บทความวิจัย

การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย

พรรณทิพา จันทร์ทัง[1] อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[1*] ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย[1]
พรทิพย์ สุขสวัสดิ์[2] และ อัจฉริยา รังษิรุจิ[1]

บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและแลบเฟจจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทยทั้งหมด 51 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมาแยกแลบเฟจพบว่า สามารถแยกแลบเฟจได้ 4 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 ซึ่งโฮสท์ของเฟจเหล่านี้ คือ แบคทีเรีย F42, F50, F57 และ F59 เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโฮสท์ของเฟจดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของโฮสท์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าโฮสท์ F42 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc lactis* (GenBank accession number GU125559) ร้อยละ 100 โฮสท์ F50 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (GenBank accession number GU138559) ร้อยละ 99 โฮสท์ F57 และ F59 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) ร้อยละ 100 สำหรับลักษณะทั่วไปของเฟจทั้ง 4 ตัว พบว่าสามารถทำลายแบคทีเรีย ก่อให้เกิดวงใส (พลาค) จึงจัดเป็นไวรูเรนท์เฟจ และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าสามารถแยกออกได้เป็น 2 แฟมิลี โดยเฟจ ΦF-42 และเฟจ ΦF-50 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 82 และ 64 นาโนเมตร ตามลำดับ และส่วนหางยาวไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 182 และ 327 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงจัดจำแนกเฟจนี้อยู่ในแฟมิลี Siphoviridae ส่วนเฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 94 × 44 และ 96 × 43 นาโนเมตร

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร (ฝ่ายประถม)
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: onanong@swu.ac.th

ตามลำดับ และส่วนหางสั้นไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 31 และ 23 นาโนเมตร ตามลำดับ จึงจัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae เมื่อนำมาศึกษาโฮสท์-เรนจ์ พบว่า แลบเฟจเหล่านี้ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบได้ ยกเว้นเฟจ ΦF-59 ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *Weissella cibaria* N22 ที่นำมาทดสอบได้ และเมื่อสกัดดีเอ็นเอของเฟจแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเฟจทั้ง 4 ตัวมีรูปแบบของดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นแลบเฟจต่างชนิดกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไดวาเลนท์แคทไอออน 2 ชนิด ($CaCl_2$ และ $MgCl_2$) ไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าแลบเฟจหลายชนิดสามารถถูกแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมัก ซึ่งการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลสามารถแสดงให้เห็นถึงลักษณะจำเพาะของแลบเฟจนั้นๆ ได้

คำสำคัญ: แลบเฟจ แบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมัก การแยก การศึกษาลักษณะ

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Phages from Fermented Fish Products in Thailand

Pantipa Jantang[1], Onanong Pringsulaka[1*], Nuttika Suwannasai[1], Phornthip Suksawat[2] and Achariya Rangsiruji[1]

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) and their phages were isolated from Thai fermented fish products. From 51 of Thai fermented fish products, 60 isolates of LAB were obtained and employed as hosts for isolation of phages. There were four different phages, named as ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 and ΦF-59, which were isolated using four distinctive bacterial hosts, so-called F42, F50, F57 and F59. These LAB were identified by 16S rDNA sequence analysis, and 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), and F57 and F59 were found to be *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716) with 100% similarities. All phages of these LAB produced clear plaques, thus indicating their virulent characteristics. Electron micrographs revealed that these four phages belonged to two morphological families. Phages ΦF-42 and ΦF-50 were found to have hexagonal heads (82 nm and 64 nm in diameter, respectively) and long noncontractile tails (182 nm and 327 nm in length, respectively), indicating that they belonged to Siphoviridae family. Moreover, phages ΦF-57 and ΦF-59 were shown to have hexagonal heads (94 × 44 nm and 96 × 43 nm in diameter, respectively) and short noncontractile tails (31 nm and 23 nm in length, respectively),

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[2]Srinakharinwirot University: Prasarnmit Demonstration School (Elementary)

[*]Corresponding author, email: onanong@swu.ac.th

suggesting that they belonged to Podoviridae family. The host-range determination revealed that these phages were incapable of cross-infection, with the exception of ΦF-59 which was able to infect the tested *Weissella cibaria* N22. In addition, the DNA isolated from these four phages were characterized using restriction enzyme analysis which showed that the restriction fragments of ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 and ΦF-59 phages were different. Furthermore, the presence of divalent cations ($CaCl_2$ and $MgCl_2$) was not found to affect phage adsorption. This study showed that a variety of LAB phages could be isolated from fermented fish products and morphological and molecular characterizations suggested their distinctive properties.

Keywords: LAB phage, lactic acid-producing bacteria, fermented fish products, isolation, characterization

บทนำ

ปัจจุบันอาหารหมักของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และ ปลาร้า ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการผลิตสู่ระดับกึ่งอุตสาหกรรมและระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยพบว่าอาหารหมักเหล่านี้มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในการหมัก การพัฒนากระบวนการผลิตอาหารหมักสามารถอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพได้ อาทิ การใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาจจะมีกลิ่นหรือรสที่เปลี่ยนไปจากเดิม ซึ่งส่งผลให้ผู้ผลิตมักจะยังคงนิยมใช้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่มีอยู่ในธรรมชาติ หรือแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักมากกว่าที่จะใช้หัวเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จึงพบปัญหาทั้งในด้านระยะเวลาที่ใช้ในการหมักค่อนข้างนาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ เช่น *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* เป็นต้น [1]

นอกจากปัญหาสำคัญเกี่ยวกับการหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวข้างต้น ในงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ในต่างประเทศพบว่าการติดเชื้อแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟจ (phage) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีแบคทีเรียเป็นโฮสท์นั้น เป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งในการผลิตอาหารหมักในแต่ละประเทศ โดยเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก หรือแลบเฟจ สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีแบคทีเรียที่เป็นโฮสท์อาศัยอยู่ การติดเชื้อของเฟจในแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นก่อให้เกิดผลเสียในอุตสาหกรรมอาหารหมักอย่างมาก เช่น ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมหมัก โดยพบว่าเฟจจะปนเปื้อนมาจากนมดิบที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ [2] และพบว่าการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) นั้นไม่เพียงพอในการยับยั้งอนุภาคไวรัส [3, 4] นอกจากนี้การใช้หัวเชื้อ (starter cultures) เดิมตลอดจะเป็นโฮสท์ที่ดีในการเพิ่มจำนวนของเฟจ [5, 6] ซึ่งเมื่อหัวเชื้อมีการติดเชื้อด้วยเฟจจะทำให้การสร้างกรดแลคติกเกิดช้า และอาจทำให้การหมักล้มเหลว [7] โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจทำให้หัวเชื้อสูญเสียคุณภาพและไม่สามารถเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ได้อีกต่อไป [L1]

จากความสำคัญดังกล่าว โครงการวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาแลบเฟจที่แยกจากอาหารปลาหมักของประเทศ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นโฮสท์จากอาหารปลาหมักที่มาจากแหล่งต่างๆ จากนั้นทำการแยกแลบเฟจจากอาหารชนิดเดียวกัน โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของแลบเฟจในอาหารปลาหมักของประเทศ และสามารถต่อยอดในการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการผลิตให้ปราศจากการปนเปื้อนจากแลบเฟจ

วิธีการทดลอง

การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักจากภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ถูกนำมาใช้แยกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก โดยใช้ loop แตะบริเวณต่างๆ ของผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมัก นำมา streak ลงบนอาหาร MRS agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง การไม่สร้างเอนไซม์

คะตะเลส และจัดจำแนกในระดับจีนัสโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 4.4, 6.5 และ 9.6 ความสามารถในการเจริญที่สภาวะที่มี NaCl เข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 และการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส [8] จากนั้นทำการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA โดยการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก ตามวิธีการของ Lu และคณะ [9] แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาเป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยใช้ primers ที่มีลำดับเบสดังนี้ [10]

Forward primer (8-27f) : 5′ AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3′

Reverse primer (1525r) : 5′ TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3′

จากนั้นทำการผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR แล้วนำไปเข้าเครื่อง Authorized Thermal Cycler (Eppendorf, USA) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ตามวิธีการของ Björkroth และคณะ [11] นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR นี้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส นำ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ FAVORGEN® GEL/PCR PURIFICATION kit (Flavogen Biotech Corp, Taiwan) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกันกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันเป็นโฮสท์

เตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.6 (ประมาณ 1×10^8 CFU/ml) ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 6-7 ชั่วโมง จากนั้นใส่ผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักปริมาณ 25 กรัมลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปตกตะกอน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 ×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีแลบเฟจอยู่หรือไม่ [12, 13]

การตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำส่วนใสที่ได้จากการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากขั้นตอนข้างต้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้ว บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหารแข็ง MRS agar นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสหรือพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้น [14]

การหาปริมาณของแลบเฟจ

การหาปริมาณของแลบเฟจทำได้โดยเจือจางแลบเฟจในตัวอย่างแบบ serial dilution ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของแลบเฟจในแต่ละระดับความเจือจาง และแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโฮสท์มาหาปริมาณแลบเฟจ โดยการทำอาหารวุ้นสองชั้น นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจาง เพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาค (Plaque forming unit/ml; PFU/ml) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร [15]

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาค (PFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนพลาค}}{\text{ปริมาณเฟจที่ใช้} \times \text{ค่าความเจือจาง}}$$

การศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เตรียมแลบเฟจในอาหารเหลว โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ใส่แลบเฟจที่แยกได้ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 ×g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีแลบเฟจมาเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และเติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8000 (Polyethylene glycol 8000) ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952 ×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้ง และนำแลบเฟจที่ตกตะกอนได้มาตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (รุ่น JEM-1010 transmission electron microscope; JEOL, Japan) [15-17]

การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นและจีนัสอื่น

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่นที่จะทดสอบ ได้แก่ *Weissella cibaria* N22, *Lactobacillus (Lb.) plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lactococcus (Lc.) lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. cremoris TUA 1344L, *Leuonostoc (Leu.) mesenteroides* JCM 6124, *Pediococcus (P.) pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *Streptococcus salivarius* JCM 57007 และแบคทีเรียกรดแลคติก 17 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองข้างต้นและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้วผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว จากนั้นหยดแลบเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นหรือจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบ ด้วยการเกิดพลาคบริเวณที่หยดแลบเฟจลงไป [12, 13]

การสกัดดีเอ็นเอของแลบเฟจ

ทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจประมาณ 100 plates หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จนมีพลาคเกิดขึ้นแล้วให้เททับหน้าอาหารด้วย MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 ×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีแลบเฟจมาเติม DNase I 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase A 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เติมพอลีเอธิลีน-ไกลคอล 8000 ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนแลบเฟจ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952 ×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนแลบเฟจที่ได้มาละลายใน TE buffer (pH 8.0) 500 ไมโครลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร เพื่อแยกพอลีเอธิลีนไกลคอลออก ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 ×g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำชั้นบนนำมาเติม sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเกลือความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมฟีนอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 ×g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสด้านบนมาเติมสารละลายฟีนอลต่อคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1 ต่อ 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 ×g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 และเอทานอลร้อยละ 95 (ที่แช่เย็น) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในตู้ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 21,952 ×g เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเอทานอลทิ้ง จากนั้นนำไประเหยเอทานอลออกใน vacuum chamber ละลายดีเอ็นเอของแลบเฟจด้วย TE buffer (pH 8.0) 30-50 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส [17]

การตัดดีเอ็นเอของแลบเฟจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ *(Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I, *Mlu*I และ *Nde*I) โดยเติมบัพเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII ทุกครั้ง

การศึกษาผลไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ

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 และนำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น และใช้เฟจในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นตัวควบคุม (ปริมาณเฟจเริ่มต้น) โดยคำนวณร้อยละของการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจจากสูตร [9]

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

ผลการทดลอง

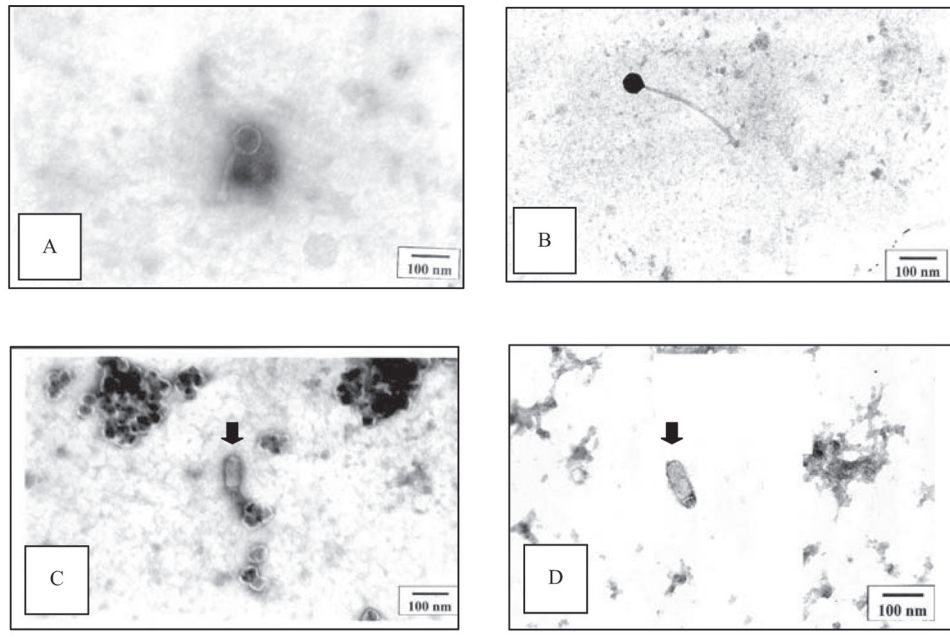
การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมัก จำนวน 51 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ขนาด 1-3 มิลลิเมตร ที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลลบในการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส เมื่อนำมาจัดจำแนกจีนัสและสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 4.4, 6.5 และ 9.6 ความสามารถในการเจริญที่สภาวะมี NaCl เข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 และการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 38 ไอโซเลท และรูปไข่ 22 ไอโซเลท

การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันเป็นโฮสท์

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 60 ไอโซเลท มาทำการแยกแลบเฟจ และนำมาตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 4 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 ซึ่งโฮสท์ของเฟจเหล่านี้ คือ F42, F50, F57 และ F59 ตามลำดับ เมื่อนำโฮสท์มาจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าโฮสท์ F42 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc lactis* ร้อยละ 100 โฮสท์ F50 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ร้อยละ 99 ส่วนโฮสท์ F57 และ F59 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 100

สำหรับลักษณะทั่วไปของแลบเฟจทั้ง 4 ตัว พบว่ามีพลาคขนาดเล็กโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.5-1.0 มิลลิเมตร และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า แลบเฟจทั้งหมดมีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม 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 (รูปที่ 1A และ 1B) จากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเฟจนี้อยู่ในแฟมิลี Siphoviridae และกลุ่มที่สอง คือ เฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 ส่วนหัวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 94 × 44 และ 96 × 43 นาโนเมตร และส่วนหางสั้นไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 31 และ 23 นาโนเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 1C และ 1D) จัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae



รูปที่ 1 รูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน, (A) ΦF-42; (B) ΦF-50; (C) ΦF-57; (D) ΦF-59 (ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งของเฟจ)

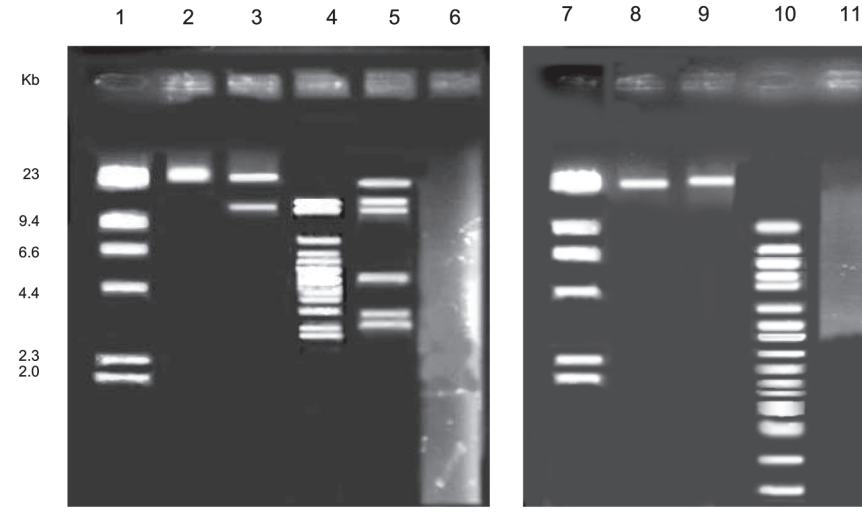
การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นและจีนัสอื่น

การศึกษาสมบัติของแลบเฟจทั้ง 4 ตัว ในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น ได้แก่ *W. cibaria* N22, *Lb. plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lc. lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *Streptococcus salivarius* JCM 57007 และแบคทีเรียกรดแลคติก 17 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลอง ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน พบว่าแลบเฟจทั้ง 3 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50 และ ΦF-57 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบได้ ยกเว้นเฟจ ΦF-59 ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *W. cibaria* N22 ที่นำมาทดสอบได้

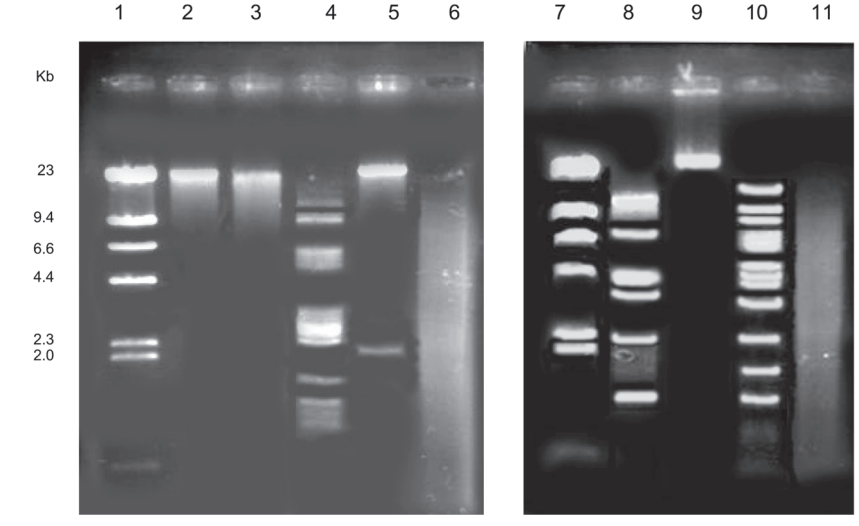
การตัดดีเอ็นเอของแลบเฟจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อนำแลบเฟจ 4 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด คือ *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I, *Mlu*I และ *Nde*I เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าเป็นแลบเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่าดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-42 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Nde*I และ *Bgl*II (รูปที่ 2) ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-50 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*II, *Bam*HI และ *Nde*I (รูปที่ 3) ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ

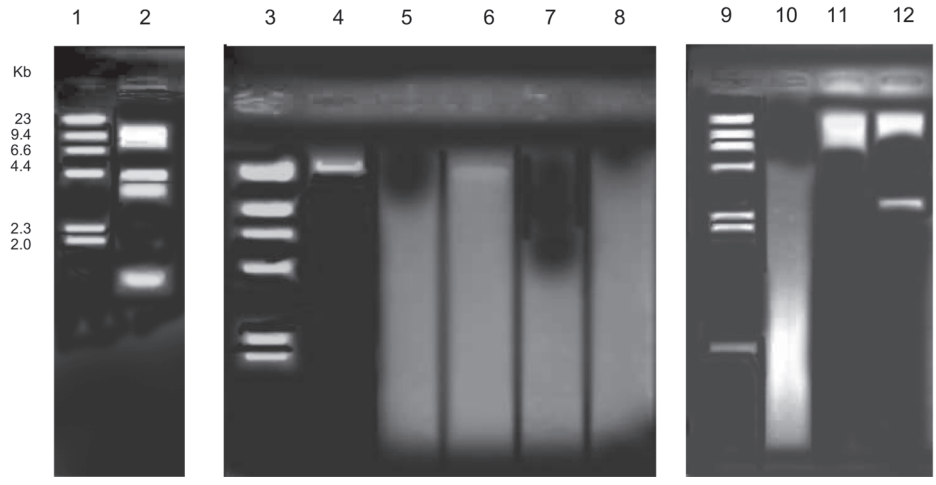
*Mlu*I แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I (รูปที่ 4) ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-59 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I (รูปที่ 5)



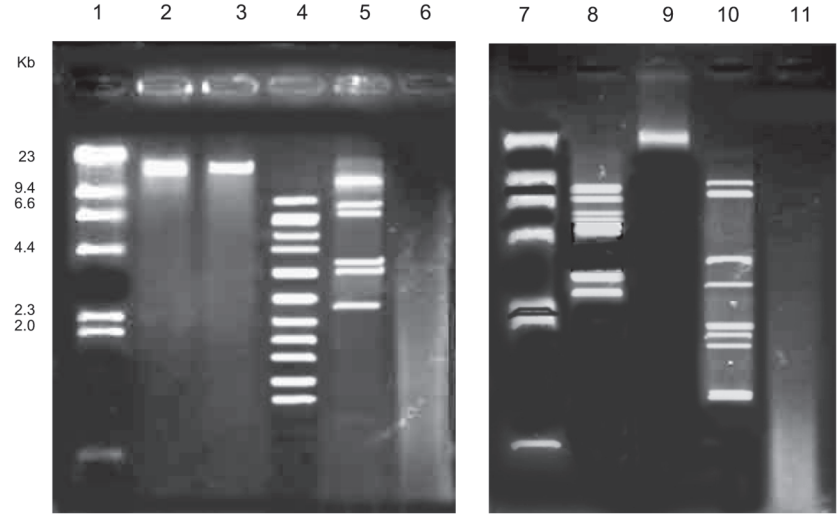
รูปที่ 2 ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-42 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, Lambda DNA marker/*Hin*dIII (แถว 1, 7); *Bgl*II (แถว 2); *Bam*HI (แถว 3); *Eco*RV (แถว 4); *Mlu*I (แถว 5); *Sac*I (แถว 6); *Eco*RI (แถว 8); *Nde*I (แถว 9); *Hin*dIII (แถว 10) และ *Pst*I (แถว 11)



รูปที่ 3 ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-50 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, Lambda DNA marker/*Hin*dIII (แถว 1, 7); *Bgl*II (แถว 2); *Bam*HI (แถว 3); *Eco*RV (แถว 4); *Mlu*I (แถว 5); *Sac*I (แถว 6); *Eco*RI (แถว 8); *Nde*I (แถว 9); *Hin*dIII (แถว 10) และ *Pst*I (แถว 11)



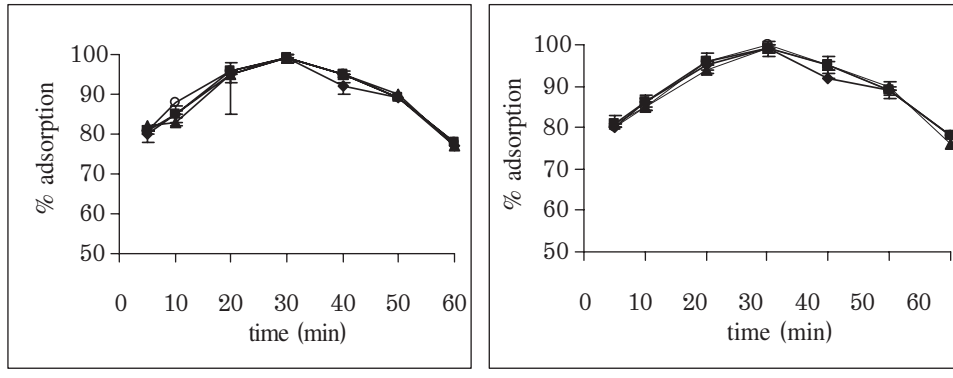
รูปที่ 4 ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, Lambda DNA marker/*Hin*dIII (แถว 1, 3, 9); *Mlu*I (แถว 2); *Nde*I (แถว 4); *Pst*I (แถว 5); *Bgl*II (แถว 6); *Bam*HI (แถว 7); *Eco*RV (แถว 8); *Sac*I (แถว 10); *Hin*dIII (แถว 11) และ *Eco*RI (แถว 12)



รูปที่ 5 ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-59 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, Lambda DNA marker/*Hin*dIII (แถว 1, 7); *Bgl*II (แถว 2); *Bam*HI (แถว 3); *Eco*RV (แถว 4); *Mlu*I (แถว 5); *Sac*I (แถว 6); *Eco*RI (แถว 8); *Nde*I (แถว 9); *Hin*dIII (แถว 10) และ *Pst*I (แถว 11)

การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ

จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจทั้ง 4 ตัว โดยการนำมาทำการติดเชื้อด้วยแลบเฟจในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ หรือ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ หรือ $MgCl_2$ ให้ผลไม่ต่างกัน โดยเฟจ ΦF-42 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 81, 85, 95 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ (รูปที่ 6A) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 81, 85, 95 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$ (รูปที่ 6B) เฟจ ΦF-50 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 95, 97, 98 และ 100 ในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ (รูปที่ 7A) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 95, 97, 98 และ 100 ในอาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$ (รูปที่ 7B) ในระยะเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ ส่วนเฟจ ΦF-57 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 80, 93 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ (รูปที่ 8A) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 80, 93 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$ (รูปที่ 8B) เฟจ ΦF-59 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 78, 91 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ (รูปที่ 9A) และสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 78, 91 และ 99 ในอาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$ (รูปที่ 9B) ในระยะเวลา 5, 10 และ 20 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเข้าติดโฮสท์ของแลบเฟจในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ หรือ $MgCl_2$ ก็ให้ผลใกล้เคียงกัน

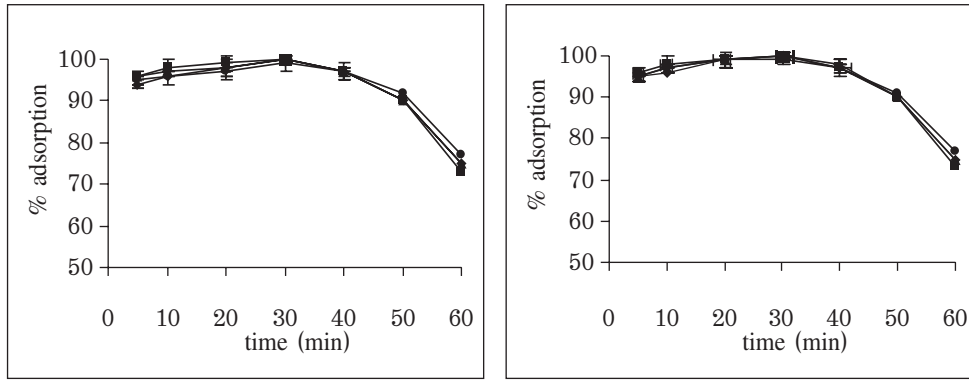


(A) (B)

รูปที่ 6 การเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจ ΦF-42 ในอาหารที่มีไดวาเลนท์แคทไอออนเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (♦) 10 มิลลิโมลาร์ (▲), 20 มิลลิโมลาร์ (○) และ 30 มิลลิโมลาร์ (■)

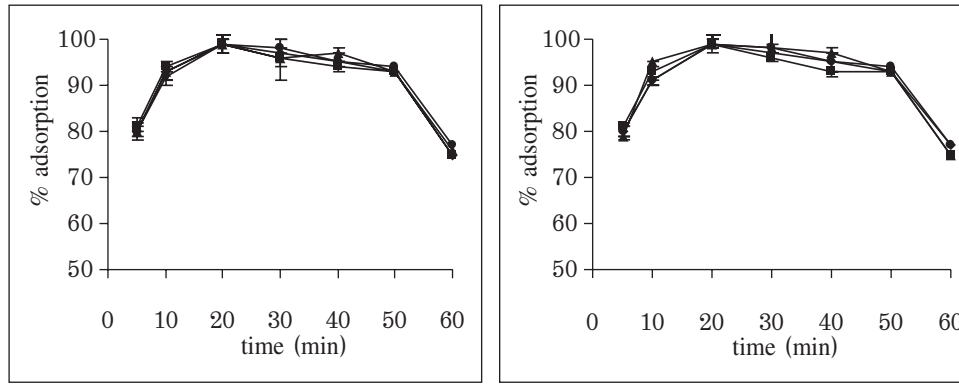
(A) อาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$

(B) อาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$



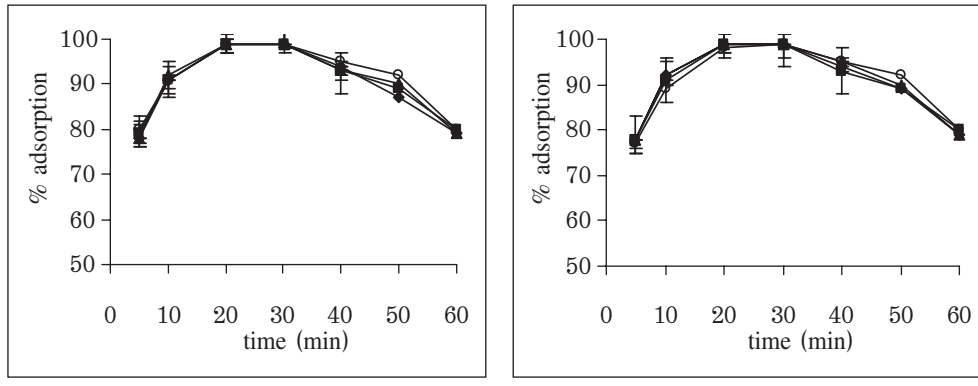
(A) (B)

รูปที่ 7 การเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจ ΦF-50 ในอาหารที่มีไดวาเลนท์แคทไอออนเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (♦) 10 มิลลิโมลาร์ (▲), 20 มิลลิโมลาร์ (○) และ 30 มิลลิโมลาร์ (■)
(A) อาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$
(B) อาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$



(A) (B)

รูปที่ 8 การเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจ ΦF-57 ในอาหารที่มีไดวาเลนท์แคทไอออนเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (♦) 10 มิลลิโมลาร์ (▲), 20 มิลลิโมลาร์ (○) และ 30 มิลลิโมลาร์ (■)
(A) อาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$
(B) อาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$



รูปที่ 9 การเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจ ΦF-59 ในอาหารที่มีไดวาเลนท์แคทไอออนเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (♦) 10 มิลลิโมลาร์ (▲), 20 มิลลิโมลาร์ (○) และ 30 มิลลิโมลาร์ (■)
(A) อาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$
(B) อาหาร MRS broth ที่มี $MgCl_2$

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมัก จำนวนทั้งหมด 51 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 38 ไอโซเลท และรูปไข่ 22 ไอโซเลท จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 60 โอโซเลท มาใช้เป็นโฮสท์สำหรับแยกแลบเฟจ พบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 4 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 ซึ่งโฮสท์ของเฟจเหล่านี้ คือ F42, F50, F57 และ F59 ตามลำดับ เมื่อนำโฮสท์มาจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าโฮสท์ F42 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc lactis* ร้อยละ 100 โฮสท์ F50 มีความคล้ายคลึงกับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ร้อยละ 99 เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Leuconostoc* sp. ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ปลาร้า [18] เป็นต้น ส่วนโฮสท์ F57 และ F59 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 100

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 อย่างไรก็ดี เฟจ ΦF-42 และเฟจ ΦF-50 ที่พบในงานวิจัยนี้มีรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจในกลุ่มแฟมิลี Siphoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ เช่น เฟจ ggg [19] ที่มีหัวขนาด 50 นาโนเมตร และหางยาว 125 นาโนเมตร

ส่วนกลุ่มที่สอง คือ เฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 ส่วนหัวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 94 × 44 และ 96 × 43 นาโนเมตร และส่วนหางสั้นไม่สามารถยืดหดได้ ขนาดความยาว 31 และ 23 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงจัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae แต่เฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 นี้มีรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจในกลุ่มแฟมิลี Podoviridae ที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ เช่น เฟจ P369 [20] ที่มีหัวขนาด 57 × 40 นาโนเมตร และหางยาว 19 นาโนเมตร และแลบเฟจส่วนใหญ่ที่เคยมีรายงานจะพบอยู่ในแฟมิลี Siphoviridae แต่ที่พบจัดอยู่ในแฟมิลี Podoviridae มีน้อยกว่าร้อยละ 1 และส่วนใหญ่จะเป็น lactococcal phages [21] เมื่อนำแลบเฟจทั้ง 4 ตัว มาศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น พบว่าแลบเฟจทั้ง 3 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50 และ ΦF-57 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบได้ ยกเว้นเฟจ ΦF-59 ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *W. cibaria* N22 ที่นำมาทดสอบได้ คุณสมบัติการมีโฮสท์-เรนจ์แคบของแลบเฟจที่แยกได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patarasmpiboon (2009) [22] ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น ซึ่งพบว่าเฟจ Φ22b และ Φ22s ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *Weissella* สปีชีส์อื่น หรือแบคทีเรียกรดแลคติกจีนัสอื่นได้

เมื่อนำแลบเฟจ 4 ตัว คือ ΦF-42, ΦF-50, ΦF-57 และ ΦF-59 มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด คือ *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I, *Mlu*I และ *Nde*I เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าเป็นแลบเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่าดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-42 มีบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-50 มีบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I นอกจากนี้ดีเอ็นเอของเฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 มีบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I แต่เนื่องจากรูปแบบดีเอ็นเอของเฟจทั้ง 2 ตัว หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นต่างกัน จึงแสดงให้เห็นว่าเฟจทั้ง 2 ตัว มีบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Sac*I และ *Mlu*I ต่างกัน จากผลการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอของแลบเฟจแต่ละตัวหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 9 ชนิดนั้น พบว่าแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นแลบเฟจต่างชนิดกัน นอกจากนี้ดีเอ็นเอของเฟจทั้ง 4 ตัว แม้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่กล่าวมาข้างต้น แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังแยกได้ไม่ชัดเจน (มีลักษณะของ smear bands ปรากฏอยู่) จึงควรเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นที่เหมาะสมต่อไป

จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ พบว่าการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจในอาหาร MRS broth ที่มี $CaCl_2$ หรือ $MgCl_2$ (10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์) ให้ผลไม่ต่างกัน โดยเฟจ ΦF-42 และ ΦF-50 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 99 และ 100 ในระยะเวลา 30 นาที ส่วนเฟจ ΦF-57 และ ΦF-59 สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 99 ในระยะเวลา 20 นาที ซึ่งเร็วกว่าเฟจ ΦJL-1 ที่พบว่าสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 96 ในระยะเวลา 30 นาที [9] แต่ช้ากว่าเฟจ Φ22b และ Φ22s ที่สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 99 ในระยะเวลา 10 นาที [23] ส่วนการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (10-30 มิลลิโมลาร์) ลงในอาหารเหลว MRS ไม่มีผลต่ออัตราการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ของเฟจทั้ง 4 ตัวในช่วง 30 นาทีแรก ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการทดลองก่อนหน้านี้ ที่พบว่าไดวาเลนท์แคทไอออนไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติด

โฮสท์ของเฟจในช่วง 30 นาทีแรก เนื่องจากขณะที่เฟจเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ของเฟจในรอบแรกนั้น ในอาหารเหลว MRS มีแคทไอออนชนิดอื่น เช่น โซเดียมไอออน (Na^+) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่เพียงพอต่อความต้องการที่จะช่วยให้เฟจสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ [9]

โดยสรุปแล้วงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแลบเฟจที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักเป็นครั้งแรกของประเทศไทย โดยเฉพาะการค้นพบแลบเฟจในแฟมิลี Podoviridae ถึง 2 ตัวในงานวิจัยนี้ นับว่าเป็นการค้นพบที่สำคัญซึ่งบ่งชี้ถึงความหลากหลายของแลบเฟจในผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมัก โดยเฉพาะการค้นพบว่า *W. cibaria* สามารถเป็นโฮสท์ที่ใช้ในการแยกแลบเฟจได้ เพราะมีรายงานการค้นพบจีนัสนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักไม่มากนัก อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลที่ได้จะพบว่าการปนเปื้อนโดยแลบเฟจในผลิตภัณฑ์ปลาหมักนั้นยังมีไม่มากนัก และแลบเฟจที่พบในงานวิจัยนี้ก็มีความจำเพาะกับโฮสท์ในจีนัส *Leuconostoc* sp. และ *Weissella* sp. ซึ่งไม่ใช่สายพันธุ์หลักที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก จึงอาจบ่งชี้ได้ว่าการปนเปื้อนแลบเฟจในผลิตภัณฑ์ปลาหมักนี้เป็นการปนเปื้อนส่วนน้อย การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแลบเฟจในงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่องานวิจัยทางด้านแบคทีริโอเฟจในอนาคตได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

เอกสารอ้างอิง

1. นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ. ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง, 159 หน้า.
2. Moineau, S. 1999. Applications of Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Reviews* 76: 377-382.
3. Binetti, A. G., and 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.
4. Capra, M. L., Quiberoni, A., and Reinheimer, J. A. 2004. Thermal and Chemical Resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* Bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology* 38(6): 499-504.
5. Coveney, H. M., Fitzgerald, G., F., and 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.
6. Neve, H., Berger, A., and Heller, K. J. 1995. A Method for Detecting and Enumerating Airborne Virulent Bacteriophage of Dairy Starter Cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 47: 193-207.

7. Josephsen, J., and Neve, H. 1998. Bacteriophages and Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S, and von Wright, S. A., Editors. New York. Marcel Dekker. p. 385-436.
8. Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria. Salminen, S., and Wright, A. V., Editors. New York. Marcel Dakker. p. 1-72.
9. Lu, Z., Breidt, Jr. F., Fleminga, H. P., Altermannb, E., and Klaenhammer, T. R. 2003. Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, ϕ JL-1, from a Cucumber Fermentation. *Journal of Food Microbiology* 84: 225-235.
10. Erko, S., and Michael, G. 1991. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. U.S.A. John Wiley and Sons.
11. Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J., and Vandamme, P. 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(1): 141-148.
12. Baross, J. A., Liston, J., and Morita, R. Y. 1978. Ecological Relationship Between *Vibrio parahaemolyticus* and Agar-Digesting Vibrios as Evidenced by Bacteriophage Susceptibility Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 500-505.
13. Koga, T., Toyoshima, S., and Kawata, T. 1982. Morphological Varieties and Host Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 466-470.
14. Birge, E. A., 2000. Bacterial and Bacteriophage Genetics. 4th Edition. New York. Springer.
15. Depaola, A., Motes, M. L., Chan, A. M., and Suttle, C. A. 1998. Phage Infecting *Vibrio vulnificus* Are Abundant and Diverse in Oysters Collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 84: 346-351.
16. Ghosh, A. M., Ansari, M. Q., and Datta, G. C. 1989. Isolation and Morphological Characterization of El Tor Cholera Phages. *Journal of General Virology* 70: 2241-2243.
17. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. 2nd Edition. U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Tanasupawat, S., Okada, S., and Komagata, K. 1998. Lactic Acid Bacteria Found in Fermented Fish in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology* 44: 193-200.
19. Greer, G. G., Dilts, B. D., and Ackermann, H. W. 2007. Characterization of a *Leuconostoc gelidum* Bacteriophage from Pork. *International Journal of Food Microbiology* 114: 370-375.
20. Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M.,C., and Moineau, S. 2006. Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4338-4346.

21. Ackermann, H. W. 2001. Frequency of Morphological Phage Descriptions in the Year 2000. *Archaeology of Virology* 146: 843-857.
22. Patarasinpaiboon, N., Pringsulaka, O., Rangsiruji, A., and Suwannasai, N. 2009. Isolation of LAB phage from Nham (Thai Fermented Pork) in Thailand. *Srinakharinwirot Science Journal* 25(1): 101-113.

ได้รับบทความวันที่ 7 ตุลาคม 2553
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 10 พฤศจิกายน 2553