ละทรีตเมนต์ จะถูกปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 200 µg/ml จากนั้นนำมาตรวจสอบชนิดโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงและขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยโปรแกรม Quantity one (Bio-rad Laboratories, USA) ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. อภัสสร ชูเทศะ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) และสารฆ่าเชื้อ

2.1 การทดสอบความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30 ppm

ถ่ายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด และเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียด ต่างจากการเตรียมในข้อ 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 และ 1.2.4 (เลือก TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ชนิดละ 1 สายพันธุ์ คือ vp-293 และ FS-015) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 ppm จากนั้นนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที สุ่มตัวอย่างเมื่อครบเวลาที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที เพื่อตรวจนับปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต ปิเปตตัวอย่าง PBS+3 % NaCl จากพลาสติกประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเปปโตน 0.1 % ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม ตรวจนับปริมาณเซลล์รอดชีวิตด้วยวิธี surface plate โดยปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAS แต่ละระดับความเจือจางทำ 2 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำ

อาหาร นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและบันทึกปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร) ลักษณะโคโลนีของเซลล์ *V.*

parahaemolyticus บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAS มีลักษณะกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ใก้แงนุณเล็กน้อย ผิวหน้าโคโลนีเปียก คำนวณหาอัตราการรอดชีวิต (survival ratio, %) ของเซลล์หลังผ่านสภาวะเครียดจากสมการ (ดัดแปลงจาก Koga and Takumi, 1995; Chang *et al.*, 2004)

$$\text{เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์หลังผ่านสภาวะเครียดที่ระยะเวลาต่างๆ (CFU/มิลลิลิตร)}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น (CFU/มิลลิลิตร)}} \right) \times 100$$

2.2 การหาค่า-ดี (D-values) ของเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ในการต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 ppm

ค่า-ดี คือ ระยะเวลาเป็นนาที่หลังจากการสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ณ อุณหภูมิที่กำหนด ซึ่งทำให้ปริมาณเซลล์ TDH หรือ TRH *V. parahaemolyticus* ลดลง 1 log cycle หรือลดลงเปอร์เซ็นต์ 90 การคำนวณค่า-ดีทำได้โดยนำปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/มิลลิลิตร) และเวลาที่เซลล์สัมผัสสารละลาย (นาที่) ณ อุณหภูมิที่กำหนด มาเขียนกราฟชนิดล็อกด้านเดียว (semilog) โดยให้ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิตอยู่บนแกนค่า log หรือแกน Y และเวลาอยู่บนแกน X แล้วคำนวณหาค่า-ดี โดยใช้กราฟเส้นแนวโน้ม (linear regression) ซึ่งแสดงในรูปของสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ ($a = \text{slope}$ และ $b = \text{จุดตัดแกน Y}$) จากสมการ โดยในการคำนวณจะใช้ข้อมูลจากการทดลองในข้อ 2.1 ที่ทำการทดลอง 2 ชั่วโมง มาหาค่าเฉลี่ยดังสมการต่อไปนี้

$$D = U / \log_{10} a - \log_{10} b = -1 / \text{slope}$$

- U = ระยะเวลาที่ใช้ในการสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
- a = ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น (ที่เวลา 0 นาที่)
- b = ปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตหลังจากสัมผัสสารละลายเป็นเวลา U นาที่
- D = ค่า-ดี

3. สถานที่ทำการวิจัย

3.1 ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร (2108) ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะ
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

3.2 ห้องวิจัย Food Safety (2111) ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะ
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

4. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่ เดือนมิถุนายน 2548 สิ้นสุดเดือนมีนาคม 2550

ผลและวิจารณ์

1. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ของ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารฆ่าเชื้อเปอร์แอซิดิกแอซิด และสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* 2 สายพันธุ์คือ vp-293 และ vp-330 และ TRH *V. parahaemolyticus* 3 สายพันธุ์คือ FS-004, FS-006 และ FS-015 เมื่อผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ ได้แก่ สภาวะเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อเปอร์แอซิดิกแอซิดที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ppm เป็นเวลา 15 นาที และสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ppm เป็นเวลา 15 นาที ถูกแยกโปรตีนภายในเซลล์และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์เครียดเหล่านั้นด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ (1-D SDS-PAGE) วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยโปรแกรม Quantity one (Bio-rad Laboratories, USA) แสดงผลในภาพที่ 6, 7, 8, 9 และ 10 ตามลำดับ ดังนี้

1.1 ผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293

จากการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสภาวะเครียดทั้ง 4 สภาวะ มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดเหล่านั้น โดยเซลล์เครียดทั้ง 4 สภาวะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนบางชนิดขึ้นมาใหม่ หรือบางชนิดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจากเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ภาพที่ 6 แสดงแถบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress; HS) (แถวที่ 3) พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ 3 ชนิดด้วยกันคือ โปรตีนขนาดโมเลกุล 47, 61 และ 63 kDa คาดว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นทั้ง 3 ชนิดนั้น มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีนในกลุ่มของ HSPs ได้แก่ โปรตีน DnaJ (Hsp70 family) ขนาดโมเลกุล 47 kDa และ โปรตีน GroEL (Hsp60 family) ขนาดโมเลกุล 62 kDa (Wong *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 1995) ซึ่งโปรตีนขนาดโมเลกุล 61 และ 63 kDa ที่พบในการทดลองนี้ คาดว่าเป็นโปรตีนกลุ่มเดียวกันคือ GroEL เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน

ผลการทดลองข้างต้นนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Wong *et al.* (2002) ซึ่งได้ศึกษาผลของสภาวะเครียดจากความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ *V. parahaemolyticus* โดยเลี้ยงเซลล์ *V. parahaemolyticus* ST550 ซีโรไทป์ O4:K13 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสาร TDH มาผ่านสภาวะเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที คณะผู้วิจัยพบว่าโปรตีน 24 ชนิด ที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้น และจากการตรวจสอบด้วยวิธี immunoblotting กับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนของ *E. coli* พบว่า โปรตีนที่สร้างเพิ่มขึ้นซึ่งมีมวลโมเลกุล 47.6 และ 62.3 kDa นั้นมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับ heat shock proteins คือ DnaJ และ GroEL ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Koga *et al.* (1996) ที่สร้างสภาวะเครียดให้แก่เซลล์ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* sp. ชนิดอื่น โดยเซลล์ถูก heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พบว่า มีการสร้างโปรตีนขนาด 58 kDa ที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน GroEL (Hsp60) ซึ่ง Goulhen *et al.* (1998) ได้กล่าวว่าโปรตีน GroEL นี้จัดเป็น universal stress protein กล่าวคือมีการสร้างโปรตีนแม้ในสภาวะของเซลล์ปกติ แต่จะมีการสร้างโปรตีนชนิดนี้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์เผชิญกับสภาวะเครียดเช่น ความร้อน

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาใน *Vibrio* sp. ชนิดอื่น ๆ เช่น ในเซลล์ *V. cholerae* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน พบว่ามีโปรตีนขนาดโมเลกุล 60 และ 68 kDa เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน GroEL และ DnaK (Jyot and Ghosh, 1995) เช่นเดียวกันกับการสร้างความเครียดในเซลล์ *V. harveyi* จากเค็มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 เพิ่มไปเป็น 39 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสร้างโปรตีนขนาดโมเลกุล 70, 58, 41 และ 14.5 kDa เพิ่มขึ้น ซึ่งมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับกลุ่ม heat shock proteins กลุ่ม DnaK, GroEL, DnaJ และ GroES ตามลำดับ (Klein *et al.*, 1995)

ส่วนรูปแบบโปรตีนของเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) (starvation stress; ST) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ chemical defined medium (CDM) ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.02 % (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างเพิ่มขึ้น 3 ชนิดด้วยกันคือ 33, 60 และ 111 kDa (ภาพที่ 6 แถวที่ 4) โดยที่โปรตีนขนาดโมเลกุล 33 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ จากการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวคาดว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีน RpoH (32 kDa) ซึ่งควบคุมการทำงานด้วย sigma factor-32 (σ^{32}) (Jenkin *et al.*, 1988, 1991) โปรตีน RpoH นี้เดิมพบว่าถูกสร้างขึ้นเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูงขึ้นเป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของ alternative sigma factor (σ^{32}) ซึ่งสามารถพบกลไกนี้ได้ในช่วงการเกิดสภาวะเครียดจากการขาดอาหารเช่นกัน ส่วนโปรตีนขนาดโมเลกุล 60 และ 111 kDa พบว่ามีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับ

GroEL (Hsp60 family) ขนาดโมเลกุล 62 kDa และกลุ่มโปรตีน general stress protein ซึ่งมักเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ตามรายงานของ Wong *et al.* (2002)

Abee and Wouters (1999) รายงานว่า GroEL เป็นโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่มของ heat shock proteins อยู่ในกลุ่ม Hsp 60 family ส่วนโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ 111 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีน RpoS ในกลุ่มของ general stress protein โปรตีนในกลุ่มนี้ควบคุมการทำงานโดยยีน rpoS มี sigma factor คือ σ^{38} พบว่าโปรตีนกลุ่มนี้ก็สามารถถูกสร้างขึ้นจากการกระตุ้นของสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (starvation stress) ได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Jenkins *et al.* (1988) ที่ศึกษาเซลล์ *E. coli* K-12 ในสภาพการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคสหรือไนโตรเจน) เป็นเวลา 1 2 4 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เครียดสามารถต้านทานความร้อนที่ 57 องศาเซลเซียสได้มากกว่าเซลล์ปกติ และเซลล์ที่อยู่ในสภาพการขาดอาหาร 4 และ 26 ชั่วโมง สามารถต้านทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 15 mM ได้เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาพบว่าสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้เซลล์ *E. coli* K-12 สร้างโปรตีนชนิดเครียดขึ้น 5 ชนิด และสามารถแสดงการต้านทานข้ามต่อสภาวะเครียดออกซิเดติกที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2.5 โมลาร์ได้อีกด้วย (Jenkins *et al.*, 1990)

ส่วนรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์ออกไซด์ิกแอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่ามีโปรตีนที่สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติในทำนองเดียวกันคือพบโปรตีนขนาดโมเลกุล 47 และ 63 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน DnaJ (47 kDa) และ GroEL (62 Kda) อ้างอิงโดย Wong *et al.* (2002) และ Klein *et al.* (1995) สภาวะเครียดจากสารออกซิไดส์ (oxidative stress) เช่นสารฆ่าเชื้อในกลุ่มนี้สามารถชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีนบางชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นให้สร้างขึ้นภายใต้สภาวะเครียดอื่น เช่น สภาวะเครียดจากความร้อน (Greenberg *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1986) โดยเฉพาะโปรตีน GroES และ DnaK ที่อยู่ในกลุ่มของ heat shock protein มีรายงานว่า การผ่านสภาวะเครียดกระตุ้น *E. coli* ให้เกิดการสร้างโปรตีน GroES ได้จากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Vanbogelen *et al.*, 1987) ส่วนการศึกษาใน *S. Typhimurium* ที่ให้สัมผัสสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่าเซลล์สร้างโปรตีน DnaK ได้เช่นกัน (Morgan *et al.*, 1986)

1.2 ผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TDH

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ vp-330

จากการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-330 ที่ผ่านสภาวะเครียดทั้ง 4 สภาวะ มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดโดยมีการสร้างโปรตีนบางชนิดที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ เช่นเดียวกับเซลล์เครียดจากสายพันธุ์ vp-293 (ภาพที่ 7) จากภาพที่ 7 แสดงรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress; HS) (แถวที่ 3) พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ 7 ชนิดด้วยกันคือ โปรตีนขนาดโมเลกุล 22, 29, 30, 35, 60, 81 และ 97 kDa จากการตรวจสอบพบว่าในสายพันธุ์นี้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีขนาดโมเลกุลในช่วง 22-35 kDa ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน RpoH (32 kDa) ที่ควบคุมการทำงานด้วย sigma factor-32 (σ^{32}) และมีการสร้างโปรตีนขนาดโมเลกุล 60 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน GroEL (Hsp60 family:62 kDa) โปรตีนขนาด 81 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนในกลุ่ม HSP90 family (90 kDa) และโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ 97 kDa ซึ่งคาดว่าเป็น general stress protein เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เครียดจากการขาดอาหารของสายพันธุ์ vp-293 อ้างอิงโปรตีนที่นำมาเทียบเคียงโดย Wong *et al.* (2002), Klein *et al.* (1995) และ Jenkins *et al.* (1988)

สำหรับรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (starvation stress; ST) แสดงในภาพที่ 7 แถวที่ 4 พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างเพิ่มขึ้น 2 ชนิดคือ 61 และ 100 kDa จากการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน GroEL (Hsp60 family:62 kDa) และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ 100 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนในกลุ่มของ general stress protein (Wong *et al.*, 2002; Abee and Wouters, 1999) แต่ไม่พบโปรตีนขนาดโมเลกุล 33 kDa ซึ่งพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในกรณีของสายพันธุ์ vp-293

ส่วนรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์ออกซิไดคแอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงในภาพที่ 7 แถวที่ 5 และ 6 พบว่ามีโปรตีนที่สร้างเพิ่มขึ้นมาคือ โปรตีนขนาดโมเลกุล 25, 30, 35, 61, 83 และ 98 kDa เช่นเดียวกันกับโปรตีนที่แยกได้จากเซลล์เครียดด้วยสารเปอร์ออกซิไดคแอซิด พบโปรตีนขนาดโมเลกุล 25, 30, 61, 82 และ 98 kDa จะเห็นได้ว่ากลุ่มโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เครียดทั้ง 2 นั้นคล้ายกัน เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดของสายพันธุ์ vp-293 ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน จากการตรวจสอบพบว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์สายพันธุ์ vp-330 นี้มีขนาดใกล้เคียงกับ

โปรตีน RpoH (32 kDa), GroEL (62 kDa), Hsp90 family (90 kDa) และโปรตีนขนาดใหญ่ 100 kDa ที่คาดว่าเป็นกลุ่มของ general stress protein (Wong *et al.*, 2002; Abee and Wouters, 1999)

1.3 ผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-004

จากการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-004 ที่ผ่านสภาวะเครียดทั้ง 4 สภาวะ มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดโดยมีการสร้างโปรตีนบางชนิดแตกต่างจากเซลล์ปกติ จากภาพที่ 8 แถวที่ 3 เป็นรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress; HS) พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้น 3 ชนิดด้วยกันคือ 23, 58 และ 70 kDa จากการตรวจสอบคาดว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีนกลุ่ม RpoH, GroEL (Hsp60 family) และ DnaK (Hsp70 family) อ้างอิงโดย Wong *et al.* (2002), Jenkins *et al.* (1988) และ Klein *et al.* (1995)

สำหรับรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (starvation stress; ST) แสดงในภาพที่ 8 แถวที่ 4 พบที่มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นเพียงชนิดเดียวคือ 32 kDa ซึ่งมีการแสดงออกที่ชัดเจนมากเหมือนกับเซลล์เครียดจากการขาดอาหารของสายพันธุ์ vp-293 ซึ่งจากการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน RpoH อ้างอิงโดย Jenkins *et al.* (1988)

ส่วนรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์ออกซิไดกแอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงในภาพที่ 8 แถวที่ 5 และ 6 พบที่มีการตอบสนองโดยการสร้างโปรตีนที่คล้ายกันเช่นเดียวกับเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อของ 2 สายพันธุ์ที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยในเซลล์เครียดสายพันธุ์ FS-004 มีการสร้างโปรตีนขนาดโมเลกุล 23, 35, 68 และ 69 kDa จากการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน RpoH (32 kDa) และ DnaK (Hsp 70) อ้างอิงโดย Jenkins *et al.* (1988) และ Klein *et al.* (1995)

1.4 ผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TRH

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ FS-006

ในทำนองเดียวกันเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-006 ที่ผ่านสภาวะเครียดทั้ง 4 สภาวะ สร้างโปรตีนบางชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้น 3 ขนาดด้วยกันคือ 58, 61 และ 99 kDa (ภาพที่ 9 แถวที่ 3) คาดว่าเป็นโปรตีนกลุ่ม GroEL (Hsp60 family) และกลุ่ม general stress protein (Wong *et al.*, 2002; Abee and Wouters, 1999) รูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (starvation stress; ST) แสดงในภาพที่ 9 แถวที่ 4 พบว่าโปรตีนที่ถูกสร้างเด่นชัดคือ 33 kDa ซึ่งมีการแสดงออกที่ชัดเจนมากเหมือนกับเซลล์เครียดจากการขาดอาหารของสายพันธุ์ vp-293 และ FS-004 คาดว่าโปรตีนดังกล่าวคือโปรตีน RpoH อ้างอิงโดย Jenkins *et al.* (1988) ส่วนโปรตีนขนาด 115 kDa คือกลุ่ม general stress protein (Wong *et al.*, 2002; Abee and Wouters, 1999)

รูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์ออกไซด์ออกซิเดชัน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงในภาพที่ 9 แถวที่ 5 และ 6 พบว่ามีการตอบสนองโดยการสร้างโปรตีนที่คล้ายกันเช่นเดียวกับเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อของ 3 สายพันธุ์ที่ได้กล่าวมาแล้วที่สร้างขึ้นมีขนาด 58 และ 108 kDa โปรตีนทั้ง 2 มีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับโปรตีน GroEL (Hsp60 family) และกลุ่ม general stress protein (Wong *et al.*, 2002; Abee and Wouters, 1999) แต่ในกรณีของเซลล์เครียดจากเปอร์ออกไซด์ออกซิเดชันพบว่าการสร้างโปรตีนขนาด 45 kDa เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ชนิดด้วย ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน DnaJ (47 kDa) อ้างอิงโดย Klein *et al.* (1995)

1.5 ผลของสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TRH

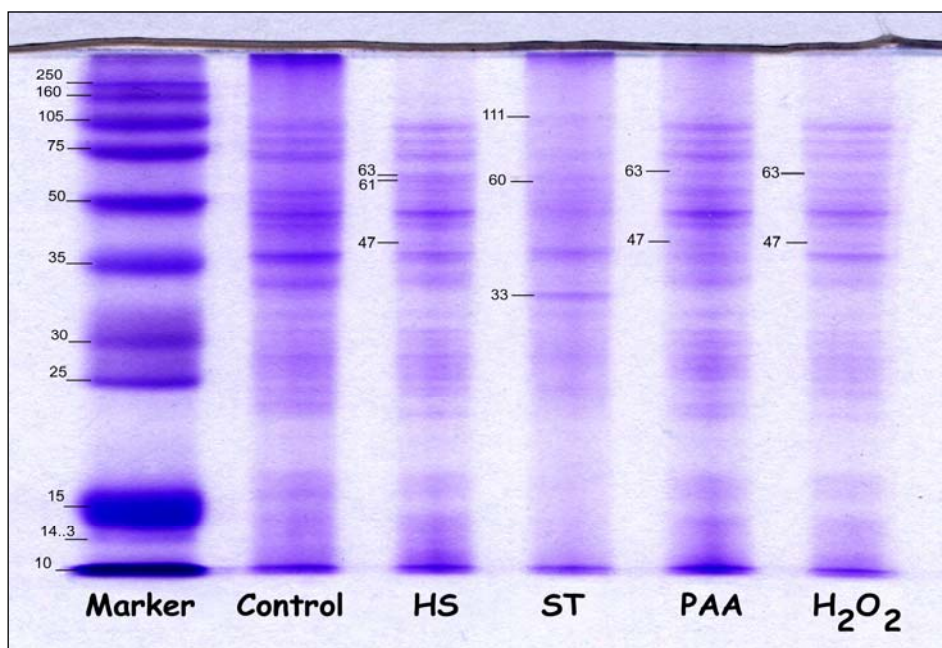
V. parahaemolyticus สายพันธุ์ FS-015

เช่นเดียวกันเซลล์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้กล่าวมาแล้วเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ก็มีการสร้างโปรตีนบางชนิดมีขนาดโมเลกุลแตกต่างจากเซลล์ปกติจากภาพที่ 10 ในแถวที่ 3 แสดงรูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน พบว่ามีโปรตีนที่สร้างขึ้นคือ 30, 54, 68 และ 77 kDa มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีนกลุ่ม RpoH (32 kDa), GroEL (60 kDa) และ DnaK (76 kDa) อ้างอิงโดย Wong *et al.* (2002), Jenkins *et al.* (1988) และ Klein *et al.* (1995)

ในทำนองเดียวกันโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (starvation stress; ST) พบว่ามีโปรตีนที่ถูกสร้างเพิ่มขึ้นหลายขนาดด้วยกันคือ 23, 32, 42, 54, 68 และ 112 kDa (ภาพที่ 10 แถวที่ 4) โดยเฉพาะโปรตีนขนาด 32 kDa ที่สร้างขึ้นในปริมาณมากอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับเซลล์เครียดจากการขาดอาหารของสายพันธุ์ vp-293, FS-004 และ FS-006 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน RpoH อ้างอิงโดย Jenkins *et al.* (1988) ส่วนโปรตีนขนาดอื่น ๆ มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับ DnaJ (42 kDa), GroEL (54 kDa), DnaK (68 kDa) และ กลุ่ม general stress protein (112 kDa) อ้างอิงโดย Wong *et al.* (2002), Jenkins *et al.* (1988) และ Klein *et al.* (1995)

แต่รูปแบบโปรตีนของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ เปอร์ออกซิติกแอซิด แสดงในภาพที่ 10 แถวที่ 5 และ 6 พบว่าการสร้างโปรตีนที่ค่อนข้างจะแตกต่างกันไม่คล้ายคลึงกันเหมือนที่พบในเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อของทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้กล่าวมาแล้ว พบโปรตีนของเซลล์เครียดจากเปอร์ออกซิติกแอซิดมีขนาดโมเลกุลคือ 29, 30 และ 31 kDa ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้มีขนาดนี้ใกล้เคียงกับโปรตีน RpoH (32 kDa) (Jenkins *et al.*, 1988) และ โปรตีนขนาด 55 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีน GroEL (62 kDa) (Wong *et al.*, 2002) แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้ในเซลล์เครียดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในทางกลับกันพบว่ามีโปรตีนขนาดโมเลกุล 45 kDa ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้มีขนาดนี้ใกล้เคียงกับโปรตีน DnaJ (Klein *et al.*, 1995) ถูกพบว่าสร้างขึ้นเฉพาะในเซลล์เครียดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่านั้น

อย่างไรก็ตามพบว่าการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นเหมือนกันในเซลล์เครียดทั้ง 2 ชนิดคือ โปรตีนขนาดโมเลกุล 68 และ 74 kDa ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 นี้มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน DnaK (68 kDa) (Klein *et al.*, 1995) การที่เซลล์สร้างโปรตีนต่างชนิดกันอาจเนื่องมาจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันคือ เปอร์ออกซิติกแอซิดเป็นสารประกอบระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแอซิดิกแอซิด ซึ่งในการตอบสนองโดยการสร้างโปรตีนชนิดเครียดที่มีผลของสภาวะเครียดที่เกิดจากกรดแอซิดิกร่วมด้วย พบเพียงในเซลล์เครียดจากสายพันธุ์ FS-006 และ FS-015 เท่านั้นที่มีรูปแบบการสร้างโปรตีนของเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 แตกต่างกัน คาดว่าในสายพันธุ์อื่น ๆ ผลของสภาวะเครียดจากกรดแอซิดิกที่มีอยู่ในสารเปอร์ออกไซด์แอซิดิกแอซิดนั้นอาจไม่ถูกกระตุ้นให้แสดงออกมา

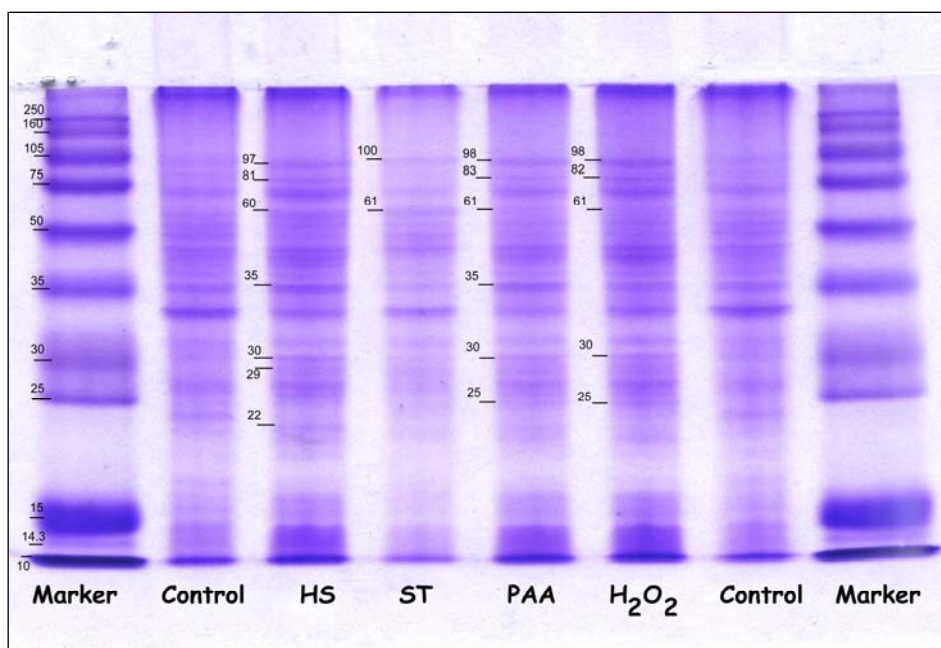


ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293

หมายเหตุ แถวที่ 2 คือ รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด แถวที่ 3 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน แถวที่ 4 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร แถวที่ 5 และ 6 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์แอซิดิกแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ ตัวเลขทางด้านซ้ายแสดงขนาดโมเลกุลเป็นกิโลดาลตัน (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 ตัวเลขและเส้นที่แสดงในแถวที่ 3-6 แสดงถึงแถบโปรตีน และขนาดโมเลกุลที่พบว่าถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น

HS = Heat stress, ST = Starvation stress, PAA = Peracetic acid stress

และ H_2O_2 = Hydrogen peroxide stress

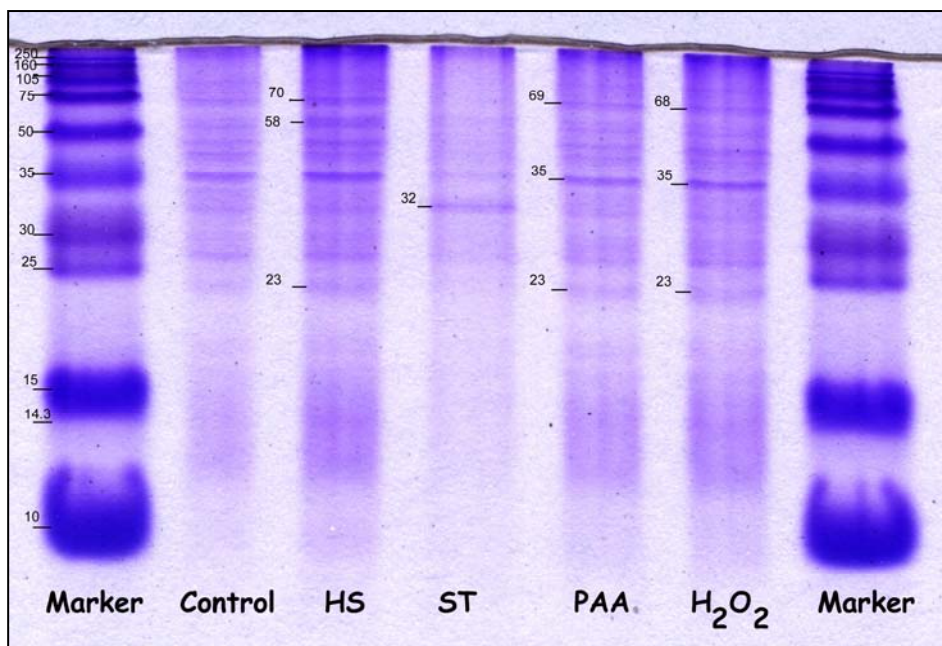


ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-330

หมายเหตุ แถวที่ 2 และ 7 คือ รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด แถวที่ 3 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน แถวที่ 4 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร แถวที่ 5 และ 6 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์แอซติกแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ ตัวเลขทางด้านซ้ายแสดงขนาดโมเลกุลเป็นกิโลดาลตัน (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 และ 8 ตัวเลขและเส้นที่แสดงในแถวที่ 3-6 แสดงถึงแถบโปรตีน และขนาดโมเลกุลที่พบว่าถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น

HS = Heat stress, ST = Starvation stress, PAA = Peracetic acid stress

และ H_2O_2 = Hydrogen peroxide stress

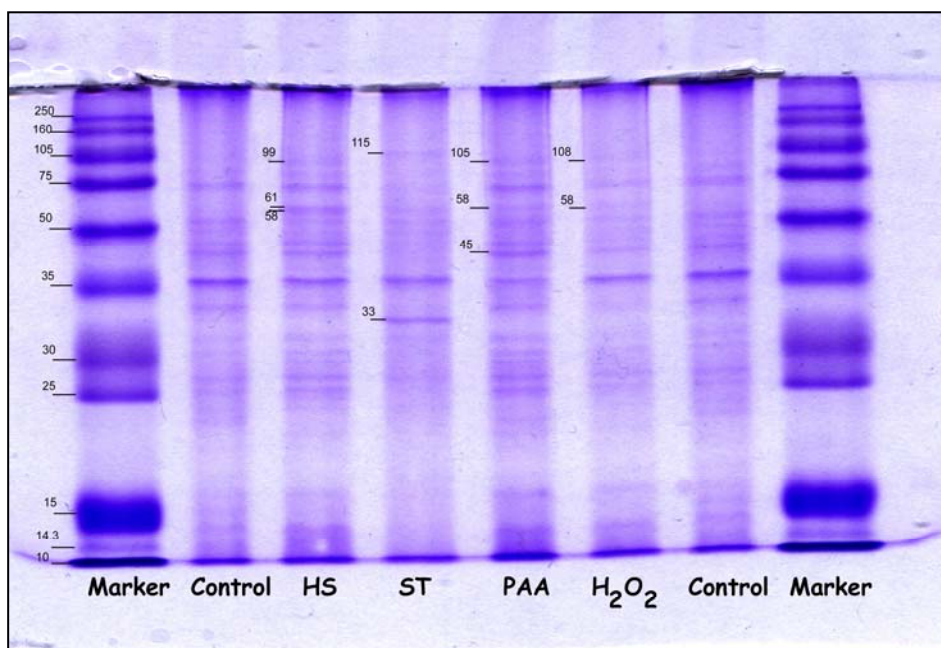


ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-004

หมายเหตุ แถวที่ 2 คือ รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด แถวที่ 3 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน แถวที่ 4 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร แถวที่ 5 และ 6 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์แอซิดิกแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ ตัวเลขทางด้านซ้ายแสดงขนาดโมเลกุลเป็นกิโลดาลตัน (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 และ 7 ตัวเลขและเส้นที่แสดงในแถวที่ 3-6 แสดงถึงแถบโปรตีน และขนาดโมเลกุลที่พบว่าถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น

HS = Heat stress, ST = Starvation stress, PAA = Peracetic acid stress

และ H_2O_2 = Hydrogen peroxide stress

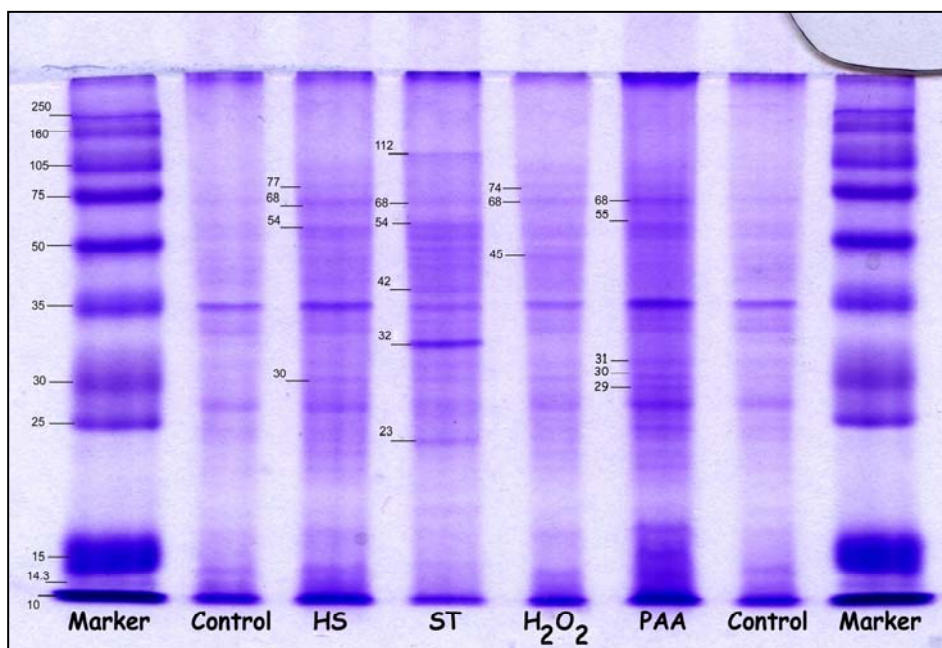


ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-006

หมายเหตุ แถวที่ 2 และ 7 คือ รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด แถวที่ 3 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน แถวที่ 4 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร แถวที่ 5 และ 6 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์แอซิดิกแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ ตัวเลขทางด้านซ้ายแสดงขนาดโมเลกุลเป็นกิโลดาลตัน (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 และ 8 ตัวเลขและเส้นที่แสดงในแถวที่ 3-6 แสดงถึงแถบโปรตีน และขนาดโมเลกุลที่พบว่าถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น

HS = Heat stress, ST = Starvation stress, PAA = Peracetic acid stress

และ H_2O_2 = Hydrogen peroxide stress



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015

หมายเหตุ แถวที่ 2 และ 7 คือ รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด แถวที่ 3 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน แถวที่ 4 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร แถวที่ 5 และ 6 คือ จากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์แอซิดิกแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ ตัวเลขทางด้านซ้ายแสดงขนาดโมเลกุลเป็นกิโลดาลตัน (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 และ 8 ตัวเลขและเส้นที่แสดงในแถวที่ 3-6 แสดงถึงแถบโปรตีน และขนาดโมเลกุลที่พบว่าถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น

HS = Heat stress, ST = Starvation stress, PAA = Peracetic acid stress

และ H_2O_2 = Hydrogen peroxide stress

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ 4 สภาวะ เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียดจะเห็นว่าเซลล์แบคทีเรียเมื่อได้รับสภาวะเครียดต่าง ๆ จะมีกลไกในการสร้างโปรตีนขึ้นมาเพื่อป้องกันเซลล์ให้รอดชีวิตได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ หรือเพื่อช่วยซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหาย ช่วยรักษาสภาพของเซลล์ หรือช่วยในการกำจัดสารหรือสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดความเครียด (stress agent) (Yousef and Courtney, 2002) ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าเซลล์ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) และสารฆ่าเชื้อจากเปอร์ออกซิไดคแอซิดหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษขึ้นมาโดยโปรตีนที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ heat shock proteins ได้แก่ DnaJ (Hsp70 family), GroEL (Hsp60 family), DnaK (Hsp70 family), HSP90 และ RpoH รวมทั้งโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (ประมาณ 100 kDa ขึ้นไป) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม general stress proteins อีกด้วย และหากเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวระหว่างเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* พบว่าเซลล์เครียดของเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้สามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนชนิดเครียดได้เช่นเดียวกัน

2. ความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารฆ่าเชื้อเปอร์ออกซิไดคแอซิด และสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 มาเป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่สร้างสาร TDH และเลือกสายพันธุ์ FS-015 มาเป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่สร้างสาร TRH จากงานวิจัยของชินจิต (2548) พบว่าเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ให้ผลในการต้านทานความร้อนหลังผ่านสภาวะเครียดได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ และผลจากการทดลองเรื่องการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ที่ได้กล่าวมาแล้วพบว่า เซลล์ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดโดยการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษกลุ่ม heat shock proteins หลายชนิดด้วยกัน

ความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ TDH และ TRH *Vibrio parahaemolyticus* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารฆ่าเชื้อเปอร์ออกซิไดคแอซิด และสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ในกรณีของเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.19 logCFU/ml) หลังจากทดสอบด้วยสารละลาย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลา 0 - 30 นาที เซลล์ปกติมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 5 นาทีแรก และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงเวลา 30 นาที ซึ่งมีปริมาณเซลล์รอดชีวิต $1.79 \log\text{CFU/ml}$ หรือมีการรอดชีวิตเพียง 0.04 % (ปริมาณเซลล์ลดลงไป 99.96 %) (ภาพที่ 11) ส่วนเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน (ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 30 นาที) จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $5.30 \log\text{CFU/ml}$ พบว่าเซลล์รอดชีวิตได้ดีในช่วง 10 นาทีแรก แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณเซลล์ก็ลดลงอย่างช้าๆ จนถึงนาทีที่ 30 พบปริมาณเซลล์รอดชีวิตอยู่ $2.93 \log\text{CFU/ml}$ หรือมีการรอดชีวิตได้ 0.42 % (ปริมาณเซลล์ลดลง 99.58 %) เซลล์ที่ผ่านความร้อนนั้นมีแสดงการต้านทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chang *et al.* (2004) ที่ศึกษาในเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 690 (แยกเชื้อได้จากผู้ป่วย) และสายพันธุ์ chopping board isolate (แยกเชื้อได้จากการเกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดในกรุงเทพฯ) โดยนำเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์มาผ่านความร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที จากนั้นนำเซลล์เครียดมาทดสอบความไว (susceptibility) ต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 20 ppm ที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 20 นาที พบว่าเซลล์ที่ผ่านความร้อนของทั้ง 2 สายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังสัมผัสสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านความร้อน โดยเซลล์ปกติมีการรอดชีวิตประมาณ 0.1 % ส่วนเซลล์ที่ผ่านความร้อนมีการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 1 – 10 % โดยเซลล์ที่ผ่านความร้อนเป็นเวลา 45 นาทีมีการรอดชีวิตสูงที่สุด

สำหรับผลของสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดดังกล่าวสามารถต้านทานสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติหรือเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดอื่นๆ (ภาพที่ 11) จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $5.18 \log\text{CFU/ml}$ เมื่อครบเวลา 30 นาที มีปริมาณเซลล์ลดลงไปเพียงเล็กน้อย เหลือปริมาณเซลล์ $4.21 \log\text{CFU/ml}$ (ภาพผนวกที่ 1) คิดเป็นการรอดชีวิต 10.73 % (ปริมาณเซลล์ลดลง 89.27 %) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Koga and Takumi (1995) ที่ทำการเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำมาทดสอบการต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ $200 \mu\text{M}$ พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหารมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์ปกติ

และในกรณีเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อกลุ่มเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเปอร์เอซิดิกแอซิด จากปริมาณเซลล์เริ่มต้นคือ 5.18 และ $5.22 \log\text{CFU/ml}$ ตามลำดับ พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้ให้ผลการการต้านทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในลักษณะที่คล้ายกัน กล่าวคือเซลล์มีการรอดชีวิตได้ดีในช่วง 15 นาที

แรก (ภาพที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ เซลล์มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยในช่วง 10 นาทีแรก และลดลงอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 15 จนถึงนาทีที่ 30 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติจะเห็นว่าหลังเวลาผ่านไปจนครบ 30 นาที เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 1.89 และ 1.96 logCFU/ml อย่างไรก็ตามมีการรอดชีวิตต่ำกว่าเซลล์เครียดที่ผ่านความเครียดด้วยความร้อนและการขาดอาหารคือ 0.05 และ 0.06 % ตามลำดับ (หรือปริมาณเซลล์ลดลง 99.5 % และ 99.4 %)

จากผลการทดสอบการต้านทานต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาที ของเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 หลังผ่านสภาวะเครียดต่างๆ ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ เนื่องจากเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดต่างๆ จะมีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษขึ้นมา ได้แก่ โปรตีนในกลุ่มของ Heat shock proteins เช่น DnaK, DnaJ, GroEL หรือ RpoH เป็นต้น เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดนั้น ทำให้เซลล์สามารถรอดชีวิตจากสภาวะเครียดดังกล่าวและสร้างความต้านทานต่อสภาวะเครียดเดิมที่ระดับสูงขึ้น หรือต้านทานต่อสภาวะเครียดอื่นๆ ได้ เช่นเดียวกับ Wong *et al.* (2002) พบว่าเมื่อเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถูกกระตุ้นให้สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าคือ 47 องศาเซลเซียส มากกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านความร้อน เซลล์ดังกล่าวมีการสร้างโปรตีน HSPs ที่มีมวลโมเลกุล 47.6 KDa ซึ่งพบในส่วน of total cellular fraction และ 62.3 KDa ซึ่งพบในส่วน of periplasmic และ extracellular fraction ได้เพิ่มขึ้น โปรตีนดังกล่าวมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับ DnaJ โปรตีนและ GroEL โปรตีน ซึ่งมีมวลโมเลกุล 41 และ 63 KDa ตามลำดับ คาดว่าโปรตีนเหล่านี้มีส่วนช่วยให้เซลล์สามารถอยู่รอดที่สภาวะอุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น

แม้ว่าในการทดลองนี้พบว่าเซลล์สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการต้านทานข้ามต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ในเวลา 30 นาที ได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดอื่น ๆ ทั้งนี้คาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไกในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของเซลล์เครียดเช่น การสร้างโปรตีนที่จำเพาะคือ stressed protein โปรตีนชนิดพิเศษนี้ช่วยให้เซลล์ทนต่อสภาวะเครียดที่ระดับรุนแรงมากขึ้น แต่อาจช่วยให้ทนได้ไม่นานมากนัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของสภาวะเครียดที่กระตุ้นและที่ทำการทดสอบด้วย ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองของ Zook *et al.* (2001) ที่ทำการศึกษาเซลล์ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 12 mM และเปอร์แอกซิติกแอซิด 0.1 % จากนั้นนำไปทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 80 mM

พบว่าเซลล์เครียดมีจำนวนลดลงเพียง 1 log cycle ที่เวลา 3 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ปกติลดลงไปถึง 4 log cycle ในเวลา 1 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์เริ่มต้น 9 logCFU/ml) จะเห็นได้ว่าเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อสามารถทนต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีระดับความเข้มข้นสูงได้เป็นเวลานานมาก ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากชนิดแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน รวมถึงระดับความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่ใช้กระตุ้นและทดสอบก็แตกต่างกัน โดยปกติแล้วเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 สามารถทนต่อสภาวะกรดที่มีความเข้มข้นสูงได้มากกว่าเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญก่อนไปทางเบสคือ 7.6 – 8.6 สภาวะที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยสารเปอร์ออกซิดิกแอซิดของ Zook *et al.* (2001) นั้นมีผลของสภาวะเครียดจากการครว่อยู่ด้วย คาดว่าเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 สามารถถูกกระตุ้นให้มีการตอบสนองได้มากกว่าจากการผ่านสารเปอร์ออกซิดิกแอซิด จึงแสดงความสามารถในการต้านทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่า อย่างไรก็ตามในการทดสอบการต้านทานต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาทีของเซลล์ *V. parahaemolyticus* ครั้งนี้พบว่าเซลล์เครียดดังกล่าวแสดงความสามารถในการต้านทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด

นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ข้างต้นยังพบว่า เซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนโปรตีนที่ตรวจพบว่าถูกสร้างเพิ่มขึ้น (จากแถบโปรตีนที่แสดงในภาพที่ 6) น้อยกว่าเซลล์เครียดจากความร้อนหรือจากการขาดอาหาร กล่าวคือเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบโปรตีนขนาดโมเลกุล 47 และ 63 kDa เพิ่มขึ้น ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน DnaJ (41 kDa) และ GroEL (62 kDa) อ้างอิงโดย Wong *et al.* (2002) แต่ในเซลล์เครียดจากความร้อนและการขาดอาหารพบว่ามีปริมาณ stressed protein ถูกสร้างเพิ่มขึ้นมากกว่า (ภาพที่ 6) คือ heat stressed cell มีโปรตีนขนาด 47, 61 และ 63 kDa และ starvation stressed cell มีโปรตีนขนาด 33, 60 และ 111 kDa จากการตรวจสอบโปรตีนทั้ง 3 มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน 3 ชนิดด้วยกันคือ RpoH (30 kDa), GroEL (62 kDa) และ HSP90 family (90 kDa) ซึ่งจำนวนหรือชนิดของโปรตีนพิเศษที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดคาดว่าจะมีผลช่วยส่งเสริมให้เกิดการต้านทานต่อสภาวะเครียดได้ดียิ่งขึ้น

จากผลการทดสอบการต้านทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเห็นได้ว่าความสามารถในการต้านทานข้ามของเซลล์สอดคล้องกับการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษของเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ TRH *V.*

parahaemolyticus สายพันธุ์ FS-015 มีการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นหลายชนิดและมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด จึงทำให้เซลล์สามารถรอดชีวิตในการทดสอบการต้านทานข้ามได้มากกว่าเซลล์ปกติ

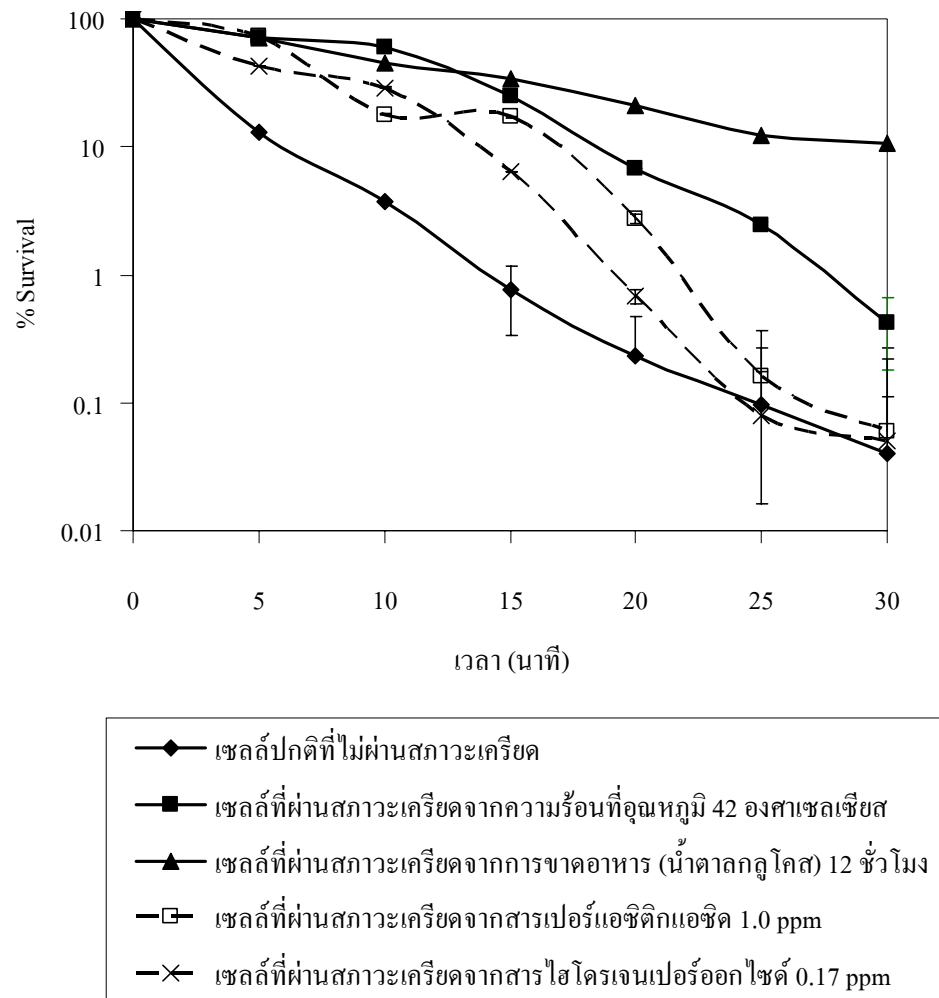
ในทำนองเดียวกันเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่มีสมบัติสร้างสาร TRH ให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ vp-293 ที่มีสมบัติสร้างสาร TDH กล่าวคือเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.44 logCFU/ml) ไม่ทนทานต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่ทดสอบ เซลล์ปกติมีปริมาณลดลงอย่างช้าๆ ในช่วง 15 นาทีแรก และลดลงอย่างอย่างรวดเร็วจนถึงเวลา 30 นาที สุดท้ายมีปริมาณเซลล์รอดชีวิต 2.27 logCFU/ml มีเซลล์รอดชีวิต 0.07 % (ปริมาณเซลล์ลดลง 99.93 %) (ภาพที่ 12) ส่วนเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.52 logCFU/ml) ที่เวลา 30 นาทีมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตอยู่ 3.15 logCFU/ml มีเซลล์รอดชีวิต 0.43 % (ปริมาณเซลล์ลดลง 99.57 %) เซลล์เครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.76 logCFU/ml) มีปริมาณเซลล์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อครบเวลา 30 นาทีมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตมากถึง 3.66 logCFU/ml ซึ่งมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดอื่นๆ (ปริมาณเซลล์ลดลง 99.2 %)

ส่วนเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อกลุ่มเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเปอร์เอซิติคแอซิด (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.27 และ 5.31 logCFU/ml) พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารละลายเปอร์เอซิติคแอซิดสามารถต้านทานสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 30 ppm ได้ดีกว่าในเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กล่าวคือเซลล์มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในช่วง 10 นาทีแรก แต่เมื่อถึงนาทีที่ 15 จนครบ 30 นาที เซลล์เครียดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็มีปริมาณเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงสุดท้ายมีปริมาณเซลล์รอดชีวิต 2.31 logCFU/ml มีการรอดชีวิต 0.10 % (ปริมาณเซลล์ลดลง 99.9 %) แต่เซลล์เครียดจากสารเปอร์เอซิติคแอซิดมีปริมาณเซลล์ลดลงเพียงเล็กน้อยตั้งแต่ นาทีที่ 0 จนถึงนาทีที่ 20 จากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็วจนเมื่อครบเวลา 30 นาที มีปริมาณเซลล์รอดชีวิตสูงกว่าคือ 3.60 logCFU/ml มีการรอดชีวิต 2.16 % (ปริมาณเซลล์ลดลง 97.84 %) ผลการทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกับสายพันธุ์ vp-293 ที่แตกต่างกันคือในสายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านสารละลายเปอร์เอซิติคแอซิดแสดงผลการต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าอย่างชัดเจน โดยมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตสูงถึง 3.60 logCFU/ml ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ของสายพันธุ์ FS-015 มีการแสดงออกจากการถูกกระตุ้นด้วยสารเปอร์เอซิติคแอซิดได้มากกว่าสายพันธุ์ vp-293 โดยสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันคือ เปอร์เอซิติคแอซิดเป็นสารประกอบระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอซิติคแอซิด ซึ่งในการตอบสนองการต้านทานต่อ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm นี้อาจมีผลของสภาวะเครียดที่เกิดจากกรดแอซิดกร่วมด้วย จึงสามารถกระตุ้นให้เซลล์สายพันธุ์ FS-015 สร้างความต้านทานข้ามได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเซลล์สายพันธุ์ vp-293

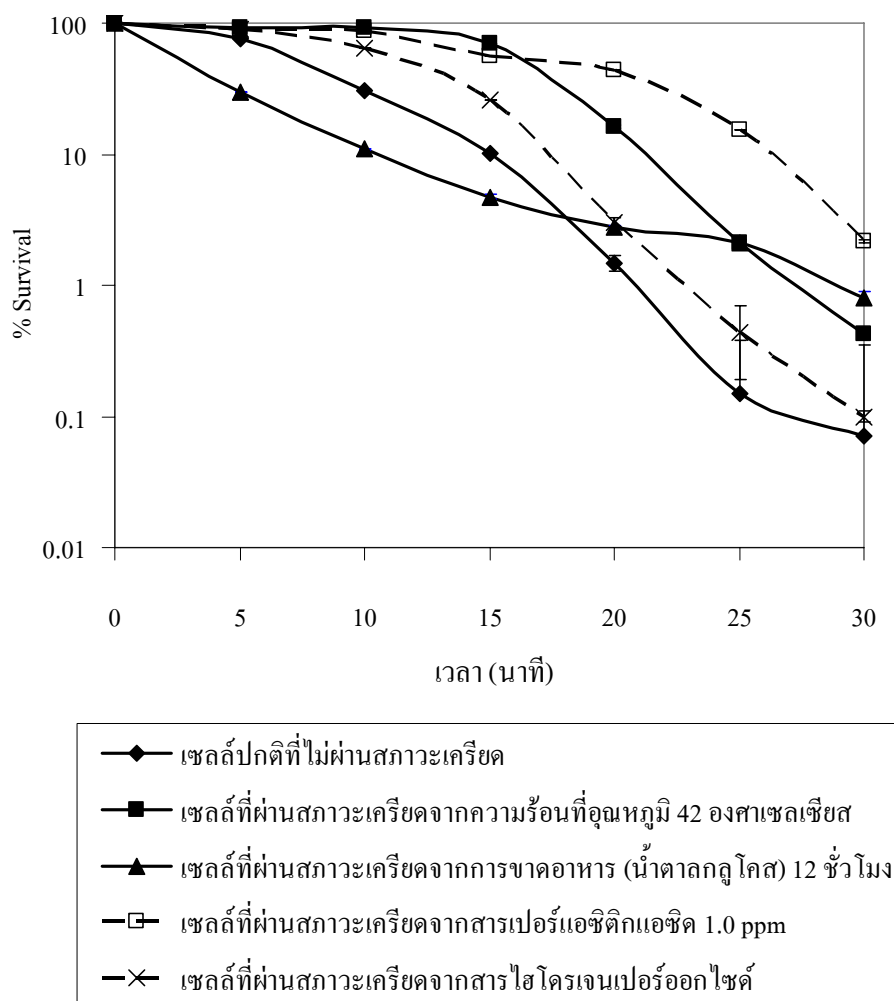
ได้เคยมีรายงานถึงผลของสภาวะเครียดจากกรดต่อการต้านทานข้ามต่อสภาวะเครียดอื่น ๆ ในเซลล์ *V. parahaemolyticus* ST550 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากกรด ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 30 นาที สามารถต้านทานข้ามต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้เพิ่มขึ้น และพบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากกรดเหล่านั้นมีการสร้างโปรตีนขนาด 47.6 และ 58.1 kDa เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน DnaJ (41 kDa) และโปรตีน GroEL (63 kDa) (Wong *et al.*, 1998)

ผลการทดลองข้างต้นนี้สามารถนำมาคำนวณหาค่าดี (D-values) ของเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 และ FS-015 (ภาคผนวก ง) ดังแสดงในตารางที่ 7 จากตารางพบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดต่างๆทั้ง 4 สภาวะนั้นมีค่าดี (D-values) ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหารแสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ได้มากกว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดอื่นๆ โดยมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตและมีค่าดีที่สูงกว่าเซลล์ทุกสภาวะ ซึ่ง Rowe and Kirk (2000) ได้รายงานว่า *E. coli* O157:H7 ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะขาดอาหาร สามารถรอดชีวิตและแสดงความสามารถในการต้านทานข้ามต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเพิ่มมากขึ้น คณะผู้ทำการวิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ *rpoS*⁺ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ปกติ กับเซลล์ *rpoS* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็น mutant พบว่าเซลล์ที่เป็นสายพันธุ์ปกติ (มียีน *rpoS*) สามารถถูกกระตุ้นจากสภาวะเครียดจากการขาดอาหารให้ต้านทานความร้อนได้ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มียีน *rpoS* (*rpoS*⁻) พบว่าเมื่อผ่านสภาวะเครียดแล้วมีการต้านทานความร้อนที่น้อยกว่าเซลล์ปกติ



ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่สร้างความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ I หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; n = 2)



ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่สร้างควมต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ I หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; n = 2)

ตารางที่ 7 ค่า-ดี(นาทิจ) ของเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 และ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่ผ่านสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียด

ชนิดของเซลล์	ค่า-ดี (นาทิจ)*	
	vp-293	FS-015
ปกติ ¹	A6.99 ± 0.00 ^a	B5.61 ± 0.33 ^a
ผ่านความร้อน ²	A8.29 ± 0.47 ^b	B6.63 ± 0.19 ^b
ผ่านการขาดอาหาร ³	A27.62 ± 0.00 ^c	B17.22 ± 0.37 ^d
ผ่านสารเปอร์ออกไซด์ ⁴	A7.18 ± 0.02 ^a	A7.61 ± 0.12 ^c
ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ⁵	A7.08 ± 0.49 ^a	B6.16 ± 0.04 ^b

หมายเหตุ 1 เซลล์อายุ 15 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงใน TSBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2 เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3 เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4 เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.17 ppm เป็นเวลา 15 นาที

5 เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.17 ppm เป็นเวลา 15 นาที

* ค่าเฉลี่ยค่า-ดี (นาทิจ); ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

A, B ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.5)

a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.5)

จากตารางที่ 7 พบว่าเซลล์ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน และการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) มีค่า-ดีสูงขึ้นแตกต่างจากค่า-ดีของเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า-ดีเพิ่มขึ้นจากเซลล์ปกติคือ 6.99 ± 0.00 นาที เป็น 8.29 ± 0.47 และ 27.62 ± 0.00 นาที ตามลำดับ แต่เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารเปอร์ออกซิไดคแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แม้ว่าในช่วงแรกของการทดสอบเซลล์จะแสดงการต้านทานได้ดีแต่เมื่อครบเวลา 30 นาทีพบว่าเซลล์มีค่า-ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยมีค่า-ดีเป็น 7.18 ± 0.02 และ 7.08 ± 0.49 นาที ตามลำดับ

ส่วนในเซลล์ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ FS-015 พบว่าเซลล์เครียดทั้งหมดมีค่า-ดีเพิ่มขึ้นแตกต่างจากค่า-ดีของเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า-ดีเพิ่มขึ้นจากเซลล์ปกติคือ 5.61 ± 0.33 นาที เป็น 6.63 ± 0.19 , 17.22 ± 0.32 , 7.61 ± 0.12 และ 6.16 ± 0.04 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเซลล์เครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) ของเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่า-ดีเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ สอดคล้องกับการทดลองส่วนแรกที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนที่พบว่า ในเซลล์เครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดหนึ่งขนาดโมเลกุลประมาณ 30 kDa คือ โปรตีน RpoH เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่พบจากเซลล์เครียดอื่น

จากการคำนวณหาค่า-ดีที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นพบว่าสอดคล้องกับการทดลองของชินจิต (2548) ที่พบว่าเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดต่างๆ มีความสามารถในการต้านทานความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้มากขึ้น โดยมีค่า-ดีเพิ่มสูงขึ้นเฉลี่ย 2-3 นาทีเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ และยังพบว่าเซลล์เครียดเหล่านั้นเมื่อถูกสร้างการปนเปื้อนบนกุ้งและหมีก็สามารถรอดชีวิตที่อุณหภูมิระดับแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส และระดับแช่แข็ง -18 องศาเซลเซียส ได้นานกว่าเซลล์ปกติ เช่นเดียวกับในการทดลองของ Zhang and Griffiths (2003) ซึ่งเลี้ยงเซลล์ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะขาดอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาทดสอบการทนทานต่อความร้อนที่ 52 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์เครียดทั้ง 3 มีค่า D_{52} เพิ่มขึ้น 11.0, 13.2 และ 18.5 นาทีตามลำดับ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ของ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารฆ่าเชื้อเปอร์แอซิติกแอซิด และสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1.1 ผลของสภาวะเครียดจากความร้อนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TDH 2 สายพันธุ์ และ TRH *V. parahaemolyticus* 3 สายพันธุ์

เซลล์ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แก่ vp-293, vp-330, FS-004, FS-006 และ FS-015 หลังจากผ่านสภาวะเครียดจากความร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษเพิ่มขึ้นทุกสายพันธุ์ โดยโปรตีนที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่เป็นโปรตีนในกลุ่ม heat shock proteins (HSPs) คาดว่าได้แก่ โปรตีน DnaJ (Hsp70 family) สายพันธุ์ที่มีการสร้างโปรตีนชนิดนี้คือ vp-293 โปรตีน GroEL (Hsp 60 family) มีการสร้างขึ้นทั้ง 5 สายพันธุ์ โปรตีน DnaK (Hsp70 family) สายพันธุ์ที่มีการสร้างได้แก่ FS-004 และ FS-015 โปรตีนในกลุ่ม HSP90 (Hsp90 family) พบมีการสร้างในเซลล์ vp-330 และโปรตีน RpoH มีการสร้างในสายพันธุ์ vp-330, FS-04 และ FS-015 รวมถึงโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 100 kDa ขึ้นไปซึ่งอยู่ในกลุ่ม general stress proteins พบมีการสร้างในสายพันธุ์ vp-330 และ FS-006

1.2 ผลของสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* 5 สายพันธุ์

เซลล์ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษขึ้นมาได้เช่นกัน ซึ่งโปรตีนที่มีการสร้างขึ้นเป็นกลุ่มของ heat shock proteins (HSPs) เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เครียดจากความร้อนคาดว่าได้แก่ โปรตีน DnaJ, GroEL, DnaK และ RpoH รวมทั้งกลุ่มของ general stress proteins ด้วย ที่น่าสังเกตคือในเซลล์เครียดจากสายพันธุ์ vp-293, FS-004, FS-006

และ FS-015 พบว่ามีการสร้างโปรตีนขนาดโมเลกุล 32-33 kDa เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด คาดว่าคือโปรตีน RpoH ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ HSPs เช่นกัน

1.3 ผลของสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อเปอร์แอซิดิกแอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* 5 สายพันธุ์

ผลการทดลองเช่นเดียวกับเซลล์เครียดจากทั้ง 2 สภาวะที่ได้กล่าวมาแล้ว กล่าวคือเซลล์เครียดจากสารฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์มีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษเพิ่มขึ้น ได้แก่ โปรตีนในกลุ่มของ heat shock proteins (HSPs) ได้แก่ DnaJ, GroEL, DnaK, RpoH และ HSP90 รวมทั้งโปรตีนในกลุ่ม general stress protein ด้วย แต่เซลล์เครียดจากสารเปอร์แอซิดิกแอซิดในสายพันธุ์ FS-006 และ FS-015 พบว่ามีการสร้างโปรตีนที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นคาดว่าคือ DnaJ (45 kDa) และ RpoH (29-31 kDa)

จากผลการทดลองข้างต้นทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าเซลล์เครียดของ TDH *V. parahaemolyticus* และ TRH *V. parahaemolyticus* สามารถถูกกระตุ้นจากสภาวะเครียด 4 สภาวะ และแสดงการสร้างโปรตีนชนิดเครียดเพิ่มขึ้นโดยแบบแผนการสร้างโปรตีนแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ไม่ได้ขึ้นกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค คือ TDH หรือ TRH

2. ความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์

TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) สารเปอร์แอซิดิกแอซิด และสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการทดสอบการต้านทานต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาที ของเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 และ TRH สายพันธุ์ FS-015 หลังผ่านสภาวะเครียด 4 สภาวะ พบว่าเซลล์เครียดทั้ง 4 สภาวะสามารถต้านทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านสภาวะเครียด โดยเซลล์สายพันธุ์ vp-293 และ FS-015 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อนมีการรอดชีวิต 0.42 และ 0.43 เมื่อผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหารมีการรอดชีวิต 10.73 และ 0.80 % ตามลำดับ ส่วนเซลล์ 2 สายพันธุ์ดังกล่าวเมื่อผ่านสภาวะเครียดจากสารเปอร์แอซิดิกแอซิดมีการรอดชีวิต 0.06 และ 2.16 % และเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการรอดชีวิต 0.05 และ 0.10 % ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่า-ดีพบว่าเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน และการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) มีค่า-ดีสูงขึ้นแตกต่างจากค่า-ดีของเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า-ดีเป็น 8.29 และ 27.62 นาที ตามลำดับ แต่เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารเปอร์ออกซิไดคแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีค่า-ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยมีค่า-ดีเป็น 7.18 และ 7.08 นาที ตามลำดับ

ส่วนในเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ พบว่าเซลล์เครียดจากความร้อน การขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) และสารเปอร์ออกซิไดคแอซิด มีค่า-ดีเพิ่มขึ้นแตกต่างจากค่า-ดีของเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า-ดีเป็น 6.63, 17.22 และ 7.61 นาที ตามลำดับ แต่เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่า-ดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยมีค่า-ดีเป็น 6.16 นาที จะเห็นได้ว่าเซลล์เครียดจากการขาดอาหาร (น้ำตาลกลูโคส) ของทั้งสายพันธุ์ vp-293 และ FS-015 มีค่า-ดีเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติคือ 27.62 และ 17.22 นาที ตามลำดับ

สรุปได้ว่าทั้งเซลล์ TDH และ TRH *V. parahaemolyticus* สามารถถูกกระตุ้นจากสภาวะเครียดให้มีการแสดงการต้านทานและต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้งนี้เกิดจากการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษเพิ่มขึ้นจึงช่วยให้เซลล์รอดชีวิตได้ดีกว่าเซลล์ปกติ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายในเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ ในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพียงเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถทราบชนิดของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้แน่นอนว่าเป็นโปรตีนชนิดใด ต้องอ้างอิงข้อมูลจากเอกสารที่มีการวิจัยก่อนหน้านี้ หากต้องการทราบถึงชนิดของโปรตีนที่มีรายละเอียดมากกว่านี้ ควรตรวจสอบด้วยเทคนิค immunoblotting หรือ western blotting ซึ่งมีการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับชนิดของโปรตีนที่ต้องการทราบ จะทำให้ทราบชนิดของ stressed protein ที่จำเพาะมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้อาจตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดได้ ด้วยการหาความหนาแน่นของแถบโปรตีนจากเซลล์เครียดแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ

2. ในการทดลองการสร้างสภาวะเครียดให้แก่เซลล์ *V. parahaemolyticus* ครั้งนี้ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ซึ่งจำลองจากสภาวะเครียดที่เซลล์ต้องเผชิญในกระบวนการผลิตอาหาร ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างอาหารทะเล และปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการตอบสนองต่อความเครียด

3. เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่มีสมบัติสร้างสาร TDH และ TRH ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค (virulence factor) ที่สำคัญประการหนึ่งของเซลล์ จึงควรมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสภาวะเครียดและปัจจัยในการก่อโรสดังกล่าวหลังจากที่เซลล์ผ่านสภาวะเครียดแล้ว มีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยก่อโรคหรือไม่อย่างไร

4. ในการศึกษาหาค่า-ดี (D-values) จากการสัมผัสสารฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านสภาวะเครียดต่างๆ พบว่าเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหารมีค่า-ดีที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากกราฟมีลักษณะลาดมีความชัน (slope) ที่ค่อนข้างน้อย คาดว่าอาจต้องเพิ่มเวลาในการทดสอบให้นานขึ้นกว่าเดิมเพื่อที่จะได้เห็นการลดลง 1 log cycle ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กมลวรรณ ปรารณาคี. 2544. การอยู่รอดของ *E. coli* และ *E. coli* O157:H7 ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดในน้ำพริกสำเร็จรูป ภายใต้อิทธิพลของวอเตอร์แอคติวิตี และอุณหภูมิในการเก็บ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชื่นจิต จันทจัญญพงษ์. 2548. ความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นจาก *Vibrio parahaemolyticus* ที่ผ่านสถานะเครียดในอาหารทะเลแช่เย็นแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีวรรณ หัตยานนท์. 2548. สารละลายเกี่ยวกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. แหล่งที่มา:
http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=890, 20 มีนาคม 2550.

อาภัสสร ฆมิศ. 2537. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส. ภาควิชาชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abee, T. and J.A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing.
Int. J. Food Microbiol. 50: 65-91.

Allan, B., M. Linseman, L.A. Macdonald, J.S. Lan and A.M. Kropinski. 1988. Heat shock response of *Pseudomonas aeruginosa*. (Abst). **J. Bacteriol.** 170(8): 3668-3674.

Amanda, G.J., M.H. Karla, J.S. Robert, W.F. John and K.B. Asim. 1998. Growth, survival and characterization of *cspA* in *Salmonella enteritidis* following cold shock. (Abst). **Curr. Microbiol.** 36: 29-35.

Banwart, G. L. 1989. Control of microorganisms by retarding growth, pp. 347-413. In G.J. Banwart, ed. **Basic Food Microbiology**. 2nd ed. Van Nostrand-Reinhold, New York.

Beuchat, L.R. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* public health significance. **Food Technol.** 36:80-83.

_____. and R.E. Worthington. 1976. Relationships between heat resistance and phospholipid fatty acid composition of *V. parahaemolyticus*. **Appl. Env. Micro.** 31 (3): 389-394.

Bradshaw, J.G., D.B. Shah, A.J. Wehby, J.T. Peeler and R.M Twedt. 1984. Thermal inactivation of the kanagawa hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in buffer and shrimp. **J. Food Sci.** 49: 183-187.

Chang, C.M., M.L. Chiang and C.C. Chou. 2004. Response of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. **J. Food Prot.** 64(10): 2183-2188.

Chiang, M.L., W.L. Ho and C.C. Chou. 2005. Response of *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Microbiol.** 23(5): 461-467.

Cook, D.W., J.C. Bowers and A. Depaola. 2002a. Density of total and pathogenic (*tdh*+) *V. parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. **J. Food Prot.** 65(12): 1873-1880.

_____, P. Oleary, J.C. Hunsucker, E.M. Sloan, J.C. Bowers, R.J. Blodgett and A. Depaola. 2002b. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oyster: A national survey from June 1998 to July 1999. **J. Food Prot.** 65(1): 79-87.

Cords, B.R. and G.R. Dychdala. 1993. Sanitizers : Halogens surface-active agents and peroxides, pp. 469-537. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. **Antimicrobial in Foods.** Marcel Dekker, Inc., USA

- Datta, P.P. and R.K. Bhadra. 2003. Cold shock response and major cold shock protein of *Vibrio cholerae*. (Abst). **Appl. Env. Microbiol.** 69(11): 6361-9.
- Dileep, V., H.S. Kumar, Y. Kumar, M. Nishibuchi, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2003. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. **Lett. Appl. Microbiol.** 36: 423-427.
- Elhadi, N., S. Radu, C.H. Chen and M. Nishibuchi. 2004. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. **J. Food Prot.** 67(7): 1469-1475.
- Farr, S.B. and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol. Rev.** 55(4): 561-585.
- Foster, J.W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. **J. Bacteriol.** 173: 6896-6902.
- _____. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium involves transeint synthesis of key shock proteins. **J. Bacteriol.** 75: 1981-1987.
- _____ and H.K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 172: 771-778. Cited J.W. Foster. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium involves transeint synthesis of key shock proteins. **J. Bacteriol.** 75: 1981-1987.
- Fujii, D.K. and A. Fulco. 1977. Biosynthesis of unsaturated fatty acids by Bacilli hyperinduction and modulation of desaturase synthesis. (Abst). **J. Biol. Chem.** 252: 3660-3670.

- Greenberg, J.T., P. Monach, J.H. Chou, P.D. Josephy and B. Dimple. 1990. Positive control of global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87:6181-6185. Cited J.W. Foster.
1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. **J. Bacteriol.** 173: 6896-6902.
- Gottesman, S., S. Wickner and M.R. Maurizi. 1997. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* 11: 815-823. Cited T. Abee and J.A. Wouters.
1999. Microbial stress response in minimal processing. **Int. J. Food Microbiol.** 50: 65-91.
- Goulhen, F., A. Hafezi, V.J. Uitto, D. Hinode, R. Nakamura, D. Grenier and D. Mayrand. 1998. Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.** 66:5307-5313. Cited H.C.
- Wong, P. Y. Peng, S.L. Lan, Y.C. Chang, K.H. Lu, C.T. Shen and S.F. Lan. 2002. Effect of heat shock on the thermotolerance, protein composition and toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Food Prot.** 65(3): 499-507.
- Hara-Kudo, Y., K. Sugiyama, M. Nishibuchi, A. Chowdhury, J. Yatsuyanagi, Y. Ohtomo, A. Saito, H. Nagano, T. Nishina, H. Nakagawa, H. Konuma, M. Miyahara and S. Kumagai. 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. **Appl. Env. Microbiol.** 69(7): 3883-3891.
- Jay, J.M. 2000. **Modern Food Microbiology.** 6th ed. Gaithersburg, Md. Aspen.
- Jenkins, D.E., J.E. Schultz and A. Matin. 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriol.** 170: 3910-3914.

- Jenkins, D.E., E.A. Auger and A. Matin. 1991. Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. **J. Bacteriol.** 173(6): 1992-1996.
- _____, S.A. Chaisson and A. Matin. 1990. Starvation- induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 172: 3910-3914.
- Jones, P.G., R.A. Vanbogelen and F.C. Neidhardt. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. (Abst). **J. Bacteriol.** 169: 2092-2095.
- Joseph, S.W., R.R. Colwell and J.B. Kaper. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. **Crit. Rev. Microbiol.** 10: 77-124.
- Jyot, J. and A. Ghosh. 1995. Induction of heat shock response in *Vibrio cholerae*. **Microbiology.** 141: 2101-2109.
- Juneja, V.K. and J.S. Novak. 2002. pp. 31-53. Adaptation of foodborne pathogens to stress from exposure to physical intervention strategies. In A.E. Yousef and V.K. Juneja, eds. **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. CRC Press, New York. 368p.
- Kepecek, P., K. Altmannova and E. Weigl. 2001. Stress proteins: Nomenclature, division and functions. **Biomed. Papers.** 145(2): 39-47.
- Klien, G.R., E. Walczak, E. Krasnowska, A. Blaszcak and B. Lipinska. 1995. Characterization of heat-shock response of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **Mol. Microbiol.** 16:801-811. Cited H.C. Wong, P. Y. Peng, S.L. Lan, Y.C. Chang, K.H. Lu, C.T. Shen and S.F. Lan. 2002. Effect of heat shock on the thermotolerance, protein composition and toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Food Prot.** 65(3): 499-507.

- Koga, T. and K. Takumi. 1995. Nutrient starvation induces cross protection against heat, osmotic or H₂O₂ challenge in *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiol. Immunol.** 39(3): 213-215.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Laohaprertthisan, V., A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto and M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Southern Thailand. (Abst). **Epidemol. Infect.** 130:395-406.
- Linton, R.H., M.D. Pierson and J.R. Bishop. 1990. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **J. Food Prot.** 53 : 924-927.
- Mogan, R.W., M.F. Christman, F.S. Jacobsan, G. Storz and B.N. Ames. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella* Typhimurium overlap with heat shock and others stress proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83:8059-8063. Cited S.B. Farr and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. **Microbiol. Rev.** 55(4): 561-585.
- Mogens, K., J. Susanne, H. Karin and K.V. Finn. 1997. Induction of heat shock protein DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. (Abst). **Appl. Env. Microbiol.** 63(5): 1826-1837.
- Oliver, J.D. and J.B. Kaper. 1997. *Vibrio* species. pp. 228-264. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. 1997. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.** ASM Press. USA

- Ray, B. 1996. **Fundamental Food Microbiology**. CRC Press, Inc., USA.
- Reeve, C.A., P.S. Amy and A. Matin. 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 160: 1041-1046.
- Rowe, M.T. and R.B. Kirk. 2000. Effect of nutrient starvation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to subsequent heat stress. **J. Food. Prot.** 63(12): 1745-1748.
- Russell, N.J. and N. Fukunaga. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. **FEMS. Microbiol. Rev.** 75:171-182. Cited T. Abee and J.A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. **Int. J. Food Microbiol.** 50: 65-91.
- Steve, F., L. Chris and M. Ben. 1996. The heat shock response of *Escherichia coli*. **A Term paper for Molecular biology of prokaryotes**. Available Source : <http://www.bio.cmu.edu/courses/03441/TermPapers/96TermPapers/heat-shock/heat-shock.html>, June 16, 2006.
- Straus, D., W. Walter. And C.A. Gross. 1990. DnaK, DnaJ and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. **Genes and Development.** 4: 2202-2209.
- Su, Y.C. and C. Liu. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **J. Food Microbiol.** Doi:10.1016/j.fm.2007.01.005.
- Vanbogelen, R.A., P.M. Kelley and F.C. Neidhardt. 1987. Differential induction of heat shock, sos and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 169: 26-32.

- Vuddhakul, V. A. Chowdhury, V. Laohaprertthisan, P. Pungrasamee, N. Patararungrong, P. Thianmontri, M. Ishibashi, C. Matsumoto and M. Nishibuchi. 2000. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* strain from environment and clinical sources in Thailand. **Appl. Env. Microbiol.** 66(6): 2685-2689.
- Wong, H.C., P. Y. Peng, J.M. Han, C.Y. Chang and S.L. Lan. 1998. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. **Infect. Immun.** 66(7): 3066-3071.
- _____, _____, S.L. Lan, Y.C. Chang, K.H. Lu, C.T. Shen and S.F. Lan. 2002. Effect of heat shock on the thermotolerance, protein composition and toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Food Prot.** 65(3): 499-507.
- _____. and Y.C. Chen. 2003. Analysis of the envelope proteins of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* cells by immunoblotting and biotin-labeling methods. **Microbiol. Immunol.** 47(5): 313-319.
- Yousef A.E. and P.D. Courtney. 2002. pp. 1-30. Basic of stress adaptation and implications in new-generation foods. In A.E. Yousef and V.K. Juneja, eds. **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. CRC Press, New York.
- _____. and V.K. Juneja. 2002. **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. CRC Press, New York.
- Zhang, Y. And M.W. Griffiths. 2003. Induced expression of the heat shock protein genes *uspA* and *grpE* during starvation at low temperatures and their influence on thermal resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.** 66(11): 2045-2050.
- Zook, C.R., F.F. Busta and L.J. Brady. 2001. Sublethal sanitizer stress and adaptive response of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.** 64(6): 767-769.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase soy agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (TSAS)

ส่วนประกอบ

trypticase soy agar	40.0	กรัม (TSA, Merck, Germany)
sodium chloride	30.0	กรัม (Merck, Germany)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่ง TSA ซึ่งเตรียมสำเร็จแล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยการต้มให้เดือดและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ Trypticase soy agar 40.0 กรัม ประกอบด้วย

peptone from casein	15.0	กรัม
peptone from soymeal	5.0	กรัม
sodium chloride	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม

2. Trypticase soy broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 % (TSBS)

ส่วนประกอบ

trypticase soy broth	30.0	กรัม (TS, Merck, Germany)
sodium chloride	30.0	กรัม (Merck, Germany)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่ง TSB ซึ่งเตรียมสำเร็จแล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยการต้มให้เดือดและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ Trypticase soy broth 30.0 กรัม ประกอบด้วย

peptone from casein	17.0	กรัม
peptone from soymeal	3.0	กรัม
D (+)-glucose	2.5	กรัม
sodium chloride	5.0	กรัม
di-potassium hydrogenphosphate	2.5	กรัม

3. Diluent (peptone – water solution ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 %)

ส่วนประกอบ

peptone from casein pancreatically digested	1.0	กรัม (Merck, Germany)
sodium chloride	30.0	กรัม (Merck, Germany)
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบให้ละลายเข้ากัน เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)

ส่วนประกอบ

thiosulfate citrate bile sucrose agar	88.0	กรัม (TCBS, Merck, Germany)
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

ซัง TCBS ซึ่งเตรียมสำเร็จแล้ว ละลายโดยการนำไปต้มให้เดือด

หมายเหตุ Thiosulfate citrate bile sucrose agar 88.0 กรัม ประกอบด้วย

peptone from casein	5.0	กรัม
peptone from soymeal	5.0	กรัม
yeast extract	5.0	กรัม
sodium citrate	10.0	กรัม
sodium thiosulfate	10.0	กรัม

ox bile, dried	5.0	กรัม
sodium cholate	3.0	กรัม
sucrose	20.0	กรัม
sodium chloride	10.0	กรัม
iron (III) citrate	1.0	กรัม
thymol blue	0.04	กรัม
bromothymol blue	0.04	กรัม
agar-agar	14.0	กรัม

5. Chemical defined medium 0.02% glucose (CDM) (Koga and Takumi, 1995)

ส่วนประกอบ

glucose	0.02 %
sodium chloride	3.0 %
di-potassium hydrogenphosphate	50 มิลลิโมลาร์
ammonium sulfate	10 มิลลิโมลาร์
magnesium sulfate	10 ไมโครโมลาร์
calcium chloride	10 ไมโครโมลาร์
zinc chloride	5 ไมโครโมลาร์
ferric sulfate	5 ไมโครโมลาร์
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร, สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 โมลาร์ 150 ไมโครลิตร, สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 10 ไมโครลิตร, สารละลายซิงค์คลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 5 ไมโครลิตร, สารละลายเฟอร์ริกซัลเฟตความเข้มข้น 1 โมลาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และชั่งสารไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.71 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 30 กรัม และกลูโคส 0.2 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับให้มีค่าความเป็นกรด-เบส 7.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Motility test medium

ส่วนประกอบ

beef extract	3.0	กรัม (Merck, Germany)
peptone	10.0	กรัม (Merck, Germany)
sodium chloride	10	กรัม (Merck, Germany)
agar	4.0	กรัม (Merck, Germany)
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วปรับให้มี ค่าความเป็นกรด-เบส 7.8 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายเอทานอล 70 %

การเตรียมเอทานอล 70 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมจากเอทานอล 95 % โดยตวงเอทานอล 95 % ปริมาตร 74 มิลลิลิตร ลงในขวดเชิงปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ก็จะได้เอทานอล 70 % ตามที่ต้องการ

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3%

ชั่งโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.702 กรัม ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.120 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1.0 ลิตรในขวดเชิงปริมาตร

3. สารผสมเปอร์แอซิดิกแอซิด (สาร Tsunami 100) (บ. เอ็กโคเล็บบ จำกัด, ประเทศไทย)

3.1 การหาความเข้มข้นของเปอร์แอซิดิกแอซิดจากสารตั้งต้น (stock solution)

สาร Tsunami 100 มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ เปอร์แอซิดิกแอซิด วิธีการหาความเข้มข้นโดยวิธีไทเทรตของเปอร์แอซิดิกแอซิดมีดังนี้

3.1.1 คูดสารตั้งต้นมาเจือจางในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 % (w/v)

3.1.2 คูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.1.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีกรดซัลฟิวริก 1 นอร์มัล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.1.3 เติมนอร์อินอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยดผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีส้มอ่อน แล้วไทเทรตด้วยซิริคซัลเฟต 0.1 นอร์มัลจนสารละลายตัวอย่างเปลี่ยนจากสีส้มอ่อนเป็นไม่มีสี

3.1.4 เติมนอร์อินอินดิเคเตอร์ 2.5 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร และสารละลายสตาร์ช 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม

3.1.5 จากนั้นไทเทรตด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนสีกลับไปเป็นสีส้มอ่อนเหมือนเดิม

3.1.6 คำนวณความเข้มข้นของเปอร์แอซิดิกแอซิดโดยปริมาตรของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ไทเทรตได้ (มิลลิลิตร) คูณกับ 0.38 เท่ากับเปอร์เซ็นต์ของเปอร์แอซิดิกแอซิด ตัวอย่างเช่น หากไทเทรตด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟตได้ 2.1 มิลลิลิตร นำ 2.1 ไปคูณกับ 0.38 จะได้เท่ากับ 0.8 แสดงว่าสารตั้งต้นมีปริมาณเปอร์แอซิดิกแอซิด 0.8 % (อ้างอิงจาก ชื่นจิต, 2548)

3.2 การเตรียมสารผสมเปอร์แอซิดิกแอซิดตามความเข้มข้นที่ต้องการ

เตรียมสารผสมเปอร์แอซิดิกแอซิดตามความเข้มข้นที่ต้องการจากสารตั้งต้นซึ่งมีปริมาณเปอร์แอซิดิกแอซิด 0.8 % เท่ากับ 8000 ppm ถ้าต้องการเตรียมสารผสมที่มีความเข้มข้น 1.0 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากสารละลายที่มีความเข้มข้น 8000 ppm สามารถเตรียมได้ตามวิธีการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times \text{ความเข้มข้นตั้งต้น} &= \text{ปริมาตรสุดท้าย} \times \text{ความเข้มข้นสุดท้าย} \\ \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times 8000 \text{ ppm} &= 100 \text{ มิลลิลิตร} \times 1.0 \text{ ppm} \\ \text{ปริมาตรตั้งต้น} &= 12.5 \text{ ไมโครลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้นสามารถเตรียมสารผสมเปอร์แอซิดิกแอซิดที่มีความเข้มข้น 1.0 ppm โดยดูดสารละลายตั้งต้นปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ต้องการแล้วผสมให้เข้ากัน

4. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Asia Pacific Specialty Chemical Limited, Australia)

4.1 เจือจางสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 35 % (มีมวลโมเลกุล 34.01 ความหนาแน่น 1.14 กรัม/มิลลิลิตร (ให้ได้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น stock solution คำนวณได้จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times \text{ความเข้มข้นตั้งต้น} &= \text{ปริมาตรสุดท้าย} \times \text{ความเข้มข้นสุดท้าย} \\ \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times 35 \% &= 10 \text{ มิลลิลิตร} \times 0.1 \% \\ \text{ปริมาตรตั้งต้น} &= 28.6 \text{ ไมโครลิตร} \end{aligned}$$

4.1.1 ดังนั้นปีเปตสารละลายเข้มข้น 35 % 28.6 ไมโครลิตรลงในขวดเชิงปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.1.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เตรียม ได้มีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ $0.0286 \times 1.14 / 34.01 = 0.001$ โมล

4.1.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.001 โมล ในสารละลาย 10 มิลลิลิตรคิดเป็น สารละลายเข้มข้น = $0.001 \times 1000 / 10 = 0.1$ โมลาร์

4.2 ต้องการสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.1 % (0.1 โมลาร์)

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times \text{ความเข้มข้นตั้งต้น} &= \text{ปริมาตรสุดท้าย} \times \text{ความเข้มข้นสุดท้าย} \\ \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times 0.1 \text{ โมลาร์} &= 100 \text{ ไมโครลิตร} \times (5 \times 10^{-6} \text{ โมลาร์}) \\ \text{ปริมาตรตั้งต้น} &= 5 \text{ ไมโครลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้นปีเปตสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 5 ไมโครลิตร ลงใน สารละลายเชื้อ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 ไมโครโมลาร์ ตามที่ต้องการ

4.3 เปลี่ยนหน่วยของสารละลายจากไมโครโมลาร์ให้เป็น ppm (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

$$\begin{aligned} \text{สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 ไมโครโมลาร์} &= 5 \times 10^{-6} \text{ โมล / ลิตร} \\ &= 5 \times 10^{-6} \times 34.01 / 1000 = 0.17 \text{ ไมโครกรัม / ลิตร} \\ &= 0.17 \text{ ppm} \end{aligned}$$

5. สารละลาย cell extraction buffer

TBS buffer (0.41 M Tris, 0.4 M boric acid และ 1 % SDS)	10.0	มิลลิลิตร
glucose	5.0	กรัม
EDTA	185.0	มิลลิกรัม
2-mercaptoethanol	5.0	มิลลิกรัม
sodium dodecyl sulfate	1.9	กรัม
glycerol	5.0	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดผสมกันละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวด
เชิงปริมาตร

ภาคผนวก ค

วิธีศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ

วิธีศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 สารละลาย 30 % acrylamide, 0.8 % BIS (N,N-bis-methylene acrylamide) : ละลาย acrylamide 30 กรัม และ bis 0.8 กรัม ในน้ำกำจัดไอออน (deionized water) ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษานาน 30 วัน

1.2 สารละลาย Tri-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 8.8 : ละลายสาร Tris-base 14.15 กรัม ในน้ำกำจัดไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับให้ได้ค่าความเป็นกรด-เบส 8.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 สารละลาย Tri-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 6.8 : ละลายสาร Tris-base 6.05 กรัม ในน้ำกำจัดไอออนปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-เบสให้ได้ 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 สารละลาย 10 % SDS (sodium dodecyl sulfate) : ละลายสาร SDS 10 กรัม ในน้ำกำจัดไอออนปริมาตร 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ จนสารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

1.5 สารละลาย running buffer : ละลายสาร Tris-base 3.0 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกำจัดไอออน แล้วเติมสารละลาย 10 % SDS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.6 สารละลายย้อม coomassie blue R-250 : ละลายสาร coomassie blue R-250 1 กรัม ในเมทานอลปริมาตร 400 มิลลิลิตรและกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกำจัดไอออนเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.7 สารละลายล้างย้อม (destaining solution) : ผสมสารเมทานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกำจัดไอออนเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร

1.9 สาร TEMED (N,N,N',N'- tetra ethylene diamine)

1.10 สาร 2 – Mercaptoethanol

1.11 กลีเซอรอล

1.12 สารละลายบรอมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ความเข้มข้น 0.5 %

1.13 สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Protein Molecular Weight Markers, Full Range Rainbow™, Amersham Biosciences, Sweden)

2. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

2.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

2.2 เติมสารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 160 ไมโครลิตร สาร 2 – เมอร์แคปโตเอทานอล ปริมาตร 40 ไมโครลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กลีเซอรอล ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารละลายบรอมฟีนอลบลูความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร 40 ไมโครลิตร น้ำกำจัดอออน ปริมาตร 380 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3 นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 4 นาที และทำให้เย็นจากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3. วิธีการเตรียมเจล

3.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล

3.2 ทำการประกอบแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นๆ โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของแผ่นเจล 0.75 – 1.0 มิลลิเมตร กำหนดให้ stacking gel มีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร เหนือ separating gel

3.3 เตรียมสารละลายของ separating gel ที่ความเข้มข้น 12 % ดังนี้ ผสมสารละลาย 30 % acrylamide , 0.8 % BIS ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลาย 10 % SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกำจัดอออนปริมาตร 3.35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.4 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นานอย่างน้อย 15 นาที แล้วเติม สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

3.5 ทำการเทสารละลายผสมของเจลลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้โดยให้ เหลือระยะห่างจากขอบบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำแผ่นกระจกวางใน แนวตั้ง

3.6 เติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยที่มุมทั้งสองด้านของกระจกเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ ให้เจลแข็งตัว เมื่อเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำให้ดูดน้ำทิ้งไป แล้วใช้กระดาษกรองชั้นเล็กๆ ดูดซับ น้ำออกไปอีกที

3.7 เตรียมสารละลาย stacking gel ความเข้มข้น 4 % ดังนี้ ผสมสารละลาย 30 % acrylamide , 0.8 % bis ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร สารละลาย Tri-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความ เป็นกรดต่าง 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลาย 10 % SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกำจัดอิออน ปริมาตร 6.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.8 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แล้วเติม สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

3.9 เทสารละลายผสมของเจลลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนโดยใช้หวี (template comb) ลงใน stacking gel แล้วทิ้งไว้จน เจลแข็งตัว นำแผ่นหวีออกจะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีน

4. วิธีการทดลอง

4.1 ต่ออุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกันเติมสารละลาย running buffer ลงใน ภาชนะทั้งด้านในและด้านนอกจนเกือบเต็ม

4.2 ใส่สารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในแต่ละช่อง โดยใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

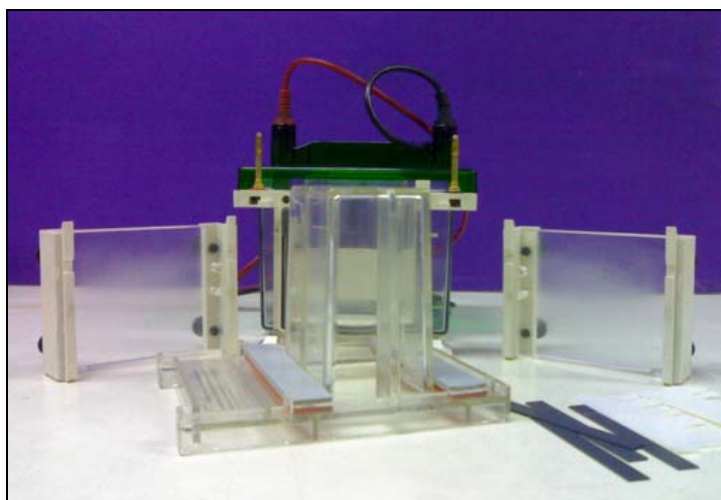
4.3 ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่าง ศักย์อยู่ที่ 100 โวลท์

4.4 หยุดการจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของสารบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่เกือบถึงปลายของ separating gel

4.5 นำแผ่นเจลออกจากชุดอุปกรณ์ แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลายสีย้อม coomassie blue R-250 นาน 30 นาที

4.6 ล้างสารละลายสีย้อมออกโดยใช้สารละลายล้างสีย้อม (destaining solution) แช่และเขย่าเพื่อให้สีย้อมละลายออกมาทำจนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

4.7 เก็บเจลที่ได้โดยการห่อด้วยพลาสติกใส จากนั้นปิดผนึกแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส



ภาพผนวกที่ ค1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบหนึ่งมิติ
หมายเหตุ เครื่องมือในภาพคือ ชุดวิเคราะห์ Mini-PROTEAN II electrophoresis cell ของบริษัท

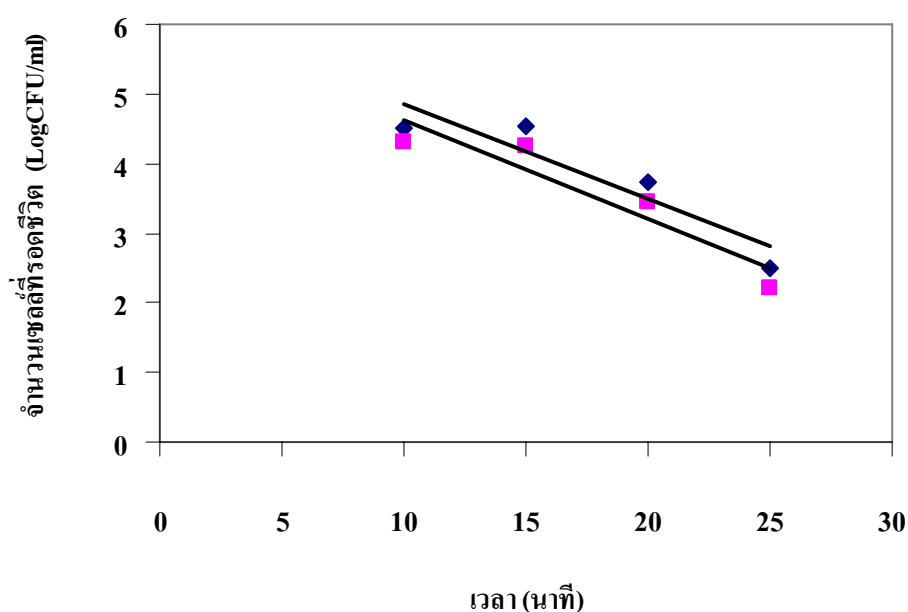
Bio-rad laboratories, USA

ภาคผนวก ง
ข้อมูลการทดลอง

ข้อมูลการทดลอง

1. วิธีหาคำนวณค่าความสามารถในการต้านทานต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ค่า-D (D-values)

นับจำนวนเซลล์ TDH หรือ TRH *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิตหลังจากสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 ppm โดยวิธี surface plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAS แล้วนำจำนวนเซลล์ที่ได้มาคำนวณ โดยนำปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/มิลลิลิตร) และเวลาที่เซลล์สัมผัสสารละลาย (นาที) ณ อุณหภูมิที่กำหนด มาเขียนกราฟชนิดล็อกด้านเดียว (semilog) โดยให้ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิตอยู่บนแกนค่า log หรือแกน Y และเวลาอยู่บนแกน X แล้วหาคำนวณค่า-D โดยใช้ระเบียบวิธีทางสถิติในรูปของเส้นแนวโน้ม (linear regression) ซึ่งแสดงในรูปของสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ (a = slope และ b = จุดตัดแกน Y)



ภาพผนวกที่ ง1 เส้นแนวโน้ม (linear regression) ของกราฟจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากสารฆ่าเชื้อเปอร์ออกไซด์ิกแอซิด ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C และเวลา 0-30 นาที

หมายเหตุ (◆) การทดลองซ้ำที่ 1; (■) การทดลองซ้ำที่ 2)

ตารางผนวกที่ ง1 ค่าความชันจากเส้นแนวโน้มของกราฟแสดงจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่รอดชีวิต หลังจากสัมผัสสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 ppm ที่ อุณหภูมิ 30 ± 2 °C

ชนิดของเซลล์	ความชันของกราฟ	
	การทดลองซ้ำที่ 1	การทดลองซ้ำที่ 2
ปกติ	-0.143	-0.143
ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน	-0.107	-0.138
ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร	-0.0362	-0.0362
ผ่านสภาวะเครียดจากเปอร์ออกซิติกแอซิด	-0.1364	-0.1422
ผ่านสภาวะเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	-0.1486	-0.1348

นำค่าความชันที่ได้มาแทนค่าในสมการ

$$\text{ค่า-ดี} = -\Delta X / \Delta Y$$

เนื่องจากพิจารณาเมื่อจำนวนเซลล์ลดลง 1 log cycle ดังนั้น ΔX จึงมีค่าเป็น 1 จะได้ว่า

$$\text{ค่า-ดี} = -1 / \text{slope}$$

ตัวอย่าง การหาค่าความสามารถในการต้านทานข้ามต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ของเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อน หลังสัมผัสสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm จากตารางผนวกที่ ง1 ความชันของกราฟเป็น -0.107 ดังนั้น ค่า-ดี ของเซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากความร้อนคำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} D_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 30 ppm}} &= -1 / (-0.107) \\ &= 9.34 \text{ นาที} \end{aligned}$$

การหาค่า-ดี ของเซลล์ปกติ เซลล์ที่ผ่านสภาวะเครียดจากการขาดอาหาร สารฆ่าเชื้อเปอร์ออกซิติกแอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คำนวณด้วยวิธีการเดียวกัน

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm

เวลา (นาท)	เซลล์ปกติ ^a	เซลล์ที่ผ่านความร้อน ^b	เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหาร ^c	เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์เอซิดิกแอซิด ^d	เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ^e
0	5.19±0.07 ^f	5.30±0.01	5.18±0.04	5.18±0.04	5.22±0.07
5	4.31±0.02	5.16±0.17	5.02±0.10	5.05±0.13	4.86±0.00
10	3.76±0.07	5.08±0.05	4.83±0.14	4.43±0.14	4.69±0.18
15	3.08±0.42	4.71±0.25	4.71±0.10	4.41±0.20	4.30±0.00
20	2.55±0.24	4.13±0.02	4.49±0.23	3.62±0.21	3.06±0.80
25	2.13±0.08	3.69±0.13	4.27±0.04	2.39±0.21	2.14±0.19
30	1.79±0.23	2.93±0.24	4.21±0.15	1.96±0.16	1.89±0.06

หมายเหตุ ^a = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ปกติที่รอดชีวิต

^b = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านความร้อนที่รอดชีวิต

^c = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหารที่รอดชีวิต

^d = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์เอซิดิกแอซิดที่รอดชีวิต

^e = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่รอดชีวิต

^f = standard deviation; n = 2

ตารางผนวกที่ 33 จำนวนเซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm

เวลา (นาท)	เซลล์ปกติ ^a	เซลล์ที่ผ่านความร้อน ^b	เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหาร ^c	เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์ออกซิดิกแอซิด ^d	เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ^e
0	5.44±0.35 ^f	5.52±0.04	5.76±0.04	5.27±0.04	5.31±0.08
5	5.32±0.26	5.49±0.06	5.23±0.00	5.22±0.04	5.26±0.03
10	4.93±0.11	5.48±0.04	4.79±0.08	5.21±0.05	5.13±0.05
15	4.45±0.09	5.36±0.14	4.43±0.18	5.02±0.04	4.73±0.03
20	3.61±0.19	4.73±0.43	4.20±0.09	4.92±0.02	3.79±0.23
25	2.61±0.23	3.85±0.13	4.08±0.04	4.45±0.03	2.96±0.25
30	2.27±0.28	3.15±0.01	3.66±0.09	3.60±0.04	2.31±0.01

หมายเหตุ ^a = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ปกติที่รอดชีวิต

^b = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านความร้อนที่รอดชีวิต

^c = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหารที่รอดชีวิต

^d = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์ออกซิดิกแอซิดที่รอดชีวิต

^e = จำนวน (logCFU/มิลลิลิตร) ของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่รอดชีวิต

^f = standard deviation; n = 2

ตารางผนวกที่ ๔4 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm

เวลา (นาที)	ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%)				
	เซลล์ปกติ ^a	เซลล์ที่ผ่านความร้อน ^b	เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหาร ^c	เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์แอซิดิกแอซิด ^d	เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ^e
0	100	100	100	100	100
5	13.16	71.64	70.67	74.17	45.15
10	3.75	59.20	45.33	17.88	29.05
15	0.77	25.27	34.66	17.15	6.37
20	0.23	6.71	20.80	2.74	0.68
25	0.09	2.43	12.30	0.16	0.08
30	0.04	0.42	10.73	0.06	0.05

หมายเหตุ ^a = เซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ปกติที่รอดชีวิต

^b = เซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านความร้อนที่รอดชีวิต

^c = เซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหารที่รอดชีวิต

^d = เซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์แอซิดิกแอซิดที่รอดชีวิต

^e = เซลล์ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่รอดชีวิต

ตารางผนวกที่ ๓5 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm

เวลา (นาที)	ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%)				
	เซลล์ปกติ ^a	เซลล์ที่ผ่านความร้อน ^b	เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหาร ^c	เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์เอซิดิกแอซิด ^d	เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ^e
0	100	100	100	100	100
5	76.00	92.47	29.90	89.78	88.83
10	30.95	91.27	10.89	86.56	65.05
15	10.25	69.58	4.72	55.91	26.12
20	1.48	16.29	2.76	44.25	3.02
25	0.15	2.11	2.08	15.16	0.44
30	0.07	0.43	0.80	2.16	0.10

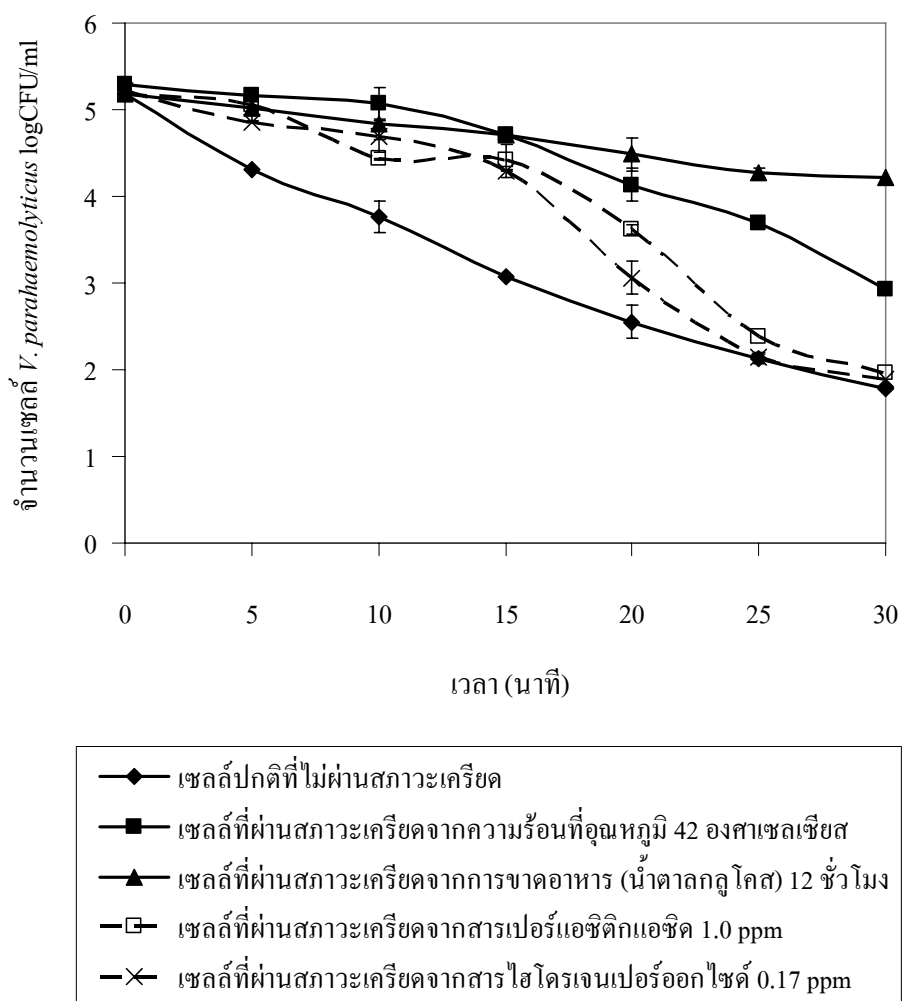
หมายเหตุ ^a = เซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ปกติที่รอดชีวิต

^b = เซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านความร้อนที่รอดชีวิต

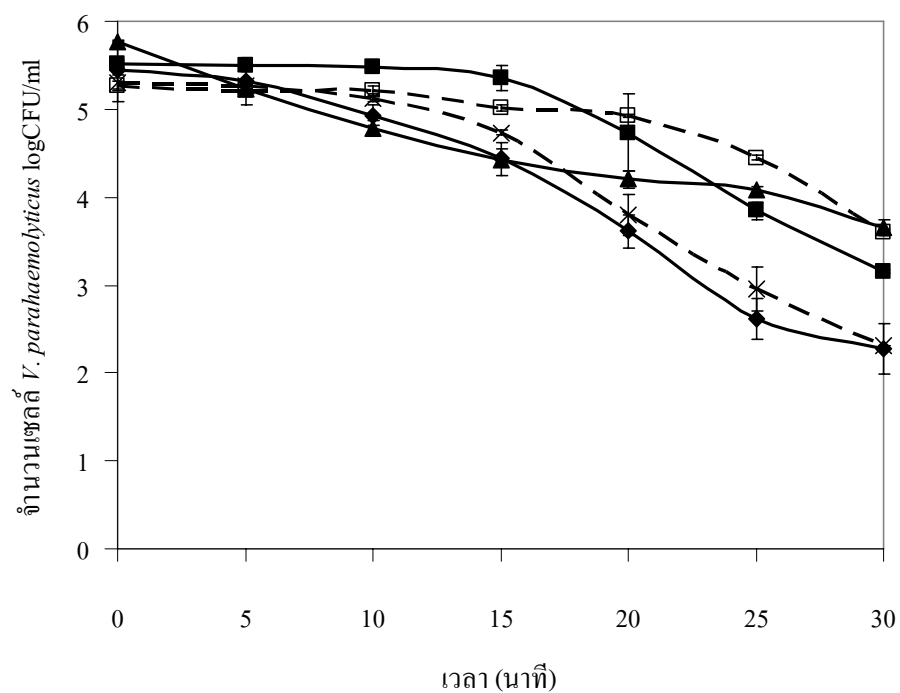
^c = เซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านการขาดอาหารที่รอดชีวิต

^d = เซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านสารเปอร์เอซิดิกแอซิดที่รอดชีวิต

^e = เซลล์ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 เซลล์ที่ผ่านสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่รอดชีวิต



ภาพผนวกที่ ง2 จำนวนเซลล์รอดชีวิตของ TDH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-293 ที่สร้าง ความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลาต่าง ๆ
 หมายเหตุ I หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; n = 2)



ภาพผนวกที่ 33 จำนวนเซลล์รอดชีวิตของ TRH *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ FS-015 ที่สร้าง ความต้านทานข้ามต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 ppm ที่เวลาต่าง ๆ
 หมายเหตุ I หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; n = 2)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวทิพย์ฤทัย ปอน้อย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 14 ตุลาคม 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วทบ. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร พ.ศ. 2546
ผลงานวิจัย	เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง ผลของสภาวะเครียดต่อการสร้างโปรตีนและความสามารถในการต้านทานข้ามต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของไวรัสโอ พาราอีโมไลติคัสในงานประชุมทางวิชาการครั้งที่ 45 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 30 มกราคม–2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์วารสารนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์