บทความวิจัย

การเหนี่ยวนำโปรเฟจที่แทรกอยู่ใน *Lactobacillus paracasei* ที่แยกได้จากนมเปรี้ยว

สิรินธร สุนทรธรรมาสน์[1] Katsumi Doi[2] ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย[3]
อัจฉริยา รังษิรุจิ[1] และ อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[3*]

บทคัดย่อ

Lactobacillus (Lb.) paracasei ถูกนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักหลากหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักที่เกิดขึ้นในการผลิตนมหมักคือ การปนเปื้อนด้วยเฟจซึ่งส่งผลให้การหมักในโรงงานผลิตนมหมักเกิดช้าลงหรือไม่สมบูรณ์ การศึกษาของกลุ่มผู้วิจัยก่อนหน้านี้ได้แยกเชื้อ *Lb. paracasei* LPC จากผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว ซึ่งค้นพบว่าในหัวเชื้อนี้มีโปรเฟจแทรกอยู่และจะสามารถหลุดออกมาได้เป็นครั้งคราวโดยการเหนี่ยวนำที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ แต่การเกิดการเหนี่ยวนำลักษณะนี้มักไม่ได้เหนี่ยวนำได้ทุกครั้งหรือไม่สามารถคาดการณ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการเหนี่ยวนำโปรเฟจที่แทรกอยู่ใน *Lb. paracasei* LPC รวมทั้งทดสอบในสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจอีก 10 ไอโซเลตด้วยรังสียูวีและสารไมโตมัยซินซีรวมถึงสภาวะต่างๆ ในระหว่างการหมักนม ผลการทดลองพบว่า การเหนี่ยวนำโปรเฟจของเชื้อจะเกิดขึ้นโดยอาศัยไมโตมัยซินซีเท่านั้น นอกจากนี้ไมโตมัยซินซียังสามารถเหนี่ยวนำโปรเฟจที่แทรกอยู่ในสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจอีก 3 สายพันธุ์ด้วย จากการศึกษานี้จึงเห็นได้ว่า ระบบการกดการเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดในเชื้อกลุ่มแลคโตบาซิลไลเพื่อให้โปรเฟจคงอยู่ในสภาวะพักเป็นระบบที่ซับซ้อน

คำสำคัญ: การเหนี่ยวนำโปรเฟจ *Lactobacillus paracasei* นมเปรี้ยว

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]Laboratory of Microbial Genetic Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

[3]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: onanong@g.swu.ac.th

Prophage Induction in *Lactobacillus paracasei* Isolated from Fermented Milk

Sirinthorn Sunthornthummas[1], Katsumi Doi[2], Nuttika Suwannasai[3], Achariya Rangsiruji[1] and Onanong Pringsulaka[3*]

ABSTRACT

Lactobacillus paracasei has been used as a starter for manufacturing of various fermented dairy products. However, one of the main problems of dairy production is the contamination of phages which leads to slow or incomplete fermentation in the dairy industry. In our previous study, *Lb. paracasei* LPC which was isolated from one of the fermented milk products was found to harbor a prophage. This prophage may be released by spontaneous induction of *Lb. paracasei* LPC but this phenomenon was unpredictable. Therefore, the present study aimed to induce the prophages from the lysogenized *Lb. paracasei* LPC and 10 phage resistant mutant strains by using standard inducing agent (ultraviolet radiation and mitomycin C). Certain culture conditions in the fermented milk production were also investigated to determine the possibility of these phages being induced. The results showed that the strong induction of the prophages in the lysogenized *Lb. paracasei* LPC was obtained only when the mitomycin C was employed. This type of inducible phages was also generated from other three resistant strains. These findings revealed that the repression system that maintains the prophages in the dormant state in lactobacilli strains is sophisticated.

Keywords: prophage induction, *Lactobacillus paracasei,* fermented milk

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

[2]Laboratory of Microbial Genetic Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

[3]Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

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

บทนำ

เฟจ (phage) หรือไวรัสที่ติดเชื้อโดยมีแบคทีเรียเป็นโฮสต์ สามารถแบ่งตามวงชีวิตออกได้เป็น 2 ประเภท คือ virulent phage และ temperate phage โดยเฟจประเภทแรกจะมีการเพิ่มจำนวนโดยอาศัย lytic cycle ซึ่งจะทำให้มีการสร้างอนุภาคเฟจออกมาเป็นจำนวนมาก และทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตกสลาย ส่วนเฟจประเภทที่ 2 หรือ temperate phage หลังจากการติดเชื้อแล้ว เฟจประเภทนี้สามารถเข้าวงชีวิตได้ทั้งแบบ lytic และ lysogenic cycle วงชีวิตแบบ lysogenic cycle จะมีการแทรกดีเอ็นเอเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย และจะเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับแบคทีเรีย โดยจะเรียกแบคทีเรียที่มีเฟจแทรกอยู่ว่า lysogen หรือ lysogenic cell และเรียกเฟจที่เข้าไปแทรกอยู่ในแบคทีเรียว่า โปรเฟจ (prophage) ซึ่งโปรเฟจจะอยู่ในระยะพัก (inactive) เมื่อแบคทีเรียมีการแบ่งตัว แบคทีเรียตัวใหม่ก็จะมีโปรเฟจแทรกอยู่ สภาวะที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ในโครโมโซมของโฮสต์นี้เรียกว่า lysogeny ซึ่งจะไม่มีการสร้างอนุภาคไวรัส และแบคทีเรียที่มีโปรเฟจจะดำรงชีวิตปกติ อย่างไรก็ตาม temperate phage อาจเข้าสู่ lytic cycle ได้เมื่อมีการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำ (induction) จากสารเคมีหรือสภาพแวดล้อมบางอย่าง หรือจากการแตกหักของดีเอ็นเอ [1]

โปรเฟจสามารถทำให้แบคทีเรียที่ติดเชื้อเกิดภูมิต้านทาน (immunity) ต่อการติดเชื้อซ้ำ (super-infection) โดยเฟจกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจีโนมของแบคทีเรีย และโปรเฟจยังอาจเป็นตัวส่งผ่านยีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรง (โดยกระบวนการ transduction หรือ lysogenic conversion) หรืออาจทำหน้าที่โดยตรงในการควบคุมความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรีย [2, 3] ในสภาวะที่มีเซลล์แบคทีเรียมาก แบคทีเรียมีการสร้างพลังงานมาก เฟจจะเข้าสู่ lytic cycle เพื่อสร้างเฟจลูกหลานจำนวนมาก แต่ในสภาวะที่มีการสร้างพลังงานต่ำ เฟจจะดำรงชีวิตในรูปของโปรเฟจเพื่อความอยู่รอด โปรเฟจจะหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียโดยการเหนี่ยวนำ (lysogenic induction หรือ prophage induction) จากนั้นเฟจจะเข้าสู่ lytic cycle โดยสารที่นิยมใช้เหนี่ยวนำคือไมโตมัยซินซี และรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต นอกจากนี้อาจเกิดจากสภาวะที่โฮสต์อาศัยอยู่หากมีสารอาหารต่ำ เฟจจะเข้าสู่ lysogenic cycle แต่หากสารอาหารเหมาะสมเฟจจะเข้าสู่ lytic cycle [1]

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก และขนมปัง [4] โดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกก่อให้เกิดผลดีคือ สามารถยืดอายุการเก็บอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนผสมในวัตถุดิบ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติกทำให้อาหารมี pH ลดลง และไม่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร [5, 6] นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์จะสร้างสารประเภทเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอื่น [7-9] อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการหมักโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหัวเชื้อตามธรรมชาตินั้นมักถูกยับยั้งโดยสารต่างๆ เช่น สารปฏิชีวนะที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ หรือสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการชำระล้างอุปกรณ์ในการผลิต แต่ส่วนใหญ่มักเกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นหัวเชื้อเกิดการติดเชื้อด้วยเฟจ [10, 11] จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกหลายจีนัสเป็น lysogenic cell กล่าวคือมีโปรเฟจแทรกอยู่ในจีโนมอย่างน้อย 1 บริเวณ โดย lysogenic cell ที่พบในอุตสาหกรรมการหมักนมที่มีโปรเฟจได้แก่ *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis, Lc. lactis* subsp. *cremoris, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus (Lb.) delbrueckii, Lb. casei, Lb. rhamnosus* หรือ *Bifidobacterium longum* [12-19] โดย lysogenic cell

เหล่านี้จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการและคงอยู่ในการหมักเป็นระยะเวลาหนึ่ง จนกระทั่งพบกับสิ่งแวดล้อมที่เหนี่ยวนำให้โปรเฟจเข้าสู่ lytic cycle และปล่อยอนุภาคของเฟจออกมา ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่อาจไม่ได้มาตรฐานตามมา ดังนั้นอุตสาหกรรมการหมักนมจึงควรให้ความสำคัญในการคัดเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อว่า สายพันธุ์เหล่านี้จะต้องไม่มีการแทรกตัวของโปรเฟจ

ในการศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ได้แยกสายพันธุ์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักนมเปรี้ยว คือ *Lb. paracasei* สายพันธุ์ LPC ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้หมักนมเปรี้ยวทางการค้าและพิสูจน์แล้วว่ามีโปรเฟจแทรกอยู่ [20] รวมทั้งสามารถแยกเฟจที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ดังกล่าวจากตัวอย่างนมเปรี้ยวจากโรงงานแห่งนี้ อีกทั้งยังได้พัฒนาสายพันธุ์กลายที่ทนต่อการติดเชื้อด้วยเฟจ อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์กลายที่ทนต่อการติดเชื้อด้วยเฟจเหล่านี้อาจเกิดจากกลไกในการต้านทานเฟจที่แตกต่างกัน หนึ่งในนั้นคือการพบโปรเฟจแทรกอยู่ในดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียส่งผลให้เฟจตัวอื่นๆ ไม่สามารถติดเชื้อในแบคทีเรียตัวนั้นๆ ได้ ซึ่งสายพันธุ์กลายนี้ไม่ควรจะนำมาใช้ในการหมักนมเพื่อแทนที่สายพันธุ์ตั้งต้น ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโปรเฟจที่แทรกอยู่ใน *Lb. paracasei* สายพันธุ์ LPC และสายพันธุ์กลายที่ทนต่อการติดเชื้อด้วยเฟจดังกล่าว โดยการเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดออกที่ใช้ในการศึกษานี้คือ การใช้รังสีอุตราไวโอเล็ต ไมโตมัย-ซินซี และสภาวะต่างๆ เพื่อที่จะพิสูจน์ว่ามีโปรเฟจแทรกอยู่จริงโดยใช้รังสีอุตราไวโอเล็ต ไมโตมัยซินซี และเมื่อเผชิญกับสภาวะที่เลียนแบบในโรงงานผลิตนมหมักแล้ว มีโปรเฟจหลุดออกมาหรือไม่ ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมนมที่พบการติดเชื้อจากเฟจภายหลังการหมักนมและละเลยสาเหตุการตรวจสอบโปรเฟจในหัวเชื้อจะได้สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจสอบหัวเชื้อภายในโรงงานอย่างเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบเฟจด้วยวิธี double agar layer technique

เลี้ยงหัวเชื้อ *Lb. paracasei* LPC หรือสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจที่แยกได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ 1-2, 1-16, 2-25, 3-1, 3-6, 3-13, 3-17, 3-27, 3-31 และ 3-34 ในอาหารแข็งเอียง MRS agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแขวนลอยในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนได้ OD ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 นำมาทำการเพิ่มจำนวนโดยใช้วิธีเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น โดยนำเชื้อข้างต้นมา 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารวุ้น MRS ที่มีการเติมวุ้น 0.5% ที่หลอมเหลวแล้ว จากนั้นผสมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเฟจปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตพลาค (plaque) หรือบริเวณที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเฟจแล้วเข้าทำลายโฮสต์จนทำให้มองเห็นเป็นวงใสบนพื้นของแบคทีเรียที่เจริญลักษณะเป็นฝ้าบนจานอาหาร (lawn) [21, 22]

การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและไมโตมัยซินซี

- การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยไมโตมัยซินซี

เลี้ยงหัวเชื้อ *Lb. paracasei* LPC รวมทั้งสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจข้ามคืนในอาหาร MRS broth จากนั้นดูดมา 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร MRS broth ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดค่า OD เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นบ่มใน waterbath เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมสารไมโตมัยซินซี (Sigma, USA) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทุกชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (หรือจนกว่าค่า OD จะลดลง ซึ่งแสดงว่าโปรเฟจเริ่มหลุดออกจากเซลล์และเข้าสู่ lytic cycle ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก) ในเบื้องต้นนี้หากมีการลดลงของค่า OD แสดงว่าเชื้อนั้นอาจมีการแทรกของโปรเฟจและสามารถเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดออกมาได้ [23] จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 3,000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บส่วนใสไปทดสอบ double agar layer technique ที่ดัดแปลงจากวิธีข้างต้นกล่าวคือ ผสมเชื้อ 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารวุ้น MRS ที่มีการเติมวุ้น 0.5% แล้วเทลงในอาหารแข็ง MRS ทันที จากนั้นหยดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่ต้องการทดสอบเฟจลงไปตรงกลางจานอาหารวุ้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากมีบริเวณใสเกิดขึ้นตรงบริเวณที่หยดตัวอย่างแสดงถึงการมีโปรเฟจหลุดออกมา โดยการทดสอบทุกครั้งจะมีการทำ positive control โดยใช้เชื้อ *Lb. paracasei* LPC และมีการหยดเฟจ ΦT25 ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ลงไปตรงกลางจานอาหารวุ้น ซึ่งจะพบโซนใสเกิดขึ้นบริเวณที่หยด รวมถึง negative control โดยใช้เชื้อ *Lb. paracasei* LPC และมีการหยดไมโตมัยซินซีความเข้มข้นต่างๆ ลงไปตรงกลางจานอาหารวุ้น

- การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

เลี้ยงหัวเชื้อ *Lb. paracasei* LPC รวมทั้งสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจข้ามคืนในอาหาร MRS broth จากนั้นดูดมา 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร MRS broth ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือเซลล์เข้าสู่ระยะ exponential phase (ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1-0.3) จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 6,000 xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาแขวนลอยใน 0.1M $MgSO_4$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นให้รังสีอัลตราไวโอเลต (Sankyo Denki (Japan) G30T8 germicidal lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยวางห่างจากจานอาหาร 52 เซนติเมตร เป็นเวลา 25 วินาที โดยมีการกวนด้วย magnetic bar ตลอดเวลา เมื่อครบเวลาให้ดูดใส่หลอดเกลียวที่มีอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 2 เท่า (double strength MRS broth) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด แล้วนำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 45 นาทีเป็นเวลา 24-32 ชั่วโมง (หรือจนกว่าค่า OD จะลดลง) นำมาเติมคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร เขย่า แล้วนำไป centrifuge ที่ 3,000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสไปทดสอบ double agar layer technique ซึ่งจะต้องปรากฏพลาคเกิดขึ้น [24]

- การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยแปรผันสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

เลี้ยงหัวเชื้อ *Lb. paracasei* LPC ข้ามคืนในอาหาร MRS broth จากนั้นดูดมา 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร MRS broth ใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการลดความเข้มข้นของสูตรอาหารลงครึ่งเท่า, 1/4 เท่า, 1/6 เท่า จากสูตรปกติ วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 3,000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บส่วนใสไปทดสอบ double agar layer technique ตามการทดลองข้างต้น

- การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

เลี้ยงหัวเชื้อ *Lb. paracasei* LPC ในอาหาร MRS broth เป็นระยะเวลา 14 วัน วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทุกวัน จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 3,000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บส่วนใสไปทดสอบ double agar layer technique ตามการทดลองข้างต้น

- การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยการแปรผัน pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

เลี้ยงหัวเชื้อ *Lb. paracasei* LPC ข้ามคืนในอาหาร MRS broth จากนั้นดูดมา 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร MRS broth ใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่า pH ตั้งแต่ 2-11 โดยใช้ 0.1 M HCl หรือ 0.1 M NaOH วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 3,000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บส่วนใสไปทดสอบ double agar layer technique ตามการทดลองข้างต้น

ผลการวิจัย

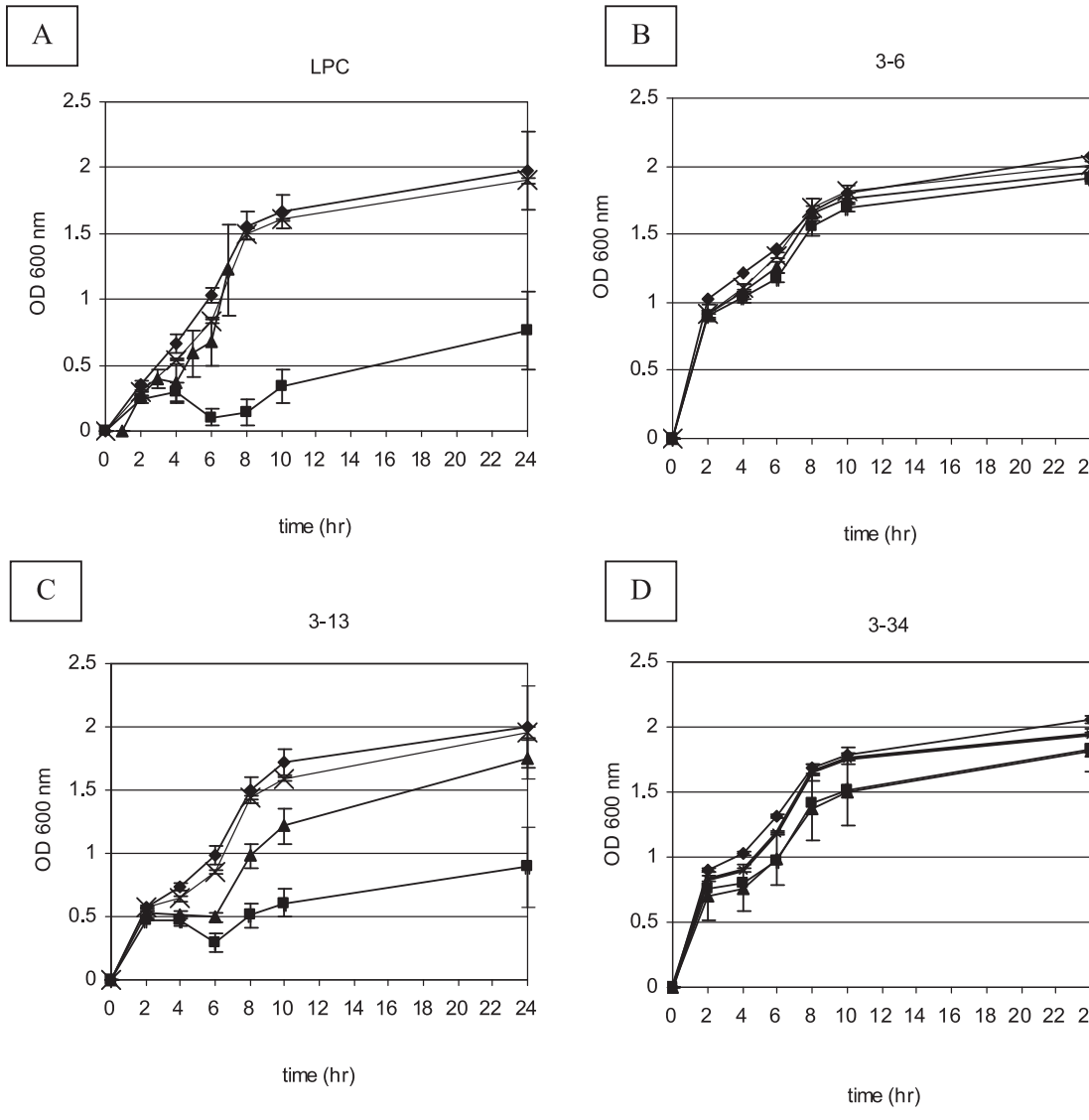
การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยไมโตมัยซินซี

จากการเหนี่ยวนำโปรเฟจในเชื้อ *Lb. paracasei* LPC และสายพันธุ์กลายทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่า มีเพียง 4 ไอโซเลต คือ สายพันธุ์ LPC, 3-6, 3-13 และ 3-34 ที่สามารถเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดออกจากจีโนมของแบคทีเรียได้ โดยความเข้มข้นที่สามารถเหนี่ยวนำได้คือ 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อวัดการเจริญของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่า *Lb. paracasei* LPC และ 3-13 จะมีการเจริญลดลงเมื่อมีการเติมไมโตมัยซินที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนอีก 2 ไอโซเลตพบว่า การเติมไมโตมัยซินไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 1) ส่วนในไอโซเลตอื่นๆ พบว่า การเติมไมโตมัยซินซีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้การเจริญลดลงกว่าที่ไม่เติมหรือที่เติมที่ความเข้มข้นต่ำ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า หลังจากที่มีการเติมไมโตมัยซินซี แล้ววัดค่าการเจริญ หากมีการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับ control ที่ไม่มีการเติมไมโตมัยซินซี แสดงว่า โปรเฟจมีการหลุดออกมาจากจีโนมของแบคทีเรียส่งผลให้การเจริญของเชื้อลดลงเนื่องจากเฟจจะเข้าสู่ lytic cycle ทำให้แบคทีเรียเกิดการแตกสลาย อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลต คือ *Lb. paracasei* LPC และ 3-13 ที่มีการเจริญลดลงเมื่อมีการเติมไมโตมัยซิน ในขณะที่อีก 2 ไอโซเลต ได้แก่ 3-6 และ 3-34 การเจริญไม่แตกต่างกับ control แต่ยังคงมีโปรเฟจหลุดออกมา ส่วนไอโซเลตที่เหลือหลังจากเติมไมโตมัยซินซีแล้วมีการเจริญลดลง แต่ไม่มีโปรเฟจหลุดออกมา

ตารางที่ 1 ผลของการเหนี่ยวนำ *Lb. paracasei* LPC และสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจทั้ง 10 ไอโซเลตด้วย ไมโตมัยซินซี โดยตรวจสอบบริเวณใสในตำแหน่งที่หยดตัวอย่างลงไป

ไอโซเลต	การเหนี่ยวนำด้วยไมโตมัยซินซีที่ความเข้มข้นต่างๆ		
	0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
Lb. paracasei LPC	-	+	+
1-2	-	-	-
1-16	-	-	-
2-25	-	-	-
3-1	-	-	-
3-6	-	+	+
3-13	-	+	+
3-17	-	-	-
3-27	-	-	-
3-31	-	-	-
3-34	-	+	+

หมายเหตุ: เครื่องหมายบวก (+) หมายถึง พบบริเวณใส (มีการหลุดออกของโปรเฟจ) เครื่องหมายลบ (-) หมายถึง ไม่พบบริเวณใส (ไม่มีการหลุดออกของโปรเฟจ)



รูปที่ 1 กราฟการเจริญของ *Lb. paracasei* LPC (A) และสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจคือ 3-6 (B), 3-13 (C) และ 3-34 (D) ในที่มีความเข้มข้นของไมโตมัยซินซีที่แตกต่างกัน โดยสัญลักษณ์ ◆ ไม่เติมไมโตมัยซินซี × เติมไมโตมัยซินซีที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ▲ เติมไมโตมัยซินซีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ■ เติมไมโตมัยซินซีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต การแปรผันสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และการแปรผัน pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

หลังจากการให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตแล้วนำตัวอย่างมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด แล้วนำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ร่วมกับการวัดปริมาณเฟจด้วยวิธี double agar layer technique พบว่า เชื้อ *Lb. paracasei* LPC มีการเจริญลดลงในชั่วโมงที่ 6 แต่ไม่ปรากฏพลาค เช่นเดียวกับสายพันธุ์กลายอื่นที่ให้ผลบวกจากการเหนี่ยวนำด้วยไมโตมัยซินซี และการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยแปรผันสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน และการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำโดยการแปรผัน pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าไม่ปรากฏพลาคเช่นเดียวกัน ซึ่งใน 3 กรณีหลังนี้ไม่ได้ทดสอบในสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจอื่นเนื่องจากสายพันธุ์ *Lb. paracasei* LPC เป็นสายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำได้ดีที่สุด แต่ไม่พบการเหนี่ยวนำในสภาวะต่างๆ ขั้นต้น จึงคาดว่าในสายพันธุ์กลายจึงไม่น่าจะเกิดการเหนี่ยวนำได้เช่นเดียวกัน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การพบเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติก ในอุตสาหกรรมการหมักประเภทต่างๆ ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทั้งการสูญเสียผลิตภัณฑ์หรือผลิตภัณฑ์ไม่ได้คุณภาพตามต้องการ นอกจากการค้นพบเฟจประเภท lytic phage ที่ทำให้เกิดการแตกสลายของหัวเชื้อแล้ว อุตสาหกรรมการหมักนมอาจพบความเสี่ยงจากโปรเฟจที่แทรกตัวอยู่ในหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิต ซึ่งเมื่อถูกเหนี่ยวนำจากสภาวะบางประการอาจทำให้โปรเฟจหลุดออกและเข้าสู่ lytic cycle ได้ หรือแม้แต่สภาวะที่เพาะเลี้ยงหัวเชื้อโดยทั่วไป อาจมีโปรเฟจหลุดออกได้โดยธรรมชาติ (spontaneous prophage induction) แต่ในระดับที่ต่ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่า การเหนี่ยวนำโปรเฟจจะเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก แต่หากมีการเลี้ยงหัวเชื้อในระดับอุตสาหกรรม หรือระดับขยายส่วนอาจทำให้จำนวนของเฟจที่หลุดออกเพิ่มขึ้น [25]

จากการทดลองการศึกษาการเหนี่ยวนำโปรเฟจด้วยไมโตมัยซินซี รังสีอัลตราไวโอเล็ต การแปรผันสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และการแปรผัน pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่า มีเพียงไมโตมัยซินซีที่สามารถเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดและเข้าสู่ lytic cycle ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า การเหนี่ยวนำโปรเฟจด้วยไมโตมัยซินซีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเหนี่ยวนำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ โดยไมโตมัยซินซีจะมีผลทำให้ดีเอ็นเอของโฮสต์เกิดการแตกหักทำให้เกิดการเหนี่ยวนำระบบ SOS response โดยระบบนี้เป็นระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอของแบคทีเรียซึ่งการกระตุ้นระบบนี้เป็นผลให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการทนต่อสภาวะเครียดหรืออาจทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ รวมทั้งอาจมีผลให้โปรเฟจเกิดการหลุดออกซึ่งต่อมาจะทำให้เฟจเข้าสู่ lytic cycle [26, 27]

รายงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการเหนี่ยวนำโปรเฟจด้วยไมโตมัยซินซีและแสงอัลตราไวโอเล็ตในแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนใหญ่มีรายงานในเชื้อ *Lactococcus* เช่น รายงานของ Roces และคณะ (2013) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำให้โปรเฟจ TP712 ที่แทรกอยู่ใน *Lc. lactis* MG1363 โดยพบว่าโปรเฟจจะเข้าสู่ lytic cycle ได้หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับการแสดงออกหรือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส FtsH ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการ lysis ของ *Lc. lactis* [28] นอกจากนี้จากการศึกษาของ Chopin และคณะ (2001) [12] รายงานว่าพบการแทรกตัวของโปรเฟจ 6 ตัวในจีโนมของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 แต่หลัง

จากเหนี่ยวนำด้วยไมโตมัยซินซีและรังสีอัลตราไวโอเล็ต พบว่า สามารถเหนี่ยวนำเฟจให้หลุดออกได้เพียง 2 ตัว เท่านั้นซึ่งยืนยันจากการส่องพบเฟจทั้งสองตัวที่มีขนาดที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน และจากการศึกษาของ Bolotin และคณะ (2001) [29] พบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำเฟจ bIL311 ที่แทรกอยู่ในเชื้อ *Lc. lactis* IL1403 หลังจากเหนี่ยวนำด้วยไมโตมัยซินซี และได้สันนิษฐานว่าไมโตมัยซินซีอาจไม่สามารถเหนี่ยวนำโปรเฟจให้หลุดออกจากจีโนมของแบคทีเรียได้เนื่องจากความหลากหลายของระบบ phage repressor system และยังอาจเป็นไปได้ว่า เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียทำให้ป้องกันไม่ให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เฟจหลุดออกมา และจากรายงานของ Ho และคณะ (2016) [30] พบว่าจากการเหนี่ยวนำโปรเฟจของ *Lc. lactis* MG1363 ด้วยไมโตมัยซินซีและสภาวะต่างๆ ที่พบได้ในระหว่างการผลิตชีส ได้แก่ pH ต่ำ ค่าแรงดันออสโมติกที่สูง และการบ่มเป็นระยะเวลานาน โดยตรวจวัดปริมาณของเฟจที่หลุดออกโดยวิธี quantitative PCR พบว่า การเหนี่ยวนำด้วยสภาวะต่างๆ ไม่มีผลทำให้โปรเฟจหลุด ยกเว้นการบ่มเป็นระยะเวลานาน 21 วัน จะทำให้มีโปรเฟจหลุดออกมาเล็กน้อย และไมโตมัยซินซีมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดมากที่สุด จากการค้นพบดังกล่าวจึงสรุปว่า ระบบ phage repression system เป็นระบบที่ประกอบด้วยตัวกระตุ้นความเครียด (stressors) หลายชนิด ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถคาดเดาว่าสภาวะใดถึงจะเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดออกได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ศึกษาในโปรเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นหัวเชื้อในโรงงานพบว่า โปรเฟจส่วนใหญ่ที่แทรกอยู่ในหัวเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้หลุดออกได้หรืออาจมีการหลุดออกแต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (defective) [31] โดยจากการศึกษาลำดับเบสในจีโนมของ *Lc. lactis* ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตชีสพบว่า ในจีโนมมีการแทรกของโปรเฟจอยู่ถึง 3 บริเวณ แต่สามารถเหนี่ยวนำให้โปรเฟจหลุดออกได้ 2 ตัวเท่านั้น และยังพบอีกว่ายังมีอีก 3 บริเวณนอกเหนือจากนี้ที่มีโปรเฟจที่ไม่สมบูรณ์แทรกอยู่ (incomplete prophages) โดยจัดกลุ่มนี้เป็น P4-like satellite prophages [12]

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรเฟจ แบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ และสภาวะต่างๆ ล้วนมีส่วนในการควบคุมระยะต่างๆ ในวงชีวิตของเฟจทั้ง lytic cycle และ lysogenic cycle ซึ่งส่งผลทำให้การเหนี่ยวนำโปรเฟจเกิดความซับซ้อนและแตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำโปรเฟจในเชื้อ *Lb. paracasei* ซึ่งจากการศึกษาจะในสภาวะที่เป็นกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักนมไม่สามารถเหนี่ยวนำโปรเฟจให้หลุดออกจากโฮสต์ได้ อย่างไรก็ตาม หากมีการใช้หัวเชื้อในปริมาณมาก อาจมีความเสี่ยงในการหลุดออกของโปรเฟจได้เช่นกัน จึงควรเลือกหัวเชื้อที่ตรวจสอบในจีโนมแล้วว่าไม่พบการแทรกตัวของโปรเฟจเพื่อความปลอดภัยในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2559 และทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 18 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. Guttman, B., Raya, R., and Kutter, E. 2005. Basic Phage Biology. In: Bacteriophages: Biology and Applications. Kutter, E., and Sulakvelidze, A., Editors. Boca Ronton, FL. CRC Press. p. 29-66.
2. Canchaya, C., Fournous, G., and Brüssow, H. 2004. The Impact of Prophages on Bacterial Chromosomes. *Molecular Microbiology* 53: 9-18.
3. Brüussow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.-D. 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 560-602.
4. Marrug, J. D. 1991. Bacteriocins, their Role in Developing Natural Products. *Food Biotechnology* 5: 305-312.
5. de Roissart, H., and Luquet, F. M., Editors. 1994. Bactéries Lactiques. France. Lorica, Uriage.
6. Salminen, S., and von Wright, S. A., Editors. 1998. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. New York. Marcel Dekker.
7. Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., and Brurberg, M. B. 1996. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
8. Moll, G. N., Konings, W. N., and Driessen, A. J. M. 1999. Bacteriocins: Mechanism of Membrane Insertion and Pore Formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.
9. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
10. Desmazeaud, M. J. 1994. Le lait milieu de culture. In: Bacteries Lactiques. de Roissart, H., and Luquet, F. M., Editors. France. Lorica. p. 25-36.
11. 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.
12. Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., and Chopin, M. -C., 2001. Analysis of Six Prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: Different Genetic Structure of Temperate and Virulent Phage Populations. *Nucleic Acids Research* 29: 644-651.
13. Desiere, F., Mahanivong, C., Hillier, A. J., Chandry, P. S., Davidson, B. E., and Brussow, H., 2001. Comparative Genomics of Lactococcal Phages: Insight from the Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* Phage BK5-T. *Virology* 283: 240-252.

14. Proux, C., van Sinderen, D., Suárez, J., García, P., Ladero, V., Fitzgerald, G.F., Desiere, F., and Brüssow, H. 2002. The Dilemma of Phage Taxonomy Illustrated by Comparative Genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology* 184(21): 6026-6036.
15. Ventura, M., Canchaya, C., Bernini, V., Altermann, E., Barrangou, R., McGrath, S., Claesson, M. J., Li, Y., Leahy, S., Walker, C. D., Zink, R., Neviani, E., Steele, J., Broadbent, J., Klaenhammer, T. R., Fitzgerald, G. F., O'toole, P. W., and van Sinderen, D. 2006. Comparative Genomics and Transcriptional Analysis of Prophages Identified in the Genomes of *Lactobacillus gasseri, Lactobacillus salivarius,* and *Lactobacillus casei. Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3130-3146.
16. Ventura, M., Zomer, A., Canchaya, C., O'Connell-Motherway, M., Kuipers, O. P., Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E., Buist, G., Wegmann, U., Shearmann, C., Gasson, M. J., Fitzgerald, G. F., Kok, J., and Van Sinderen, D. 2007. Comparative Analyses of Prophage-Like Elements Present in Two *Lactococcus lactis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7771-7780.
17. Ventura, M., Turroni, F., Lima-Mendez, G., Foroni, E., Zomer, A., Duranti, S., Giubellini, V., Bottacini, F., Horvath, P., Barrangou, R., Sela, D. A., Mills, D. A., and van Sinderen, D. 2009. Comparative Analyses of Prophage-Like Elements Present In Bifidobacterial Genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 75(21): 6929-6936.
18. Zago, M., Suárez, V., Reinheimer, J. A., Carminati, D., and Giraffa, G. 2007. Spread and Variability of the Integrase Gene in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Strains and Phages Isolated from Whey Starter Cultures. *Journal of Applied Microbiology* 102(2): 344-351.
19. Durmaz, E., Miller, M. J., Azcarate-Peril, M. A., Toon, S. P., and Klaenhammer, T. R. 2008. Genome Sequence and Characteristics of Lrm1, A Prophage from Industrial *Lactobacillus rhamnosus* Strain M1. *Applied and Environmental Microbiology* 74(15): 4601-4609.
20. Sunthornthummas, S., Doi, K., Rangsiruji, A., Sarawaneeyaruk, S., and Pringsulaka, O. 2017. Isolation and Characterization of *Lactobacillus paracasei* LPC and Phage ΦT25 from Fermented Milk. *Food Control* 73: 353-1361.
21. Baross, J. A., Liston, J., and Morita, R. Y. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages and Other *Vibrio* Bacteriophages in Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 492-499.

22. 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.
23. Raya, R. R., and Hébert, E. M. 2009. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. In: Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions. Clokie, M .R. J., and Kropinski, A. M., Editors. United Kingdom. Humana Press. p. 23-32.
24. Doria, F., Napoli, C., Costantini, A., Berta, G., Saiz, J.-C., and Garcia-Moruno, E. 2013. Development of a New Method for Detection and Identification of *Oenococcus oeni* Bacteriophages Based on Endolysin Gene Sequence and Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 79(16): 4799-4805.
25. Czyz, A., Los, M., Wrobel, B., and Wegrzyn, G. 2001. Inhibition of Spontaneous Induction of Lambdoid Prophages in *Escherichia coli* Cultures: Simple Procedures with Possible Biotechnological Applications. *BMC Biotechnology* 1: 1.
26. Garcia-Russell, N., Elrod, B., and Dominguez, K. 2009. Stress-Induced Prophage DNA Replication in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 889-895.
27. Madera, C., Garcia, P., Rodriguez, A., Suarez, J., and Martinez, B. 2009. Prophage Induction in *Lactococcus lactis* by the Bacteriocin Lactococcin 972. *International Journal of Food Microbiology* 129: 99-102.
28. Roces, C., Wegmann, U., Campelo, A.B., García, P., Rodríguez, A., and Martínez, B. 2013. Lack of the Host Membrane Protease FtsH Hinders Release of the *Lactococcus lactis* Bacteriophage TP712. *Journal of General Virology* 94: 2814-2818.
29. Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., and Sorokin, A. 2001. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* 11: 731-753.
30. Ho, C.-H., Stanton-Cook, M., Beatson, S. A., Bansal, N., and Turner, M. S. 2016. Stability of Active Prophages in Industrial *Lactococcus lactis* Strains in the Presence of Heat, Acid, Osmotic, Oxidative and Antibiotic Stressors. *International Journal of Food Microbiology* 220: 26-32.
31. Casjens, S. 2003. Prophages in Bacterial Genomics: What Have We Learned So Far? *Molecular Microbiology* 249: 277-300.

ได้รับบทความวันที่ 16 มกราคม 2560
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 1 มิถุนายน 2560