

การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

พรรณทิพา จันทร์ทัง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มิถุนายน 2553

การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

พรรณทิพา จันทร์ทั้ง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มิถุนายน 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย

บทคัดย่อ

ของ

พรรณทิพา จันทร์ทั้ง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มิถุนายน 2553

พรณทิพา จันทรทัต. (2553). การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย. ปริญญาโท กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อาจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, อาจารย์ ดร. ญัฐริกา สุวรรณาศรัย

จากการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและแลบเฟจจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทยทั้งหมด 51 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมาแยกแลบเฟจพบว่า สามารถแยกแลบเฟจได้ 4 ตัว คือ Φ F-42, Φ F-50, Φ F-57 และ Φ F-59 ซึ่งโฮสต์ของเฟจเหล่านี้ คือ F42, F50, F57 และ F59 เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโฮสต์ของเฟจดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของโฮสต์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าโฮสต์ F42 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc lactis* (GenBank accession number GU125559) ร้อยละ 100 F50 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (GenBank accession number GU138559) ร้อยละ 99 F57 และ F59 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) ร้อยละ 100 สำหรับลักษณะทั่วไปของเฟจทั้ง 4 ตัว พบว่าให้พลาคลิส์จึงจัดเป็นไวรัสเอนท์เฟจ และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าสามารถแยกออกได้เป็น 2 แฟมิลี โดยเฟจ Φ F-42 และเฟจ Φ F-50 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 82 และ 64 นาโนเมตร ตามลำดับ และส่วนหางยาวไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 182 และ 327 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงจัดจำแนกเฟจนี้อยู่ในแฟมิลี Siphoviridae ส่วนเฟจ Φ F-57 และ Φ F-59 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 94 x 44 และ 96 x 43 นาโนเมตร ตามลำดับ และส่วนหางสั้นไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 31 และ 23 นาโนเมตร ตามลำดับ จึงจัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae เมื่อนำมาศึกษาโฮสต์ - เอนจ์ พบว่าแลบเฟจเหล่านี้ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนส์อื่นที่นำมาทดสอบได้ ยกเว้นเฟจ Φ F-59 ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *Weissella cibaria* ที่นำมาทดสอบได้ และเมื่อสกัดดีเอ็นเอของเฟจแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเฟจทั้ง 4 ตัวมีรูปแบบของดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นแลบเฟจต่างชนิดกัน และจากการศึกษาผลของไดวาเลนต์แคทไอออน 2 ชนิด (CaCl_2 และ MgCl_2) ที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ พบว่าไดวาเลนต์แคทไอออนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA PHAGES FROM
FERMENTED FISH PRODUCTS IN THAILAND

AN ABSTRACT
BY
PUNTIPA JUNTANG

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education in Degree in Biology
at Srinakharinwirot University

June 2010

Puntipa Juntang. (2010). *Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Phages from Fermented Fish Products in Thailand*. Master Thesis. M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Onanong Pringsulaka, Dr. Nuttika Suwannasai

Lactic acid bacteria and LAB phages from Thai fermented fish products were isolated. From a total of 51 samples of Thai fermented fish, 60 isolates of lactic acid bacteria were obtained and employed as hosts for isolation of phages. Four phages designated Φ F-42, Φ F-50, Φ F-57 and Φ F-59 were isolated from four distinct bacterial hosts, namely F42, F50, F57 and F59 which were identified by 16S rDNA sequence analyses. BLAST searches against the GenBank database revealed that F42 possessed 100% similarity to *Leuconostoc lactis* (GenBank accession number GU125559), F50 possessed 99% similarity to *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (GenBank accession number GU138559), F57 and F59 were close to *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) with 100% similarities. All phages produced clear plaques indicating that they were virulent phages. Electron microscopy revealed that these four phages belonged to two morphological families. Phages Φ F-42 and Φ F-50, had hexagonal heads (82 nm and 64 nm in diameter, respectively) and long noncontractile tails (182 nm and 327 nm in length, respectively) thus they belonged to Siphoviridae family. On the other hand, Phages Φ F-57 and Φ F-59 had a hexagonal head (94 x 44 nm and 96 x 43 nm in diameter, respectively) and short noncontractile tail (31 nm and 23 nm in length, respectively) thus they belonged to Podoviridae family. Host-range determination revealed that these phages were not capable of infecting all of the strains of lactic acid bacteria and other genera used, with the exception of Φ F-59 which was capable of infecting the tested *Weissella cibaria*. In addition, DNAs isolated from the four phages were characterized by restriction analyses. Results showed that the restriction fragment patterns generated from the Φ F-42, Φ F-50, Φ F-57 and Φ F-59 phages were different. The adsorption experiment showed that the presence of divalent cations (CaCl_2 and MgCl_2) did not affect phage adsorption.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย

ของ

พรรณทิพา จันทร์ทัง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรีย์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งษิรุจิ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรีย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริพรรณ สุขนงสิงห์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน

จาก

เงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปี พ.ศ. 2553

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร.อรอนงค์ พึ่งสุลกะ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรัย คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการ จัดทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัฉริยา รังษิรุจิ และอาจารย์ ดร.ศิริพรรณ สุขนธสิงห์ ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่าง สูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งทำ ให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยครั้งนี้ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็น ส่วนหนึ่งของการพัฒนาประเทศ ตามเจตนารมณ์ของการศึกษาตามหลักสูตรชีวิตวิทยาต่อไป

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปี พ.ศ. 2553 ผู้วิจัยขอขอบคุณ มา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ สนับสนุนทุนการศึกษาให้กับผู้วิจัย ทำยที่สุดขอโน้มรำลึกถึงคุณบิดา มารดา และขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่าน อื่นๆ ที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อย ด้วยดี

พรรณทิพา จันทร์ทั้ง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย.....	2
ความสำคัญของการศึกษาวิจัย.....	2
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก.....	3
แบคทีเรียกรดแลคติก.....	7
แบคทีเรียโอเฟจ.....	14
แลคติกแอซิดแบคทีเรียโอเฟจ.....	31
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	33
อุปกรณ์และสารเคมี.....	33
วิธีดำเนินการทดลอง.....	34
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก.....	34
การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก.....	34
การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นโฮสต์.....	37
การตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น.....	37
การหาปริมาณของแลบเฟจ.....	38
การเพิ่มจำนวนของแลบเฟจ.....	39

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	
แบบส่องผ่าน.....	39
การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื่อมกับแบคทีเรียกรดแลคติก	
สายพันธุ์อื่นและจีนส์อื่น.....	39
การสกัดดีเอ็นเอของแลบเฟจ.....	40
การตรวจสอบดีเอ็นเอของแลบเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส.....	41
การศึกษาผลไดวาเลนซ์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของ	
แลบเฟจ.....	41
4 ผลการศึกษา.....	43
5 สรุป และอภิปรายผลการทดลอง.....	87
บรรณานุกรม.....	92
ภาคผนวก.....	103
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	114

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมัก.....	13
2	การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ.....	17
3	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณไฮรอปโคโลนี บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5.....	44
4	ลักษณะของพลาแคและจำนวนพลาแคหลังจากทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจ.....	52
5	ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้.....	54
6	ผลการศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	68
7	ผลการทดสอบแลบเฟจในการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่น และจีโนมอื่น.....	70
8	รูปร่างเฟจในกลุ่มแฟมิลีย Siphoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ.....	88
9	รูปร่างเฟจในกลุ่มแฟมิลีย Podoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ.....	89

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	การผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักแบบ homofermentation และ heterofermentation.....	12
2	การจัดจำแนกเฟจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก.....	16
3	การจัดจำแนกแฟมิลีของเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วย การจัดอนุกรมวิธานของไวรัส.....	19
4	รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคเฟจ.....	21
5	วงชีวิตแบบไลติคของเฟจ.....	24
6	วงชีวิตแบบไลโซเจนิกของเฟจ.....	26
7	ลักษณะของพลาซมิดที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย.....	28
8	การทำอาหารวุ้นสองชั้น.....	38
9	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก.....	43
10	การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 จำนวน 4 ไอโซเลท.....	51
11	ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท F42 กับ type strain ของ <i>Leuconostoc lactis</i> JCM6123 (GenBank accession number AB023968).....	58
12	ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท F50 กับ type strain ของ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NCFB 523 (GenBank accession number AB023242).....	61
13	ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท F57 กับ type strain ของ <i>Weissella cibaria</i> LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989).....	64

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

14	ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท F59 กับ type strain ของ <i>Weissella cibaria</i> LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989).....	67
15	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-42 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	73
16	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-42 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	74
17	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-50 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	75
18	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-50 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	76
19	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	77
20	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	78
21	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	79
22	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-59 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	80
23	ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-59 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	81
24	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-42 ในอาหารที่มี CaCl_2	83
25	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-42 ในอาหารที่มี MgCl_2	83
26	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-50 ในอาหารที่มี CaCl_2	84
27	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-50 ในอาหารที่มี MgCl_2	84
28	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-57 ในอาหารที่มี CaCl_2	85
29	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-57 ในอาหารที่มี MgCl_2	85
30	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-59 ในอาหารที่มี CaCl_2	86
31	การเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ ΦF-59 ในอาหารที่มี MgCl_2	86

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันอาหารหมักของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และ ปลาร้า ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมและระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยพบว่าอาหารหมักเหล่านี้มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในการหมัก การพัฒนากระบวนการผลิตอาหารหมักสามารถอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพได้ อาทิ การใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาจจะมีกลิ่น รสที่เปลี่ยนไปจากเดิม ซึ่งส่งผลให้ผู้ผลิตยังนิยมที่จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในธรรมชาติ หรือแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมัก จึงพบปัญหาทั้งในด้านระยะเวลาที่ใช้ในการหมักค่อนข้างนาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ (นภา. 2535)

นอกจากปัญหาสำคัญเกี่ยวกับการหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวข้างต้น ในงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ในต่างประเทศพบว่าการติดเชื้อแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟजनั้นเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งในการผลิตอาหารหมักในแต่ละประเทศ โดยเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก หรือแลบเฟจ สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์อาศัยอยู่ การติดเชื้อของเฟจในแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นก่อให้เกิดผลเสียในอุตสาหกรรมอาหารหมักอย่างมาก เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารหมักผลิตภัณฑ์นม โดยพบว่าเฟจจะปนเปื้อนมาจากนมดิบที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Moineau. 1999: 77 - 382) และพบว่าการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) นั้นไม่เพียงพอในการยับยั้งอนุภาคไวรัส (Binetti; & Reinheimer. 2000: 509 - 515; Capra; Quiberoni; & Reinheimer. 2004: 499 - 504) นอกจากนี้การใช้หัวเชื้อ (starter cultures) เดิมตลอดจะเป็นโฮสต์ที่ดีในการเพิ่มจำนวนของเฟจ (Coveney; Fitzgerald; & Daly. 1994: 621-630; Neve; Berger; & Heller. 1995: 193 - 207) ซึ่งเมื่อหัวเชื้อมีการติดเชื้อด้วยเฟจจะทำให้การสร้างกรดแลคติกเกิดช้า และอาจทำให้การหมักล้มเหลว (Josephsen; & Neve. 1998: 385 - 436) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจทำให้สูญเสียหัวเชื้อที่ดีที่สามารถเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์

จากความสำคัญดังกล่าว โครงการวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาแลบเฟจที่แยกจากอาหารปลาหมักของประเทศ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นโฮสต์จากอาหารปลาหมักในแหล่งต่างๆ จากนั้นทำการแยกแลบเฟจจากอาหารชนิดเดียวกัน โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของแลบเฟจในอาหารปลาหมักของประเทศ และสามารถต่อยอดในการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการผลิตให้ปราศจากการปนเปื้อนจากแลบเฟจ

ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และแลบเฟจจากอาหารปลาหมักของประเทศ
2. เพื่อศึกษารูปร่างของแลบเฟจที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของแลบเฟจที่แยกได้ คือ ความสามารถในการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่น และจีโนมอื่น รูปแบบของดีเอ็นเอของแลบเฟจ และผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์

ความสำคัญของการศึกษาวิจัย

การศึกษาชนิดและคุณสมบัติต่างๆ ของแลบเฟจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่ทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของแลบเฟจในอาหารปลาหมักของประเทศ และสามารถต่อยอดในการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการผลิตให้ปราศจากการปนเปื้อนจากแลบเฟจ

ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างอาหารปลาหมัก
2. จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก
3. คัดแยกแลบเฟจโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นโฮสต์
4. ศึกษารูปร่างของแลบเฟจที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
5. ศึกษาคุณสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนมอื่น
6. สกัดดีเอ็นเอของแลบเฟจและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
7. ศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ผลิตรภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตรภัณฑ์ที่แปรรูปจากกระบวนการหมักหรืออาหารหมักคองได้รับความนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศแถบตะวันออกเฉียงใต้ออกมากกว่าในประเทศแถบตะวันตก โดยเฉพาะในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ลาว กัมพูชา และไทย มีการนำสัตว์น้ำ เช่น ปลา มาแปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก เช่น การทำกะปิ น้ำปลา ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม ปลาต้ม เป็นต้น ในปัจจุบันผลิตรภัณฑ์ปลาที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมักเป็นที่รู้จักกันดียิ่งในประเทศทางตะวันตก เนื่องจากมีผู้อพยพจากประเทศเวียดนาม กัมพูชา และลาว มาอาศัยอยู่นั่นเอง ผลิตรภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภาษาของแต่ละประเทศหรือแต่ละท้องถิ่น เช่น น้ำปลา (fish sauce) มีชื่อเรียกต่างๆ คือ พม่า เรียก งาปี (ngapi) ฟิลิปปินส์ เรียก ปาติส (patis) หรือกะปิ มาเลเซีย เรียก บลาชัน (blachan) อินโดนีเซีย เรียก แทรสซี (trassi) และฟิลิปปินส์ เรียก บากูอง (bagoong) เป็นต้น (Beddows. 1985: 1 - 39)

1.1 ประเภทของผลิตรภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตรภัณฑ์ที่หมักจากปลาแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 3 กลุ่ม (ชมภู. 2550: 68) คือ

1.1.1 ผลิตรภัณฑ์ปลาหมักประเภทซอส (fermented fish sauce) ได้มาจากการหมักปลากับเกลือ โดยกระบวนการหมักเกิดจากเอนไซม์ในปลาและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน หลังจากบ่มไว้ประมาณ 3 - 6 เดือน แล้วนำมากรอง เอน้ำที่ผ่านการกรองนำไปฆ่าเชื้อเก็บไว้บริโภค ผลิตรภัณฑ์ปลาหมักประเภทซอสที่สำคัญ ได้แก่ น้ำปลา น้ำบูดู

1.1.2 ผลิตรภัณฑ์ปลาหมักประเภทกะปิ (fermented fish paste) ทำได้โดยการหมักปลากุ้ง หอย หรือปลาหมึก กับเกลือและบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปตากแดด หลังจากหมักไว้ระยะหนึ่งจะได้ผลิตรภัณฑ์ประเภทกะปิ

1.1.3 ผลิตภัณฑ์ปลาหมักประเภทเป็นตัวหรือเป็นชิ้น (fermented fish) เป็นการหมักปลากับเกลือเพียงอย่างเดียว อาจมีการเติมข้าวสุก ข้าวคั่ว ข้าวหมาก หรือรำข้าวลงไปด้วย อาหารหมักในกลุ่มนี้ ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ้า ปลาส้ม และส้มผัก

1.2 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

1.2.1 น้ำปลา

การทำน้ำปลาเริ่มจากใช้ปลาคลุกกับเกลือในอัตราส่วนปลา 2 ส่วนต่อเกลือ 1 ส่วน หมักในโถหรือถังไม้ ใช้ของหนักทับเพื่อให้ปลาจมอยู่ใต้น้ำเกลือตลอดเวลา ปลาที่ใช้เป็นปลาทะเลหรือปลาน้ำจืด หากเลือกปลาขนาดเล็กจะใช้เวลาการหมักประมาณ 3 เดือน หากเป็นปลาขนาดใหญ่จะใช้เวลาหมักประมาณ 1 ปีหรือมากกว่า เนื่องจากปลาตัวใหญ่จะมีไขมันมาก กว่าจะเกิดการย่อยสลายต้องใช้เวลาช้านานและมักมีกลิ่นไม่ดี (นนุช. 2538: 73 - 75)

1.2.2 น้ำบูดู

ทำจากปลาทะเล เช่น ปลาไส้ตัน ปลากระดัก และปลาหลังเขียว นำปลามาหมักกับเกลือ 3 - 12 เดือน ก่อนเติมน้ำตาล น้ำมะพร้าว และมะขามแขก หลังจากนั้นนำมาต้มก่อนบรรจุขวด แต่บางท้องที่จะมีการเติมน้ำตาลในระหว่างที่ทำการหมัก (นนุช. 2538: 73 - 75)

1.2.3 ปลาร้า

การทำปลาร้าประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลัก คือ ปลา รำข้าวหรือข้าวคั่ว และเกลือ โดยขั้นตอนการทำเริ่มจากนำปลาล้างทำความสะอาด จากนั้นนำมาขอดเกล็ด เอาไส้ออก แล้วนำมาล้างน้ำให้สะอาดและทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ นำมาคลุกเคล้ากับเกลือโดยใช้สัดส่วนของเกลือและปลาระหว่าง 1 ต่อ 2 ถึง 1 ต่อ 5 ส่วน หลังจากเกลือถูกดูดซึมเข้าไปในเนื้อปลาดีแล้ว ให้ใส่รำหรือข้าวคั่วผสมกับปลาให้เข้ากัน หรืออาจจะใส่รำข้าว ข้าวคั่ว และเกลือ ผสมกับปลาพร้อมกันเลยก็ได้ จากนั้นนำใส่ลงในไหที่ล้างสะอาดและแห้งจนเต็ม แล้วใช้ผ้าหรือพลาสติกปิดปากไหให้แน่นเพื่อป้องกันไม่ให้แมลงวันวางไข่ การหมักปลาร้าจะหมักไว้นาน 12-24 สัปดาห์ (ลูกจันทร์. 2524: 55 - 57)

1.2.4 ปลาเจ้า

ปลาเจ้า (หรือบางครั้งเรียกว่า ปลาข้าวหมาก) ทำจากปลาน้ำจืด เช่น ปลาตะเพียน ปลาเทโพ ปลาสวาย ปลาเค็ม และปลาเนื้ออ่อน นำมาหมักกับข้าวหมากและเกลือ ประมาณ 2 - 4 สัปดาห์ (นนุช. 2538: 73 - 75)

1.2.5 ปลาส้ม

ปลาส้มเกิดจากการหมักปลาสดที่ตัดแต่งแล้วกับส่วนผสมต่างๆ เช่น ข้าวเหนียว นึ่งหรือข้าวสุก กระเทียม และเกลือเป็นหลัก จนเกิดรสเปรี้ยว โดยกระบวนการผลิตปลาส้มจะเริ่มจากการนำปลาสด เช่น ปลาดู ปลาตะเพียน ปลาขาว มาขูดเกล็ด ควักไส้ ตัดแต่ง ในขั้นตอนการตัดแต่งปลานั้น จะบั้งปลาที่ข้างลำตัว เพื่อให้เกลือสามารถซึมผ่านไปตามเนื้อเยื่อของปลาได้ดีขึ้น จากนั้นล้างทำความสะอาด สะเด็ดน้ำให้แห้ง นำมาแช่ในน้ำเกลือ แล้วนำมาคลุกเคล้ากับกระเทียม ข้าวเหนียวนึ่งหรือข้าวสุก จากนั้นนำมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วใส่ในภาชนะ เช่น ปิ๊บ กระละมังเคลือบ หรือถังพลาสติก ตั้งทิ้งไว้ 2 - 3 วัน สำหรับระยะเวลาในการหมักปลาส้มขึ้นอยู่กับสภาพอากาศหรืออุณหภูมิในสถานที่ผลิต ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงในช่วงฤดูร้อนจะใช้เวลาเพียง 2 วัน ในขณะที่ฤดูหนาวอุณหภูมิต่ำอาจใช้เวลา 7 วัน จึงจะสามารถบริโภคได้ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2547)

1.2.6 ส้มผัก

ทำจากปลาน้ำจืด เช่น ปลาเค้า ปลากลาย ปลาสวาย ปลาเทโพ ปลาเนื้ออ่อน ปลาดู ปลาตะเพียน เป็นต้น นำปลามาขูดเอาเฉพาะเนื้อสับให้ละเอียดใส่ถุงปิ๊บเอาน้ำออก แล้วผสมกับเกลือ ข้าวสุก และกระเทียม นวดให้เหนียวแล้วห่อใส่ภาชนะอัดให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ 5 - 10 วัน (นงนุช. 2538: 73 - 75)

1.2.7 ปลาจ่อม

ใช้ปลาน้ำจืดขนาดเล็ก เช่น ปลาสลัดน้อย ปลาชิว นำมาหมักกับเกลือ ข้าวสุก กระเทียม และข้าวคั่ว หมักทิ้งไว้ 3 - 5 วัน (นงนุช. 2538: 73 - 75)

อย่างไรก็ตามอาหารปลาหมักเหล่านี้มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติในการหมัก ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่น รสที่เปลี่ยนไปจากเดิม และมักพบปัญหาทั้งในด้านระยะเวลาที่ใช้ในการหมักค่อนข้างนาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ (นภา. 2535: 64)

1.3 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทย

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทย (มัทนา. 2545: 83 - 84) ได้แก่

1.3.1 น้ำปลา

แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Bacillus* โดยเชื่อว่ามีบทบาทในการสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นของน้ำปลาคือ *Pediococcus halophilus*

1.3.2 น้ำบูดู

แบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Bacillus*, *Staphylococcus* และ coryneform bacteria ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักและจะพบแบคทีเรียชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 90 เมื่อสิ้นสุดการหมัก จึงเชื่อว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในน้ำบูดู

1.3.3 ปลาาร้า

แบคทีเรียที่พบในระยะแรกส่วนใหญ่เป็นพวก *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนช่วยในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วน *Pediococcus halophilus* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักปลาาร้าเช่นเดียวกับน้ำปลาและบูดู โดยพบปริมาณสูงถึงร้อยละ 90 เมื่อสิ้นสุดการหมักจึงเชื่อว่าเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกรด กลิ่น และรสในปลาาร้า ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus farciminis* และ *Leuconostoc* sp. (Tanasupawat; Okada; & Komagata. 1998: 193 - 200)

1.3.4 ปลาเจ้า

แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมัก ได้แก่ *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* จึงมีส่วนช่วยในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาเช่นกัน ส่วนแบคทีเรียที่พบตลอดกระบวนการหมัก และพบปริมาณมากคือ *Pediococcus cerevisiae* จึงเชื่อว่าน่าจะเป็นตัวการสำคัญในการสร้างกรด กลิ่น และรสในปลาเจ้า ส่วนยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* และจีนัส *Endomycopsis* ที่พบในผลิตภัณฑ์น่าจะมีบทบาทในการสร้างแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ในปลาเจ้า

1.3.5 ปลาส้ม

แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบปริมาณมากในกระบวนการหมักคือ *Lactobacillus* spp. โดยพบถึงร้อยละ 79 *Pediococcus* spp. ร้อยละ 18 และ *Aerococcus* spp. ร้อยละ 3 (Kopermsub; Vichitphan; & Yunchalard. 2006: 32 - 39) นอกจากนี้จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างปลาส้มในจังหวัดสงขลา พบแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus farciminis*, *Weissella confusa*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus garviae*, *Staphylococcus* และ *Zygosaccharomyces rouxii* (Paludan - Müller; et al. 2002: 61 - 70)

1.3.6 ส้มผัก

แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Staphylococcus* จึงมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus brevis* ซึ่งพบมากที่สุดตลอดกระบวนการหมักและชนิดที่พบรองลงมาคือ *Pediococcus cerevisiae* โดยแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมีบทบาทในการสร้างกรดและกลิ่นรสในส้มผัก

1.3.7 ปลาจ่อม

แบคทีเรียที่แยกได้จากปลาจ่อม ได้แก่ *Lactobacillus farciminis* และ *Lactobacillus pentosus* (Tanasupawat; Okada; & Komagata. 1998: 193 - 200)

2. แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ mesophilic bacteria แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram - positive bacteria) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ทนต่อความเป็นกรด โดยสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0 - 4.5 สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการหมักน้ำตาล ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ไม่มีไซโตโครม ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ และวิตามิน (Ringo; & Gatesoupe. 1998: 177 - 203) แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ใน

ธรรมชาติและสามารถแยกได้จากอาหารหมักดองทั่วไป เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง หน้าหมัก แหนม ไข่กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ นอกจากนี้ยังพบได้ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ อีกด้วย (Sarkar; & Banerjee. 1996: 231 - 233; Stiles; & Holzapfel. 1997: 1 - 29)

2.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกเป็น 12 จินัส ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ รวมถึงข้อมูลทางด้านพันธุกรรม ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละจินัสมีลักษณะดังนี้

2.1.1 *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* แต่มีลักษณะที่แตกต่างคือ สามารถเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำสูงประมาณ 9 ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* (Williams; Hirsch; & Cowan. 1953: 475 - 480), *A. urinae* (Aguirre; & Collins. 1992: 401 - 405), *A. christensenii* (Collins; et al. 1999: 1125 - 1128), *A. sanguinicola* (Lawson; et al. 2001a: 475 - 479), *A. urinaehominis* (Lawson; et al. 2001b: 683 - 686), *A. urinaeequi* (Felis; Torriani; & Dellaglio. 2005: 1325 - 1327) และ *A. suis* (Vela; et al. 2007: 1291 - 1294)

2.1.2 *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดสั้นถึงปานกลาง หรือเป็นท่อนเรียว (slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 - 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ประกอบด้วย 11 สปีชีส์ มีปริมาณของ G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1 - 29)

2.1.3 *Enterococcus*

เซลล์มีรูปร่างไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ ต้องการอาหารซับซ้อนสำหรับการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 เจริญได้ที่ความเป็น

กรดต่าง 9.6 ประกอบด้วย 40 สปีชีส์ มีปริมาณของ G+C ระหว่าง 37 - 40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Devriese; & Pot. 1995: 327 - 367; Jay. 1996: 110 - 113; Schleifer; & Ludwig. 1995: 7 - 19)

2.1.4 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุดและมีความหลากหลายของลักษณะทางฟิโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เนื่องจากมีปริมาณของ G+C ภายในสปีชีส์แตกต่างกันมาก คือ ระหว่าง 32 - 53 โมลเปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นโซ่ ในการเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน บางสปีชีส์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส (pseudocatalase) สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่างๆ และเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น หนุ่ยหมักและผักดอง (Harrigan. 1998: 346 - 348)

2.1.5 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มักใช้เป็นก้ำเชื้อในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณของ G+C ระหว่าง 34 - 43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Teuber. 1995: 173 - 234)

2.1.6 *Leuconostoc*

มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยัดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative การเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน มีปริมาณของ G+C ระหว่าง 37 - 40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dellaglio; Dicks; & Torriani. 1995: 235 - 278)

2.1.7 *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenus* ด้วยคุณสมบัติการทนกรด และผลิตเอทานอลในปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมของดีเอ็นเอ โดยการศึกษา DNA hybridization และลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าแตกต่างจากสปีชีส์อื่นของ *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio; Dicks; & Torriani. 1995: 235 - 278)

2.1.8 *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 - 1.43 ไมครอน สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางตั้งฉากของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ทนต่อความเข้มข้นเกลือสูง บางสปีชีส์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ มีปริมาณของ G+C ระหว่าง 34 - 44 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stlies; & Holzapfel. 1997: 1 - 29)

2.1.9 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 - 1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ต้องการอาหารซับซ้อนในการเจริญ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 - 40 องศาเซลเซียส เป็นได้ทั้ง homofermentative และ heterofermentative พบได้ในอาหารเป็นส่วนใหญ่ นิยมใช้เป็นกัลลาเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก มีปริมาณของ G+C ระหว่าง 34 - 46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Hardie; & Whiley. 1995: 55 - 124)

2.1.10 *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* สปีชีส์เดิมคือ *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือไฮเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 18 และมีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับจีโนส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าจีโนสเดิม (Stlies; & Holzapfel. 1997: 1 - 29)

2.1.11 *Vagococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกออกมาจากจีโนส *Streptococcus* เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Vagococcus fluvialis*, *V. carniphilus*, *V. fessus*, *V. lutrae*, *V. salmoninarum* (Wallbanks; et al. 1990: 224 - 230) และ *V. elongates* (Lawson; et al. 2007: 751 - 754)

2.1.12 *Weissella*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกจีโนสเดียวที่มีทั้งรูปร่างทรงกลม และเป็นท่อน ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในจีโนส *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ได้แก่ *Weissella paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*), *W. confusa* (*Lb. confusus*), *W. halotolerans*

(*Lb. halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. kandleri*), *W. minor* (*Lb. minor*), *W. viridescens* (*Lb. viridescens*) นอกจากนี้ยังมีสปีชีส์ที่แยกได้ใหม่คือ *W. hellenica* (Stlies; & Holzapfel. 1997: 1 - 29), *W. thailandensis* (Tanasupawat; et al. 2000: 1479 - 1485), *W. cibaria* (Björkroth; et al. 2002: 141 - 148), *W. kimchii* (Choi; et al. 2002: 507 - 511), *W. soli* (Magnusson; et al. 2002: 831 - 834), *W. koreensis* (Lee; et al. 2002: 1257 - 1261) และ *W. ghanensis* (De Bruyne; et al. 2008: 2721-2725)

2.2 กระบวนการหมักกรดแลคติก

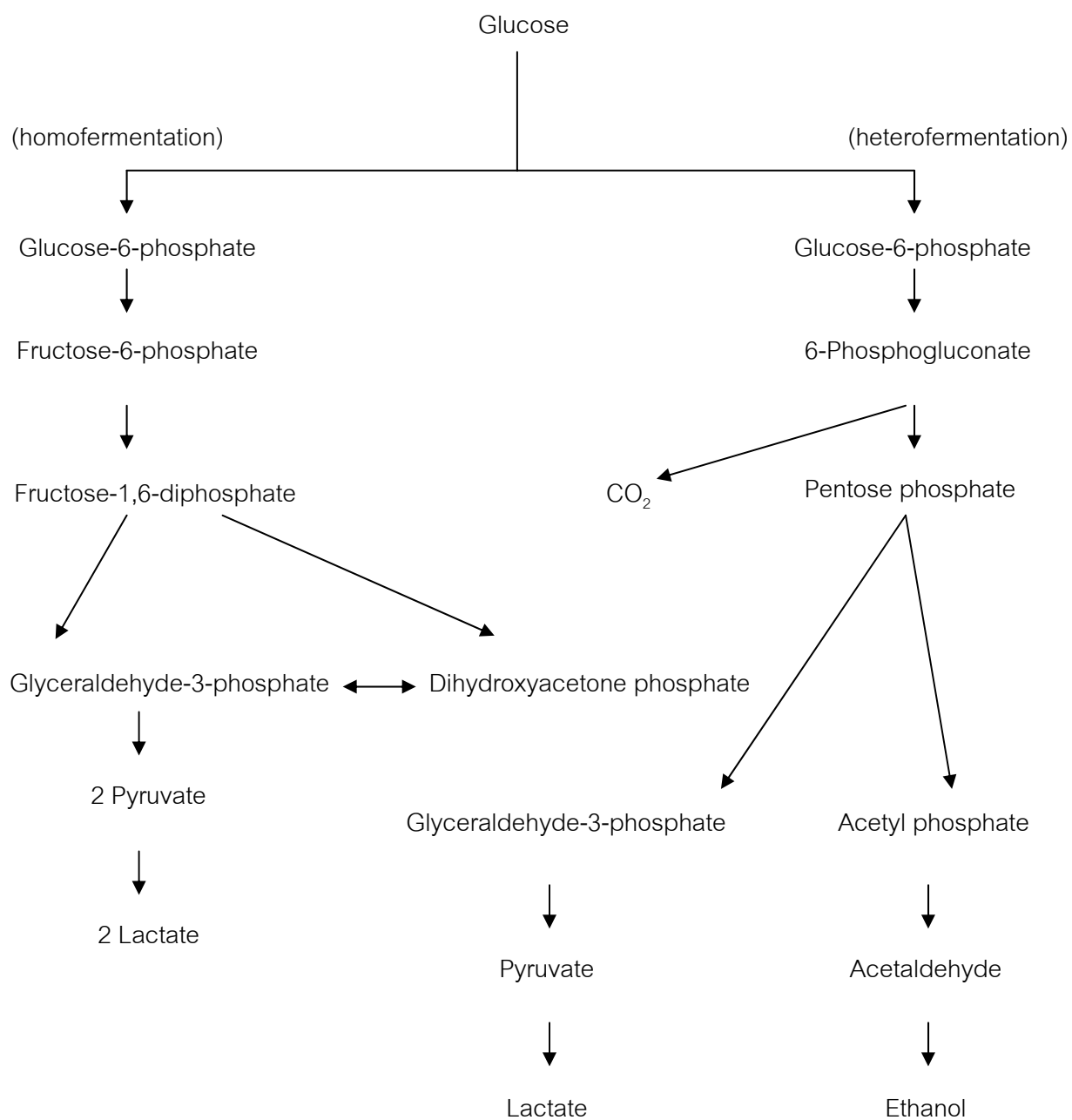
แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการหมักน้ำตาลเฮกโซสแตกต่างกัน ซึ่งผลจากการหมักสามารถแบ่งรูปแบบของกระบวนการหมักได้เป็น 2 รูปแบบ คือ

2.2.1 Homofermentation

เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ glycolytic pathway ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณร้อยละ 95 จากการหมักกลูโคส โดยกลูโคส 1 โมเลกุลเมื่อผ่านเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวต 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กรดแลคติก (Adams; & Moss. 1995: 232 - 248) แบคทีเรียแลคติกที่มีรูปแบบการหมักแบบนี้มีทั้งชนิดที่มีรูปร่างเป็นท่อน เช่น จีโนส *Lactobacillus* และชนิดที่มีรูปร่างทรงกลม เช่น จีโนส *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น

2.2.2 Heterofermentation

เป็นการหมักกลูโคสโดยแบคทีเรียกรดแลคติกไปเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegel. 1993: 300 - 305; Adams; & Moss. 1995: 232 - 248) ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปแบบการหมักแบบนี้ ได้แก่ จีโนส *Lactobacillus* บางสปีชีส์ และจีโนส *Leuconostoc* โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในจีโนส *Lactobacillus* มีรูปแบบการหมักได้ทั้งสองแบบ



ภาพประกอบ 1 การผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักแบบ homofermentation และ heterofermentation

ที่มา: Forsythe. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. p. 124.

3. แบคทีริโอเฟจ

3.1 ประวัติการค้นพบ

แบคทีริโอเฟจ เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรีย ค้นพบครั้งแรกโดย Twort นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ในปี 1915 โดยรายงานสาเหตุการติดเชื้อใน *Staphylococcus* เนื่องจากลักษณะโคโลนีที่ทำการเพาะเลี้ยงเปลี่ยนแปลงไป และแพร่ไปยังโคโลนีอื่น นอกจากนั้นตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อนี้สามารถผ่านเครื่องกรองได้ Twort จึงได้ตั้งสมมติฐานอย่างหลากหลายและอธิบายลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ว่าสิ่งที่สามารถผ่านเครื่องกรองได้คล้ายไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ (animal viruses) และพืช (plant viruses) อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวถูกมองข้ามจากนักวิทยาศาสตร์ไม่มีการศึกษาค้นคว้าต่อ จนกระทั่งในปี 1917 d' Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดา ซึ่งทำงานอยู่ใน Pasteur Institute ได้ทดลองกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เป็นสาเหตุโรคบิด และพบว่าได้เกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Twort โดยเขาได้แยกเชื้อ *S. dysenteriae* จากอุจจาระและนำอุจจาระไปกรองนำส่วนของเหลวที่ได้ผสมกับอาหารที่มีเชื้อ *S. dysenteriae* ช่วงกำลังเจริญ บ่มไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อ จึงสรุปว่าสิ่งที่ผ่านเครื่องกรองได้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และให้ความหมายของแบคทีริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams. 1958: 1 - 3)

3.2 สมบัติทั่วไปของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจมีสมบัติทั่วไป (Voyles. 2002: 83) ดังนี้คือ

3.2.1 สามารถดำรงชีวิตแบบอิสระได้ แต่การเพิ่มจำนวนอนุภาคเฟจเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อเฟจหรือภายในโฮสต์เท่านั้น โดยอาศัยเมแทบอลิซึมของโฮสต์ในการผลิตเฟจรุ่นใหม่ออกมา

3.2.2 ไม่จัดเป็นเซลล์เพราะไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) หรือโครงสร้างอื่นๆ ของเซลล์

3.2.3 องค์ประกอบหลักของเฟจมีเพียงกรดนิวคลีอิกซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดใดชนิดหนึ่ง และส่วนของแคพซิด (capsid) ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) เพื่อป้องกันกรดนิวคลีอิกที่อยู่ภายใน

3.2.4 กรดนิวคลีอิกที่บรรจุอยู่ภายในส่วนใหญ่เป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) อาจพบชนิดอื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) หรือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA)

3.2.5 ขนาดของกรดนิวคลีอิกแตกต่างกันตามชนิดของเฟจ

3.3 การจัดจำแนกเฟจ

การจัดจำแนกอาศัยลักษณะรูปร่างของเฟจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และชนิดของกรดนิวคลีอิก โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามวิธีของ Bradley ซึ่งเป็นพื้นฐานของการจัดหมวดหมู่ของเฟจในปัจจุบัน (Bradley. 1967: 230 - 314) ดังนี้ คือ

3.3.1 กลุ่ม A ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีส่วนหาง (tail) ที่มีซีทที่ยึดหดได้ห่อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่พบระยะงาค (appendage) เช่น โยหาง (tail fiber) เป็นโครงสร้างส่วนปลายสุด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ อาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยต่อไปอีกตามลักษณะรูปร่าง

3.3.2 กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีซีทห่อหุ้ม แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีระยะงาคซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

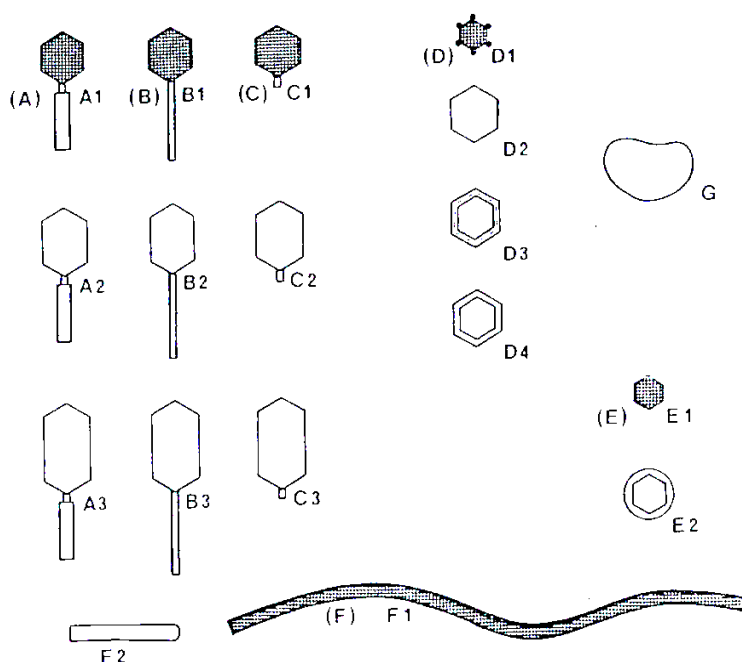
3.3.3 กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีซีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีระยะงาค มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

3.3.4 กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคปไซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคปซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

3.3.5 กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคปไซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

3.3.6 กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวมีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้พบเฟจกลุ่ม G ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน มี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ (Ackermann; et al. 1984: 61 - 71) แต่ไม่พบส่วนของแคปซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เช่น เฟจ MV - L2 โดยทั่วไปเฟจที่พบมีรูปร่างอยู่ในกลุ่ม A, B และ C ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การจัดจำแนกเฟจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดกรดนิวคลีอิก

ที่มา: Goyal; Gerbra; & Bitton. (1987). *Phage Ecology*. p. 53.

ในการจัดหมวดหมู่ (classification) ของไวรัสมีการอธิบายน้อยกว่าในแบคทีเรีย เพราะขาดความรู้เบื้องต้น เช่น แหล่งกำเนิด วิวัฒนาการ โดยทั่วไปแบ่งไวรัสออกเป็นกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ไวรัสสัตว์ ไวรัสพืช และไวรัสแบคทีเรีย ซึ่งใช้ความแตกต่างของโฮสในการแบ่งกลุ่ม อย่างไรก็ตามไม่สามารถจัดหมวดหมู่และตั้งชื่อ (nomenclature) ให้เป็นระบบเดียวกันได้ จนกระทั่งคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (International committee for taxonomy of viruses: ICTV) ได้พัฒนารูปแบบการจัดหมวดหมู่ และแบ่งไวรัสเป็น 50 แฟมิลี สำหรับชื่อแฟมิลีให้ลงท้ายด้วยคำว่า -viridae เช่น แฟมิลี Poxviridae ชื่อชั้นแฟมิลีให้ลงท้ายด้วยคำว่า -virinae เช่น ชั้นแฟมิลี

Chorodopoxvirinae และชื่อจีนัสให้ลงท้ายด้วยคำว่า -virus เช่น จีนัส *Orthopoxvirus* (Harley; & Klein. 1993: 363) การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ

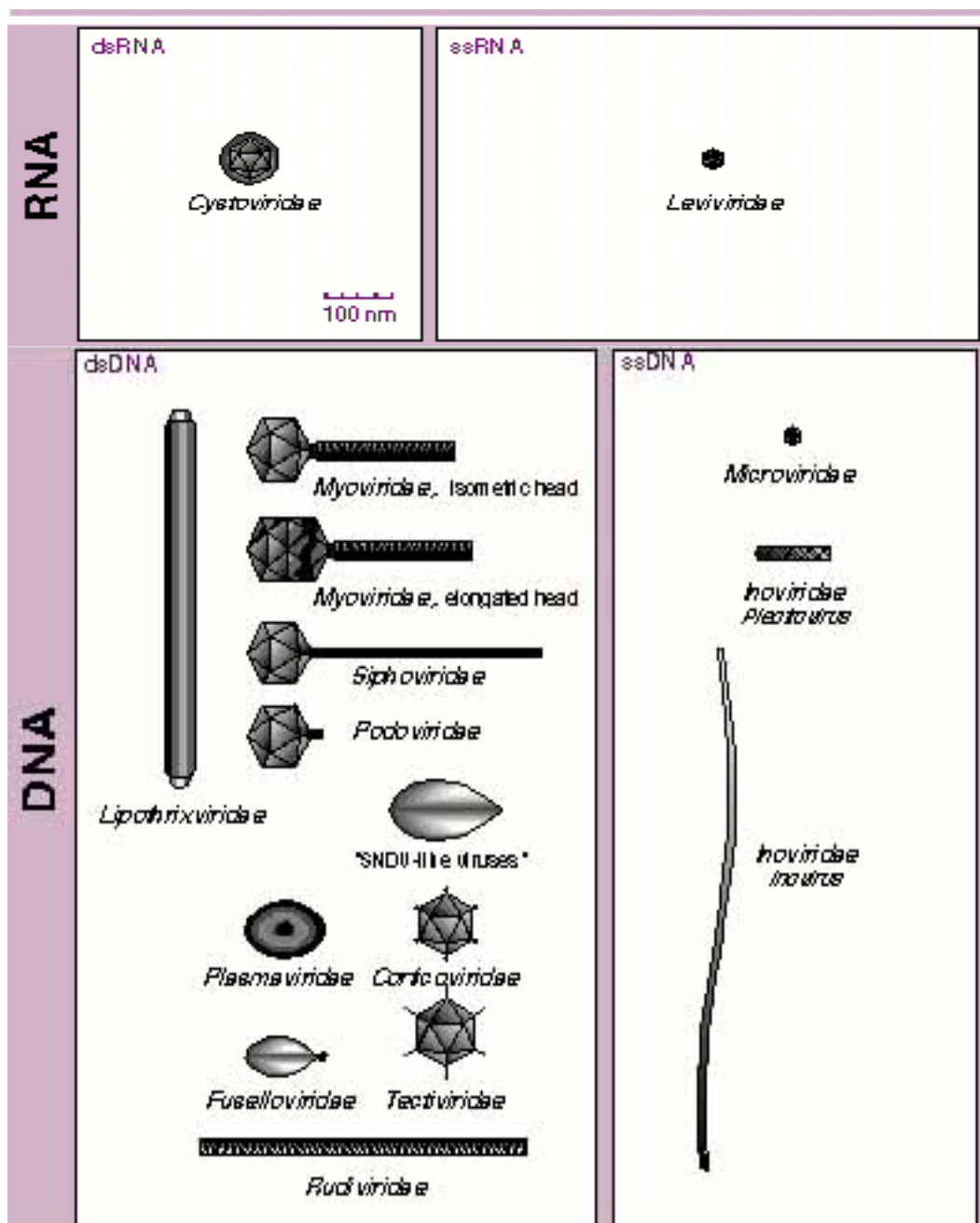
สมบัติต่างๆ ของไวรัสที่นำมาจัดทำอนุกรมวิธาน	
1. รูปร่างและขนาด	ความสมมาตรของแคปซิด การมี spike การมีหรือไม่มี envelope
2. สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีฟิสิกส์ของไวรัส	
2.1	น้ำหนักโมเลกุล buoyant density และ sedimentation coefficient
2.2	ความทนต่อกรด ความร้อน ไอออนที่มีประจุบวก สารละลาย ผงซักฟอก และรังสี
2.3	ลักษณะของจีโนม เช่น มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ
	ความยาวของจีโนม เป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่ เป็นเส้นตรงหรือเป็นวงกลม
	ถ้าเป็นท่อน มีจำนวนและความยาวเท่าใด
	มี polarity เป็นบวกหรือลบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ G+C content
2.4	สมบัติของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ เช่น
	จำนวน ขนาด และหน้าที่ของโปรตีนโครงสร้าง (structural protein)
	จำนวน ขนาด และหน้าที่ของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (non-structural protein)
	การมีโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษต่างๆ เช่น transcriptase, reverse transcriptase, hemagglutinin, neuraminidase และ fusion
	ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน
2.5	สมบัติของไขมัน ได้แก่ ปริมาณ ชนิด และอื่นๆ
2.6	สมบัติของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ปริมาณ ชนิด และอื่นๆ

ตาราง 2 (ต่อ)

สมบัติต่างๆ ของไวรัสที่นำมาจัดทำอนุกรมวิธาน
2.7 การเรียงตัวของยีนในจีโนม (genome organization) และการเพิ่มจำนวน ได้แก่ การจัดลำดับยีน วิธีการเพิ่มจำนวน จำนวนและตำแหน่งของ open reading frame การถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) post-translational processing ตำแหน่งภายในเซลล์ที่โปรตีนของไวรัสสะสมอยู่ ตำแหน่งภายในเซลล์ที่ไวรัสประกอบเป็นอนุภาค ตำแหน่งและวิธีการที่ไวรัสเกิดเป็นอนุภาคสมบูรณ์ และออกจากเซลล์ 2.8 สมบัติของแอนติเจน ได้แก่ สมบัติทาง serology 2.9 สมบัติทางชีววิทยา ได้แก่ โฮสต์ - เรนจ์ ในธรรมชาติ วิธีการติดต่อในธรรมชาติ การมีพาหะ การก่อโรค สภาพภูมิศาสตร์ในแหล่งที่พบไวรัส ความชอบต่อเนื้อเยื่อ (tissue tropism) และพยาธิวิทยา

ที่มา: ดัดแปลงจาก พิไลพันธ์ พุทธิวัฒน์. (2540). *ไวรัสวิทยา*. หน้า 2.2 - 2.3.

สำหรับการจัดจำแนกแฟมิลีของเฟจเน้นสมบัติ 3 ประการ คือ ชนิดของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid type) จำนวนสายของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid strandedness) และการมีหรือไม่มี envelope โดยได้จัดจำแนกและตั้งชื่อแฟมิลีเฟจที่มีอยู่มากกว่า 2,000 ชนิด ตามที่มีการค้นพบในเวลานั้น (Lim. 1998: 390) ดังแสดงในภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 การจัดจำแนกแฟมิลีของเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วย
การจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

ที่มา: Van Regenmortel; Fauquet; & Bishop. (2000). *Virus Taxonomy*. p 53.

3.4 โครงสร้างของเฟจ

โครงสร้างของอนุภาคเฟจประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ โปรตีนห่อหุ้มหรือแคพซิด เป็นโครงสร้างภายนอก และกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ภายในแคพซิด

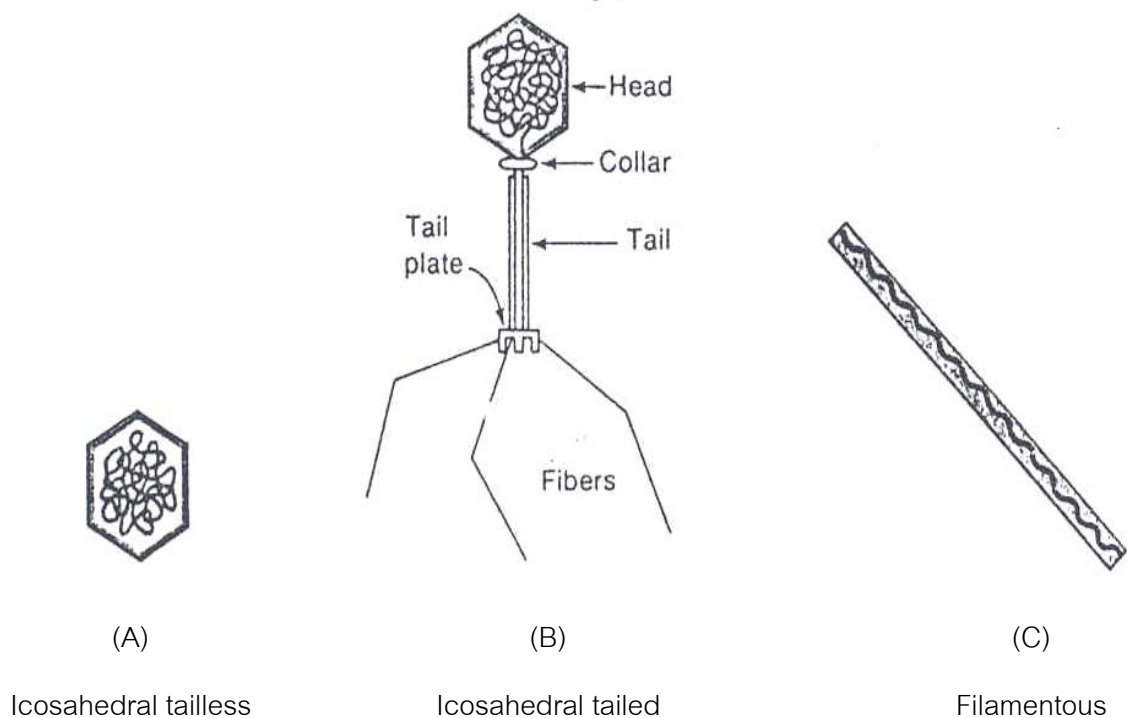
3.4.1 แคพซิด

แคพซิด เป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคเฟจ ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกไว้ในช่วยป้องกันกรดนิวคลีอิกจากการถูกทำลายด้วยรังสี อุณหภูมิ สารเคมี แคพซิดประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย เรียกว่า แคปโซเมอร์ (capsomer) เมื่อแคปโซเมอร์มาต่อกันทำให้เกิดรูปร่างแบบต่างๆ ดังนี้ (Mckane; & Kandel. 1996: 306 - 309; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 82)

3.4.1.1 รูปทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral structure) เช่น รูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral) โดยโครงสร้างบริเวณส่วนหัว มีมุมยอดทั้งหมด 12 มุม แต่ละมุมประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 5 หน่วย มารวมกันเรียกว่า เพนตอน (penton) นอกจากนี้มีหน้าสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้า เกิดจากแคปโซเมอร์ 6 หน่วย เรียก เฮกซอน (hexon) มาเรียงตัวรอบเพนตอน ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (A)

3.4.1.2 โครงสร้างซับซ้อน (complex structure) จะมีส่วนหางที่เกิดจากการเรียงตัวของแคปโซเมอร์ต่อจากส่วนหัวลงมาในลักษณะที่เรียงตัวแบบขดเป็นเกลียวและส่วนหางอาจประกอบด้วยซีทห่อหุ้มแกนกลาง (core) แผ่นฐาน (base plate) และใยหาง ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (B)

3.4.1.3 แบบสายยาว (filamentous structure) เกิดจากแคปโซเมอร์มาเรียงต่อกันในลักษณะแบบขดเป็นเกลียว มีกรดนิวคลีอิกเป็นแกนกลาง ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (C)



ภาพประกอบ 4 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคเฟจ (A) รูปทรงหลายเหลี่ยม (B) โครงสร้างซับซ้อน (C) แบบสายยาว

ที่มา: Maloy; Cronan; & Freifelder. (1994). *Microbial Genetics*. p. 82.

3.4.2 กรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกที่พบเป็นองค์ประกอบของอนุภาคเฟจ อาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอนุภาคของเฟจส่วนมากมีกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายคู่ นอกจากนี้ อาจพบดีเอ็นเอสายเดี่ยว อาร์เอ็นเอสายคู่ และอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว โดยกรดนิวคลีอิกจะอัดตัวแน่นอยู่ภายในแคปซิด (Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 82)

3.5 วงชีวิตของเฟจ

วงชีวิตของเฟจ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

3.5.1 วงชีวิตแบบไลติก (Lytic cycle)

เฟจที่เพิ่มจำนวนโดยใช้วงชีวิตนี้ เรียกว่า ไวรุเลนต์เฟจ (virulent phage) โดยเฟจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตาย เพื่อปล่อยเฟจรุ่นใหม่ออกมา (Boyd. 1995: 403; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 84 - 85) วงชีวิตแบบไลติกประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (ดังแสดงในภาพประกอบ 5)

3.5.1.1 การเกาะติด (adsorption)

เฟจจะใช้ปลายของส่วนหางหรือเรียกส่วนนี้ว่าตำแหน่งเกาะติดของเฟจ (attachment site) จับกับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) ที่จำเพาะบนผนังเซลล์แบคทีเรีย เฟจแต่ละชนิดจะมีตำแหน่งรีเซพเตอร์กับการเกาะติดแตกต่างกันออกไป โดยธรรมชาติตำแหน่งรีเซพเตอร์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น โปรตีน เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ลิพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดไทโคอิก (teichoic acid) รวมทั้งแฟลกเจลลา (flagella) และพิล (pili) เป็นต้น ซึ่งโดยปกติรีเซพเตอร์เหล่านี้จะมีหน้าที่อื่น เช่น เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์หรือส่วนประกอบของแคปซูลมากกว่าจะทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ให้เฟจ (Furukawa; Kuroiwa; & Mizushima. 1983: 938 - 945; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 84 - 85)

3.5.1.2 การส่งผ่านกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (penetration)

หลังจากเกิดการเกาะติดแล้ว ส่วนที่หุ้มห่อตัวของส่วนหางจะหดตัวทำให้ส่วนแกนหาง (tail core) ผ่านเข้าสู่ผิวเซลล์จนถึงชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และส่งผ่านกรดนิวคลีอิกจากส่วนหัวผ่านส่วนแกนหางเข้าสู่ไซโตพลาสซึมโดยที่แคพซิดของเฟจยังคงอยู่ภายนอก ดังนั้นกรดนิวคลีอิกจะเข้าสู่เซลล์โดยไม่ผ่านสื่อกลางใด (Furukawa; Kuroiwa; & Mizushima. 1983: 938 - 945) เฟจบางชนิดมีหางที่ยาวจะสามารถส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ แต่เฟจที่มีส่วนหางสั้นจะส่งผ่านไปยังเพอริพลาสซึม (periplasm) ในบริเวณเพอริพลาสซึม (periplasmic space) ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนเฟจที่ไม่มีหางนั้นเฟจจะทำให้แคพซิดแตกออกก่อน และปล่อยกรดนิวคลีอิกไปที่ผนังเซลล์ก่อนเข้าสู่เซลล์ (Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 84 - 85) และเฟจที่มีรูปร่างเป็นสายยาวพบว่าแคพซิดจะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วย (Campbell. 1996)

3.5.1.3 การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของเฟจ (biosynthesis)

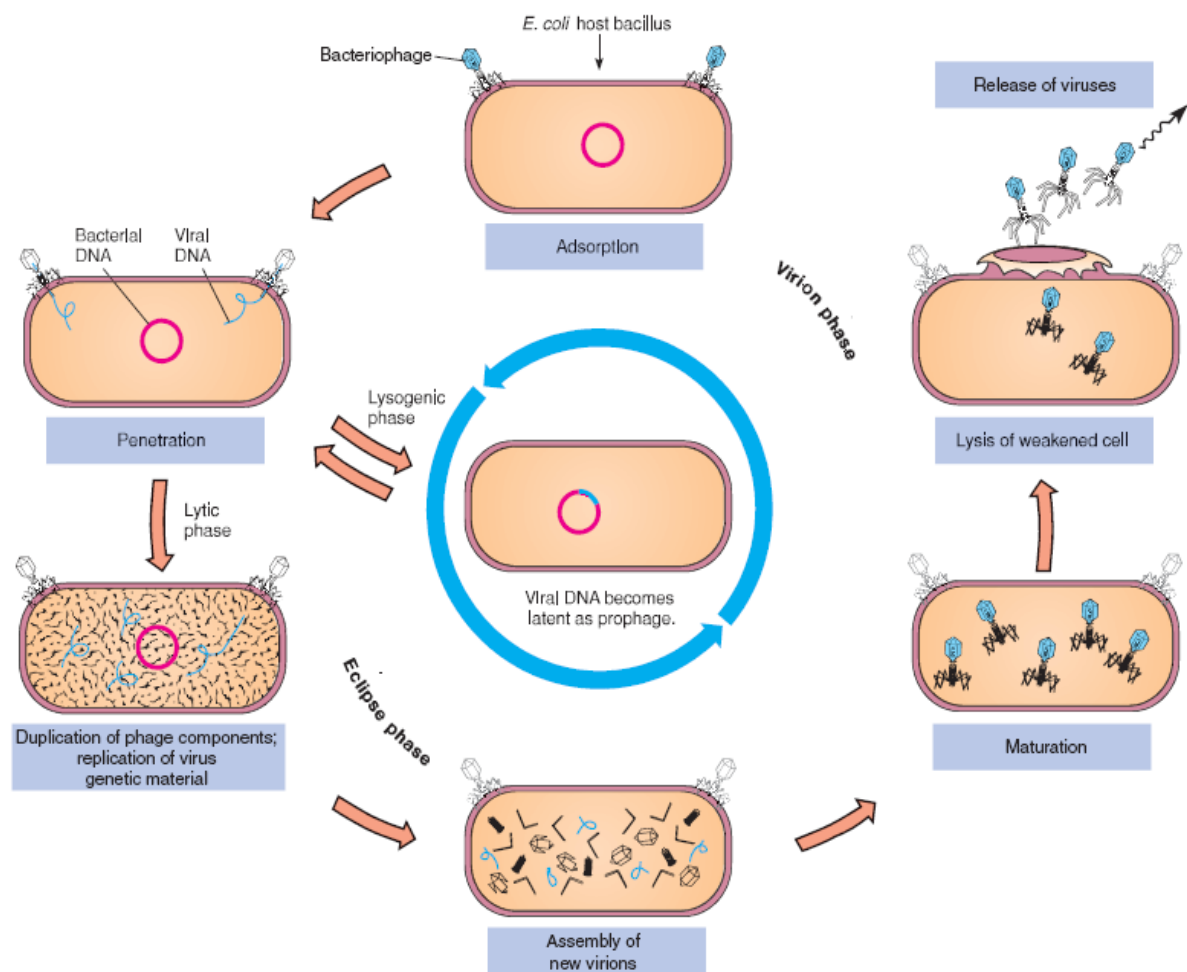
เมื่อดีเอ็นเอของเฟจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของเฟจ โดยจะเริ่มต้นจากการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA; messenger RNA) จากดีเอ็นเอของเฟจ โดยอาศัยอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) ของแบคทีเรีย ซึ่งเอ็มอาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นในช่วงนี้เรียกว่าเอ็มอาร์เอ็นเอช่วงต้น (early mRNA) และจะเกิดการแปลรหัส (translation) ไปเป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของเฟจเอง เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนชุด (copy) ดีเอ็นเอของเฟจและควบคุมเมแทบอลิซึมในเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นมีการถอดรหัสช่วงหลังจากการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอของเฟจ โดยใช้อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของเฟจเอง จะได้เอ็มอาร์เอ็นเอช่วงหลัง (late mRNA) ซึ่งเมื่อแปลรหัสออกมาจะได้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคเฟจ เช่น แคปซิด ส่วนหาง รวมทั้งเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการประกอบโครงสร้างเฟจและการปลดปล่อยอนุภาคเฟจรุ่นใหม่

3.5.1.4 การประกอบเป็นรูปร่างของอนุภาคเฟจ (assembly)

ขั้นตอนโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคเฟจ เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคปซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคปซิดจะเชื่อมต่อกับซีทห่อหุ้มและส่วนหาง แล้วประกอบกันเป็นอนุภาคเฟจที่สมบูรณ์ โดยทั่วไปในเซลล์ของแบคทีเรีย 1 เซลล์สามารถผลิตเฟจได้ 50 - 100 อนุภาค ทั้งนี้จำนวนอนุภาคของเฟจขึ้นกับความจำเพาะของเฟจและแบคทีเรียด้วย

3.5.1.5 การปลดปล่อยอนุภาคของเฟจรุ่นใหม่ออกจากเซลล์แบคทีเรีย (release)

ขั้นตอนสุดท้ายของการติดเชื้อจากเฟจ คือเฟจจะสังเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิดเพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรีย คือ เอนไซม์โฮลิน (holin) เพื่อย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ และไลโซไซม์เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและเฟจถูกปล่อยออกมาภายนอก (Young, 1992: 430 - 481; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 84 - 85)



ภาพประกอบ 5 วงชีวิตแบบไลติกของเฟจ

ที่มา: Talaro; & Talaro. (2002). *Foundations in Microbiology*. p. 169.

3.5.2 วงชีวิตแบบไลโซเจนิค (Lysogenic cycle)

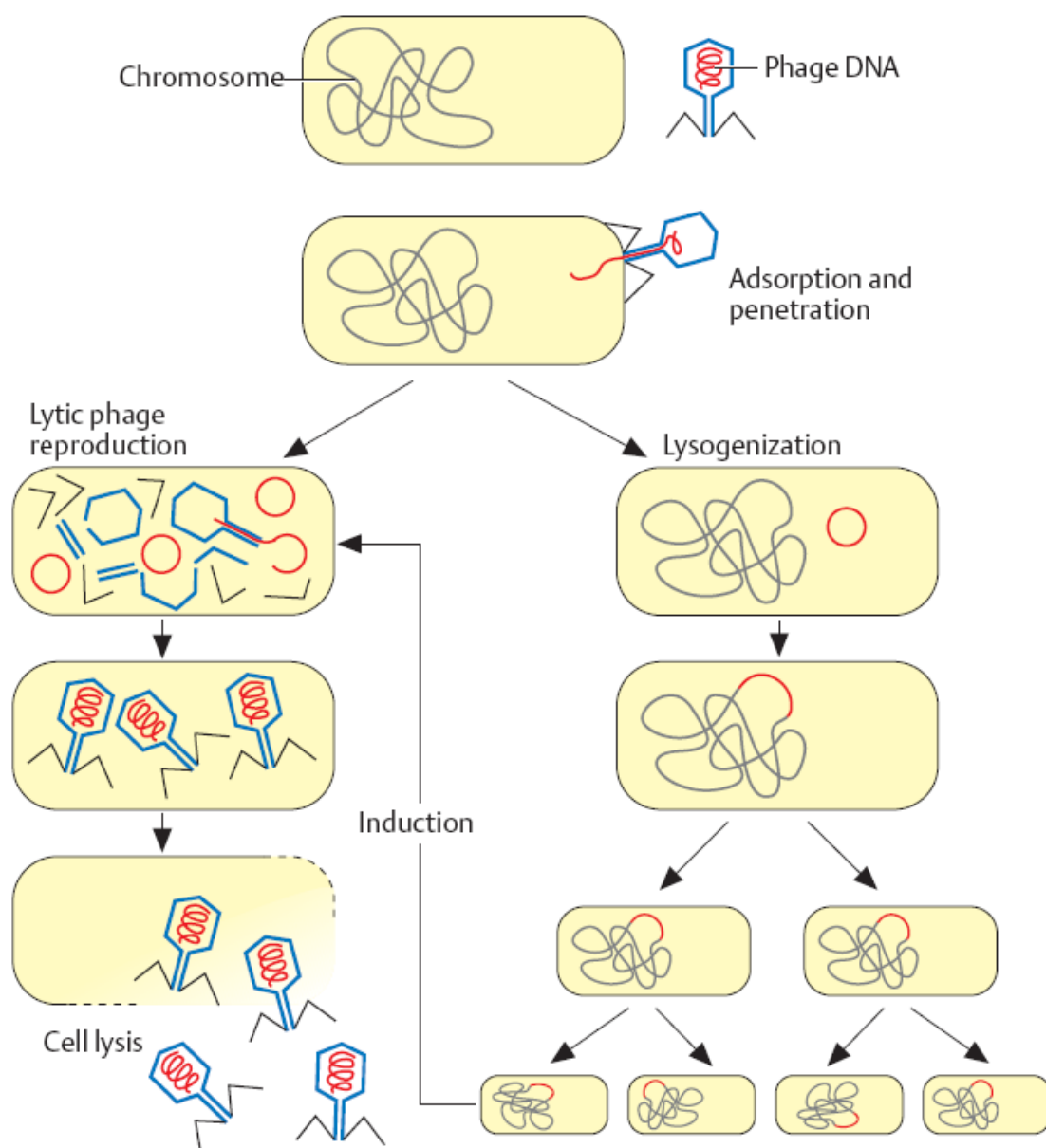
เฟจที่มีวงชีวิตทั้งแบบไลโซเจนิคและแบบไลติค เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) (Alcamo. 1996: 338; Mckane; & Kandel, 1996: 317) ตัวอย่าง เช่น แลมดาเฟจ (lambda phage) ที่มีความจำเพาะกับ *E. coli* ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ (ดังภาพประกอบ 6)

3.5.2.1 เฟจจะทำการเกาะติดกับแบคทีเรียในตำแหน่งที่จำเพาะและปล่อยดีเอ็นเอที่เป็นสายตรงเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

3.5.2.2 ดีเอ็นเอที่เป็นสายตรงของเฟจจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวนแบบปิด

3.5.2.3 ดีเอ็นเอของเฟจในรูปวงแหวนแบบปิด ในช่วงแรกจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและถอดรหัสโดยอาศัยเอนไซม์จากแบคทีเรีย เมื่อได้เอ็มอาร์เอ็นเอของเฟจแล้ว จะเกิดการแปลรหัสและได้โปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งจะเข้าขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างอนุภาคของเฟจและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปลดปล่อยเฟจ ดังนั้นจึงไม่เข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค จากนั้นดีเอ็นเอของเฟจในรูปวงแหวนแบบปิดจะเข้าสู่สอดแทรก (integration) กับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งจะเรียกเฟจในช่วงนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียนี้ว่า ไลโซเจน (lysogen) โปรเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

3.5.2.4 การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติค (induction) เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ สามารถทำให้โปรเฟจหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียและเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคเพื่อผลิตอนุภาคเฟจรุ่นใหม่ การชักนำโปรเฟจเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดระดับลงของโปรตีนควบคุม และสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากการตอบสนองของแบคทีเรียที่มีต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอัลตราไวโอเลต (Voyles. 2002: 96) หรือสารเคมี เช่น มิโตมายซิน ซี (mitomycin C) (Lim. 1998: 411) เป็นต้น



ภาพประกอบ 6 วงชีวิตแบบไลโซเจนิคของเฟจ

ที่มา: Talaro; & Talaro. (2002). *Foundations in Microbiology*. p. 169.

3.6 ลักษณะพลาไคที่เกิดจากเฟลจ

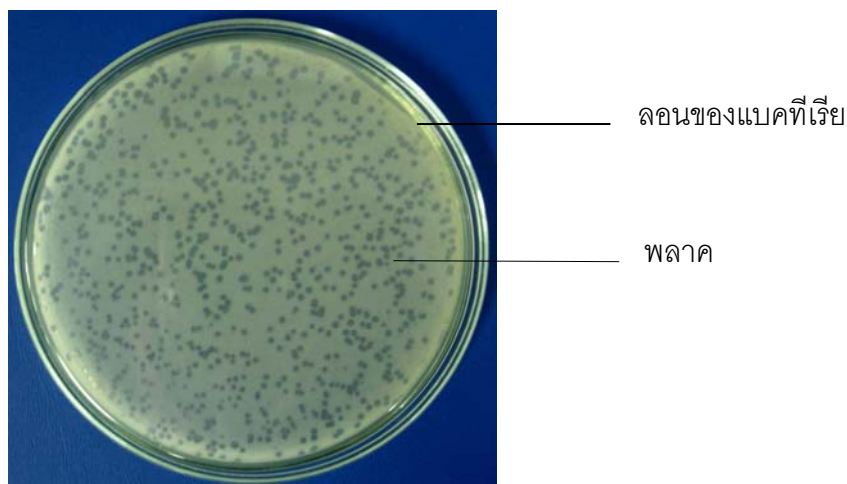
พลาไคที่เกิดจากเฟลจจะมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ พลาไคใส (clear plaque) และพลาไคขุ่น (turbid plaque) ขนาดและรูปร่างของพลาไคขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของเฟลจและแบคทีเรียรวมทั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย ถ้าแบคทีเรียในบริเวณที่มีเฟลจอยู่หยุดเจริญเร็วซึ่งอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด สารพิษที่แบคทีเรียสร้างออกมาบกพร่องการเจริญของแบคทีเรียเอง หรือไม่มีพื้นที่ให้แบคทีเรียเจริญ พลาไคที่ได้ก็จะมีขนาดเล็ก ขนาดของเฟลจมีผลต่อขนาดพลาไคเช่นกัน ซึ่งเฟลจที่มีอนุภาคเล็กสามารถแพร่ไปตามอาหารเลี้ยงเชื้อสู่เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใกล้เคียงได้เร็วกว่าเฟลจที่มีอนุภาคใหญ่ (Adams. 1958: 450 – 456) ลักษณะของพลาไค มี 2 แบบ ดังนี้

3.7.1 พลาไคใส พลาไคที่ปรากฏจะมีลักษณะใส เนื่องจากเฟลจเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลติก เฟลจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตายจึงเห็นเป็นวงใส เฟลจที่ทำให้เกิดพลาไคในลักษณะนี้ เรียกว่า ไวรูเลนซ์เฟลจ

3.7.2 พลาไคขุ่น พลาไคที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น เฟลจที่ทำให้เกิดพลาไคมีลักษณะขุ่น เรียกว่า เทมเพอเรตเฟลจ โดยเริ่มแรกเฟลจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบไลติก จนถึงระยะหนึ่งเฟลจบางส่วนจะเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลโซเจนิก ซึ่งแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อโดยเฟลจชนิดนี้ จะไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์ จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาไคทำให้เห็นพลาไคมีลักษณะขุ่น

3.7 การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสต์

การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสต์ใช้เทคนิคที่เรียกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) โดยนำเฟลจและแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ที่มีความจำเพาะกัน มาผสมกันในอาหารวุ้นเหลว แล้วเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มเป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง พบว่าโฮสต์หรือแบคทีเรียที่ไม่ติดเชื้อ สามารถเจริญเป็นลอน (lawn) ปกคลุมผิวหน้าอาหารชั้นบนสุด แต่ถ้าพบว่ามีพลาไคเกิดขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย แสดงว่าโฮสต์เกิดการติดเชื้อ (Cappuccino; & Sherman. 2001: 231) ดังแสดงในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ลักษณะของพลาแคที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย

ที่มา: พรทิพย์ สุขสวัสดิ์. (2549). การศึกษาสมบัติของไวรัสโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย. p. 17

3.8 การเพาะเลี้ยงเฟจ

ในการนำเฟจไปใช้ศึกษาวิจัยในด้านต่างๆ จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของเฟจสูงและมีปริมาณมากเพียงพอ คือประมาณ $10^7 - 10^{10}$ PFU/ml (Plaque forming unit per millilitre) (Klaus; et al. 1981: 269 - 279) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเฟจให้ได้จำนวนมาก ซึ่งการเพาะเลี้ยงเฟจที่นิยม มี 2 วิธี คือ

3.8.1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เป็นการเลี้ยงแบคทีเรียและเฟจในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เพื่อให้การเจริญของเชื้อมีประสิทธิภาพดี ซึ่งเฟจจะเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แบคทีเรียจนเซลล์แตกสลาย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใสเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่การเจริญของเซลล์แบคทีเรียเพียงชนิดเดียว การเพาะเลี้ยงเฟจในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนี้นิยมใช้กับเฟจที่มีโฮสต์เป็นแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวได้ดี เช่น เฟจของ *E. coli* หรือเฟจของ *Lactococcus* sp. (Lillehaug. 1997: 85 - 90; Yin; Zeph; & Statzky. 1997: 461 - 466)

3.8.2 การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำเฟจและแบคทีเรียมาผสมกันในอาหารวุ้นเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงบนอาหารวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มทิ้งไว้จนมีพลาไคเกิดขึ้น เททับอาหารที่มีพลาไคด้วยอาหารเหลว บ่มทิ้งไว้ 2 - 5 ชั่วโมง โดยเขย่าจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ จากนั้นแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก นำส่วนน้ำใสออกมารองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างน้ำใสที่กรองได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Adams. 1958: 447)

3.9 การศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของเฟจ

การศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของเฟจ หมายถึง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียโฮฟกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ไม่ใช่โฮสต์ที่แยกได้จากเฟจนั้น ถ้าเฟจทำให้แบคทีเรียเกิดการติดเชื้อได้มากชนิดเรียกว่า เฟจมีโฮสต์-เรนจ์กว้าง แต่ถ้าเฟจสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการติดเชื้อได้น้อยชนิด เรียกว่า เฟจมีโฮสต์-เรนจ์แคบ ปัจจุบันมีการศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของเฟจโดยนำมาทดสอบความจำเพาะกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์หรือจีแนส (Matsuzaki; et al. 1992: 93 - 97) และต่อมาได้มีการเรียกเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสปีชีส์เดียวว่า monovalent phage และเรียกเฟจที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียมากกว่า 1 สปีชีส์ว่า polyvalent phage (Kalmanson; & Bronfenbrenner. 1942: 13)

3.10 การศึกษารูปร่างของเฟจ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือสำหรับนำมาศึกษารูปร่างและวัดขนาดเฟจ โดยมักจะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) และย้อมตัวอย่างเฟจด้วยวิธีเนกาทีฟสเตนนิ่ง (negative staining) โดยใช้ uranyl acetate หรือ phosphotungstic acid ทำให้เห็นรูปร่างเฟจมีสีอ่อนบนพื้นผิว (background) ที่ทึบแสง สำหรับการวัดขนาดอนุภาคเฟจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจเกิดความผิดพลาด อันเนื่องมาจากตัวอย่างเฟจแห้งมาก ทำให้ขนาดที่วัดได้เล็กกว่าความเป็นจริง หรืออาจมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเงาของโลหะที่พอกตัวหนาเกินไป (Zachary. 1976: 415 - 422; Kay; & Bradley. 1960: 553 - 563)

3.11 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อเฟจ

3.11.1 ความต้องการอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte requirement)

เฟจต้องการไอออนแคลเซียมและแมกนีเซียม เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) หรือแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการติดเชื้อ (Watanabe; & Takesue. 1972: 19 - 30) ซึ่งความต้องการไอออนแคลเซียมและแมกนีเซียมสำหรับการเพิ่มจำนวนของเฟจนั้นได้ศึกษามาเป็นระยะเวลานาน พบว่าไอออนแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ เพราะไอออนแคลเซียมและแมกนีเซียมจะมีส่วนช่วยให้เฟจสามารถเข้าเกาะติดกับผนังเซลล์ของโฮสต์ซึ่งมีประจุเป็นลบได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้แคลเซียมและแมกนีเซียมยังมีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเฟจส่วนใหญ่ด้วย โดยระดับของแคลเซียมและแมกนีเซียมที่เฟจต้องการเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนให้ได้มากที่สุดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเฟจ และชนิดของโฮสต์ แต่โดยทั่วไปจะมีการเติมแคลเซียมและแมกนีเซียมลงไปในการศึกษาเกี่ยวกับเฟจประมาณ 5 - 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมักจะมีการเติมแคลเซียมและแมกนีเซียมลงไปในรูปแบบของแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยเพิ่มขนาดของพลาไคให้ใหญ่ขึ้นได้ (Mullan. 2002)

3.11.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อการอยู่รอดของเฟจ โดยทั่วไปเฟจส่วนใหญ่จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อย่างไรก็ตามเฟจบางตัวสามารถทนที่อุณหภูมิดังกล่าวได้นาน 5 นาทีในหางนม (skim milk; pH 6.0) บางชนิดทนต่อการทำแห้งที่อุณหภูมิ 90 - 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเฟจบางตัวยังสามารถอยู่รอดได้แม้ว่าจะผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีแบบใช้อุณหภูมิสูงแต่ใช้เวลาสั้น (High temperature - short time; HTST pasteurization; อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที) ดังนั้นปัจจุบันจึงมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนสูงเพื่อทำลายเฟจ โดยส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าเฟจจะถูกทำลายหมดไปในกระบวนการผลิตนม (Mullan. 2002) แต่ในอุตสาหกรรมนมมีการหมักหลายชนิด พบว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักไม่สามารถที่จะผ่านความร้อนสูงเป็นระยะเวลานานได้ เพราะจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นั้นได้ ดังนั้นในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่

มีต่อเฟจในปัจจุบันจะเน้นศึกษาถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ทำให้เฟจเหลือน้อยที่สุดพอที่จะทำให้การหมักได้ผลดีและไม่ส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์

3.11.3 ความเป็นกรดต่าง (pH)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเฟจจะถูกทำลายในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างต่ำ โดยเมื่อมีการเติมกรดแลคติกร้อยละ 2.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในนม เป็นเวลา 5 นาที เฟจจะถูกทำลายหมด อย่างไรก็ตามการเติมกรดแลคติกลงไปให้นมน้อยกว่าร้อยละ 1 จะมีผลต่อเฟจน้อยมาก แม้ว่าจะบ่มไว้นานถึง 24 ชั่วโมงก็ตาม ซึ่งจากการทดลองต่อมาพบว่าเฟจจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.5 และมากกว่าหรือเท่ากับ 11.8 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 2.5 - 11.8 จะเห็นผลได้ช้า ส่วนที่ความเป็นกรดต่าง 4.0 - 7.0 จะต้องใช้เวลามากกว่า 5 วัน เฟจถึงจะถูกทำลายได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันพบว่าเฟจจะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วที่ความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 5.0 โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mullan. 2002)

4. แลคติกแอซิดแบคทีริโอเฟจ

แลคติกแอซิดแบคทีริโอเฟจ หรือแลคติกเฟจ (lactic phage) หรือแลบเฟจ (LAB phage) คือเฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายชนิด อุตสาหกรรมอาหารหมักที่มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหัวเชื้อได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตชีส ซึ่งนิยมใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* อุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต ซึ่งมักใช้เชื้อ *Streptococcus thermophilus* ร่วมกับ *Lactobacillus delbrueckii* เป็นต้น นอกจากนี้ lactobacilli หลายสปีชีส์ยังถูกใช้เป็นโพรไบโอติก (probiotic) ปัญหาหลักที่สำคัญในการหมักอาหารได้แก่ การปนเปื้อนด้วยแบคทีริโอเฟจ ซึ่งทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อ ดังนั้นจะทำให้การเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารไปเป็นกรดแลคติกเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ การหมักเกิดช้าลง หรืออาจทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ (Brüssow; et al. 1994: 4537 – 4543; Brüssow. 2001: 283 - 303)

การติดเชื้อมีเฟจในแบคทีเรียกรดแลคติกยังคงมีรายงานไม่มากนัก โดยรายงานส่วนใหญ่จะศึกษาในผลิตภัณฑ์นม (Hino; & Ikebe. 1965: 472 – 476; Watanabe; et al. 1970: 409 – 415;

Séchaud; et al. 1988: 401 – 410; Moineau; & Lévesque. 2005: 285 – 296) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแยกได้จากอาหารหมักตามธรรมชาติ จึงสามารถแยกเฟจได้จากแหล่งต่างๆ เหล่านี้เช่นกัน เช่น การแยกแลบเฟจจากแหนม พบว่าเกิดการปนเปื้อนเฟจของเชื้อในกลุ่ม *Weissella* ซึ่งเฟจกลุ่มนี้ส่งผลทำให้การหมักแหนมช้าลง (ณัฐพร. 2552: 63 - 67) และในการผลิตชีสโดยใช้เชื้อ *Lactococcus* เป็นหัวเชื้อพบว่าเกิดการปนเปื้อนของเทมเพอเรตเฟจซึ่งในที่สุดจะเปลี่ยนเป็นไลติกเฟจเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมัก (Reiter; & Kirikova. 1976: 221 - 225) แหล่งที่อาจพบการปนเปื้อนของเฟจในการผลิตชีส ได้แก่ บริเวณการผลิต (Jarvis. 1984: 343 - 349) นมดิบซึ่งเฟจสามารถเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียที่พบในนมดิบได้ (Heap; Limsowtin; & Lawrence. 1978: 16 - 22) นอกจากนี้ Klaenhammer (1984) ยังสรุปว่าเฟจสามารถปนเปื้อนได้ในบริเวณที่ทำชีสทุกแห่งทั่วโลก แม้จะมีการควบคุมทางสุขอนามัยเป็นอย่างดี หรือมีการเปลี่ยนหัวเชื้อ แม้กระทั่งการใช้เชื้อที่ผ่านการติดเชื้อด้วยเฟจก็ตาม

การปนเปื้อนด้วยแบคทีริโอเฟจในอาหารหมักนับเป็นปัญหาหลักในระดับอุตสาหกรรม การสุขาภิบาลที่ดีในบริเวณที่ใช้ในการหมักจะช่วยลดการปนเปื้อนของเฟจในการหมักได้ ทั้งนี้รวมถึงการแยกห้องเก็บหัวเชื้อในการหมักจากห้องที่ใช้ในการผลิต การใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ การใช้อาหารที่ยับยั้งเฟจ (Phage inhibitory medium; PIM) ในการถ่ายหัวเชื้อ เป็นต้น (Mullan. 1986: 39 - 42)

จากความสำคัญดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของเฟจในอาหารปลาหมักของประเทศ ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกในการศึกษาการกระจายของแลบเฟจจากอาหารปลาหมัก โดยข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การค้นคว้าและศึกษาในการพัฒนาวิธีการในการรักษาหัวเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการผลิตให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเฟจ ซึ่งจะทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และได้ผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักที่มีคุณภาพต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) (SHEL-LAB)
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (Astell)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) (Science Tech)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot-air sterilizing oven) (Fisher Scientific)
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Du Pont)
กล้องจุลทรรศน์ (microscope) (Olympus)
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) (Jeol)
เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus) (Bio-Rad)
เครื่อง Polymerase Chain Reaction (authorized thermal cycler) (Eppendorf)
ชุดถ่ายภาพเจล (Viber Lourmat)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

MRS agar (Hi-media)
MRS broth (Hi-media)
Sodium chloride (Labscan)
Polyethylene glycol 8000 (Sigma)
Sodium dodecyl sulfate (Sigma)
Chloroform (Merck)
Phenol (USB)
Absolute ethanol (Merck)
Ethidium bromide (Bio-Rad)
Loading dye (Fermentas)
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI*, *MluI*, *NdeI* (Fermentas)
เอนไซม์ RNase A (Fermentas)
เอนไซม์ DNase I (Fermentas)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ใช้ loop เฝ้าไฟจนแดง รอจนเย็นแล้วนำ loop แต่ละบริเวณต่างๆ ของอาหารปลาหมักนำมา streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

2.1.1 รูปร่าง คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ขนาด 1 - 3 มิลลิเมตร ที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ลงในอาหาร MRS agar

2.1.2 การทดสอบเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ loop เชื้อเชื้อจากข้อ 2.1.1 ที่เจริญบน MRS agar มาแตะลงบนสไลด์ที่มี 1 หยดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

ถ้าเชื้อทดสอบให้ผลบวกในข้อ 2.1.1 และให้ผลลบในข้อ 2.1.2 คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกให้เก็บเชื้อไว้ใน MRS agar เพื่อนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพื่อจำแนกสปีชีส์ต่อไป โดย subculture ทุก 2 สัปดาห์ และเก็บ stock culture ใน MRS broth ที่เติมกลีเซอรอล ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.2.1 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 6.5 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิต่างกันคือ ที่ 10 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่ (Axelsson. 1998: 1 - 72)

2.2.2 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่าความเป็นกรดต่าง 4.4, 6.5 และ 9.6

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเป็น 4.4, 6.5 และ 9.6 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่ (Axelsson. 1998: 1 - 72)

2.2.3 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะมีเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่ไม่มี NaCl และมี NaCl ร้อยละ 6.5 และ 18 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่ (Axelsson. 1998: 1 - 72)

2.2.4 ตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการใช้กลูโคส

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่มีหลอดดักก๊าซ 1 หลอด นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ (Axelsson. 1998: 1 - 72)

2.3 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีจำนวนเซลล์ 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย TE buffer pH 8 (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จากนั้นทำเซลล์แขวนลอยใน TE buffer pH 8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ lysozyme 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอลต่อคอลโรฟอร์ม (อัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,244xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยนำส่วนใสมาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 และเอทานอลร้อยละ 95 (ที่แช่เย็น) ในอัตราส่วนปริมาตร 2 ต่อ 1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,244xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอลร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,244xg เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอทานอลทิ้ง จากนั้นนำไประเหยเอทานอลออกแขวนลอยดีเอ็นเอด้วย nuclease-free dH_2O ปริมาตร 30 - 50 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม ผสมกับ 1X TAE 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 4) นำมาหลอมให้ละลาย แล้วเทลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท 1X TAE ให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ผสมกับ loading dye แล้วนำมาใส่ช่องภายในเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที แล้ว

ล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นเป็น แถบสีส้ม การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-Log DNA Ladder, New England Biolabs)

2.3.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

นำ DNA ที่สกัดได้มาเป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ primers ที่มีลำดับเบสดังนี้ (Erko; & Michael. 1991)

forward primer (8-27f): 5' AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG 3'

reverse primer (1525r): 5' TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3'

โดยส่วนผสมของ PCR reaction ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร มีดังนี้ 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, dNTP mix 1 มิลลิโมลาร์, forward primer 15 พิโคโมล, reverse primer 15 พิโคโมล, ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 40 นาโนกรัม, *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ และ 5X Q solution 10 ไมโครลิตร

นำหลอด PCR tubes ที่ผสมสารต่าง ๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง Authorized Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. preheating อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. denaturing อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3. annealing อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
5. ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 เป็นจำนวน 35 รอบ
6. final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

ให้นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR นี้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.3.1 โดยชิ้นดีเอ็นเอจะมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส

2.3.3 การทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ใช้ FAVORGEN® GEL/PCR PURIFICATION kit (ภาคผนวก ค ข้อ 1)

2.3.4 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ส่งไปหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA (ห้างหุ้นส่วนจำกัดเวิร์ด เมดิก) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรม Chromas version

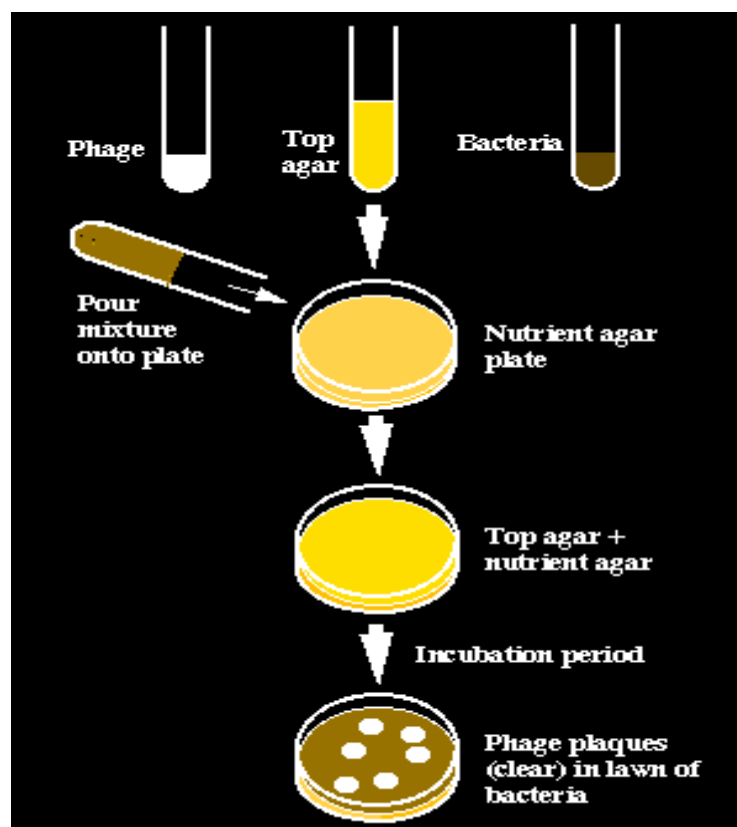
2.0.1 (Technelysium Pty Limited. Australia) และจัดเรียงต่อสายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.9 (Tom Hall, North Carolina State University) แล้วนำลำดับเบสของซิงดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

3. การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นไฮสท์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 - 7 ชั่วโมง จากนั้นใส่อาหารปลาหมึก ปริมาตร 25 กรัมลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปตกตะกอน เพื่อแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอน้ำใสมารองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีแลบเฟจอยู่หรือไม่ (Baross; Liston; & Morita. 1978a: 492 - 499; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466 - 470)

4. การตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำน้ำใสที่ได้จากข้อ 3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณเซลล์ เท่ากับ 1×10^8 CFU/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS agar ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้ว บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัวแล้วนำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสหรือพลาเกที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (Baross; Liston; & Morita. 1978b: 500 - 505)



ภาพประกอบ 8 การทำอาหารวุ้นสองชั้น

ที่มา: Nester; Roberts; & Nester. (1995). *Microbiology: A Human Perspective*. p. 293.

5. การหาปริมาณของแลบเฟจ

การหาปริมาณของแลบเฟจทำได้โดยเจือจางแลบเฟจในตัวอย่างแบบ serial dilution ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของแลบเฟจในแต่ละระดับความเจือจาง และแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโฮสต์ หาปริมาณแลบเฟจโดยนับจำนวนพลาไคที่เกิดขึ้น โดยการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีทดลองในข้อ 4 แล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจาง เพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาไค (PFU; Plaque forming unit per millilitre) คำนวณได้จากสูตร (Depaola; et al. 1998: 346 - 351)

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาไค} = \frac{\text{จำนวนพลาไค}}{\text{ปริมาณเฟจที่ใช้} \times \text{ค่าความเจือจาง}}$$

6. การเพิ่มจำนวนของแลบเฟจ

เตรียมแลบเฟจโดยเทคนิคการทำอาหารวันสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 หลังจากบ่มไว้เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนมีฟลาคเกิดขึ้น ให้เททับหน้าอาหารด้วย MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อชะแลบเฟจออกจากผิวหน้าอาหาร โดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 - 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอาส่วนน้ำใสออกมารองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างน้ำใสที่กรองได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Adams. 1958: 447)

7. การศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เตรียมแลบเฟจในอาหารเหลว โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 - 7 ชั่วโมง ใส่แลบเฟจที่แยกได้ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025x g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีแลบเฟจมาเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แชน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และเติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8000 (polyethylene glycol 8000) ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้งและนำแลบเฟจที่ตกตะกอนได้มาส่งดูรูปร่าง โดยนำกริด (grid) วางทับบนตะกอน เป็นเวลา 5 นาที ยกกริดซึ่งจะมีตัวอย่างแลบเฟจติดขึ้นมาด้วย จากนั้นย้อมด้วย uranyl acetate ร้อยละ 1 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (สถานที่ส่งวิเคราะห์คือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) (Depaola; et al. 1998: 346 - 351; Ghosh; Ansari; & Datta. 1989: 2241 - 2243; Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989: 4.22)

8. การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีสอื่น

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีสอื่นที่จะทดสอบ ได้แก่ *Weissella cibaria* N22, *Lb. plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lc. lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *Streptococcus salivarius* JCM 57007 และแบคทีเรียกรดแลคติก 17 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่าง

กัน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS agar ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเทพิบบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว จากนั้นหยดแลบเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของแลบเฟจในการติดเชื้กับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบจากการเกิดพลาควาบริเวณที่หยดแลบเฟจลงไป (Baross; Liston; & Morita. 1978b: 500 - 505; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466 – 470)

9. การสกัดดีเอ็นเอของแลบเฟจ

ทำการทดลองดังนี้ คือ

9.1 ทำการเพิ่มจำนวนแลบเพลจ โดยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 ประมาณ 100 plates หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 16 - 24 ชั่วโมง จนมีพลาคลเกิดขึ้นแล้วให้เททับหน้าอาหารด้วย MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อชะแลบเพลจออกจากผิวหน้าอาหาร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีแลบเพลจ มาเติม DNase I 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase A 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8000 ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.2 ทำการตกตะกอนแลบเฟจ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนแลบเฟจที่ได้ มาละลายใน TE buffer (pH 8.0) 500 ไมโครลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร เพื่อแยกพอลิเอธิลีนไกลคอลออก ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำชั้นบนนำมาเติม sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเกลือความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

9.3 ทำการสกัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยเติมฟีนอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสด้านบนมาเติมสารละลายฟีนอลต่อคอลโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1 ต่อ 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอต่อไป

9.4 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยดูดส่วนใสด้านบนที่ได้จากข้อ 9.3 มาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 และเอทานอลร้อยละ 95 (ที่แช่เย็น) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในตู้ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเอทานอลทิ้ง จากนั้นนำไปละลายเอทานอลออกใน vacuum chamber ละลายดีเอ็นเอของแลบเฟจด้วย TE buffer (pH 8.0) 30 - 50 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989: 4.22)

10. การตรวจสอบดีเอ็นเอของแลบเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ทำการทดลองดังนี้ คือ

10.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 9 มาวิเคราะห์ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งเตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.6 กรัม ผสมกับ 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้เจลละลาย แล้วเทเจลลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอของแลบเฟจที่สกัดได้มาใส่ลงในช่องภายในเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 - 2 ชั่วโมง นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้ม โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*

10.2 เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่แยกได้ว่าบริสุทธิ์ให้นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI*, *MluI* และ *NdeI* (Binetti; et al. 2008: 147 – 153; Kilic; et al. 1996: 2111 – 2116; Raiski; & Belyasova. 2009: 1 - 5) โดยเติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด (ภาคผนวก ข) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 3 ชั่วโมง ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับข้อ 10.1

11. การศึกษาผลไดวาเลนซ์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^8 CFU/ml มาทำการติดเชื้อด้วยแลบเฟจในอาหาร MRS broth ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารรูนสองชั้น

ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 และใช้เฟจในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นตัวควบคุม (ปริมาณเฟจเริ่มต้น) โดยคำนวณร้อยละของการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจจากสูตร (Lu; et al. 2003a: 225 - 235)

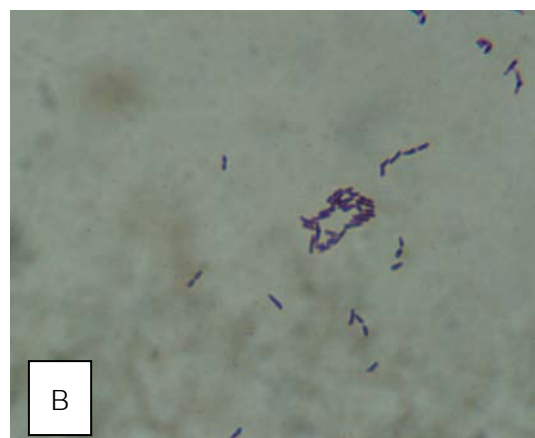
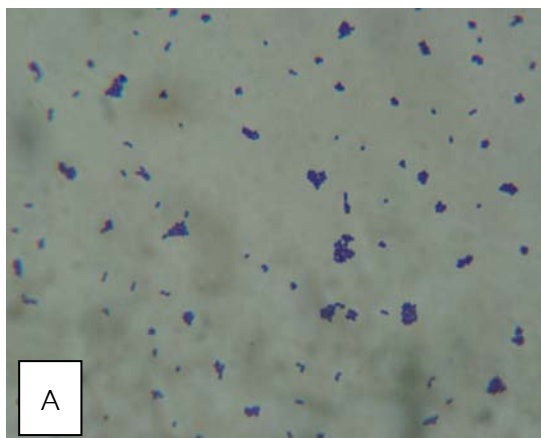
$$\text{ร้อยละของการเข้าเกาะติดของเฟจ} = \frac{(\text{ปริมาณเฟจเริ่มต้น} - \text{ปริมาณเฟจที่เหลือ})}{\text{ปริมาณเฟจเริ่มต้น}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักจำนวน 51 ตัวอย่าง โดยเลือกโคโลนีเดียวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 นำมาย้อมสีแกรม แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ (ภาพประกอบ 9) จากนั้นนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะเลส คัดเลือกเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์อะเลส พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 38 ไอโซเลท และรูปไข่ 22 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 3



ภาพประกอบ 9 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

A. ไอโซเลท F50 เซลล์รูปไข่ B. ไอโซเลท F57 เซลล์รูปท่อน (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ตาราง 3 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณไฮรอปโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
20/4/52	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F1	รูปไข่
	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F2	รูปท่อน
	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F3	รูปท่อน
20/4/52	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F4	รูปไข่
	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F5	รูปท่อน
	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F6	รูปท่อน
	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F7	รูปท่อน
20/4/52	ปลาร้า	ตลาดพระโขนง จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
20/4/52	ปลาจ่อม	ตลาดพระโขนง จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
21/4/52	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F8	รูปไข่
	ปลาสด	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F9	รูปไข่

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F10	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F11	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F12	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F13	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F14	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F15	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F16	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F17	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F18	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F19	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F20	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F21	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F22	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F23	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F24	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F25	รูปไข่

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
21/4/52	ปลาร้า	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
21/4/52	ปลาจ่อม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
27/4/52	ปลาต้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F27	รูปไข่
	ปลาต้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F28	รูปไข่
	ปลาต้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F29	รูปไข่
	ปลาต้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F30	รูปไข่
	ปลาต้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F31	รูปไข่
3/5/52	ปลาต้ม	ตลาดหน้าวัดพราหมณ์มณี จ. นครนายก	F32	รูปท่อน
	ปลาต้ม	ตลาดหน้าวัดพราหมณ์มณี จ. นครนายก	F33	รูปท่อน
3/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าวัดพราหมณ์มณี จ. นครนายก	ไม่พบ	-

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F34	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F35	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F36	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F38	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F39	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F40	รูปท่อน
4/5/52	ปลาร้า	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	ไม่พบ	-
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	F41	รูปท่อน
4/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	ไม่พบ	-
4/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	ไม่พบ	-
4/5/52	ปลาร้า	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	ไม่พบ	-
7/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F42	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F43	รูปท่อน

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
7/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F44	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F45	รูปท่อน
7/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
7/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
9/5/52	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F46	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F47	รูปท่อน
9/5/52	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F48	รูปท่อน
	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F49	รูปท่อน
9/5/52	ปลาร้า	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
10/5/52	ปลาส้ม	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	F50	รูปไข่
	ปลาส้ม	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	F51	รูปท่อน
10/5/52	ปลาร้า	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	ไม่พบ	-
10/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	ไม่พบ	-
15/5/52	ปลาส้ม	ตลาดมืด อ. จอมบึง จ. ราชบุรี	F52	รูปท่อน
15/5/52	ปลาร้า	ตลาดมืด อ. จอมบึง จ. ราชบุรี	ไม่พบ	-
15/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	F53	รูปไข่
15/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
18/5/52	ปลาแป้งแดง	ตลาดนัด อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	ไม่พบ	-
18/5/52	ปลาแป้งแดง	ตลาดนัด อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	ไม่พบ	-
18/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัด อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	ไม่พบ	-
18/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด อ. พังงา จ. นครศรีธรรมราช	ไม่พบ	-
18/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัด อ. พังงา จ. นครศรีธรรมราช	ไม่พบ	-
25/5/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F55	รูปไข่
	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F56	รูปไข่
25/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ดินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	ไม่พบ	-
28/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	F57	รูปท่อน
28/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-
28/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	ไม่พบ	-

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
4/6/52	ปลาสด	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ติเนอร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F58	รูปท่อน
	ปลาสด	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ติเนอร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F59	รูปท่อน
4/6/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ติเนอร์ จ. ฉะเชิงเทรา	ไม่พบ	-
7/6/52	ปลาสด	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	F60	รูปท่อน
7/6/52	ปลาร้า	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	ไม่พบ	-
7/6/52	ปลาจ่อม	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	ไม่พบ	-
8/6/52	ปลาจ่อม	ตลาดมืด อ. จอมบึง จ. ราชบุรี	ไม่พบ	-
8/6/52	ปลาร้า	ตลาดมืด อ. จอมบึง จ. ราชบุรี	ไม่พบ	-

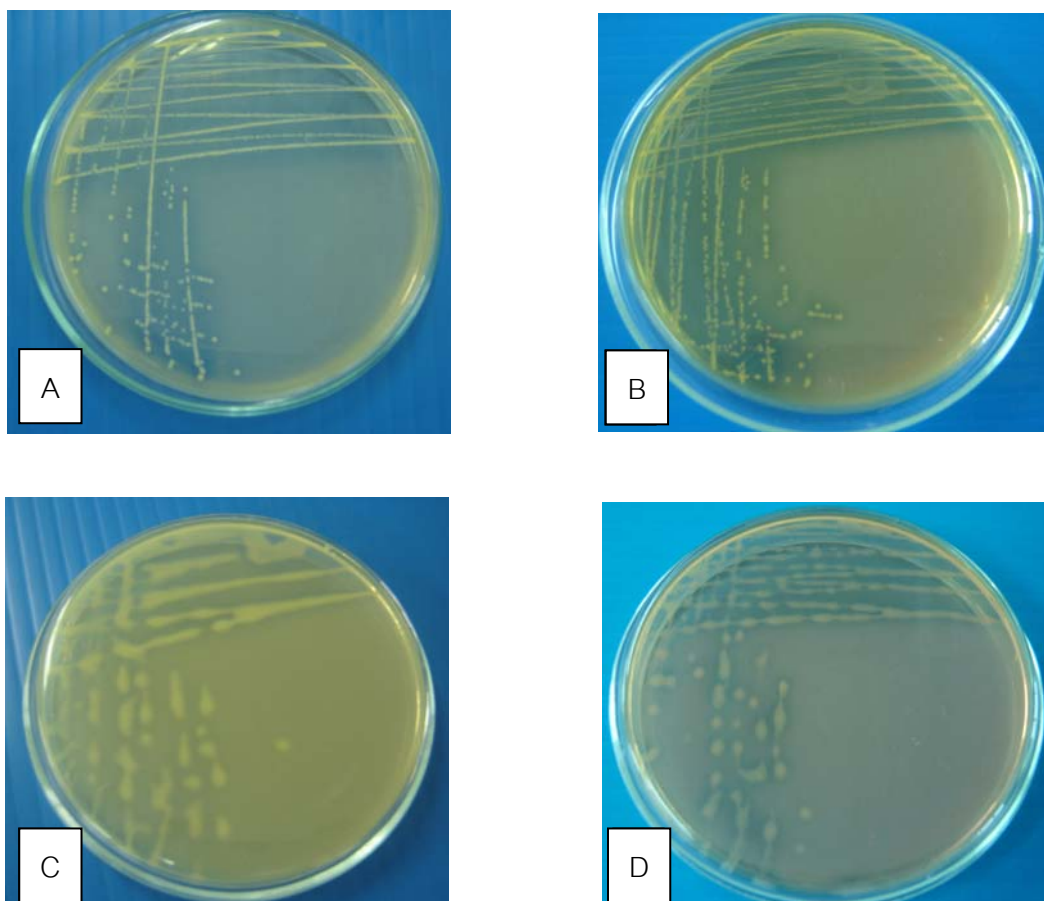
2. การคัดแยกแลบเฟจโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นโฮสต์

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 60 ไอโซเลท ที่แยกได้มาเป็นโฮสต์ สำหรับแยกแลบเฟจจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมัก โดยวิธีการส่งเสริมการเจริญตามวิธีการทดลองในข้อ 3 จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำใสที่คาดว่าจะมีแลบเฟจ จำนวน 60 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3. การตรวจสอบแลบเฟจและหาปริมาณแลบเฟจ

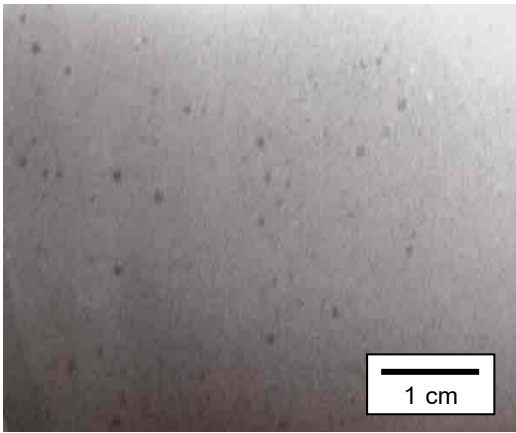
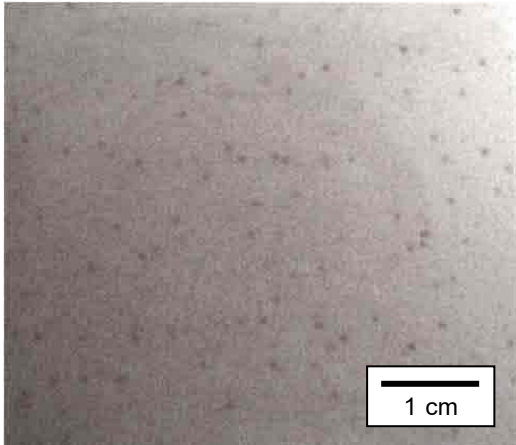
นำตัวอย่างน้ำใสที่ได้มาตรวจสอบว่ามีแลบเฟจหรือไม่ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารรูนสองชั้นตามวิธีการทดลองในข้อ 4 แล้วตรวจสอบปริมาณพลาไคที่เกิดขึ้น จากนั้นนำมาแยกเป็นพลาไคเดี่ยว (single plaque isolation) พบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 4 ตัว โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก

4 ไอโซเลทเป็นไฮสท์ (ภาพประกอบ 10) ซึ่งลักษณะพลาคของแลบเฟจแต่ละตัวมีขนาดแตกต่างกัน จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจตามวิธีการทดลองในข้อ 6 โดยลักษณะพลาค และจำนวนพลาค หลังจากทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจแสดงดังตาราง 4

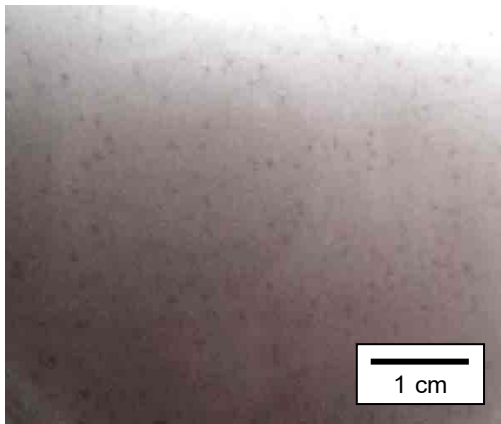
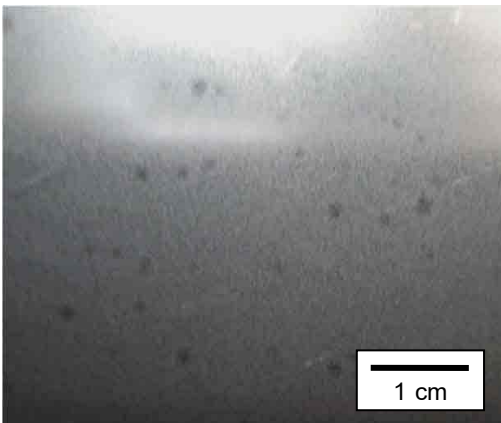


ภาพประกอบ 10 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 จำนวน 4 ไอโซเลท A. ไอโซเลท F42 B. ไอโซเลท F50 C. ไอโซเลท F57 D. ไอโซเลท F59

ตาราง 4 ลักษณะของพลาคและจำนวนพลาคหลังจากทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจ

เฟจ	จำนวนพลาค (PFU/ml)	ขนาดเส้น ผ่าน ศูนย์กลาง ของพลาค (มิลลิเมตร)	ลักษณะ ของพลาค	รูปร่างพลาค
ΦF-42	1.6×10^8	0.5-0.7	ใส	
ΦF-50	1.53×10^7	0.5	ใส	

ตาราง 4 (ต่อ)

เฟจ	จำนวนพลาค (PFU/ml)	ขนาดเส้น ผ่าน ศูนย์กลาง ของพลาค (มิลลิเมตร)	ลักษณะ ของพลาค	รูปร่างพลาค
ΦF-57	2.73×10^9	0.5	ใส	
ΦF-59	1.3×10^8	1.0	ใส	

4. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกเฟจได้

4.1 การจัดจำแนกในระดับจีนัสโดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ไอโซเลท คือ F42, F50, F57 และ F59 ซึ่งเป็นไฮสท์ที่แยกเฟจได้ มาทดสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส และการเจริญในสภาวะต่างๆ พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

ไอโซเลท	Catalase test	Gram stain	Gas from glucose	Temperature (°C)		NaCl (%)				pH			
				10	45	4.0	6.5	8	18	4.4	7.0	8.5	9.6
F42	-	positive	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
F50	-	positive	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
F57	-	positive	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
F59	-	positive	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ

4.2 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของไฮสท์ F42, F50, F57 และ F59 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยการทำ PCR พบว่าขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (base pair; bp) และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไฮโซเลข F42 (1,405 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc lactis* (GenBank accession number GU125559) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก ค ข้อ 2) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ F42 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Leuconostoc lactis* JCM6123 (GenBank accession number AB023968) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 11 ไฮโซเลข F50 (1,405 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (GenBank accession number GU138559) ร้อยละ 99 (ภาคผนวก ค ข้อ 3) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ F50 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Leuconostoc mesenteroides* NCFB 523 (GenBank accession number AB023242) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 12 ไฮโซเลข F57 (1,432 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก ค ข้อ 4) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ F57 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 13 และไฮโซเลข F59 (1,432 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก ค ข้อ 5) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ F59 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 14

		10	20	30	40	50
F42						
Leu. lactis		GGCGGCGTGC	CTAATACATG	CAAGTCGAAC	GCGCAGCGAA	AGGTGCTTGC
		60	70	80	90	100
F42		ACCTTTCAAG	CGAGTGGCGA	ACGGGTGAGT	AACACGTGGA	TAACCTGCCT
Leu. lactis		ACCTTTCAAG	CGAGTGGCGA	ACGGGTGAGT	AACACGTGGA	TAACCTGCCT
		110	120	130	140	150
F42		CAAGGCTGGG	GATAACATTT	GGAAACAGAT	GCTAATACCG	AATAAAACTT
Leu. lactis		CAAGGCTGGG	GATAACATTT	GGAAACAGAT	GCTAATACCG	AATAAAACTT
		160	170	180	190	200
F42		AGTATCGCAT	GATACAAAGT	TGAAAGGCGC	TACGGCGTCA	CCTAGAGATG
Leu. lactis		AGTATCGCAT	GATACAAAGT	TGAAAGGCGC	TACGGCGTCA	CCTAGAGATG
		210	220	230	240	250
F42		GGTCCGCGGT	GCATTAGTTA	GTTGGTGGGG	TAAAGGCCTA	CCAAGACAAT
Leu. lactis		GGTCCGCGGT	GCATTAGTTA	GTTGGTGGGG	TAAAGGCCTA	CCAAGACAAT
		260	270	280	290	300
F42		GATGCATAGC	CGAGTTGAGA	GACTGATCGG	CCACATTGGG	ACTGAGACAC
Leu. lactis		GATGCATAGC	CGAGTTGAGA	GACTGATCGG	CCACATTGGG	ACTGAGACAC
		310	320	330	340	350
F42		GGCCCAAAC	CCTACGGGAG	GCTGCAGTAG	GGAATCTTCC	ACAATGGGCG
Leu. lactis		GGCCCAAAC	CCTACGGGAG	GCTGCAGTAG	GGAATCTTCC	ACAATGGGCG
		360	370	380	390	400
F42		AAAGCCTGAT	GGAGCAACGC	CGCGTGTTG	ATGAAGGCTT	TAGGGTCGTA
Leu. lactis		AAAGCCTGAT	GGAGCAACGC	CGCGTGTTG	ATGAAGGCTT	TAGGGTCGTA
		410	420	430	440	450
F42		AAGCACTGTT	GTATGGGAAG	AAATGCTAGA	ATAGGGAATG	ATTCTAGTTC
Leu. lactis		AAGCACTGTT	GTATGGGAAG	AAATGCTAGA	ATAGGGAATG	ATTCTAGTTC
		460	470	480	490	500
F42		GACGGTACCA	TACCAGAAAG	GGACGGCTAA	ATACGTGCCA	GCAGCCGCGG
Leu. lactis		GACGGTACCA	TACCAGAAAG	GGACGGCTAA	ATACGTGCCA	GCAGCCGCGG
		510	520	530	540	550
F42		TAATACGTAT	GTCCCGAGCG	TTATCCGGAT	TTATTGGGCG	TAAAGCGAGC
Leu. lactis		TAATACGTAT	GTCCCGAGCG	TTATCCGGAT	TTATTGGGCG	TAAAGCGAGC
		560	570	580	590	600
F42		GCAGACGGTT	GATTAAGTCT	GATGTGAAAG	CCCGGAGCTC	AACTCCGGAA
Leu. lactis		GCAGACGGTT	GATTAAGTCT	GATGTGAAAG	CCCGGAGCTC	AACTCCGGAA

		610	620	630	640	650
F42						
Leu. lactis		TGGCATTGGA AACTGGTTAA CTTGAGTGTT GTAGAGGTAA GTGGAACCTCC				
		660	670	680	690	700
F42						
Leu. lactis		ATGTGTAGCG GTGGAATGCG TAGATATATG GAAGAACACC AGTGGCGAAG				
		710	720	730	740	750
F42						
Leu. lactis		GCGGCTTACT GGACAACAAC TGACGTTGAG GCTCGAAAGT GTGGGTAGCA				
		760	770	780	790	800
F42						
Leu. lactis		AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACAC CGTAAACGAT GAATACTAGG				
		810	820	830	840	850
F42						
Leu. lactis		TGTTAGGAGG TTTCCGCCTC TTAGTGCCGA AGCTAACGCA TTAAGTATTC				
		860	870	880	890	900
F42						
Leu. lactis		CGCCTGGGGA GTACGACCGC AAGGTTGAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGA				
		910	920	930	940	950
F42						
Leu. lactis		CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC				
		960	970	980	990	1000
F42						
Leu. lactis		CTTACCAGGT CTTGACATCC TTTGAAGCTT CTAGAGATAG AAGTGTCTC				
		1010	1020	1030	1040	1050
F42						
Leu. lactis		TTCGGAGACA AAGTGACAGG TGGTGCATGG TCGTCGTCAG CTCGTGTCGT				
		1060	1070	1080	1090	1100
F42						
Leu. lactis		GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCTTAT TGTTAGTTGC				
		1110	1120	1130	1140	1150
F42						
Leu. lactis		CAGCATTAG TTGGGCACTC TAGCGAGACT GCCGGTGACA AACC GGAGGA				
		1160	1170	1180	1190	1200
F42						
Leu. lactis		AGGCGGGGAC GACGTCAGAT CATCATGCCC CTTATGACCT GGGCTACACA				

```

          1210          1220          1230          1240          1250
F42      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. lactis CGTGCTACAA TGGCGTATAC AACGAGTTGC CAACCCGCGA GGGTGAGCTA

          1260          1270          1280          1290          1300
F42      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. lactis ATCTCTTAAA GTACGTCTCA GTTCGGACTG CAGTCTGCAA CTCGACTGCA

          1310          1320          1330          1340          1350
F42      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. lactis CGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGCGGATC AGCACGCCGC GGTGAATACG

          1360          1370          1380          1390          1400
F42      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. lactis TTCCCGGGTC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TTTGTAATGC

          1410          1420          1430          1440          1450
F42      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. lactis CCAAAGCCGG TGGCCTAACC TTATGGAGG A----- GGCAGGACAG

F42      .
Leu. lactis A

```

ภาพประกอบ 11 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F42 กับ type strain ของ *Leuconostoc lactis* JCM6123 (GenBank accession number AB023968)

		10	20	30	40	50
F50						
Leu. mesenteroides		GCGGCGTGCC	TAATACATGC	AAGTCGAACG	CACAGCGAAA	GGTGCTTGCA
		60	70	80	90	100
F50						
Leu. mesenteroides		CCTTTC AAGT	GAGTGGCGAA	CGGGTGAGTA	ACACGTGGAC	AACCTGCC TC
		110	120	130	140	150
F50						
Leu. mesenteroides		AAGGCTGGGG	ATAACATTTG	GAAACAGATG	CTAATACCGA	ATAAAAC TTA
		160	170	180	190	200
F50						
Leu. mesenteroides		GTGTCGCATG	ACACAAAGTT	AAAAGGCGCT	TCGGCGTCAC	CTAGAGATGG
		210	220	230	240	250
F50						
Leu. mesenteroides		ATCCGCGGTG	CATTAGTTAG	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGACAATG
		260	270	280	290	300
F50						
Leu. mesenteroides		ATGCATAGCC	GAGTTGAGAG	ACTGATCGGC	CACATTGGGA	CTGAGACACG
		310	320	330	340	350
F50						
Leu. mesenteroides		GCCCAAAC TC	CTACGGGAGG	CTGCAGTAGG	GAATCTTCCA	CAATGGGCGA
		360	370	380	390	400
F50						
Leu. mesenteroides		AAGCCTGATG	GAGCAACGCC	GCGTGTGTGA	TGAAGGCTTT	CGGGTCGTAA
		410	420	430	440	450
F50						
Leu. mesenteroides		AGCACTGTTG	TATGGGAAGA	ACAGCTAGAA	TAGGAAATGA	TTTTAGTTTG
		460	470	480	490	500
F50						
Leu. mesenteroides		ACGGTACCAT	ACCAGAAAGG	GACGGCTAAA	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT
		510	520	530	540	550
F50						
Leu. mesenteroides		AATACGTATG	TCCCAGACGT	TATCCGGATT	TATTGGGCGT	AAAGCGAGCG
		560	570	580	590	600
F50						
Leu. mesenteroides		CAGACGGTTT	ATTAAGTCTG	ATGTGAAAGC	CCGGAGCTCA	ACTCCGGAAT

```

        610        620        630        640        650
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides GGCATTGGAA ACTGGTTAAC TTGAGTGCAG TAGAGGTAAG TGGAACTCCA
        660        670        680        690        700
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides TGTGTAGCGG TGGAAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA GTGGCGAAGG
        710        720        730        740        750
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides CGGCTTACTG GACTGCAACT GACGTTGAGG CTCGAAAGTG TGGGTAGCAA
        760        770        780        790        800
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACACC GTAAACGATG AACACTAGGT
        810        820        830        840        850
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides GTTAGGAGGT TTCCGCCCTCT TAGTGCCGAA GCTAACGCAT TAAGTGTTC
        860        870        880        890        900
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides GCCTGGGGAG TACGACCGCC AGGTTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGAC
        910        920        930        940        950
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides CCGCACAAGC GGTGGAACAT GTGGTTTAAT TCGAAGCAAC GCGAAGAACC
        960        970        980        990        1000
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides TTACCAGGTC TTGACATCCT TTGAAGCTTT TAGAGATAGA AGTGTTCCT
        1010       1020       1030       1040       1050
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides TCGGAGACAA AGTGACAGGT GGTGCATGGT CGTCGTCAGC TCGTGTCTGT
        1060       1070       1080       1090       1100
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCCTATT GTTAGTTGCC
        1110       1120       1130       1140       1150
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides AGCATTCAGA TGGGCACCTCT AGCGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA
        1160       1170       1180       1190       1200
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides GGCGGGGACG ACGTCAGATC ATCATGCCCC TTATGACCTG GGCTACACAC

```

```

          1210      1220      1230      1240      1250
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides GTGCTACAAT GGCGTATACA ACGAGTTGCC AACCCGCGAG GGTGAGCTAA

          1260      1270      1280      1290      1300
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides TCTCTTAAAG TACGTCTCAG TTCGGATTGT AGTCTGCAAC TCGACTACAT

          1310      1320      1330      1340      1350
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCACGCCGCG GTGAATACGT

          1360      1370      1380      1390      1400
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides TCCCGGGTCT TGTACACACC GCCCGTCACA CCATGGGAGT TTGTAATGCC

          1410      1420      1430      1440
F50      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Leu. mesenteroides CAAAGCCGGT GGCCTAACCT TTTAGCCT-- ----
                  CAAAGCCGGT GGCCTAACCT TTTAGGAAGG AGCCGTCTAA GGCAGG

```

ภาพประกอบ 12 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F50 กับ type strain ของ *Leuconostoc mesenteroides* NCFB 523 (GenBank accession number AB023242)

		10	20	30	40	50
F57						
W. cibaria		GATGAACGCT	GGCGGCGTGC	CTAATACATG	CAAGTCGAAC	GCTTTGTGGT
		60	70	80	90	100
F57						
W. cibaria		TCAACTGATT	TGAAGAGCTT	GCTCAGATAT	GACGATGGAC	ATTGCAAAGA
		110	120	130	140	150
F57						
W. cibaria		GTGGCGAACG	GGTGAGTAAC	ACGTGGGAAA	CCTACCTCTT	AGCAGGGGAT
		160	170	180	190	200
F57						
W. cibaria		AACATTTGGA	AACAGATGCT	AATACCGTAT	AACAATAGCA	ACCGCATGGT
		210	220	230	240	250
F57						
W. cibaria		TGCTACTTAA	AAGATGGTTC	TGCTATCACT	AAGAGATGGT	CCCGCGGTGC
		260	270	280	290	300
F57						
W. cibaria		ATTAGTTAGT	TGGTGAGGTA	ATGGCTCACC	AAGACGATGA	TGCATAGCCG
		310	320	330	340	350
F57						
W. cibaria		AGTTGAGAGA	CTGATCGGCC	ACAATGGGAC	TGAGACACGG	CCCATACTCC
		360	370	380	390	400
F57						
W. cibaria		TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGG
		410	420	430	440	450
F57						
W. cibaria		AGCAACGCCG	CGTGTTGTAT	GAAGGGTTTC	GGCTCGTAAA	ACACTGTTGT
		460	470	480	490	500
F57						
W. cibaria		AAGAGAAGAA	TGACATTGAG	AGTAAC TGTT	CAATGTGTGA	CGGTATCTTA
		510	520	530	540	550
F57						
W. cibaria		CCAGAAAGGA	ACGGCTAAAT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGTATGT
		560	570	580	590	600
F57						
W. cibaria		TCCAAGCGTT	ATCCGGATTT	ATTGGGCGTA	AAGCGAGCGC	AGACGGTTAT

	610	620	630	640	650
F57					
W. cibaria	TTAAGTCTGA	AGTGAAAGCC	CTCAGCTCAA	CTGAGGAATT	GCTTTTGGAAA
	660	670	680	690	700
F57					
W. cibaria	CTGGATGACT	TGAGTGCAGT	AGAGGAAAGT	GGAAGTCCAT	GTGTAGCGGT
	710	720	730	740	750
F57					
W. cibaria	GAAATGCGTA	GATATATGGA	AGAACACCAG	TGGCGAAGGC	GGCTTTCTGG
	760	770	780	790	800
F57					
W. cibaria	ACTGTAACTG	ACGTTGAGGC	TCGAAAGTGT	GGGTAGCAAA	CAGGATTAGA
	810	820	830	840	850
F57					
W. cibaria	TACCCTGGTA	GTCCACACCG	TAAACGATGA	GTGCTAGGTG	TTTGAGGGTT
	860	870	880	890	900
F57					
W. cibaria	TCCGCCCTTA	AGTGCCGCAG	CTAACGCATT	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT
	910	920	930	940	950
F57					
W. cibaria	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG
	960	970	980	990	1000
F57					
W. cibaria	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGTCT
	1010	1020	1030	1040	1050
F57					
W. cibaria	TGACATCCCT	TGACAACTCC	AGAGATGGAG	CGTTCCCTTC	GGGGACAAGG
	1060	1070	1080	1090	1100
F57					
W. cibaria	TGACAGGTGG	TGCATGGTTG	TCGTCTAGCTC	GTGTCGTGAG	ATGTTGGGTT
	1110	1120	1130	1140	1150
F57					
W. cibaria	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTATTAC	TAGTTGCCAG	CATTTAGTTG
	1160	1170	1180	1190	1200
F57					
W. cibaria	GGCACTCTAG	TGAGACTGCC	GGTGACAAAC	CGGAGGAAGG	TGGGGATGAC

```

      1210      1220      1230      1240      1250
F57      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG

      1260      1270      1280      1290      1300
F57      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria CGTATACAAC GAGTTGCCAA CCCGCGAGGG TGAGCTAATC TCTTAAAGTA

      1310      1320      1330      1340      1350
F57      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria CGTCTCAGTT CGGATTGTAG GCTGCAACTC GCCTACATGA AGTCGGAATC

      1360      1370      1380      1390      1400
F57      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria GCTAGTAATC GCGGATCAGC ACGCCGCGGT GAATACGTTT CCGGGTCTTG

      1410      1420      1430      1440      1450
F57      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria TACACACCGC CCGTCACACC ATGAGAGTTT GTAACACCCA AAGCCGGTGG

      1460      1470      1480      1490      1500
F57      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria GGTAACCTT- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
GGTAACCTTC GGGAGCCAGC CGTCTAAGGT GGGACAGATG ATTAGGGTGA

      1510      1520
F57      ....|....| ....|....| ....|....|
W. cibaria AGTCGTAACA AGGTAGCCGT AGGAGAACC

```

ภาพประกอบ 13 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต F57

กับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989)

		10	20	30	40	50
F59						
W. cibaria		-----TG	CAAGTCGAAC	GCTTTGTGGT		
		GA	TGAACGCT	GGCGGCGTGC	CTAATACATG	CAAGTCGAAC
						GCTTTGTGGT
		60	70	80	90	100
F59						
W. cibaria		TCAACTGATT	TGAAGAGCTT	GCTCAGATAT	GACGATGGAC	ATTGCAAAGA
		TCAACTGATT	TGAAGAGCTT	GCTCAGATAT	GACGATGGAC	ATTGCAAAGA
		110	120	130	140	150
F59						
W. cibaria		GTGGCGAACG	GGTGAGTAAC	ACGTGGGAAA	CCTACCTCTT	AGCAGGGGAT
		GTGGCGAACG	GGTGAGTAAC	ACGTGGGAAA	CCTACCTCTT	AGCAGGGGAT
		160	170	180	190	200
F59						
W. cibaria		AACATTTGGA	AACAGATGCT	AATACCGTAT	AACAATAGCA	ACCGCATGGT
		AACATTTGGA	AACAGATGCT	AATACCGTAT	AACAATAGCA	ACCGCATGGT
		210	220	230	240	250
F59						
W. cibaria		TGCTACTTAA	AAGATGGTTC	TGCTATCACT	AAGAGATGGT	CCCGCGGTGC
		TGCTACTTAA	AAGATGGTTC	TGCTATCACT	AAGAGATGGT	CCCGCGGTGC
		260	270	280	290	300
F59						
W. cibaria		ATTAGTTAGT	TGGTGAGGTA	ATGGCTCACC	AAGACGATGA	TGCATAGCCG
		ATTAGTTAGT	TGGTGAGGTA	ATGGCTCACC	AAGACGATGA	TGCATAGCCG
		310	320	330	340	350
F59						
W. cibaria		AGTTGAGAGA	CTGATCGGCC	ACAATGGGAC	TGAGACACGG	CCCATACTCC
		AGTTGAGAGA	CTGATCGGCC	ACAATGGGAC	TGAGACACGG	CCCATACTCC
		360	370	380	390	400
F59						
W. cibaria		TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGG
		TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGG
		410	420	430	440	450
F59						
W. cibaria		AGCAACGCCG	CGTGTTGTGAT	GAAGGGTTTC	GGCTCGTAAA	ACACTGTTGT
		AGCAACGCCG	CGTGTTGTGAT	GAAGGGTTTC	GGCTCGTAAA	ACACTGTTGT
		460	470	480	490	500
F59						
W. cibaria		AAGAGAAGAA	TGACATTGAG	AGTAACTGTT	CAATGTGTGA	CGGTATCTTA
		AAGAGAAGAA	TGACATTGAG	AGTAACTGTT	CAATGTGTGA	CGGTATCTTA
		510	520	530	540	550
F59						
W. cibaria		CCAGAAAGGA	ACGGCTAAAT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGTATGT
		CCAGAAAGGA	ACGGCTAAAT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGTATGT
		560	570	580	590	600
F59						
W. cibaria		TCCAAGCGTT	ATCCGGATTT	ATTGGGCGTA	AAGCGAGCGC	AGACGGTTAT
		TCCAAGCGTT	ATCCGGATTT	ATTGGGCGTA	AAGCGAGCGC	AGACGGTTAT

		610	620	630	640	650
F59						
W. cibaria		TTAAGTCTGA AGTGAAAGCC CTCAGCTCAA CTGAGGAATT GCTTTGGAAA				
		660	670	680	690	700
F59						
W. cibaria		CTGGATGACT TGAGTGCAGT AGAGGAAAAGT GGAACCTCCAT GTGTAGCGGT				
		710	720	730	740	750
F59						
W. cibaria		GAAATGCGTA GATATATGGA AGAACACCAG TGGCGAAGGC GGCTTTCTGG				
		760	770	780	790	800
F59						
W. cibaria		ACTGTAAC TG ACGTTGAGGC TCGAAAGTGT GGGTAGCAAA CAGGATTAGA				
		810	820	830	840	850
F59						
W. cibaria		TACCCTGGTA GTCCACACCG TAAACGATGA GTGCTAGGTG TTTGAGGGTT				
		860	870	880	890	900
F59						
W. cibaria		TCCGCCCTTA AGTGCCGCAG CTAACGCATT AAGCACTCCG CCTGGGGAGT				
		910	920	930	940	950
F59						
W. cibaria		ACGACCGCAA GGTTGAAACT CAAAGGAATT GACGGGGACC CGCACAAAGCG				
		960	970	980	990	1000
F59						
W. cibaria		GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG CGAAGAACCCT TACCAGGTCT				
		1010	1020	1030	1040	1050
F59						
W. cibaria		TGACATCCCT TGACAACTCC AGAGATGGAG CGTTCCCTTC GGGGACAAGG				
		1060	1070	1080	1090	1100
F59						
W. cibaria		TGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT				
		1110	1120	1130	1140	1150
F59						
W. cibaria		AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTATTAC TAGTTGCCAG CATTTAGTTG				
		1160	1170	1180	1190	1200
F59						
W. cibaria		GGCACTCTAG TGAGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC				

		1210	1220	1230	1240	1250
F59						
W. cibaria		GTCAAATCAT	CATGCCCCCTT	ATGACCTGGG	CTACACACGT	GCTACAATGG
		GTCAAATCAT	CATGCCCCCTT	ATGACCTGGG	CTACACACGT	GCTACAATGG
		1260	1270	1280	1290	1300
F59						
W. cibaria		CGTATACAAC	GAGTTGCCAA	CCCGCGAGGG	TGAGCTAATC	TCTTAAAGTA
		CGTATACAAC	GAGTTGCCAA	CCCGCGAGGG	TGAGCTAATC	TCTTAAAGTA
		1310	1320	1330	1340	1350
F59						
W. cibaria		CGTCTCAGTT	CGGATTGTAG	GCTGCAACTC	GCCTACATGA	AGTCGGAATC
		CGTCTCAGTT	CGGATTGTAG	GCTGCAACTC	GCCTACATGA	AGTCGGAATC
		1360	1370	1380	1390	1400
F59						
W. cibaria		GCTAGTAATC	GCGGATCAGC	ACGCCGCGGT	GAATACGTTC	CCGGGTCTTG
		GCTAGTAATC	GCGGATCAGC	ACGCCGCGGT	GAATACGTTC	CCGGGTCTTG
		1410	1420	1430	1440	1450
F59						
W. cibaria		TACACACCGC	CCGTCACACC	ATGAGAGTTT	GTAACACCCA	AAGCCGGTGG
		TACACACCGC	CCGTCACACC	ATGAGAGTTT	GTAACACCCA	AAGCCGGTGG
		1460	1470	1480	1490	1500
F59						
W. cibaria		GGTAACCTTC	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
		GGTAACCTTC	GGGAGCCAGC	CGTCTAAGGT	GGGACAGATG	ATTAGGGTGA
		1510	1520			
F59						
W. cibaria		AGTCGTAACA	AGGTAGCCGT	AGGAGAACC		

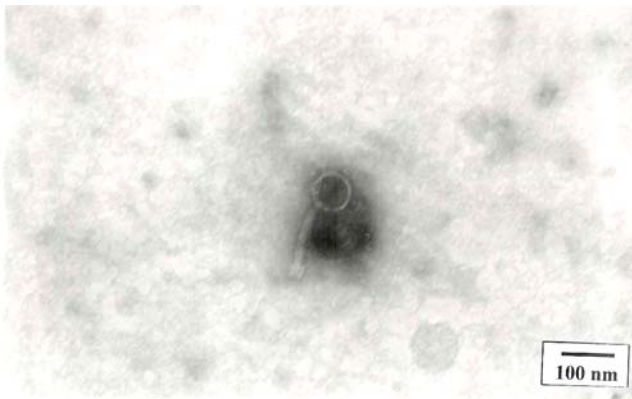
ภาพประกอบ 14 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F59

กับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989)

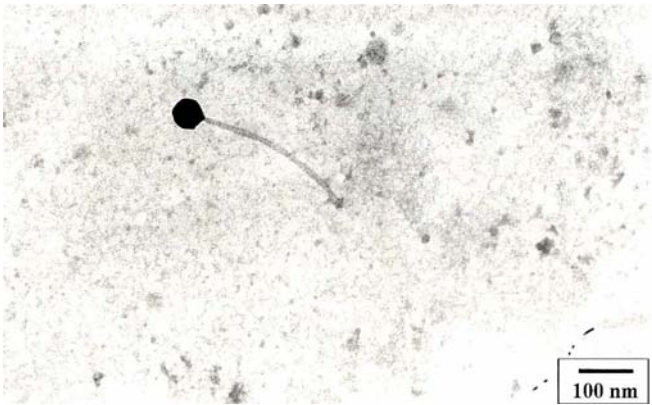
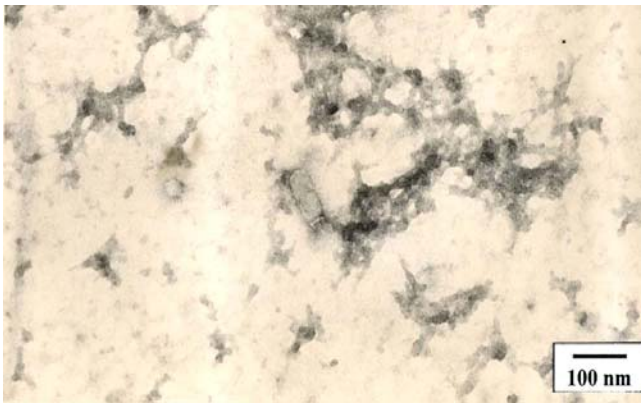
5. การศึกษารูปร่างของแลบเฟจ

เมื่อทำการศึกษารูปร่างของแลบเฟจทั้ง 4 ตัว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า เฟจ 4 ตัว จัดอยู่ใน 2 แฟมิลี โดยเฟจ Φ F-42 และเฟจ Φ F-50 มีส่วนหัวเป็นหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 82 และ 64 นาโนเมตร ตามลำดับ และส่วนหางไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 182 และ 327 นาโนเมตร ตามลำดับ จากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเฟจนี้จัดอยู่ในแฟมิลี Siphoviridae ส่วนเฟจ Φ F-57 และ Φ F-59 มีส่วนหัวเป็นหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 94 x 44 และ 96 x 43 นาโนเมตร ตามลำดับ และส่วนหางสั้นไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 31 และ 23 นาโนเมตร ตามลำดับ จัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae (ตาราง 6)

ตาราง 6 ผลการศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เฟจ	ขนาดส่วนหัว (นาโนเมตร)	ความยาวส่วน หาง (นาโนเมตร)	รูปร่างของเฟจ
Φ F-42	82	182	

ตาราง 6 (ต่อ)

เฟลจ	ขนาดส่วนหัว (นาโนเมตร)	ความยาวส่วนหาง (นาโนเมตร)	รูปร่างของเฟลจ
ΦF-50	64	327	
ΦF-57	94 x 44	31	
ΦF-59	96 x 43	23	

6. การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้กับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่น

จากการทดสอบแลบเฟจในการติดเชื้กับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่นของแลบเฟจทั้ง 4 ตัว โดยทดสอบกับแบคทีเรียกรดแลคติก 17 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน พบว่าแลบเฟจทั้ง 3 ตัว คือ Φ F-42, Φ F-50 และ Φ F-57 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้กับแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากการทดลองนอกเหนือจากสายพันธุ์ที่ใช้แยกแลบเฟจได้ ยกเว้นเฟจ Φ F-59 ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้กับ *Weissella cibaria* F57 และเมื่อทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่น คือ *Weissella cibaria* N22, *Lb. plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lc. lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *Streptococcus salivarius* JCM 57007 พบว่ามีเพียงเฟจ Φ F-59 เท่านั้น ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้กับ *Weissella cibaria* N22 ได้ ส่วนแลบเฟจอีก 3 ตัว ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้กับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่นที่นำมาทดสอบได้ ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ผลการทดสอบแลบเฟจในการติดเชื้กับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่น

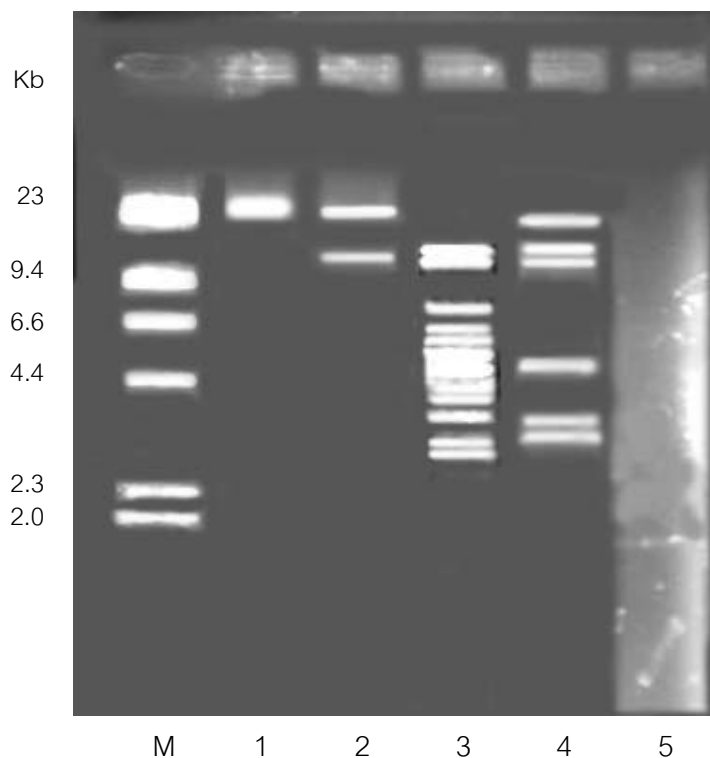
เฟจ ไอโซลท์	Φ F-42	Φ F-50	Φ F-57	Φ F-59	รวม
F6	-	-	-	-	0
F17	-	-	-	-	0
F19	-	-	-	-	0
F20	-	-	-	-	0
F22	-	-	-	-	0
F26	-	-	-	-	0
F27	-	-	-	-	0
F30	-	-	-	-	0

ตาราง 7 (ต่อ)

เฟลจ ไฮสท์	ΦF-42	ΦF-50	ΦF-57	ΦF-59	รวม
F34	-	-	-	-	0
F35	-	-	-	-	0
F42	+	-	-	-	1
F48	-	-	-	-	0
F49	-	-	-	-	0
F50	-	+	-	-	1
F51	-	-	-	-	0
F57	-	-	+	+	2
F59	-	-	-	+	1
<i>Weissella cibaria</i> N22	-	-	-	+	1
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	-	-	-	-	0
<i>Lb. sakei</i> JCM 1157	-	-	-	-	0
<i>Lc. lactis</i> JCM 7638	-	-	-	-	0
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TUA 1344L	-	-	-	-	0
<i>Leu. mesenteroides</i> JCM 6124	-	-	-	-	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	-	-	-	-	0
<i>P. pentosaceus</i> JCM 5890	-	-	-	-	0
<i>Streptococcus salivarius</i> JCM 57007	-	-	-	-	0
รวม	1	1	1	3	

7. การตรวจสอบดีเอ็นเอของแลบเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส

ได้สกัดดีเอ็นเอของแลบเฟจทั้ง 4 ตัว คือ เฟจ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 ตามวิธีการทดลองในข้อ 9 จากนั้นนำดีเอ็นเอของแลบเฟจมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ เมื่อพบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์จึงนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด ได้แก่ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI*, *MluI* และ *NdeI* พบว่าดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-42 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *NdeI* และ *BglII* (ภาพประกอบ 15, 16) ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-50 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BglII*, *BamHI* และ *NdeI* (ภาพประกอบ 17, 18) ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* (ภาพประกอบ 19, 20, 21) ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-59 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* (ภาพประกอบ 22, 23)



ภาพประกอบ 15 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-42 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *HindIII*

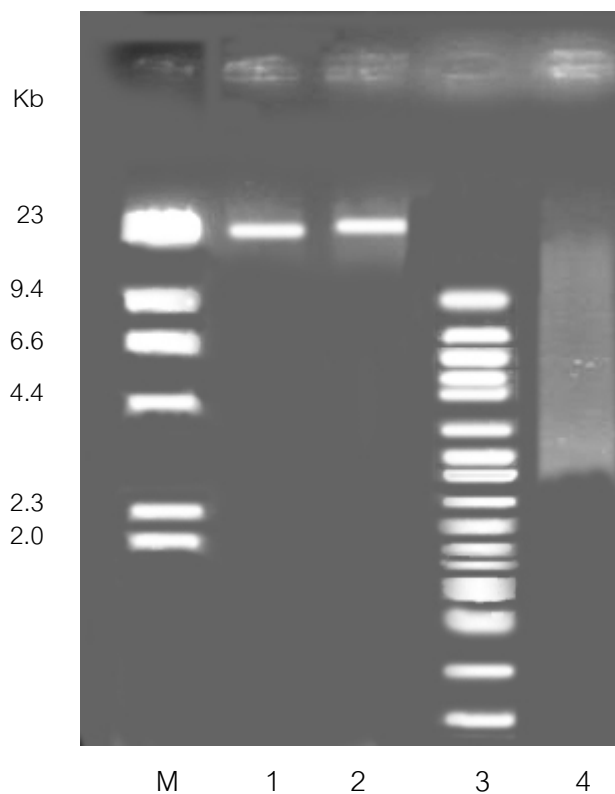
แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV*

แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI*

แถว 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI*



ภาพประกอบ 16 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-42 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

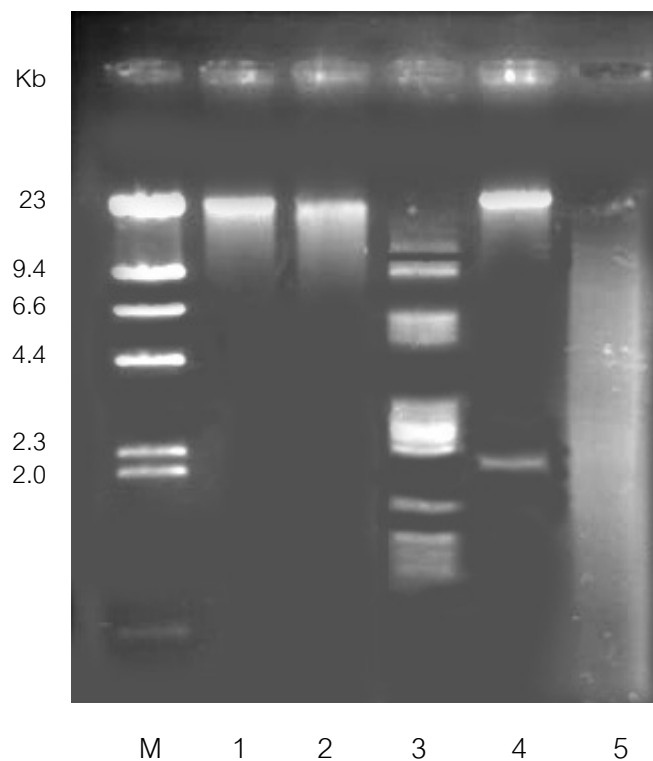
แถว M คือ Lambda DNA marker/ *Hind*III

แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I



ภาพประกอบ 17 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-50 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *HindIII*

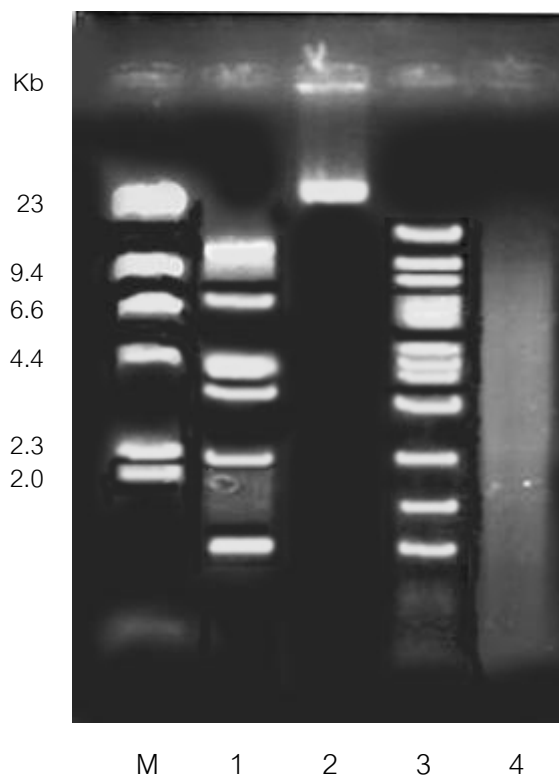
แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV*

แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI*

แถว 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI*



ภาพประกอบ 18 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-50 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

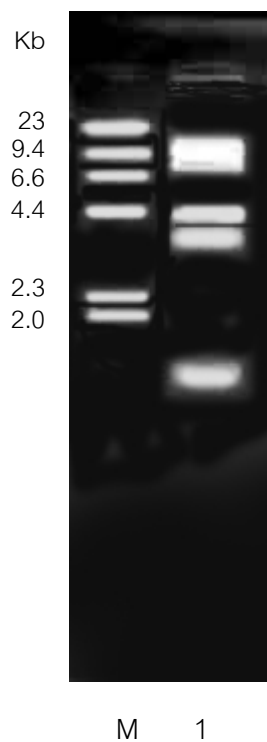
แถว M คือ Lambda DNA marker/ *Hind*III

แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

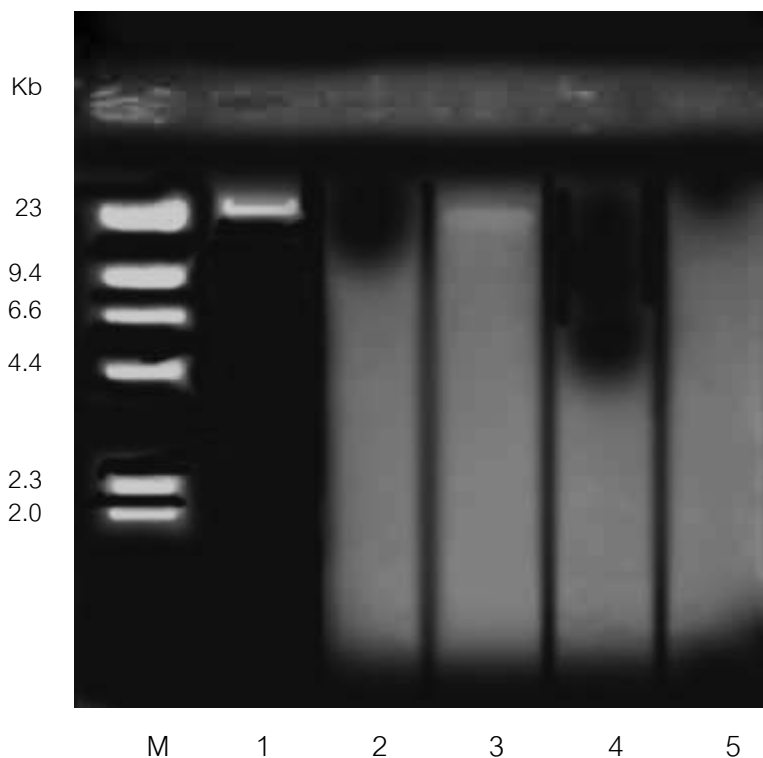
แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I



ภาพประกอบ 19 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *Hind*III

แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I



ภาพประกอบ 20 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *HindIII*

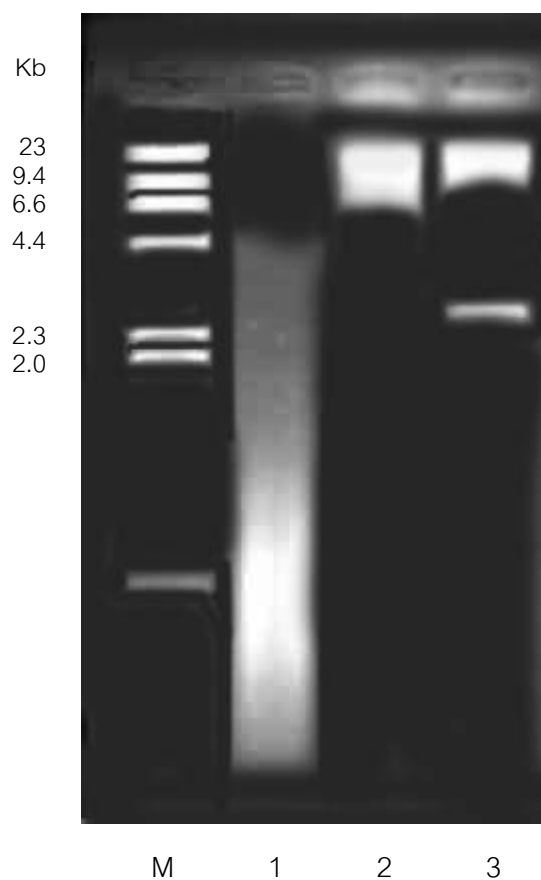
แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

แถว 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV*



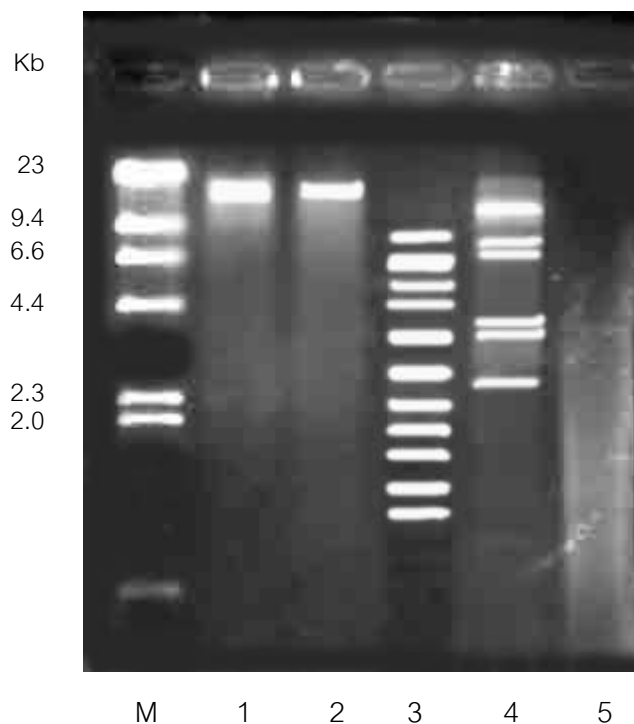
ภาพประกอบ 21 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *Hind*III

แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



ภาพประกอบ 22 ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-59 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *HindIII*

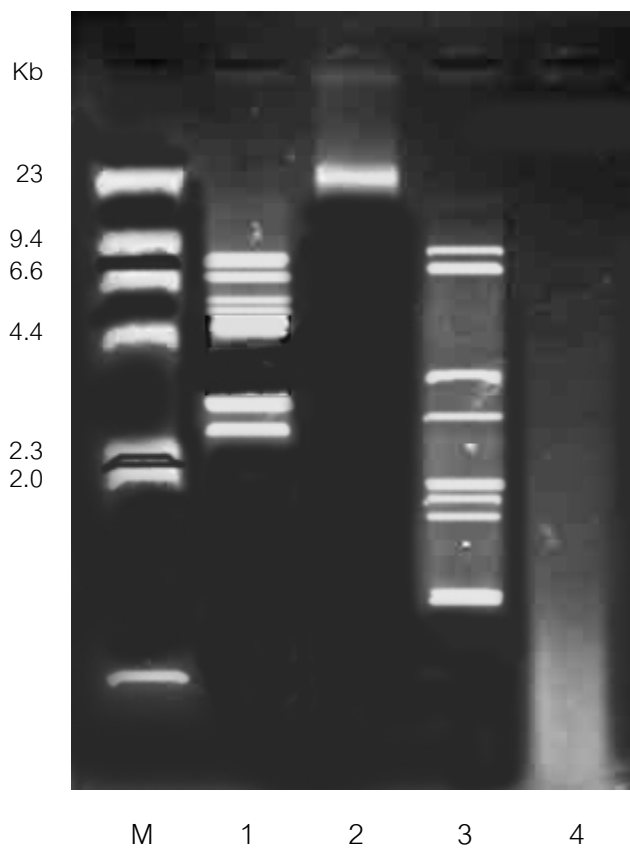
แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV*

แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI*

แถว 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI*



ภาพประกอบ 23 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-59 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ Lambda DNA marker/ *HindIII*

แถว 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

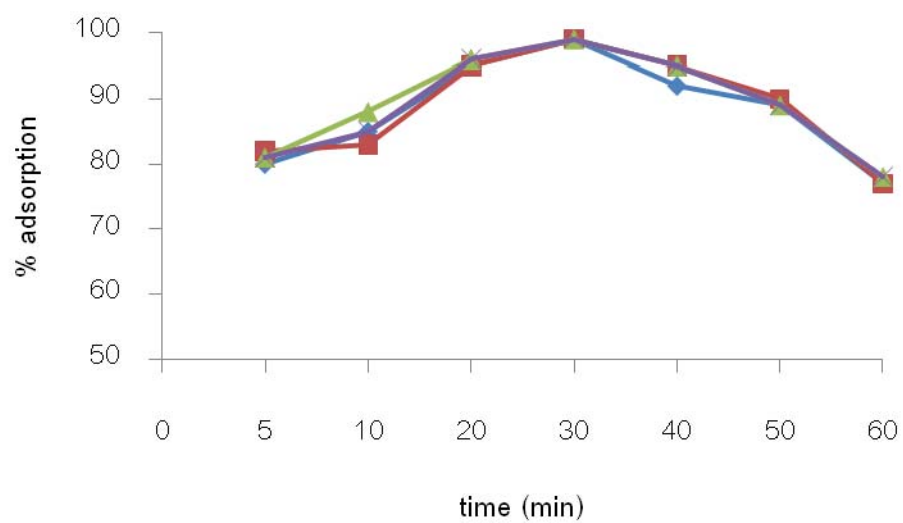
แถว 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

แถว 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

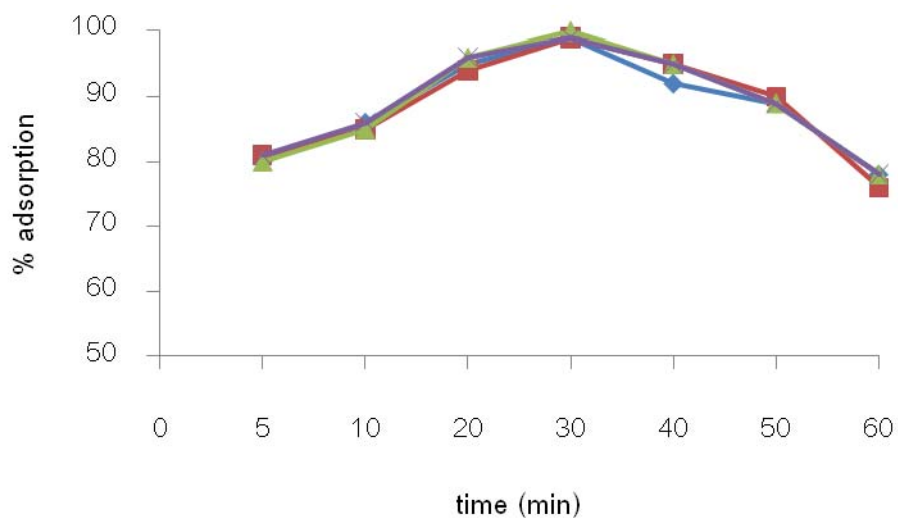
แถว 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

8. การศึกษาผลของไดวาเลนซ์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ

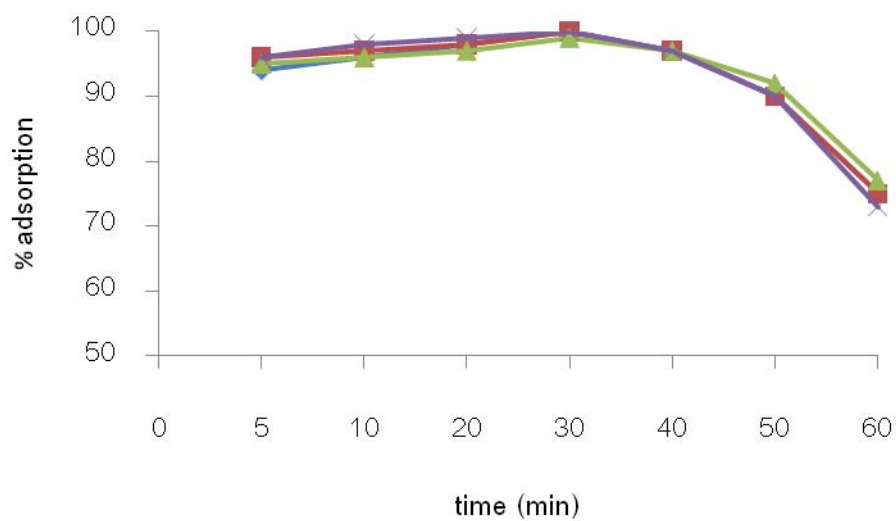
จากการศึกษาผลของไดวาเลนซ์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจทั้ง 4 ตัว โดยการนำมาทำการติดเชื้อด้วยแลบเฟจในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 หรือ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 หรือ MgCl_2 ให้ผลไม่ต่างกัน โดยเฟจ $\Phi\text{F-42}$ สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 81, 85, 95 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 (ภาพประกอบ 24) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 81, 85, 95 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี MgCl_2 (ภาพประกอบ 25) เฟจ $\Phi\text{F-50}$ สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 95, 97, 98 และ 100 ในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 (ภาพประกอบ 26) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 95, 97, 98 และ 100 ในอาหาร MRS broth ที่มี MgCl_2 (ภาพประกอบ 27) ในระยะเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ ส่วนเฟจ $\Phi\text{F-57}$ สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 80, 93 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 (ภาพประกอบ 28) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 80, 93 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี MgCl_2 (ภาพประกอบ 29) เฟจ $\Phi\text{F-59}$ สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 78, 91 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 (ภาพประกอบ 30) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 78, 91 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี MgCl_2 (ภาพประกอบ 31) ในระยะเวลา 5, 10 และ 20 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเข้าติดโฮสต์ของแลบเฟจในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีการเติม CaCl_2 หรือ MgCl_2 ก็ให้ผลไม่ต่างกัน ดังนั้นจะเห็นว่าไดวาเลนซ์แคทไอออนทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ



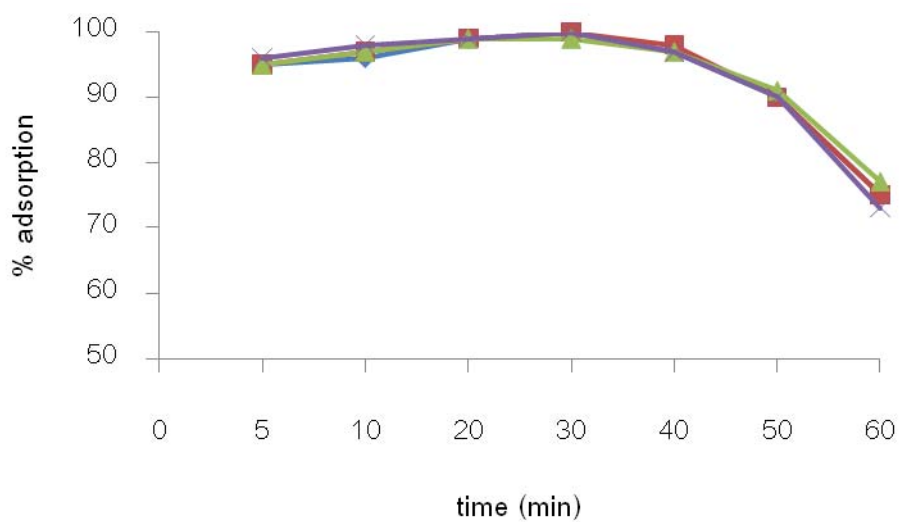
ภาพประกอบ 24 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ $\Phi\text{F-42}$ ในอาหารที่มี CaCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ ($\diamond$) 10 มิลลิโมลาร์ ($\blacksquare$), 20 มิลลิโมลาร์ ($\blacktriangle$) และ 30 มิลลิโมลาร์ ($\times$)



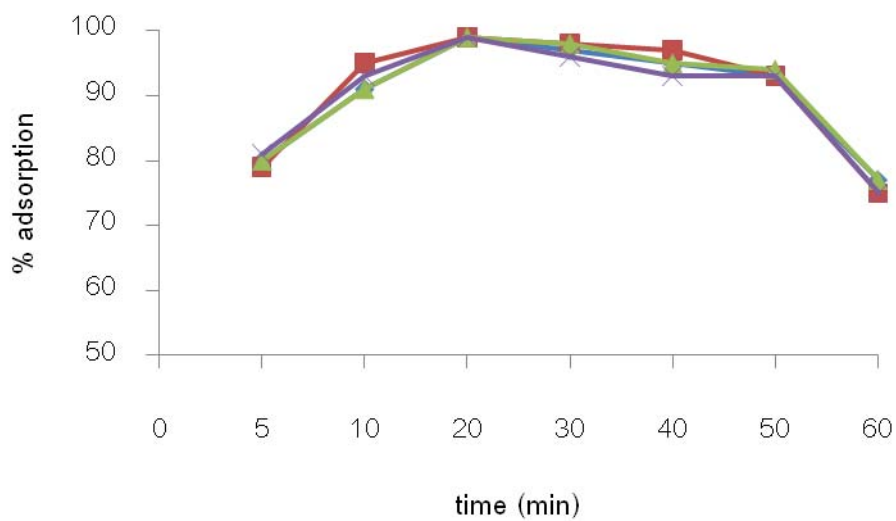
ภาพประกอบ 25 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ $\Phi\text{F-42}$ ในอาหารที่มี MgCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ ($\diamond$) 10 มิลลิโมลาร์ ($\blacksquare$), 20 มิลลิโมลาร์ ($\blacktriangle$) และ 30 มิลลิโมลาร์ ($\times$)



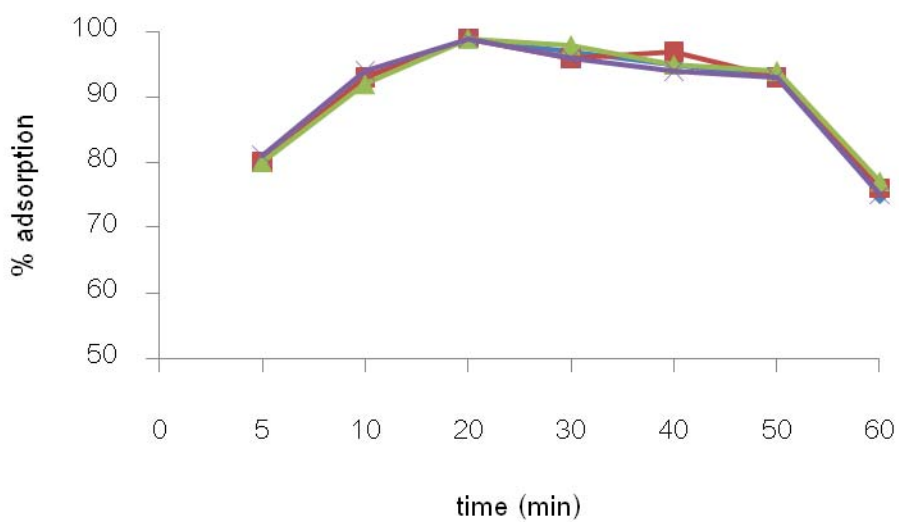
ภาพประกอบ 26 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ ΦF-50 ในอาหารที่มี CaCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (—◆—)
10 มิลลิโมลาร์ (—■—), 20 มิลลิโมลาร์ (—▲—) และ 30 มิลลิโมลาร์ (—×—)



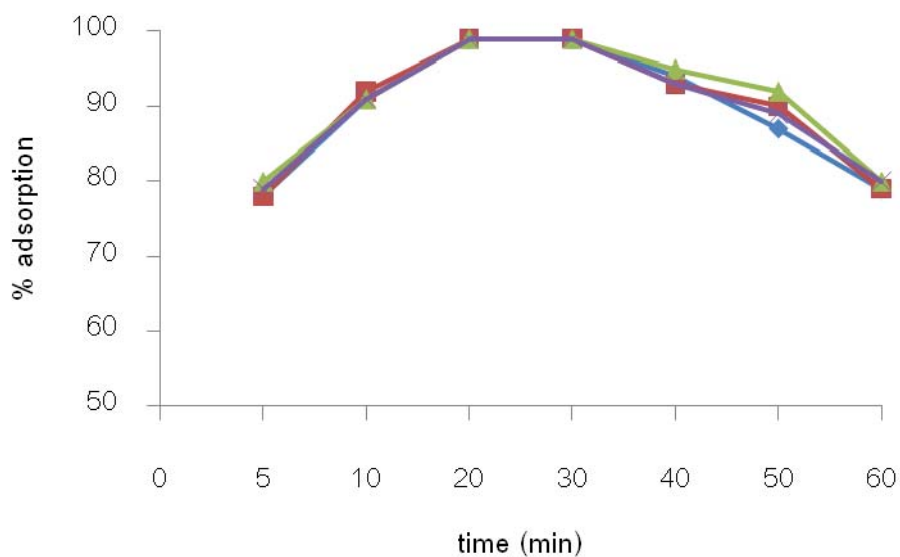
ภาพประกอบ 27 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ ΦF-50 ในอาหารที่มี MgCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (—◆—)
10 มิลลิโมลาร์ (—■—), 20 มิลลิโมลาร์ (—▲—) และ 30 มิลลิโมลาร์ (—×—)



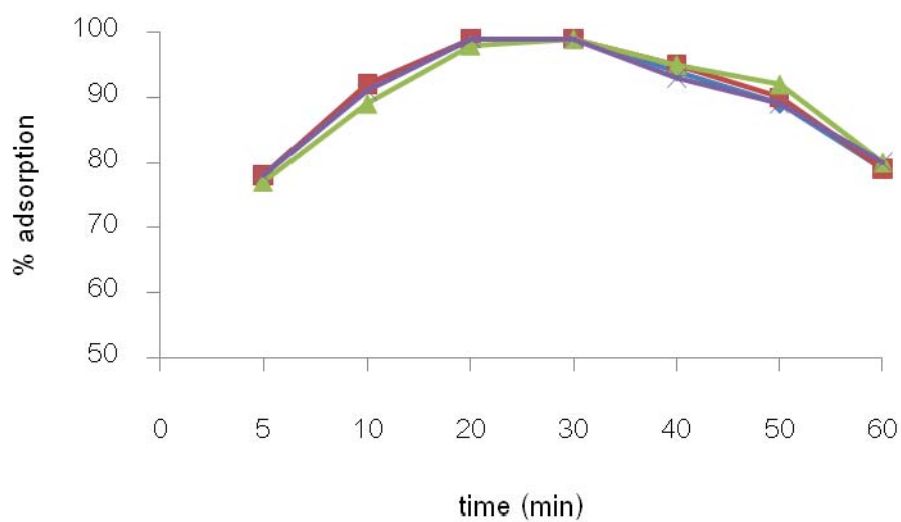
ภาพประกอบ 28 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ ΦF-57 ในอาหารที่มี CaCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (—◇—)
10 มิลลิโมลาร์ (—■—), 20 มิลลิโมลาร์ (—▲—) และ 30 มิลลิโมลาร์ (—×—)



ภาพประกอบ 29 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ ΦF-57 ในอาหารที่มี MgCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (—◇—)
10 มิลลิโมลาร์ (—■—), 20 มิลลิโมลาร์ (—▲—) และ 30 มิลลิโมลาร์ (—×—)



ภาพประกอบ 30 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ ΦF-59 ในอาหารที่มี CaCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (—◇—)
10 มิลลิโมลาร์ (—■—), 20 มิลลิโมลาร์ (—▲—) และ 30 มิลลิโมลาร์ (—×—)



ภาพประกอบ 31 การเข้าเกาะติดไฮสท์ของเฟลจ ΦF-59 ในอาหารที่มี MgCl_2 เข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (—◇—)
10 มิลลิโมลาร์ (—■—), 20 มิลลิโมลาร์ (—▲—) และ 30 มิลลิโมลาร์ (—×—)

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมัก จำนวนทั้งหมด 51 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 38 ไอโซเลท และรูปไข่ 22 ไอโซเลท จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 60 ไอโซเลท มาใช้เป็นโฮสต์สำหรับแยกแลบเฟจ พบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 4 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 ซึ่งโฮสต์ของเฟจเหล่านี้ คือ F42, F50, F57 และ F59 ตามลำดับ เมื่อนำโฮสต์มาจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าโฮสต์ F42 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc lactis* (GenBank accession number GU125559) ร้อยละ 100 โฮสต์ F50 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (GenBank accession number GU138559) ร้อยละ 99 เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Leuconostoc* sp. ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ปลาข้าว (Tanasupawat; Okada; & Komagata. 1998: 193 - 200) เป็นต้น ส่วนโฮสต์ F57 และ F59 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) ร้อยละ 100 ซึ่งเชื้อ *W. cibaria* มีการแยกและศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 โดยครั้งนั้นได้ทำการแยกเชื้อจากวัตถุดิบที่จะทำอาหารหมักในประเทศมาเลเซีย (Björkroth.; et al. 2002: 141 - 148) และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยกเชื้อ *W. cibaria* ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น แป้งหมัก (sourdoughs) (De Vuyst.; et al. 2002: 6059 - 6069) ไส้กรอกเลือด (Morcilla de Burgos) (Santos; et al. 2005: 285 - 296) และปลาต้ม (Paludan-Müller; et al. 2002: 61 - 70) เป็นต้น

เมื่อนำแลบเฟจทั้ง 4 ตัว มาศึกษาลักษณะของพลาค พบว่าแลบเฟจทั้ง 4 ตัว มีลักษณะของพลาคใส และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.5 – 1.0 มิลลิเมตร แสดงว่าเฟจทั้ง 4 ตัวเป็นไวรูเรนท์เฟจ และเมื่อศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแลบเฟจทั้งหมดมีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวแตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ เฟจ ΦF-42 และเฟจ ΦF-50 ส่วนหัวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 82 และ 64 นาโนเมตร ตามลำดับ และส่วนหางยาวไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 182 และ 327 นาโนเมตร ตามลำดับ

จากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเฟจนี้อยู่ในแฟมิลี Siphoviridae โดยเฟจทั้งสองตัวมีขนาดของส่วนหัวที่ใหญ่กว่าเฟจในแฟมิลี Siphoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่น เช่น เฟจ ggg (Greer; Dilts; & Ackermann. 2007: 370 – 375) และเฟจ Φ1-A4 (Lu; et al. 2003b: 3192 - 3202) และเฟจ ΦF-50 มีขนาดของส่วนหัวเล็กกว่าเฟจ Φ1-F8 (Lu; et al. 2003b: 3192 - 3202) นอกจากนี้เฟจทั้งสองตัวยังมีส่วนหางที่ยาวกว่าเฟจ ggg แต่สั้นกว่าเฟจ Φ1-F8 ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 รูปร่างเฟจในกลุ่มแฟมิลี Siphoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ

เฟจ	แฟมิลี	ขนาดส่วนหัว (นาโนเมตร)	ความยาวส่วนหาง (นาโนเมตร)	เอกสารอ้างอิง
ggg	Siphoviridae	50	125	Greer; Dilts; & Ackermann. 2007: 370 – 375
Φ1-A4	Siphoviridae	53	131	Lu; et al. 2003b: 3192 - 3202
Φ1-F8	Siphoviridae	71	351	Lu; et al. 2003b: 3192 - 3202
bIL170	Siphoviridae	50	126	Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346
P087	Siphoviridae	59	163	Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346
949	Siphoviridae	70	490	Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346
1706	Siphoviridae	58	276	Deveau; et al. 2006: 4338 – 4346
ΦF-42	Siphoviridae	82	182	การศึกษานี้
ΦF-50	Siphoviridae	64	327	การศึกษานี้

และกลุ่มที่สอง คือ เฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 ส่วนหัวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 94 x 44 และ 96 x 43 นาโนเมตร และส่วนหางสั้นไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 31 และ 23 นาโนเมตร ตามลำดับ จัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae โดยเฟจทั้งสองตัวนี้มีขนาดใหญ่กว่าเฟจ P369 (Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346) ซึ่งส่วนหัวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 57 x 40 นาโนเมตร และส่วนหางยาว 19 นาโนเมตร

นอกจากนี้ยังมีขนาดเล็กกว่าเฟจ KSY1 (Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346) ซึ่งส่วนหัวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 223 x 45 นาโนเมตร และส่วนหางยาว 32 นาโนเมตร ดังแสดงในตาราง 9 ตาราง 9 รูปร่างเฟจในกลุ่มแฟมิลี Podoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ

เฟจ	แฟมิลี	ขนาดส่วนหัว (นาโนเมตร)	ความยาวส่วนหาง (นาโนเมตร)	เอกสารอ้างอิง
P369	Podoviridae	57 x 40	19	Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346
KSY1	Podoviridae	223 x 45	32	Deveau; et al. 2006: 4338 - 4346
ΦF-57	Podoviridae	94 x 44	31	การศึกษานี้
ΦF-59	Podoviridae	96 x 43	23	การศึกษานี้

แลบเฟจส่วนใหญ่ที่เคยมีรายงานจะพบอยู่ในแฟมิลี Siphoviridae แต่ที่พบจัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae มีน้อยกว่าร้อยละ 1 และส่วนใหญ่จะเป็น lactococcal phages (Ackermann. 2001: 843 - 857) ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าสามารถแยกเฟจของ *Weissella cibaria* ที่จัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก เช่นเดียวกับงานวิจัยของณัฐพร (ณัฐพร. 2552: 43 - 56) ซึ่งสามารถแยกเฟจของ *Weissella cibaria* ที่จัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae ได้จากแหนม นอกจากนี้การศึกษารูปร่างของแลบเฟจทำให้เราทราบทางอ้อมว่าแลบเฟจมีกรดนิวคลีอิกชนิดใด ซึ่งในงานวิจัยนี้แลบเฟจทั้ง 4 ตัว ที่แยกได้มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

เมื่อนำแลบเฟจทั้ง 4 ตัว มาศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่น พบว่าแลบเฟจทั้ง 3 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50 และ ΦF-57 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่นที่นำมาทดสอบได้ ยกเว้นเฟจ ΦF-59 ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมี *Weissella cibaria* ที่นำมาทดสอบได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าแลบเฟจมีโฮสต์ – เรนจ์แคบ จึงสามารถนำสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของณัฐพร (ณัฐพร. 2552: 43 - 56) ที่ได้ศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อมีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่น ซึ่งพบว่าเฟจ Φ22b และ Φ22s ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมี *Weissella* สปีชีส์อื่น หรือแบคทีเรียกรดแลคติกจีโนสอื่นได้

เมื่อนำแลบเฟจ 4 ตัว คือ Φ F-42, Φ F-50, Φ F-57 และ Φ F-59 มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด คือ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI*, *MluI* และ *NdeI* เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าเป็นแลบเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่าดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-42 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-42 มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-50 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-50 มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* ดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-57 และ Φ F-59 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ Φ F-57 และ Φ F-59 มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* แต่เนื่องจากรูปแบบดีเอ็นเอของเฟจทั้ง 2 ตัว หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นต่างกัน จึงแสดงให้เห็นว่าเฟจทั้ง 2 ตัว มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SacI* และ *MluI* ต่างกัน นอกจากนี้ดีเอ็นเอของเฟจทั้ง 4 ตัว แม้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่กล่าวมาข้างต้น แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังแยกได้ไม่ชัดเจน จึงควรเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นที่เหมาะสมต่อไป และจากรูปแบบดีเอ็นเอของแลบเฟจแต่ละตัวหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 9 ชนิดแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็น แลบเฟจต่างชนิดกัน

จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคโทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ พบว่าการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจในอาหาร MRS broth ที่มี CaCl_2 หรือ MgCl_2 (10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์) ให้ผลไม่ต่างกัน โดยเฟจ Φ F-42 และ Φ F-50 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 99 และ 100 ในระยะเวลา 30 นาที ส่วนเฟจ Φ F-57 และ Φ F-59 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 99 ในระยะเวลา 20 นาที ซึ่งเร็วกว่าเฟจ Φ JL-1 ที่พบว่าสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 96 ในระยะเวลา 30 นาที (Lu; et al. 2003a: 225 - 235) แต่ช้ากว่าเฟจ Φ 22b และ Φ 22s ที่สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ร้อยละ 99 ในระยะเวลา 10 นาที (ณัฐพร. 2552: 69) ส่วนการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (10 - 30 มิลลิโมลาร์) ลงในอาหารเหลว MRS ไม่มีผลต่ออัตราการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ของเฟจทั้ง 4 ตัวในช่วง 30 นาทีแรก ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการทดลองก่อนหน้านี้ ที่พบว่าไดวาเลนท์แคโทไอออนไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจในช่วง

30 นาทีแรก เนื่องจากในการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ของเฟจในรอบแรกนั้น ในอาหารเหลว MRS มีแคทไอออนชนิดอื่น เช่น โซเดียมไอออน (Na^+) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่เพียงพอต่อความต้องการที่จะช่วยให้เฟจสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ (Lu; et al. 2003a: 225 - 235) แต่แคทไอออนในอาหารเหลว MRS ไม่มีปริมาณมากพอสำหรับการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ในรอบต่อไป ดังนั้นปริมาณแคลเซียมไอออนที่มากเกินไปจะทำให้การเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ของเฟจในรอบต่อไปของวงจรชีวิตของเฟจเร็วขึ้น แต่จะไม่มีผลต่อปริมาณของเฟจ เพราะปริมาณของเฟจที่อยู่ในอาหารที่ไม่มีการเติมโดวาเลนท์แคทไอออนจะเพิ่มจำนวนจนมีปริมาณเท่ากับเฟจในอาหารที่มีโดวาเลนท์แคทไอออนในช่วงที่ 4 หลังการติดเชื้อ (Watanabe; & Takesue. 1972: 19 - 30) และในการทดลองนี้พบว่า การเข้าติดโฮสต์ของแลบเฟจทั้ง 4 ตัว ในอาหาร MRS broth ที่มีและไม่มีเติม CaCl_2 หรือ MgCl_2 ให้ผลไม่ต่างกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโดวาเลนท์แคทไอออนทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าโดวาเลนท์แคทไอออนไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ (ณัฐพร. 2552: 69; Lu; et al. 2003a: 225 - 235)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแลบเฟจนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานต่องานวิจัยทางด้านแบคทีริโอเฟจ โดยเฉพาะการค้นพบแลบเฟจในแฟมิลี Podoviridae ถึง 2 ตัวในงานวิจัยนี้ นับเป็นการค้นพบที่สำคัญในด้านความหลากหลายของแฟมิลีนี้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และจากการจำแนกโฮสต์ที่แยกแลบเฟจได้ พบว่าเป็น *W. cibaria* ซึ่งมีรายงานการค้นพบจีโนมนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักไม่มากนัก เช่น ปลาซึ่ม (Paludan-Müller; et al. 2002: 61 - 70) เป็นต้น และในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแลบเฟจที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักเป็นครั้งแรกของประเทศไทย ซึ่งจากข้อมูลที่ได้จะพบว่าการปนเปื้อนโดยแลบเฟจในผลิตภัณฑ์เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ปลาหมักทั้งหมดยังมีไม่มากนัก และแลบเฟจที่พบในงานวิจัยนี้ก็มีความจำเพาะกับโฮสต์ในจีโนส *Leuconostoc* sp. และ *Weissella* sp. ซึ่งไม่ใช่สายพันธุ์หลักที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก จึงอาจพบการปนเปื้อนนี้เป็นส่วนน้อย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ชมภู ยิ้มโต. (2550). *การถนอมอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์. (2552). *การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากเหวมในประเทศไทย*. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- นภา โล่ห์ทอง. (2535). *กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต*. กรุงเทพฯ: ฟันนี่ พับบลิชซิ่ง.
- นงนุช รักสกุลไทย. (2538). *กรรมวิธีแปรรูปสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์. (2540). *ไวรัสวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรสมัย.
- พรทิพย์ สุขสวัสดิ์. (2549). *การศึกษาสมบัติของไวรัสโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย*. ปรินูญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. (2545). *ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลูกจันทร์ ภัคศรีพันธุ์. (2524). *อุตสาหกรรมอาหารหมัก*. กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2547). *ปลาสมมุติบัญญัติท้องถิ่นอีสานเสริมความแข็งแรงให้กับชุมชนพึ่งพาตนเองได้*. สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2553. จาก <http://www2.nstda.or.th/>
- Ackermann, H.W.; et al. (1984). Classification of *Vibrio* Bacteriophages. *Intervirology* 22: 61 - 71.
- Ackermann, H.W. (2001). Frequency of Morphological Phage Descriptions in the Year 2000. *Archaeology of Virology* 146: 843 - 857.
- Adams, M.H. (1958). *Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers.
- Adams, M.R.; & Moss, M.O. (1995). *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Aguirre, M.; & Collins, M.D. (1992). Phylogenetic Analysis of Some *Aerococcus*-like Organisms for Urinary Tract Infections: Description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *Journal of General Microbiology* 138: 401 – 405.
- Alcamo, E. (1996). *Fundamentals of Microbiology*. 5th Ed. United States of America: Benjamin/ Cummings.
- Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, In: Salminen, S.; & Wright, A.V., (Eds.). *Lactic Acid Bacteria*. pp. 1 - 72. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Baross, J.A.; Liston, J.; & Morita, R.Y. (1978a). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages and Other *Vibrio* Bacteriophages in Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 492 - 499.
- _____. (1978b). Ecological Relationship between *Vibrio parahaemolyticus* and Agar-Digesting Vibrios as Evidenced by Bacteriophage Susceptibility Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 500 - 505.
- Beddows, C.G. (1985). Fermented Fish and Fish Products, In: Wood, B.J.B., (Ed.). *Microbiology of Fermented Foods*. 2nd Ed. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Binetti, A.G.; & Reinheimer, J.A. (2000). Thermal and Chemical Inactivation of Indigenous *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages Isolated from Argentinian Dairy Plants. *Journal of Food Protection* 63: 509 – 515.
- Binetti, A.G.; et al. (2008). PCR Method for Detection and Identification of *Lactobacillus casei/paracasei* Bacteriophages in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology* 124: 147 - 153.
- Björkroth, K.J.; et al. (2002). Taxonomic Study of *Weissella confusa* and Description of *Weissella cibaria* sp. nov., Detected in Food and Clinical Samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 141 - 148.

- Boyd, R.F. (1995). *Basic Medical Microbiology*. 5th Ed. United States of America: Little/Brown.
- Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 31: 230 - 314.
- Brüssow, H. (2001). Phages of Dairy Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 283 - 303.
- Brüssow, H.; et al. (1994). Detection and Classification of *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages Isolated from Industrial Milk Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4537 – 4543.
- Campbell, A.M. (1996). Bacteriophages, In: Fields, D.N.; Knipe, D.M.; & Howley, P.M., (Eds.). *Fields Virology*. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Cappuccino, J.G.; & Sherman, N. (2001). *Microbiology: A Laboratory Manual*. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Capra, M.L.; Quiberoni, A.; & Reinheimer, J.A. (2004). Thermal and Chemical Resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* Bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology* 38(6): 499 – 504.
- Choi, H.J.; et al. (2002). *Weissella kimchii* sp. nov., a Novel Lactic Acid Bacterium from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 507 - 511.
- Collins, M.D.; et al. (1999). *Aerococcus christensenii* sp. nov., from the Human Vagina. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1125 – 1128.
- Coveney, H.M.; Fitzgerald, G.F.; & Daly, C. (1994). A Study of the Microbiological Status of Irish Farmhouse Cheeses with Emphasis on Selected Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 621 – 630.
- De Bruyne, K.; et al. (2008). *Weissella ghanensis* sp. nov., Isolated from a Ghanaian Cocoa Fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2721 – 2725.

- Dellaglio, F.; Dicks, L.M.T.; & Torriani, S. (1995). The Genus *Leuconostoc*, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H., (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional.
- Depaola, A.; et al. (1998). Phage Infecting *Vibrio vulnificus* are Abundant and Diverse in Oysters Collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 84: 346 - 351.
- Deveau, H.; et al. (2006). Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4338 – 4346.
- Devriese, L.A.; & Pot, B. (1995). The Genus of *Enterococcus*, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- De Vuyst, L.; et al. (2002). The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6059 – 6069.
- Erko, S.; & Michael, G. (1991). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. The United States of America: John Wiley & Sons.
- Felis, G.E.; Torriani, S.; & Dellaglio, F. (2005). Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1325 – 1327.
- Forsythe, S.J. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Furukawa, H.; Kuroiwa, T.; & Mizushima, S. (1983). DNA Injection During Bacteriophage T4 Infection of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 154: 938 - 945.
- Ghosh, A.M.; Ansari, M.Q.; & Datta, G.C. (1989). Isolation and Morphological Characterization of El Tor Cholera Phages. *Journal of General Virology* 70: 2241 - 2243.
- Goyal, S.M.; Gerbra, C.P.; & Bitton, G. (1987). *Phage Ecology*. United States of America: A Wiley-Interscience.

- Greer, G.G.; Dilts, B.D.; & Ackermann, H.W. (2007). Characterization of a *Leuconostoc gelidum* Bacteriophage from Pork. *International Journal of Food Microbiology* 114: 370 - 375.
- Hammes, W.P.; Hertel, C.; & Cavadini, C. (1995). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria, In: Karl Heinz, E.; Takeoka, G.R.; & Teranishi, R., (Eds.). *Genetically Modified Foods*. Washington DC.: American Chemical Society.
- Hardie, J.M.; & Whiley, R.A. (1995). The Genus *Streptococcus*, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H., (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Harley, O.P.; & Klein, D.A. (1993). *Microbiology*. 2nd Ed. Oxford: Wm.C.Brown.
- Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Method in Food Microbiology*. 3rd Ed. New York: Academic Press.
- Heap, H.A.; Limsowtin, G.K.Y.; & Lawrence, R.C. (1978). Contribution of *Streptococcus lactis* Strains in Raw Milk to Phage Infection in Commercial Cheese Factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 13(1): 16 - 22.
- Hino, M.; & Ikebe, N. (1965). Studies on the Lactic Acid Bacteria Employed for Beverage Production II. Isolation and Some Properties of a Bacteriophage Infected During the Fermentation of Lactic Acid Beverage. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* 39: 472 – 476.
- Jarvis, A.W. (1984). Differentiation of Lactic Streptococcal Bacteriophage into Bacteriophage Specificity by DNA-DNA Homology. *Applied and Environmental Microbiology* 47(2): 343 - 349.
- Jay, M.T. (1996). *Modern Food Microbiology*. New York: International Thomson Publishing.
- Josephsen, J.; & Neve, H. (1998). Bacteriophages and Lactic Acid Bacteria, In: Salminen, S.; & von Wright, S.A., (Eds.). *Lactic Acid Bacteria*. pp. 385-436. New York: Marcel Dekker.

- Kalmanson, G.; & Bronfenbrenner, J. (1942). Evidence of Serological Heterogeneity of Polyvalent " Pure Line " Bacteriophage. *Journal of Immunology* 45: 13.
- Kay, D.; & Bradley, D.E. (1960). The Fine Structure of Bacteriophages. *Journal of General Microbiology* 23: 553 - 563.
- Kilic, A.O.; et al. (1996). Analysis of *Lactobacillus* Phages and Bacteriocins in American Dairy Products and Characterization of a Phage Isolated from Yougurt. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2111 - 2116.
- Klaenhammer, T.R. (1984). Interactions of Bacteriophages with Lactic Streptococci. *Advances in Applied Microbiology* 30: 1 - 29.
- Klaus, S.; et al. (1981). Properties of Temperate Actinophage SH10. *Journal of General Microbiology* 123: 269 - 279.
- Koga, T.; Toyoshima, S.; & Kawata, T. (1982). Morphological Varieties and Host-Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 466 - 470.
- Kopermsub, P.; Vichitphan, S.; & Yunchalard, S. (2006). Lactic Acid Bacteria Isolated from *Plaa-som*, a Thai Fermented Fish Product. *Journal of Biotechnology* 7(1): 32 - 39.
- Lawson, P.A.; et al. (2001a). *Aerococcus sanguicola* sp. nov., Isolated from a Human Clinical Source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 475 – 479.
- _____. (2001b). *Aerococcus urinaehominis* sp. nov., Isolated from Human Urine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 683 – 686.
- _____. (2007). *Vagococcus elongatus* sp. nov., Isolated from a Swine-manure Storage Pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 751 - 754.
- Lee, J.S.; et al. (2002). *Weissella koreensis* sp. nov., Isolated from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1257 - 1261.

- Lillehaug, D. (1997). An Improved Plaque Assay for Poor Plaque-producing Temperate Lactococcal Bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology* 83: 85 - 90.
- Lim, D. (1998). *Microbiology*. 2nd Ed. The United States of America: McGraw- Hill.
- Lu, Z.; et al. (2003a). Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, Φ JL-1, from a Cucumber Fermentation. *Journal of Food Microbiology* 84: 225 - 235.
- _____. (2003b). Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3192 – 3202.
- Magnusson, J.; et al. (2002). *Weissella soli* sp. nov., a Lactic Acid Bacterium Isolated from Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 831 - 834.
- Maloy, S.R.; Cronan, J.F.; & Freifelder, D.J. (1994). *Microbial Genetics*. 2nd Ed. Boston: Jones and Bartlett.
- Matsuzaki, S.; et al. (1992). A Broad-Host-Range Vibriophage, KVP 40, Isolated from Seawater. *Microbiology and Immunology* 36: 93 - 97.
- Mckane, L.; & Kandel, J. (1996). *Microbiology*. United States of America: McGraw-Hill.
- Moineau, S. (1999). Applications of Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Reviews* 76: 77 – 382.
- Moineau, S.; & Lévesque, C. (2005). In: Kutter, E.; & Sulakvelidze, A., (Eds.). *Bacteriophages Biology and Applications*. pp. 285 – 296. Florida: CRC Press, Boca Raton.
- Mullan, W.M.A. (1986). Bacteriophage Induced Starter Problems. *Dairy Industries International* 51: 39 - 42.
- Mullan, W.M.A. (2002). Bacteriophage Enumeration. *Dairy Science and Food Technology*. Retrieved January, 10, 2010. from <http://www.dairyscience.info/phage/enumeration.asp>
- Nester, E.W.; Roberts, C.B.; & Nester, M.T. (1995). *Microbiology: A Human Perspective*. United States of America: Wn.C.Brown.

- Neve, H.; Berger, A.; & Heller, K.J. (1995). A Method for Detecting and Enumerating Airborne Virulent Bacteriophage of Dairy Starter Cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 47: 193 – 207.
- Paludan-Müller, C.; et al. (2002). Fermentation and Microflora of *Pla-Som*, a Thai Fermented Fish Product Prepared with Different Salt Concentrations. *International Journal of Food Microbiology* 73: 61 – 70.
- Raiski, A.; & Belyasova, N. (2009). Biodiversity of *Lactococcus lactis* Bacteriophages in the Republic of Belarus. *International Journal of Food Microbiology* 130: 1 - 5.
- Reiter, B.; & Kirikova, M. (1976). The Isolation of a Lysogenic Strains from a Multiple Strains Starter Culture. *Journal of the Society of Dairy Technology* 29: 221 - 225.
- Ringo, E.; & Gatesoupe, F.J. (1998). Lactic Acid Bacteria in Fish: A Review. *Aquaculture* 160: 177 - 203.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. 2nd Ed. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, E.M.; et al. (2005). Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria in “morcilla de Burgos”. *International Journal of Food Microbiology* 97: 285 - 296.
- Sarkar, P.K.; & Banerjee, S. (1996). Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacterial Isolates Obtained from Natural Habitats. *Journal of Food Science Technology* 33: 231 - 233.
- Schlegel, H.G. (1993). *General Microbiology*. 7th Ed. New York: Cambridge University Press.
- Schleifer, K.H.; & Ludwig, W. (1995). Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H., (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Séchaud, L.; et al. (1988). Bacteriophages of Lactobacilli. *Biochimie* 70: 401 – 410.
- Stiles, M.E.; & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1 - 29.
- Talaro, K.P.; & Talaro, A. (2002). *Foundations in Microbiology*. 4th Ed. Boston: McGraw-Hill.

- Tanasupawat, S.; et al. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., Isolated from Fermented Fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1479 - 1485.
- Tanasupawat, S.; Okada, S.; & Komagata, K. (1998). Lactic Acid Bacteria Found in Fermented Fish in Thailand. *Journal of General Applied Microbiology* 44: 193 - 200.
- Teuber, M. (1995). The Genus *Lactococcus*, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H., (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional.
- Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; & Bishop, D.H. (2000). *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Virus. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press.
- Vela, A.I.; et al. (2007). *Aerococcus suis* sp. nov., Isolated from Clinical Specimens from Swine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1291 – 1294.
- Voyles, B.A. (2002). *The Biology of Viruses*. 2nd Ed. New York: McGraw-Hill.
- Wallbanks, S.; et al. (1990). 16S rRNA Sequence Determination for Members of the Genus *Carnobacterium* and Related Lactic Acid Bacteria and Description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 224 – 230.
- Watanabe, K.; & Takesue, S. (1972). The Requirement for Calcium in Infection with *Lactobacillus* Phage. *Journal of General Virology* 17: 19 – 30.
- Watanabe, K.; et al. (1970). Bacteriophage Active Against the Lactic Acid Beverage-Producing Bacterium *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology* 20: 409 – 415.
- Williams, R.E.O.; Hirsch, A.; & Cowan, S.T. (1953). *Aerococcus*, a New Bacterial Genus. *Journal of General Microbiology* 8: 475 – 480.
- Yin, X.; Zeph, L.R.; & Statzky, G. (1997). A Simple Method for Enumerating Bacteriophages in Soil. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 461 - 466.
- Young, R.Y. (1992). Bacteriophage Lysis: Mechanism and Regulation. *Microbiology Reviews* 56: 430 - 481.

Zachary, A. (1976). Physiology and Ecology of Bacteriophages of the Marine Bacterium *Beneckea natriegens*: Salinity. *Applied and Environmental Microbiology* 31: 415 - 422.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

peptone	10.0	กรัม
beef extract	10.0	กรัม
yeast extract	5.0	กรัม
glucose	20.0	กรัม
dipotassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
tween 80	1.0	กรัม
diammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
sodium acetate	5.0	กรัม
magnesium sulfate	0.1	กรัม
manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น MRS soft agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 0.5 กรัม

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. TE-buffer

Tris-HCl	0.1	โมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)

sodium dodecyl sulfate	100	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 3 M sodium acetate

sodium acetate	408.3	กรัม
น้ำกลั่น	800.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 5.2 โดยใช้ glacial acetic acid เข้มข้น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 50X TAE buffer

Tris-base	242.0	กรัม
glacial acetic acid	57.1	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	1.0	ลิตร

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะใช้ให้ทำการเจือจางเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น

สภาวะที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

EcoRI (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (5,000 u)	0.5	ไมโครลิตร
Buffer H	3.5	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	11.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

NdeI (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (500 u)	0.5	ไมโครลิตร
Buffer D	3.5	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	11.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

HindIII (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (5,000 u)	1.0	ไมโครลิตร
Buffer R	1.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	13.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

*Pst*I (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (3,000 u)	1.0	ไมโครลิตร
Buffer O	1.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	13.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

*Bgl*II (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (500 u)	1.0	ไมโครลิตร
10x Buffer O	2.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	12.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

*Bam*HI (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (4,000 u)	1.0	ไมโครลิตร
10x Buffer <i>Bam</i> HI	2.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	12.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

Eco32I (EcoRV) (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (2,000 u)	1.0	ไมโครลิตร
10x Buffer R	2.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	12.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

MluI (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (1,000 u)	1.0	ไมโครลิตร
10x Buffer R	2.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	12.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

SacI (Fermentas)

DNA	5.0	ไมโครลิตร
Enzyme (1,200 u)	1.0	ไมโครลิตร
10x Buffer <i>SacI</i>	2.0	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	12.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค

1. การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR product purification) โดยใช้ FAVORGEN® GEL/PCR PURIFICATION kit

นำ PCR product มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม FADF buffer ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 5 (PCR product ต่อ FADF buffer) ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมมาใส่ใน column นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนที่อยูข้างล่างของ column แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนที่อยูข้างล่างของ column นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำ column มาวางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

2. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F42 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
GQ272607.1	Lactococcus lactis strain FWA-ZB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%
GU125559.1	Leuconostoc lactis strain IMAU80137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2593	2593	99%	0.0	100%
FJ749493.1	Leuconostoc lactis strain IMAU50098 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2593	2593	99%	0.0	100%
FJ749307.1	Leuconostoc lactis strain IMAU40031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2593	2593	99%	0.0	100%
EU419607.1	Leuconostoc lactis strain KLDS 5.0605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2593	2593	99%	0.0	100%
EU419606.1	Leuconostoc lactis strain KLDS 5.0604 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2593	2593	99%	0.0	100%
AJ970316.1	Leuconostoc lactis 16S rRNA gene, strain LMG 22650	2593	2593	99%	0.0	100%
AB023968.1	Leuconostoc lactis gene for 16S ribosomal RNA	2593	2593	99%	0.0	100%
GQ487716.1	Leuconostoc lactis strain EG001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	99%	0.0	100%
GQ476981.1	Leuconostoc lactis strain LY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2588	2588	100%	0.0	99%

3. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F50 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
GU138559.1	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides IMAU:10231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
GQ280807.1	Leuconostoc mesenteroides strain BW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
FJ915820.1	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU10165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
FJ915639.1	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU60193 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
FJ749873.1	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU60158 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
FJ749315.1	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU40039 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
FJ655776.1	Leuconostoc mesenteroides strain kimshi001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
FJ215670.1	Leuconostoc mesenteroides strain IMAU60148 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
EU483104.1	Leuconostoc mesenteroides strain 6055 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%
EU419608.1	Leuconostoc mesenteroides strain KLDS 5.0606 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	99%	0.0	99%

4. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F57 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AB494716.1	Weissella cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DH8	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138616.1	Weissella cibaria IMAU:10288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138615.1	Weissella cibaria IMAU:10287 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138603.1	Weissella cibaria IMAU:10275 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138580.1	Weissella cibaria IMAU:10252 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138579.1	Weissella cibaria IMAU:10251 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138554.1	Weissella cibaria IMAU:10226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138547.1	Weissella cibaria IMAU:10219 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
EU600924.1	Weissella sp. KLDS 7.0701 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
AB362617.1	Weissella cibaria gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0136	2645	2645	100%	0.0	100%

5. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท F59 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AB494716.1	Weissella cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DH8	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138616.1	Weissella cibaria IMAU:10288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138615.1	Weissella cibaria IMAU:10287 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138603.1	Weissella cibaria IMAU:10275 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138580.1	Weissella cibaria IMAU:10252 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138579.1	Weissella cibaria IMAU:10251 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138554.1	Weissella cibaria IMAU:10226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
GU138547.1	Weissella cibaria IMAU:10219 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
EU600924.1	Weissella sp. KLDS 7.0701 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%
AB362617.1	Weissella cibaria gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0136	2645	2645	100%	0.0	100%

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล	นางสาวพรรณทิพา จันท์ทัง
วันเดือนปีเกิด	16 กรกฎาคม 2525
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 107/1 หมู่ 7 ตำบลที่วัง อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ครู
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนบ้านคลองเสาเหนือ
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2543	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีทุ่งสง
พ.ศ. 2547	วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
พ.ศ. 2549	ประกาศนียบัตรบัณฑิต (วิชาชีพครู) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
พ.ศ. 2553	กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ