

ผลการทดลอง
(Results)

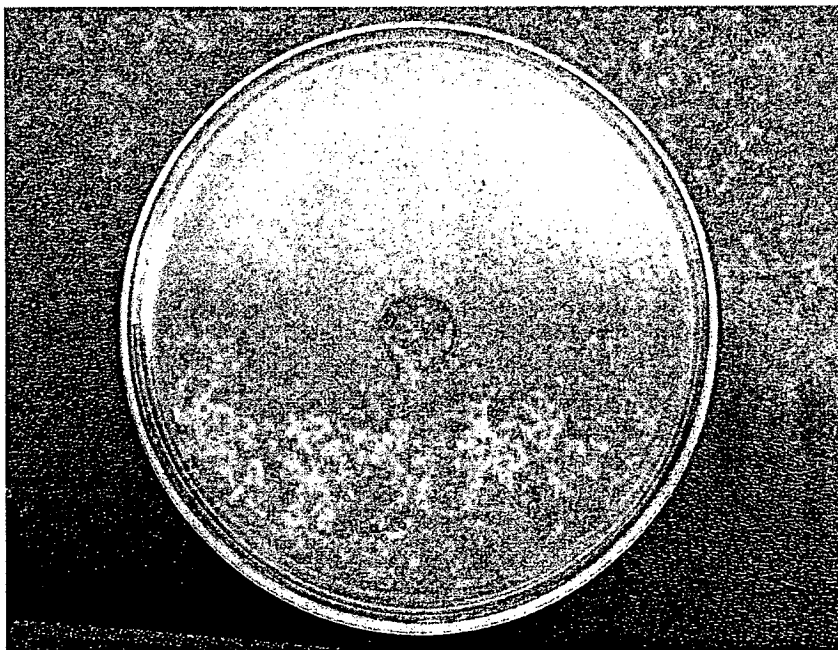
1. การตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจจากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถทำลาย

Lactococcus lactis subsp. *lactis* TFF221

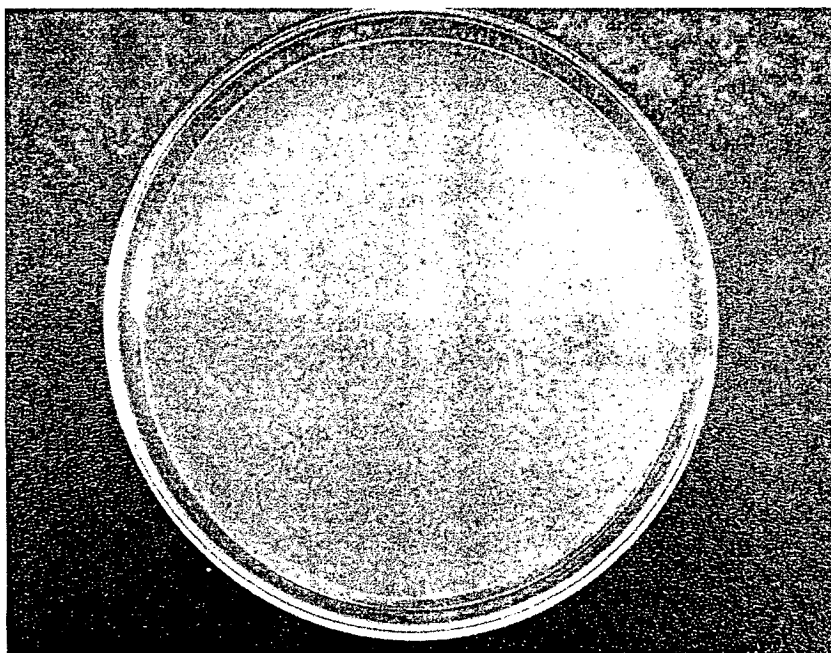
จากการนำตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ จำนวน 30 ตัวอย่างมาทำการตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจซึ่งสามารถทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 โดยวิธี enrichment method จากนั้นจึงทดสอบความสามารถในการทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ของแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี spot test พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียโอเฟจซึ่งทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ได้จากอาหารหมัก 1 ชนิดคือ กุ้งจ่อม (ตารางที่ 6) โดยสังเกตจาก clear zone ที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารที่มีการเจริญของ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 (รูปที่ 6) เมื่อนำสารละลายที่มีแบคทีเรียโอเฟจอยู่นั้นไปทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจให้ได้ single plaque โดยวิธี double-layer agar plaque assay พบว่าเกิด plaques ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 1 มิลลิเมตร (รูปที่ 7) เก็บ plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ นั้นไปเพิ่มจำนวน (propagation) เพื่อให้ได้ปริมาณมาก และตรวจสอบค่า titer [plaque forming unit (pfu)/ml] เรียกชื่อแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า ϕTFF221 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 ชนิดและจำนวนอาหารหมักและการตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจ

อาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้
ผักดอง	7	0
แหนม	4	0
ไส้กรอกอีสาน	4	0
หม่ำ	3	0
กุ้งจ่อม	4	1
ปลาสาม	4	0
เค็มบักนัด	4	0



รูปที่ 6 clear zone ของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 เมื่อทดสอบโดยวิธี spot test



รูปที่ 7 ลักษณะของ plaque ของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221

2. ความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

เมื่อนำแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ไปทดสอบความสามารถในการทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นจำนวน 17 สายพันธุ์ดังต่อไปนี้ *Lactococcus lactis* ATCC11454, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11007, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Lactobacillus brevis* ATCC14869, *Lactobacillus brevis* UBUB001, *Lactobacillus casei* ATCC334, *Lactobacillus curvatus* ATCC25601, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC12315, *Lactobacillus pentosus* ATCC8041, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, *Leuconostoc cremoris* ATCC19254, *Leuconostoc fallax* ATCC700006, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR473, *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745, *Pediococcus pentosaceus* TISTR374, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 และ *Enterococcus faecalis* TISTR927 โดยวิธี spot test พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ไม่สามารถทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวได้ ซึ่งสังเกตจากการไม่เกิด clear zone บนผิวหน้าอาหารที่มีส่วนผสมของแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละชนิดเจริญอยู่ (ตารางที่ 7)

3. ผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจในโฮสต์เซลล์

จากการศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ในโฮสต์เซลล์ โดยใช้สารละลาย CaCl_2 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้ 0, 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 mM พบว่าเมื่อเติม CaCl_2 ความเข้มข้นเท่ากับ 10 mM มีผลทำให้แบคทีเรียโอเฟจเพิ่มจำนวนได้สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง โดยสามารถนับจำนวนแบคทีเรียโอเฟจได้เท่ากับ 1.92×10^9 pfu/ml (รูปที่ 8)

4. การยึดเกาะของแบคทีเรียโอเฟจบนผิวของโฮสต์เซลล์

จากการศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 บนผิวเซลล์ของ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 พบว่าเมื่อนำตัวอย่างแบคทีเรียโอเฟจที่เก็บที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที มาับจำนวนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ (% adsorption of bacteriophage) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 บนผิวเซลล์ของโฮสต์มีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5-10 นาทีแรก และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 97.8% เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที (รูปที่ 9)

5. การเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ

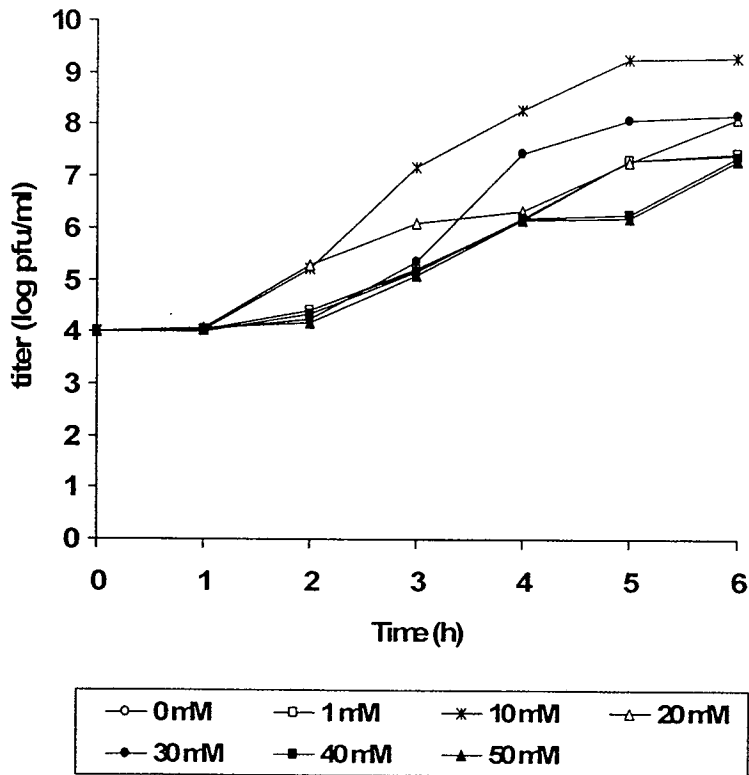
การเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 (one-step growth curve) มีลักษณะดังกราฟในรูปที่ 10 โดยมี latent period เท่ากับ 30 นาที burst period เท่ากับ 120 นาที และ burst size เท่ากับ 60 pfu/เซลล์ที่ติดเชื้อ

ตารางที่ 7 ความสามารถในการทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ
แบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221

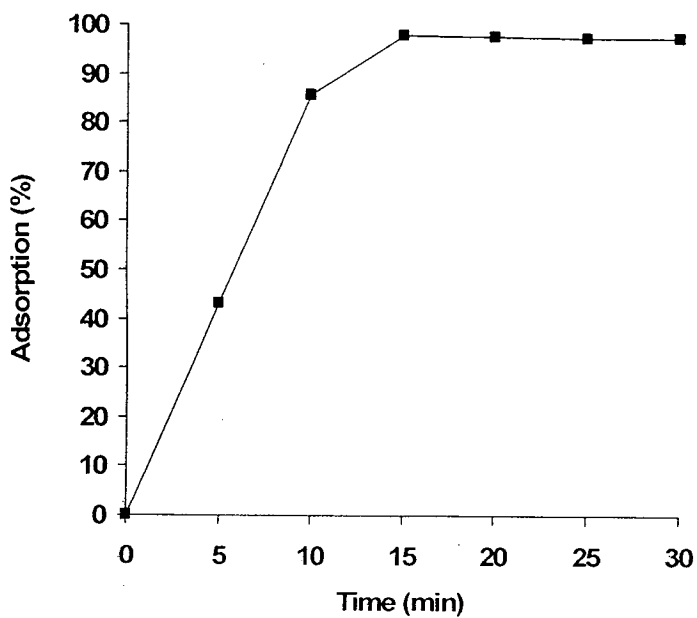
แลคติกแอซิดแบคทีเรีย *	ผลการทดสอบ spot test [†]
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC11454	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> TFF221	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11007	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356	—
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC14869	—
<i>Lactobacillus brevis</i> UBUB001	—
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC334	—
<i>Lactobacillus curvatus</i> ATCC25601	—
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC12315	—
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC8041	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	—
<i>Leuconostoc cremoris</i> ATCC19254	—
<i>Leuconostoc fallax</i> ATCC700006	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR473	—
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC25745	—
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR374	—
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	—
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR927	—

* ATCC, American Type Culture Collection; TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technological Research; TFF and UBUB, Culture Collection of Biological Science Department, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University.

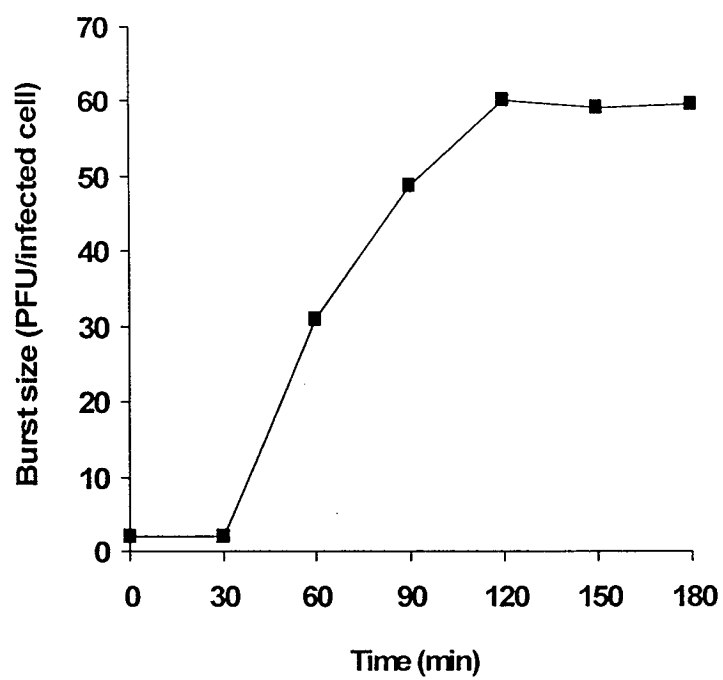
[†]+, clear zone; — no clear zone



รูปที่ 8 จำนวนแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-50 mM



รูปที่ 9 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 บนผิวเซลล์ของ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221



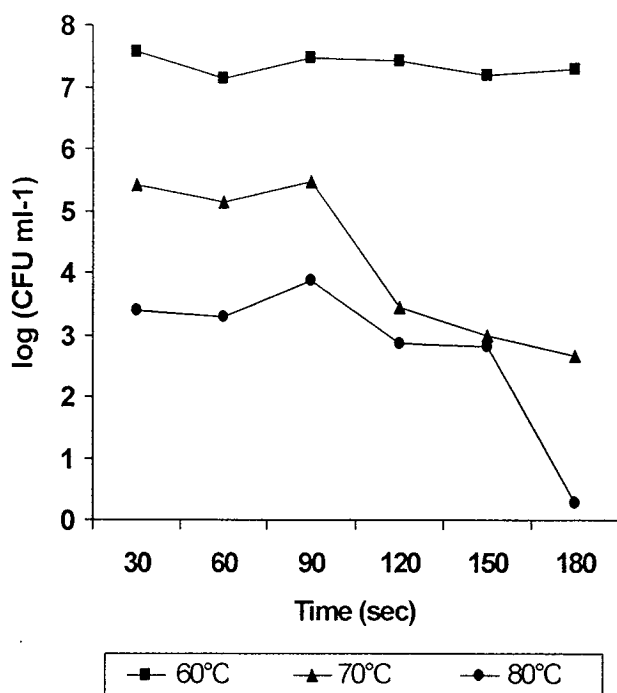
รูปที่ 10 One-step growth curve ของ แบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221

6. การทนความร้อน ทนความเป็นกรด-ด่าง และทนต่อสารละลายเกลือ (NaCl) ของแบคทีเรียโอเฟจ

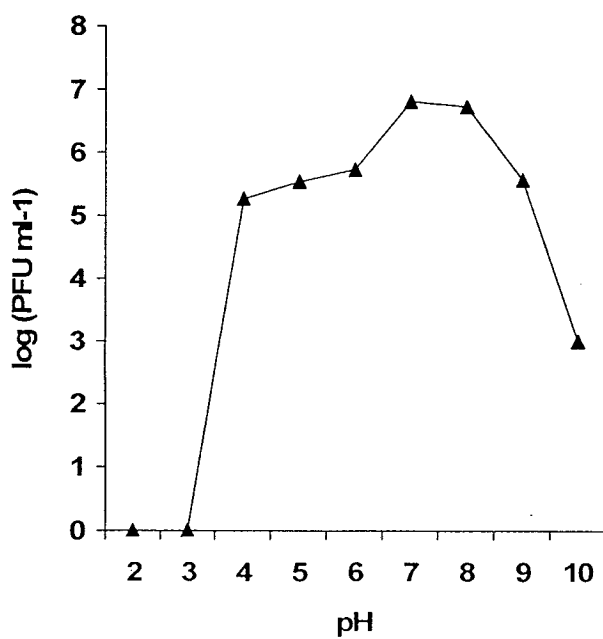
ผลการทนความร้อนของแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาทีมานับจำนวนแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี double-layer agar plaque assay พบว่า แบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสจึงไม่สามารถนับจำนวนได้เลยตั้งแต่ 30 วินาทีแรก แต่แบคทีเรียโอเฟจสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการรอดชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจจะลดลง สำหรับที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แม้ว่าในช่วง 150 วินาทีแรก แบคทีเรียโอเฟจยังสามารถรอดชีวิตได้บ้าง แต่ก็มีจำนวนลดลงจนแทบจะตรวจไม่พบเลยเมื่อครบเวลา 180 วินาที (รูปที่ 11)

ผลการทดสอบการทนต่อความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียโอเฟจ ในช่วง pH ตั้งแต่ 2-10 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างมานับจำนวนแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี double-layer agar plaque assay พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 สามารถมีชีวิตรอดได้ใน pH ช่วงกว้างตั้งแต่ 4-10 โดยมีการรอดชีวิตมากที่สุดที่ pH เท่ากับ 7-8 (รูปที่ 12)

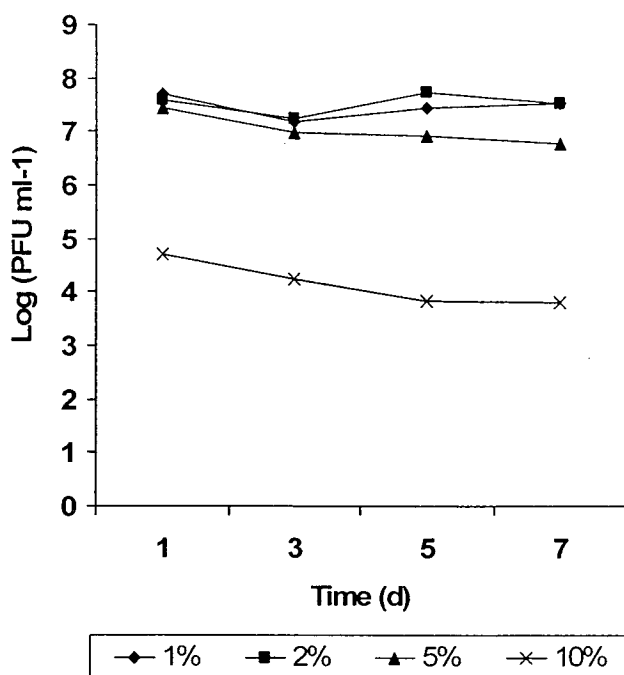
ผลการทดสอบการทนต่อสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของแบคทีเรียโอเฟจ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 5 และ 10% (w/v) และเก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ไปนับจำนวนแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี double-layer agar plaque assay พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 สามารถทนต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2 และ 5 ได้ค่อนข้างดีโดยมีการรอดชีวิตใกล้เคียงกันตลอดช่วงระยะเวลา 7 วันที่ทำการทดลอง แต่มีการรอดชีวิตลดลงเมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10% โดยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10% มีผลทำให้จำนวนของแบคทีเรียโอเฟจลดลงตั้งแต่วันแรกที่ทำทดลอง (รูปที่ 13)



รูปที่ 11 การทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 ที่อุณหภูมิ 60, 70, และ 80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 12 การทนต่อความเป็นกรด-ด่างของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 ในช่วง pH ตั้งแต่ 2-10



รูปที่ 13 การทนต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10% ของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221

7. รูปร่างของแบคทีริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เมื่อนำแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 มาทำให้บริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) แล้วนำไปศึกษาารูปร่างของแบคทีริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Transmission electron microscope, TEM) พบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 มีรูปร่างของส่วนหัวเป็น icosahedral head ขนาดประมาณ 90×100 (กว้าง $\times$ ยาว) นาโนเมตร มีหางแบบ contractile tail ยาวประมาณ 140 นาโนเมตร ปลายหางมี baseplate จากรูปร่างลักษณะที่กล่าวมานี้จึงจัดอยู่ใน *Myoviridae* family (รูปที่ 14)

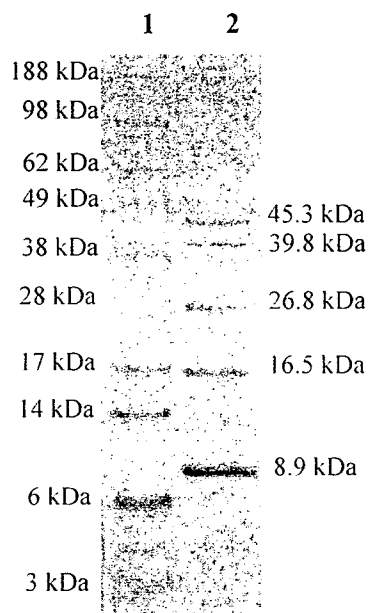


รูปที่ 14 ภาพถ่ายแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

8. โปรตีนและสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ

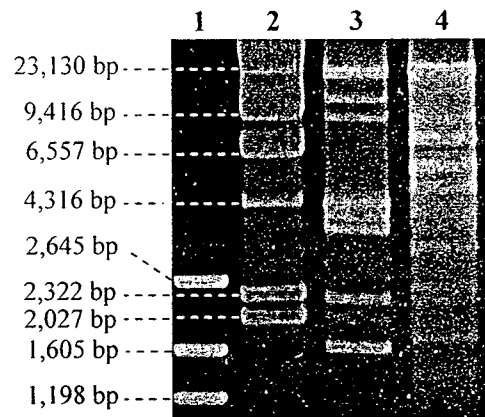
เมื่อนำสารละลายแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 บริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) มาศึกษาโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) ของแบคทีริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 มีโปรตีนโครงสร้างหลัก (major proteins) ประมาณ 5 ชนิด มีขนาดเท่ากับ 8.9, 16.5, 26.8, 39.8 และ 45.3 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 15)

จากการสกัดสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 และตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonucleases ชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจหลังจากถูกตัดโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonuclease หลายชนิด (ไม่ได้แสดงผล) แต่ถูกตัดด้วย *Afl* II และ *Hpa* I (รูปที่ 16) จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงว่าสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 น่าจะเป็น double-stranded DNA และเมื่อนำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ถูกตัดด้วย *Afl* II มาคำนวณขนาดของสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 คาดว่าน่าจะมีขนาดประมาณ 65 kb

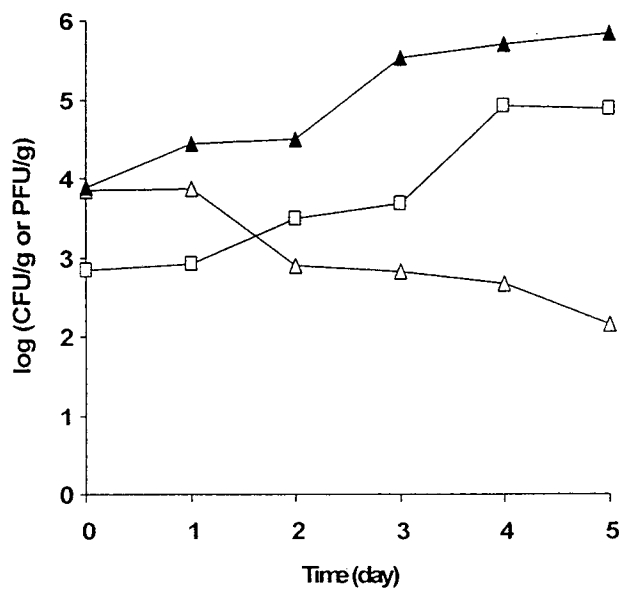


รูปที่ 15 โปรตีนโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221 เมื่อแยกโดยวิธี SDS-PAGE:

1; Standard protein marker (SeeBlue[®] Plus2), 2; แบคทีริโอเฟจ ϕ TFF221



รูปที่ 16 สารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 เมื่อตัดด้วย restriction endonucleases :
 1, pGEM DNA marker; 2, λ DNA ตัดด้วย *Hind* III; 3, phage ϕ TFF221 genome
 ตัดด้วย *Afl* II; 4, phage ϕ TFF221 genome ตัดด้วย *Hpa* I



รูปที่ 17 การติดตาม *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ และแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ใน
 กระบวนการหมัก : ▲, แบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ในชุดควบคุม
 (control); △, แบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ในชุดการทดลอง;
 □, แบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ในชุดการทดลอง

9. ผลของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายหัวเชื้อในกระบวนการหมัก

จากการทำทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) โดยการนำพลาสมิด pN014-GFP ใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 โดยวิธี electroporation พบว่าสามารถคัดเลือก transformant (*L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺) ที่รับพลาสมิดดังกล่าวไว้ภายในเซลล์ และ transformant ดังกล่าวยังคงมีความไว (sensitive) ต่อแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 เมื่อทดสอบโดยวิธี spot test

เมื่อนำ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ไปใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักอาหาร ซึ่งในการศึกษานี้ใช้กุ้งจ่อมเป็นแม่แบบ (model) เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ในการทำลายหัวเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ในกระบวนการหมัก จากผลการติดตามแบคทีเรียหัวเชื้อและแบคทีเรียโอเฟจในชุดการทดลอง (เดิมทั้งหัวเชื้อและแบคทีเรียโอเฟจ) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เดิมเฉพาะหัวเชื้อแต่ไม่เติมแบคทีเรียโอเฟจ) พบว่าในชุดการทดลองจำนวน *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ลดลงจาก 3.84 log cfu/g ในครั้งแรกที่นับจำนวน (เวลาเริ่มต้นหมัก) เป็น 2.16 log cfu/g ในวันที่ห้าของการหมัก ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 เพิ่มขึ้นจาก 2.84 log pfu/g ในครั้งแรกที่นับจำนวน (เวลาเริ่มต้นหมัก) เป็น 4.88 log pfu/g ในวันที่ห้าของการหมัก แต่ในทางตรงกันข้ามในชุดควบคุมจำนวน *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ เพิ่มขึ้นจาก 3.88 log cfu/g ในครั้งแรกที่นับจำนวน (เวลาเริ่มต้นหมัก) เป็น 5.83 log cfu/g ในวันที่ห้าของการหมัก และไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ได้เลยตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 17) ดังนั้นผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการลดลงของหัวเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ น่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 และส่งผลให้เกิดการทำลายหัวเชื้อดังกล่าว