บทความวิจัย

การแยกแลบเฟจจากตัวอย่างแหนมในประเทศไทย

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์* อรอนงค์ พริ้งศุลกะ อัจฉริยา รังษิรุจิ และ ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย

บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียกรดแลคติคและแลบเฟจจากตัวอย่างแหนมในประเทศไทยทั้งหมด 36 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดมาแยกแลบเฟจพบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้เพียง 1 ตัว คือ ϕ 22 เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติค N 22 ที่ใช้เป็นโฮสท์ในการแยกเฟจดังกล่าว โดยใช้ชุด API 50 CHL และลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank แสดงให้เห็นว่าโฮสท์ N 22 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 99 สำหรับลักษณะทั่วไปของเฟจ ϕ 22 พบว่ามีพลาคขนาดเล็กโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 มิลลิเมตร และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านพบว่าจัดอยู่ใน Family Podoviridae โดยมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาด 91x36 นาโนเมตร และส่วนหางสั้นความยาว 27 นาโนเมตร เมื่อนำมาศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่นพบว่า เฟจ ϕ 22 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *Weissella* สปีชีส์อื่นหรือแบคทีเรียกรดแลคติคต่างสปีชีส์ได้ และจากการศึกษากราฟการเจริญพบว่ามี latent period และ burst size เท่ากับ 110 นาที และ 55 phage particles/infected cell ตามลำดับ สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับโฮสท์ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5-8 และค่า *D* values ของ ϕ 22 สามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และปริมาณเฟจจะลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 60 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 20 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาน้อยกว่า 10 วินาที ซึ่งจากการศึกษาทั้งหมดพบว่าเป็นรายงานครั้งแรกที่ค้นพบแลบเฟจของ *Weissella cibaria* นอกจากนี้เฟจที่ได้มีลักษณะรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจของ *Weissella* และแลบเฟจส่วนใหญ่ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่เคยมีรายงาน

คำสำคัญ: แลบเฟจ แบคทีเรียกรดแลคติค แหนม การแยก

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: keng_mb12@hotmail.com

Isolation of LAB phage from Nham (Thai Fermented Pork) in Thailand

Nattaporn Patarasinpaiboon*, Onanong Pringsulaka, Achariya Rangsiruji and Nuttika Suwannasai

ABSTRACT

Lactic acid bacteria and LAB phage from Nham (Thai Fermented Pork) in Thailand were isolated. From a total of 36 samples, 41 isolates of lactic acid bacteria were obtained and employed as hosts for isolation of phages. It was found that only one phage designated ϕ 22 was isolated. The lactic acid bacterial isolate named N 22 which was sensitive to ϕ 22 infection was identified by API 50 CHL kit and a full length of the 16S rRNA sequence was analyzed. The result from the 16S rRNA sequence revealed that the isolate possessed 99% similarity to *Weissella cibaria* in the GenBank database. Phage ϕ 22 formed small plaques with entire edges of 0.3 mm in diameter. Electron micrographs indicated that the phage head was hexagonal, head size and length of tail were 91x36 nm and 27 nm, respectively. On the basis of the morphology, this phage belonged to the family Podoviridae. Host-range determination revealed that phage ϕ 22 was not capable of infecting all of the 41 isolates of lactic acid bacteria and referenced *Weissella* strains used. One-step growth experiment showed that the latent period and burst size were estimated at 110 min and 55 phage particles/infected cell, respectively. Furthermore, the phage was infective over a wide range of pH (pH 5-8) and the *D* values of ϕ 22 were calculated as 60 s at 70°C and 15 s at 80°C. Phage titers decreased below the detection limit after heating for more than 60 s at 80°C, or 20 s at 90°C or less than 10 s at 100°C. This is the first report on the isolation of *Weissella cibaria* phage and the isolated phage ϕ 22 was different from other *Weissella* phages as well as other phages infecting lactic acid bacteria.

Keywords: LAB phage, lactic acid bacteria, Nham, isolation

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

*Corresponding author, e-mail: keng_mb12@hotmail.com

บทนำ

แหนมเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประชาชนทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการบริโภคอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาค มีรสเปรี้ยว แหนมที่นิยมบริโภคกันส่วนใหญ่จะผลิตจากเนื้อหมู ซึ่งมีหลายประเภท เช่น แหนมหูหมู แหนมหมูผสมหนังหมู แหนมซี่โครงหมู เป็นต้น การหมักแหนมทำได้โดยนำเนื้อหมูมาผสมกับข้าวสุกบด กระเทียมบด และเครื่องปรุงต่างๆ จากนั้นบ่มไว้ประมาณ 3-4 วัน เพื่อให้เกิดการหมัก อันเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติค [1] จนผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว การผลิตแหนมในปัจจุบันมักผลิตในลักษณะอุตสาหกรรมในครัวเรือน ทำให้มีปัญหาในการควบคุมคุณภาพ แหนมที่ผลิตได้มีอายุการเก็บรักษาสั้น มีการเน่าเสียสูง รวมทั้งมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ ทั้งนี้สาเหตุหลักเกิดจากการผลิตที่ยังไม่มีการควบคุมสุขลักษณะ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแต่ละครั้งไม่คงที่ ผู้ผลิตมักอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในการหมัก แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยไม่มากนักเกี่ยวกับสาเหตุอื่นๆ ที่ทำให้การหมักแหนมให้ผลที่ไม่ดี

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟจ (phage) เป็น bacterial virus หมายถึง กลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ค้นพบครั้งแรกโดย Twort ในปี ค.ศ. 1915 และ d' Herelle ในปี ค.ศ. 1917 โดย d' Herelle ได้ให้ความหมายของแบคเทอริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย [2] เฟจจัดเป็นออบลิเกต-พาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรีย ทำให้การเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฟจเกิดขึ้นเฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฟจจะเข้าไปเกาะติดกับผนังเซลล์และปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นก็เข้าสู่วงชีวิตของเฟจเพื่อเพิ่มจำนวนอนุภาคเฟจต่อไป [3]

แลคติคแอซิดแบคเทอริโอเฟจ หรือแลคติคเฟจ (lactic phage) หรือแลบเฟจ (LAB phage) คือ เฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe: GRAS) และได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผักและผลไม้ ปลา และเนื้อสัตว์ [4, 5] จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติคช่วยในการสร้างกรดของผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติคยังมีคุณสมบัติเป็นสารกันบูดชีวภาพ (biopreservative) [6] ซึ่งในการผลิตอาหารหมักให้ได้ผลดีนั้นขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัยทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ รวมถึงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก (starter) และแบคเทอริโอเฟจ โดยพบว่าถ้าหัวเชื้อเริ่มต้นมีการปนเปื้อนด้วยแลบเฟจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นมีจำนวนน้อยและไม่สามารถทำให้การหมักเกิดกรดได้ตามต้องการ ส่งผลเสียต่อผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาหารไม่ดี การหมักใช้เวลานาน [7] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติคและแยกแลบเฟจซึ่งปนเปื้อนในแหนม จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแลบเฟจ เพื่อสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการควบคุมการผลิตอาหารหมักให้ได้ผลดี และทราบแนวทางการป้องกันการปนเปื้อนจากแลบเฟจในเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตอาหารหมัก

วิธีการทดลอง

การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค

ใช้ loop เผาไฟจนแดง รอจนเย็นแล้วนำ loop แตะบริเวณต่างๆ ของแหนม นำมา streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคเบื้องต้น โดยดูจากรูปร่าง การไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และจัดจำแนกในระดับจีนัสโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 4.4 และ 9.6 ความสามารถในการเจริญที่สภาวะมี NaCl เข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 และการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส [8] จากนั้นทำการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (โดยใช้วิธีการตามบริษัทผู้ผลิตกำหนด) และอาศัยลำดับเบสในยีน 16S rRNA โดยการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติคตามวิธีการของ Lu และคณะ [7] แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาเป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย โดยใช้ primers ที่มีลำดับเบสดังนี้ [9]

forward primer (8-27f) : 5’ AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3’

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

จากนั้นทำการผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR แล้วนำไปเข้าเครื่อง MiniCycler™ (Bio-Rad, U.S.A.) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ตามวิธีการของ Björkroth และคณะ [10] นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR นี้ มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส นำ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIA quick Gel extraction Kit (QIAGEN) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกันกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST)

การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เป็นโฮสท์

เตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติคโดยให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.6 ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 6-7 ชั่วโมง จากนั้นใส่แหนมปริมาณ 25 กรัมลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปตกตะกอน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีแลบเฟจอยู่หรือไม่ [11, 12]

การตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำน้ำใสที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแบคทีเรียกรดแลคติคปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้วบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสหรือพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้น [13]

การหาปริมาณของแลบเฟจ

การหาปริมาณของแลบเฟจทำได้โดยเจือจางแลบเฟจในตัวอย่างแบบ serial dilution ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของแลบเฟจในแต่ละระดับความเจือจางและแบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้เป็นโฮสท์มาหาปริมาณแลบเฟจ โดยการทำอาหารวุ้นสองชั้น นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจางเพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาค (Plaque forming unit/ml; PFU/ml) โดยคำนวณได้จากสูตร [14]

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

การศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เตรียมแลบเฟจในอาหารเหลว โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคเพาะเลี้ยงในอาหาร 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 หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025 x g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีแลบเฟจมาเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และเติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8,000 (polyethylene glycol 8,000) ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้งและนำแลบเฟจที่ตกตะกอนได้มาส่องดูรูปร่างของแลบเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [14-16]

การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น และจีนัสอื่น

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น ได้แก่ *W. confusa* NRIC 0207, *W. hellenica* NRIC 0203, *W. paramesenteroides* NRIC 1542 และ *W. thailandensis* FS61-1 (ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อทั้ง 4 สปีชีส์จากรองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสอื่นที่จะทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเททับ

ลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว จากนั้นหยดแลบเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่นหรือจีนัสที่นำมาทดสอบจากการเกิดพลาคบริเวณที่หยดแลบเฟจลงไป [11, 12]

การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ (One-step growth experiment)

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่ติดเชื้อด้วยแลบเฟจเป็นเวลา 10 นาที มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนตะกอนมาทำการแขวนลอยในอาหาร MRS broth เก็บตัวอย่างทุก 5-10 นาที เป็นเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น นำปริมาณเฟจที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเฟจ โดยกำหนดให้ระยะเวลาตั้งแต่เฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็น latent period [2, 17] และคำนวณ burst size ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนของจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของ latent period ต่อจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรก ตามวิธีของ Adams [2]

การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของเฟจ

นำสารแขวนลอยของแลบเฟจในแต่ละระดับความเจือจางและเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้เป็นโฮสท์มาหาปริมาณแลบเฟจ โดยการทำอาหารวุ้นสองชั้น ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 และ MRS agar ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.4-9.6 บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจางเพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาค [7]

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ

ตามวิธีการของ Lu และคณะ [7] โดยนำเฟจมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยให้มีค่าความสามารถในการเกิดพลาคเป็น 10^6 PFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างของเฟจที่ช่วงเวลาต่างๆ มา 1 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

ผลการทดลอง

การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค

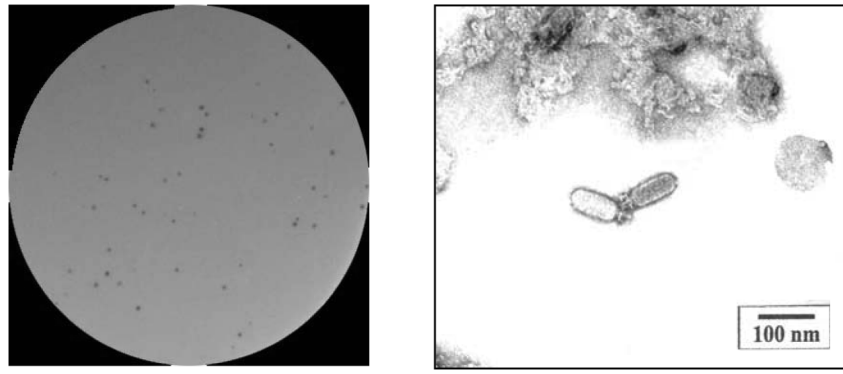
จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างแหนมจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เป็นโคโลนีเดี่ยวขนาด 1-3 มิลลิเมตร ที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลลบในการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส เมื่อนำมาจัดจำแนกจีนัสและสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่า

ความเป็นกรดด่าง 4.4 และ 9.6 ความสามารถในการเจริญที่สภาวะมี NaCl เข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 และการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคสพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลท

การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เป็นโฮสท์

นำแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมด 41 ไอโซเลท มาทำการแยกแลบเฟจ และนำมาตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นพบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 1 ตัว จากโฮสท์ N 22 ที่ได้จากตัวอย่างแหนมจังหวัดเชียงใหม่ และให้ชื่อแลบเฟจที่แยกได้ว่า ϕ 22 เมื่อนำโฮสท์ N 22 มาจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomerieux, France) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Weissella* sp. ร้อยละ 91.8 และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในยีน 16S rRNA พบว่าโฮสท์ N 22 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 99

สำหรับลักษณะทั่วไปของเฟจ ϕ 22 พบว่ามีพลาคขนาดเล็กโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 มิลลิเมตร (รูปที่ 1A) และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านพบว่า ϕ 22 มีรูปร่างเป็นหกเหลี่ยม ส่วนหางสั้นจัดอยู่ในกลุ่ม C ตามวิธีของ Bradley และอยู่ใน Family Podoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส โดยส่วนหัวมีขนาด 91x36 นาโนเมตร และส่วนหางยาว 27 นาโนเมตร (รูปที่ 1B)



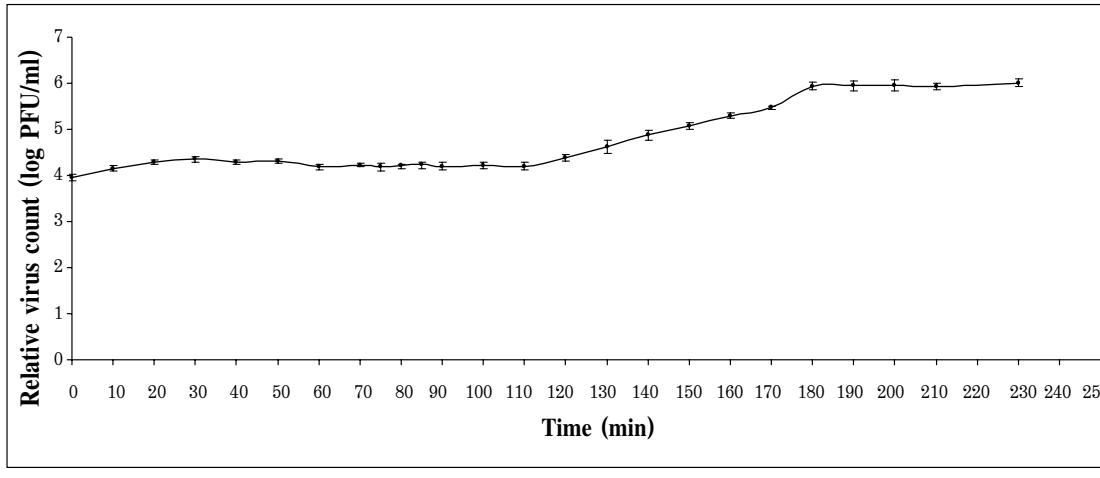
รูปที่ 1 ลักษณะพลาคและรูปร่างของแลบเฟจ ϕ 22
(A) ลักษณะพลาค
(B) รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น และจีนัสอื่น

การศึกษาสมบัติของแลบเฟจ ϕ 22 ในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น ได้แก่ *W. confusa* NRIC 0207, *W. hellenica* NRIC 0203, *W. paramesenteroides* NRIC 1542 และ *W. thailandensis* FS61-1 และแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสอื่น ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมจำนวน 41 ไอโซเลท และ *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 พบว่าแลบเฟจ ϕ 22 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคทุกชนิดที่ทำการทดสอบ

การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ (One-step growth experiment)

จากการศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ ϕ 22 (รูปที่ 2) จากกราฟ พบว่าเฟจมี latent period เท่ากับ 110 นาที และเมื่อคำนวณ burst size พบว่ามีค่าเท่ากับ 55 particles/infected cell



รูปที่ 2 กราฟการเจริญของแลบเฟจ ϕ 22

การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของเฟจ

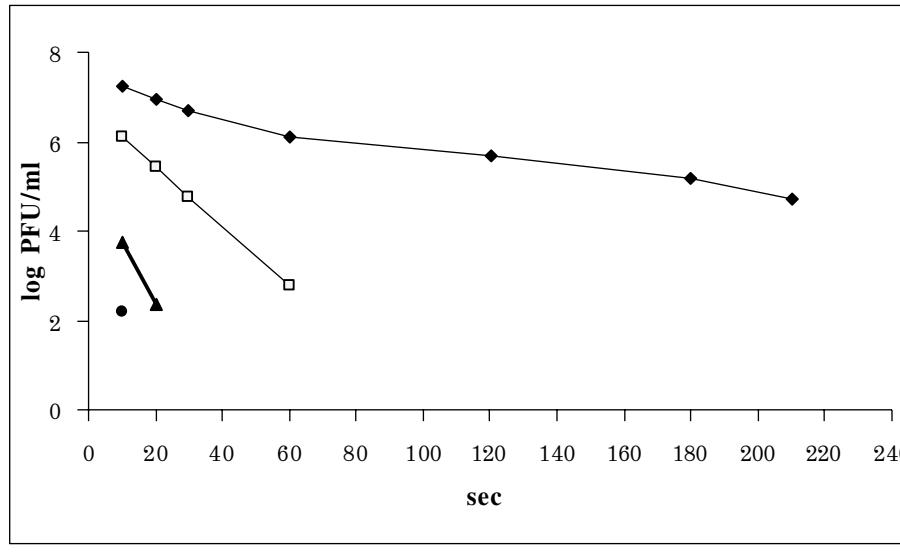
เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 และ MRS agar ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.4-9.6 ในการเตรียมการทำวุ้น 2 ชั้น เพื่อทดสอบปริมาณพลาคที่เกิดขึ้น พบว่าค่าความสามารถในการเกิดพลาคที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความสามารถในการเกิดพลาคที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ

ค่าความเป็นกรดด่าง	ค่าความสามารถในการเกิดพลาค (PFU/ml)
4.4	0
5	7.8×10^6
6	1.28×10^8
7	1.02×10^9
8	2.5×10^8
9.6	0

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ

เมื่อนำแลบเฟจ ϕ 22 ที่มีค่าความสามารถในการเกิดพลาคเท่ากับ 10^6 PFU/ml มาบ่มที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถหาค่า *D* values (ระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเฟจลดลง 1 log (PFU/ml) ณ อุณหภูมินั้น) ของ ϕ 22 สามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และปริมาณเฟจจะลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 60 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 20 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 10 วินาที (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ ϕ 22 [อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (◆), อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (◇), อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (▲), และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (●)]

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนมจำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลท ซึ่งจากกระบวนการผลิตแหนมที่ทำการบรรจุโดยไล่อากาศออกแล้วปล่อยให้เกิดการหมักด้วยเชื้อในธรรมชาติที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญ ดังนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เจริญมักจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ส่วนจุลินทรีย์อื่นที่ต้องการออกซิเจนจะไม่เจริญเติบโต และจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ชอบความเป็นกรดจะตายเพราะกรดที่สร้างออกมาจากจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติค [18] โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่ทราบสายพันธุ์ในแหนมที่หมักตามธรรมชาติ (natural fermentation) มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus bavaricus, Lb. curvatus, Lb. farciminis, Lb. plantarum, Lb. sake, Pediococcus damnosus, P. acidilactici, P. pentosaceus* และ *Leuconostoc* sp. [19] อย่างไรก็ตามการหมักตามธรรมชาติ กิจกรรมการหมักมักไม่คงที่ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของแหนมที่ผลิตได้ เทคโนโลยีการผลิตแหนมในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังนิยมการหมักโดยอาศัยเชื้อตามธรรมชาติ และใช้ดินประสิวเข้าช่วยเพื่อให้แหนมน่ารับประทาน จากการสำรวจผู้ผลิตจำนวน 80 ราย ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าทุกรายใช้วิธีการหมักตามธรรมชาติโดยใช้ดินประสิวหรือแป้งช่วยในการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่ามีผู้ผลิตในภาคเหนือตอนบนเพียงรายเดียวเท่านั้นที่ใช้เทคนิคการผลิตโดยใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ แต่ไม่พบผู้ผลิตที่ใช้เทคนิคการฉายรังสีแต่อย่างใด [20]

เมื่อนำโฮสท์ N 22 มาจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomerieux, France) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Weissella* sp. ร้อยละ 91.8 และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในยีน 16S rRNA พบว่าโฮสท์ N 22 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 99 ลำดับเบสในยีน 16S rRNA ของโฮสท์ N 22

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้มาใช้เป็นโฮสท์สำหรับการแยกแลบเฟจพบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 1 ตัว คือ เฟจ ϕ 22 ซึ่งทำให้เกิดพลาคขนาด 0.3 มิลลิเมตร เมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านพบว่าจัดอยู่ใน Family Podoviridae โดยมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาด 91x36 นาโนเมตร และส่วนหางสั้น ความยาว 27 นาโนเมตร ซึ่งมีลักษณะรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจของ *Weissella* sp. และแลบเฟจส่วนใหญ่ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่เคยมีรายงาน โดยส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ใน Family Siphoviridae เช่น เฟจ ϕJL-1 [7] ที่มีหัวขนาด 59 nm และหางยาว 182 nm และเฟจ B2 [20] ที่มีหัวขนาด 110 nm หางยาว 500 nm เมื่อนำมาศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น พบว่าเฟจ ϕ 22 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *Weissella* สปีชีส์อื่นหรือแบคทีเรียกรดแลคติคต่างสปีชีส์ได้ ซึ่งคล้ายกับเฟจของเชื้อ *Weissella* สายพันธุ์อื่นที่เป็นเฟจที่มีความสามารถในการติดเชื้อกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น [21]

จากการศึกษากราฟการเจริญ พบว่าเฟจ ϕ 22 มี latent period เท่ากับ 110 นาที ซึ่งนานกว่าเฟจ phage B2 [22] ที่มี latent period เท่ากับ 75 นาที และเฟจ ϕJL-1 [7] ที่มี latent period เท่ากับ 35 นาที เฟจ ϕ 22 มี burst size เท่ากับ 55 phage particles/infected cell ซึ่งใหญ่กว่าเฟจ ϕJL-1 [7] และเฟจ B2 [22] ที่มี burst size เท่ากับ 22 และ 12-14 phage particles/infected cell ตามลำดับ แต่เฟจ ϕ 22 มีขนาด burst size ที่เล็กกว่าเฟจ fri [23] ที่มี burst size เท่ากับ 200 phage particles/infected cell

เฟจ ϕ 22 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับโฮสท์ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5-8 และค่า *D* values ของ ϕ 22 สามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปริมาณเฟจจะลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 60 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 20 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาน้อยกว่า 10 วินาที ซึ่งเฟจ ϕ 22 มีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยกว่าเฟจ ϕJL-1 [7] ที่มีค่า *D* values เท่ากับ 2.7 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 0.2 นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากการศึกษาทั้งหมดพบว่าเป็นรายงานครั้งแรกที่ค้นพบแลบเฟจของ *Weissella cibaria* และเฟจที่ได้มีลักษณะรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจของ *Weissella* sp. และแลบเฟจส่วนใหญ่ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่เคยมีรายงาน นอกจากนี้จากผลการศึกษาผลของอุณหภูมิและผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของเฟจ ϕ 22 ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันการปนเปื้อนจากแลบเฟจในเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตอาหารหมักได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์มอบเชื้อทดสอบ และอาจารย์ศรีกาญจนา คล้ายเรือง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างแหนมบางส่วน รวมทั้งอาจารย์ ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำด้านการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติค

เอกสารอ้างอิง

1. Adam, M. R., and Moss, M. O. 1995. Food Microbiology. Cambridge. The Royal Society of Chemistry.
2. Adams, M. H. 1959. Bacteriophages. New York. Interscience Publishers.
3. Mckane, L., and Kandel, J. 1996. Microbiology. U.S.A. McGraw-Hill.
4. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2539. อาหารจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียนานาชาติ (ตอนที่ 3). *วารสารจาร์พา* 3 (3): 29-31.
5. Geoffrey, C. P. 1987. Fermentation Foods of the World: A Dictionary and Guide. London. Butterworth.
6. Kelly, W. J., Asmunson, R. V., and Huang, C. M. 1996. Characterization of Plantaricin KW30, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum. Journal of Applied Bacteriology* 81: 657-662.

7. 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.
8. Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Genus *Weisella.* In: Sneath, P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Baltimore. Williams and Wilkins.
9. Erko, S., and Michael, G. 1991. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. U.S.A. John Wiley and Sons.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Birge, E. A., 2000. Bacterial and Bacteriophage Genetics. 4th Edition. New York. Springer.
14. 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.
15. 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.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. 2nd Edition. U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Ellis, E. L., and Delbruck, M. 1939. The Growth of Bacteriophage. *Journal of General Physiology* 22: 365-384.
18. ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ และ ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์. 2536. Rapid method และ Automation สำหรับจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
19. ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2546. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) กรุงเทพฯ. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

20. อารี วิบูลย์พงศ์ ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์ เยาวเรศ เชาวนพูนผล วิมล อารยะรัตน์ และนัทธียา หวั่นท๊อก. 2545. รายงานการวิจัยการศึกษาสถานภาพการผลิตแหนม: ภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ได้จาก http://www. mcc.cmu.ac.th/agbus/data/research%20paper/Project%20Nham.pdf. 7 เมษายน 2551.
21. Lu, Z., Breidt, Jr. F., Fleminga, H. P., and Plengvidhya, V. 2003. Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3192-3202.
22. Nester, E. W., Roberts, C. B., and Nester, M. T. 1995. *Microbiology: A Human Perspective.* U.S.A. Wn. C. Brown.
23. Trevors, K. E., Holley, R. A., and Kempton, A. G. 1983. Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage Isolated from a Meat Starter Culture. *Journal of Applied Bacteriology* 54: 281-288.

ได้รับบทความวันที่ 19 มีนาคม 2552
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 7 เมษายน 2552