

บทที่ 4

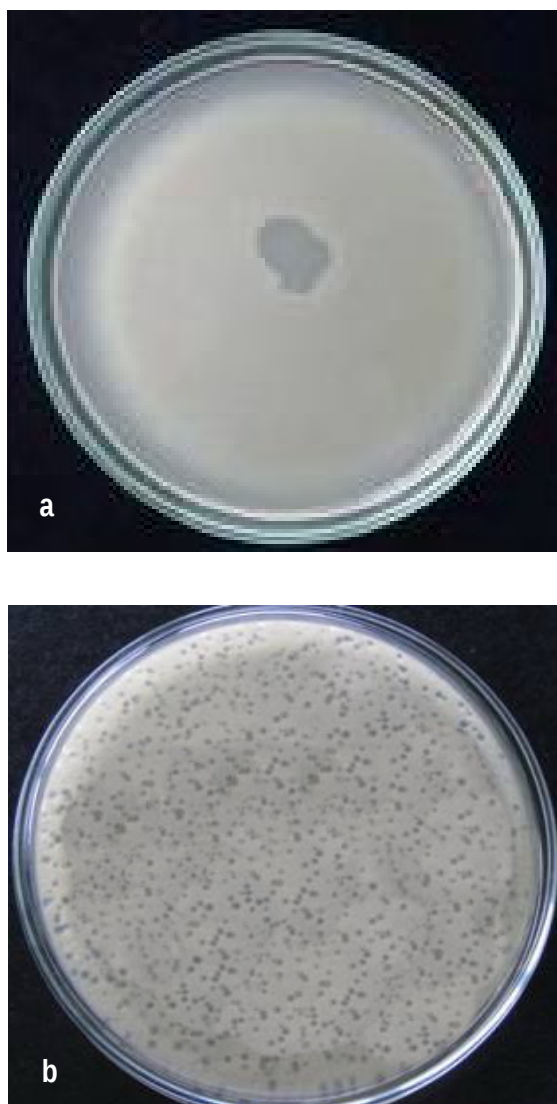
ผลการทดลอง

1. การตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจจากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถทำลาย *Lactococcus lactis* RP359

จากการสุ่มเลือกตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) มาทำการตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 โดยวิธี enrichment method จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการทำลาย *L. lactis* RP359 โดยวิธี spot test พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 ได้ จำนวน 1 isolate จากอาหารหมัก 1 ชนิดคือ เค็มบักนัด (ตารางที่ 3) ลักษณะของ clear zone ที่พบคือ ใสและเป็นวงกว้างตรงตำแหน่งที่หยดสารละลายสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียโอเฟจลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *L. lactis* RP359 เจริญอยู่ (รูปที่ 3a) เมื่อนำสารละลายดังกล่าวซึ่งผ่านการทดสอบโดยวิธี spot test แล้วและเกิด clear zone นั้น มาทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจให้บริสุทธิ์โดยวิธี double-layer agar method พบว่า plaque ของแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้มีลักษณะเป็นวงใสขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 3b) จากนั้นได้ทำการเก็บ plaque เดี่ยว ๆ นั้นเพื่อไปเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจ (phage propagation) และหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจในหน่วย plaque forming unit (pfu)/ml ตั้งชื่อแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า ϕ RP359 และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนอาหารหมักและการตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจ

อาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้
ผักดอง	4	-
แหนม	5	-
ไส้กรอกอีสาน	4	-
หม่ำ	4	-
กุ้งจ่อม	4	-
ปลาซ้ม	5	-
เค็มบักนัด	4	1



รูปที่ 3 แบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักเค็มบักนัด (a) วิธี spot test
(b) วิธี double-layer agar method

2. การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

เมื่อนำแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ไปทดสอบความสามารถในการทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นโดยวิธี spot test แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 4 ผลการทดลองพบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 สามารถทำลายได้เฉพาะ *L. lactis* RP359 เท่านั้นและไม่สามารถทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ ได้เลย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ RP359 ในการทำลาย
แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ

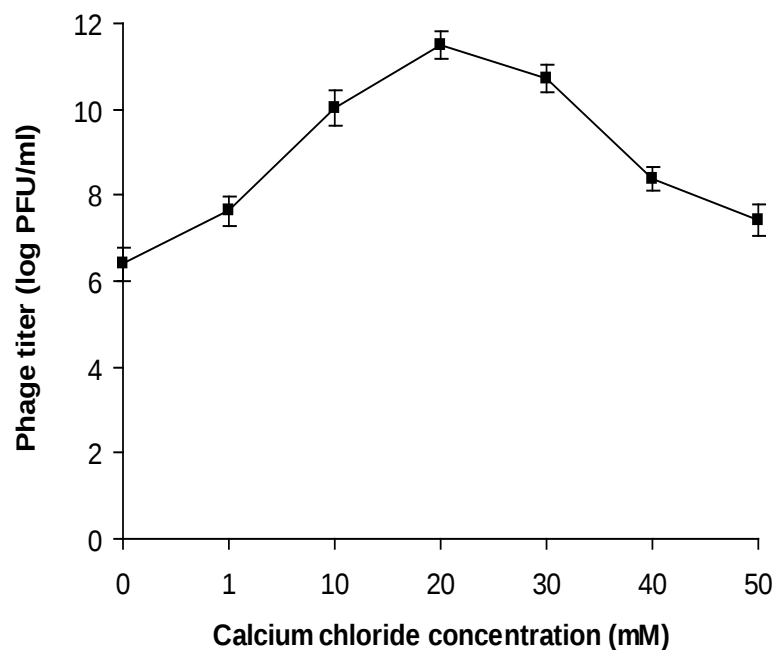
แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทดสอบ ^a	ผลการทดสอบ ^b (spot test)
<i>Lactococcus lactis</i> RP359	+
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> TFF221	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11007	-
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	-
<i>Lactobacillus brevis</i> UBUB001	-
<i>Lactobacillus curvatus</i> ATCC 25601	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 12315	-
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-
<i>Leuconostoc fallax</i> ATCC 700006	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 473	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR374	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	-
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR927	-

^aATCC, American Type Culture Collection; TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technology Research; TFF and UBU, Culture Collection of Biological Science Department, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University.

^b+, เกิด clear zone; -, ไม่เกิด clear zone

3. การศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจในโฮสต์เซลล์

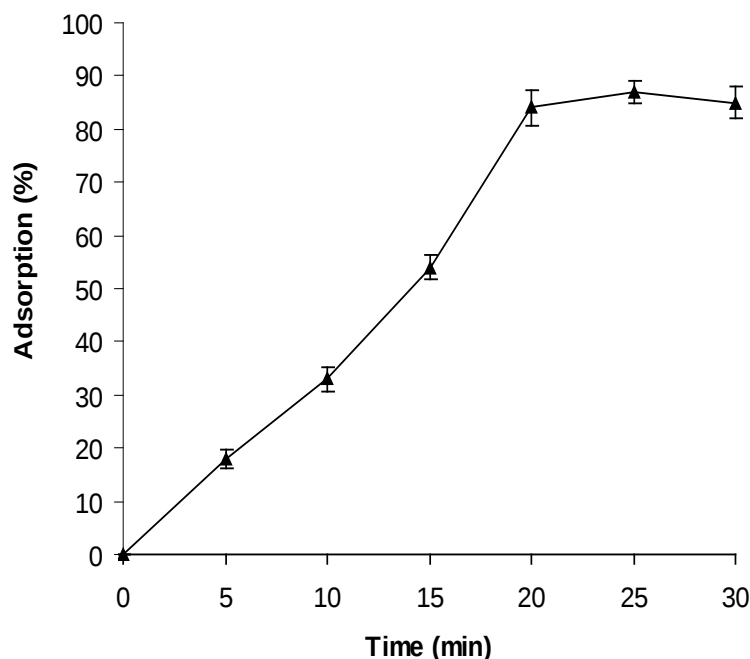
เมื่อทดสอบผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจในโฮสต์เซลล์ (*L. lactis* RP359) ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase โดยใช้สารละลาย CaCl_2 ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 0, 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 mM และแบคทีเรียโอเฟจเริ่มต้นเท่ากับ 10^4 pfu/ml เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นของ CaCl_2 ที่ใช้ มาทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโอเฟจที่ถูกสร้างและปล่อยออกมาจากโฮสต์เซลล์โดยวิธี double-layer agar method พบว่าเมื่อเติม CaCl_2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 mM มีผลทำให้แบคทีเรียโอเฟจถูกสร้างออกมาได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารละลาย CaCl_2 (0 mM) และความเข้มข้นอื่น ๆ ของสารละลาย CaCl_2 ที่ทดสอบ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจ ϕRP359

4. การศึกษาการยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์

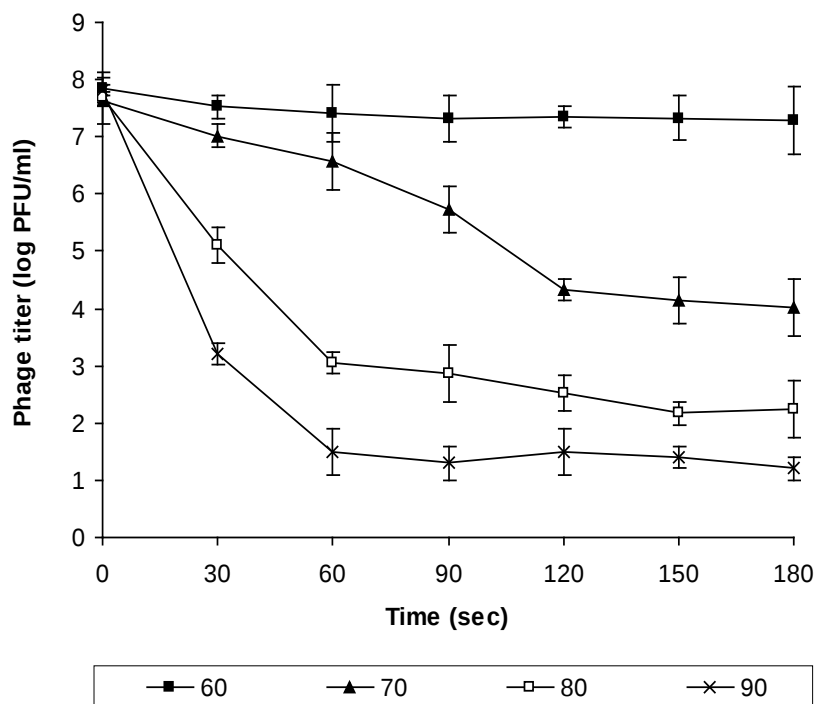
เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ของแบคทีริโอเฟจ ϕRP359 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดทดสอบ (มีทั้งโฮสต์เซลล์และแบคทีริโอเฟจอยู่ด้วยกัน ในอาหาร MRS broth) และอีกชุดหนึ่งเป็นชุดควบคุม (มีเฉพาะแบคทีริโอเฟจเท่านั้นที่อยู่ในอาหาร MRS broth) หลังจากบ่มและเก็บตัวอย่างเป็นช่วง ๆ ตั้งแต่เวลา 0-30 นาที แล้วนำแต่ละตัวอย่างไปทำการนับจำนวนแบคทีริโอเฟจโดยวิธี double-layer agar method ปริมาณแบคทีริโอเฟจที่นับได้ในชุดทดสอบเรียกว่า residual titer และปริมาณแบคทีริโอเฟจที่นับได้ในชุดควบคุมเรียกว่า control titer เมื่อนำ residual titer และ control titer ที่เวลาต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดสอบไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ (% adsorption of the bacteriophage) ตามสมการที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕRP359 สามารถยึดเกาะที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้สูงถึง 85% ภายในเวลา 20 นาที (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 บนผิวเซลล์ *Lactococcus lactis* RP359

5. การศึกษาการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ

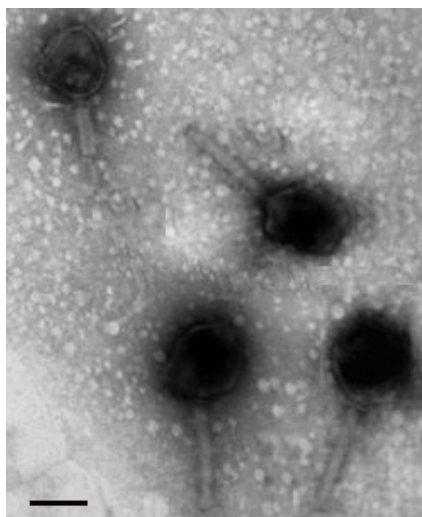
การทดสอบการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยหลังจากให้ความร้อนแล้ว จะเริ่มจับเวลาและเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำแต่ละตัวอย่างที่เก็บมานั้น ไปทำการนับจำนวนแบคทีริโอเฟจที่รอดชีวิตโดยวิธี double-layer agar method ผลการทดลองพบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ดี เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส แบคทีริโอเฟจจะลดจำนวนลงมากถึง 3 log PFU/ml โดยประมาณ ภายในเวลา 120 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส แบคทีริโอเฟจลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียง 60 วินาที ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จำนวนของแบคทีริโอเฟจลดลงเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยแบคทีริโอเฟจลดจำนวนลงถึง 6 log PFU/ml ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และแบคทีริโอเฟจลดจำนวนลงถึง 5 log PFU/ml ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส

6. การศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

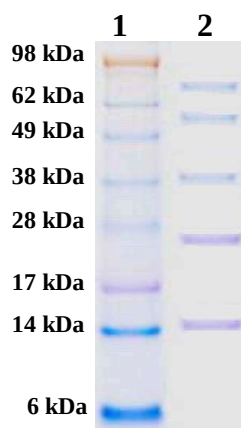
หลังจากที่นำแบคทีริโอเฟจไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ที่เตรียมได้ไปศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 โดยนำไปย้อมแบบ negative staining ด้วย 2% (w/v) uranyl acetate และดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 มีหัวแบบ icosahedral head มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70 นาโนเมตร และมีหางแบบ contractile tail ยาวประมาณ 100 นาโนเมตร (รูปที่ 7) และจากรูปร่างของแบคทีริโอเฟจภายใต้กล้อง แบคทีริโอเฟจชนิดนี้น่าจะจัดอยู่ใน order *Caudovirales* และอยู่ใน family *Myoviridae* เมื่ออาศัยเกณฑ์ในการจำแนกไวรัสตาม International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV)



รูปที่ 7 ภาพถ่ายของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 เมื่อย้อมแบบ negative staining และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

7. การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE

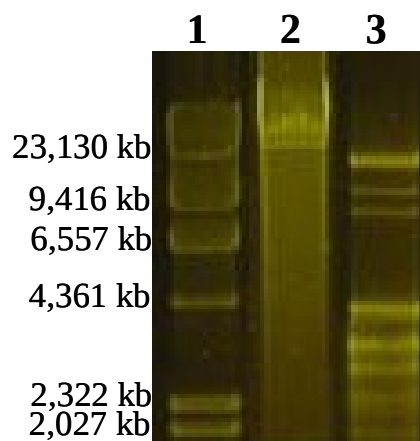
นำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ไปศึกษาโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของแบคทีริโอเฟจ พบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลัก (major proteins) จำนวน 5 ชนิดปรากฏให้เห็นบนแผ่น polyacrylamide gel โดยมีขนาดเท่ากับ 80, 57, 40, 25 และ 15 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 โปรตีนโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 เมื่อแยกโดยวิธี SDS-PAGE: Lane 1; SeeBlue[®] Plus2 molecular mass markers, Lane 2; phage ϕ RP359

8. การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ

จากการสกัดสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonucleases ชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonucleases บางชนิด (ไม่ได้แสดงผล) แต่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I (รูปที่ 9) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 เป็น double-stranded DNA



รูปที่ 9 สารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 เมื่อตัดด้วย restriction endonuclease:

Lane 1; Lambda DNA cleaved with *Hind*III, Lane 2; uncut genome ของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359, Lane 3; genome ของแบคทีริโอเฟจ ϕ RP359 ตัดด้วย *Pst*I