บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบ

1) ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

จากตารางที่ 3 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบจากแหล่งน้ำนมดิบของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตนมดิบรายย่อยเชียงใหม่และเชียงราย 3 แห่ง คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสมาชิกโรงงานนม อสค. ห้วยแก้ว เชียงใหม่ 3 รายได้แก่ ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7010, ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7021, และ ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7009 สหกรณ์โคนมแม่ลาว สหกรณ์โคนมแม่โจ้ และ สหกรณ์โคนมสันป่าตอง - แม่วาง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่ลาวได้จำนวน colony ที่ตรวจนับได้มากที่สุดคือเป็นจำนวน $2.5x10^9$ cfu/ml และปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้น้อยที่สุด เท่ากับ $1.1x10^5$ cfu/ml ซึ่งมาจากตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7010

ตารางที่ 3 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบ ที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

แหล่งน้ำนมดิบ	ปริมาณ cfu/ml
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7010	$1.1x10^5$
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7021	$1.7x10^6$
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7009	$9.6x10^6$
สหกรณ์โคนมแม่ลาว (มล)	$2.5x10^9$
สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ)	$2.0x10^5$
สหกรณ์โคนมสันป่าตอง - แม่วาง(สต)	$2.1x10^6$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมดิบ ได้ผลดังตารางที่ 2

เมื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงของ Litmus milk และการทดสอบเอนไซม์ catalase โดยในการศึกษาการเจริญใน litmus milk เชื้อที่ไม่สามารถเจริญใน litmus milk ได้จะถูกตัดทิ้ง และการทดสอบ catalase test ถ้ากรณีที่เชื้อให้ผลบวก (เกิดฟองแก๊สภายใน 15 วินาที หลังจากหยด 3% H_2O_2) จะถูกตัดทิ้ง ส่วนเชื้อที่ให้ผลลบ (ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นหลังจากหยด H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ3) จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป ผลที่ได้ คือจะได้ จำนวนเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำนวน 20 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสมาชิกโรงงานนม อสค. ห้วยแก้ว เชียงใหม่ จากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7021 จำนวน 4 สายพันธุ์ ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7009 จำนวน 1 สายพันธุ์ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่โจ้ จำนวน 7 สายพันธุ์และตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง จำนวน 8 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

ตัวอย่างน้ำนมดิบ	รหัสและลักษณะโคโลนี	litmus milk	catalase test
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7010	A, สีเขียวเข้มรูปร่างกลมขนาดประมาณ 4 มม.	-	+
	B, สีเขียวรูปวงรีขนาดเล็กขนาดประมาณ 1 มม.	-	+
	C, สีเขียวรูปวงรีขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 3 มม.	-	+
	D, สีเขียวมีจุดสีเขียวเข้มตรงกลางขนาดประมาณ 4 มม.	-	+
	E, สีเขียวรูปวงรีขนาดกลางขนาดประมาณ 2 มม.	-	+
	F, สีเขียวเข้มรูปร่างวงกลมขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	-	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำนมดิบ	รหัสและลักษณะโคโลนี	litmus milk	catalase test
	G, สีเขียวอ่อนขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	-	+
สหกรณ์โคนมแม่ลาว (มล)	A, สีเขียวเข้มรูปร่างกลมขนาดประมาณ 2-3 มม.	-	-
	B, สีเขียวรูปวงรีขนาดเล็กขนาดประมาณ 1-2 มม.	-	-
	C, สีเขียวรูปวงรีขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 3 มม.	-	-
	D, สีเขียวมีจุดสีเขียวเข้มตรงกลางขนาดประมาณ 3-4 มม.	+	+
	E, สีเขียวรูปวงรีขนาดกลางขนาดประมาณ 2-3 มม.	-	-
	F, สีเขียวเข้มรูปร่างวงกลมขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	-	-
	K, สีเขียวขอบไม่เรียบขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 5 มม.	-	-
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7021	A, สีเขียวเข้มรูปร่างกลมขนาดประมาณ 2-3 มม.	++	-
	B, สีเขียวรูปวงรีขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	++	-
	D, สีเขียวมีจุดสีเขียวเข้มตรงกลางขนาดประมาณ 3-4 มม.	++	-
	E, สีเขียวรูปวงรีขนาดกลางขนาดประมาณ 3 มม.	-	+
	L, สีขาวรูปร่างวงกลมขนาดประมาณ 4 มม.	++	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำนมดิบ	รหัสและลักษณะโคโลนี	litmus milk	catalase test
	M, สีขาวรูปร่างวงรีขนาดประมาณ 2-3 มม.	-	+
	N, สีขาวรูปร่างเหลี่ยมขนาดประมาณ 4 มม.	-	+
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7009	A, สีเขียวเข้มรูปร่างกลมขนาดประมาณ 3-4 มม.	-	+
	B, สีเขียวรูปวงรีขนาดเล็กขนาดประมาณ 1 มม.	++	-
	C, สีเขียวรูปวงรีขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 3 มม.	-	+
	D, สีเขียวมีจุดสีเขียวเข้มตรงกลางขนาดประมาณ 4-5 มม.	-	+
	E, สีเขียวรูปวงรีขนาดกลางขนาดประมาณ 2 มม.	-	+
	F, สีเขียวเข้มรูปร่างวงกลมขนาดเล็กขนาดประมาณ 1 มม.	+	+
	P, สีขาวมีลักษณะเป็นปุยขนาดประมาณ 2 มม.	-	+
สหกรณ์โคนมแม่โจ้	A, สีเขียวเข้มรูปร่างกลมขนาดประมาณ 3-4 มม.	-	-
	B, สีเขียวรูปวงรีขนาดเล็กขนาดประมาณ 1 มม.	+	-
	C, สีเขียวรูปวงรีขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 3 มม.	++	-
	E, สีเขียวรูปวงรีขนาดกลางขนาดประมาณ 2 มม.	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำนมดิบ	รหัสและลักษณะโคโลนี	litmus milk	catalase test
	F, สีเขียวเข้มรูปร่างวงกลมขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	+	-
	G, สีเขียวอ่อนขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	+	-
	I, สีเขียวเข้มมีขอบสีเขียวอ่อนขนาดประมาณ 2 มม.	++	-
	J, กลมเอียงสีเขียวเข้มมีขอบสีเขียวอ่อนขนาดประมาณ 2-3 มม.	++	-
	M, สีขาวรูปร่างวงรีขนาดประมาณ 2-3 มม.	++	+
	O, สีขาวขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 7 มม.	++	+
	T, สีเขียวตรงกลางมีสีขาว รูปร่างวงกลม ขนาดประมาณ 4-5 มม.	++	+
	U, สีเขียวอ่อน รูปร่างกลมเอียง ขนาดประมาณ 3-4 มม.	++	+
	X, สีเขียวขอบเหลือง รูปร่างวงกลม ขนาดประมาณ 3-4 มม.	++	+
	Z, สีเขียว รูปร่างกลมเอียง มีส่วนนูนออกมานอกวุ้น ขนาดประมาณ 3 มม.	-	+
	a, สีเขียว รูปร่างวงกลม มีโซนสีขาวคล้ายรูปถั่วล้อมรอบ ขนาดประมาณ 3-4 มม.	++	-
	b, สีเขียวเข้ม รูปร่างวงกลมติดกัน 2 อัน ขนาดประมาณ 4-5 มม.	++	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำนมดิบ	รหัสและลักษณะโคโลนี	litmus milk	catalase test
สหกรณ์โคนม สันป่าตอง - แม่วาง	B, สีเขียวรูปวงรีขนาดเล็กขนาดประมาณ 1 มม.	++	-
	C, สีเขียวรูปวงรีขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 3 มม.	++	-
	E, สีเขียวรูปวงรีขนาดกลางขนาดประมาณ 2 มม.	++	-
	F, สีเขียวเข้มรูปร่างวงกลมขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 มม.	+	-
	R, สีเขียวอ่อนขอบสีขาว รูปร่างวงกลมขนาดประมาณ 3-4 มม.	+	-
	c, สีขาวขนาดใหญ่ ภายใน colony มี colony เหลี่ยม สีขาวซ้อนอยู่ขนาดประมาณ 4-5 มม.	+	-
	h, สีขาวคล้ายถั่ว ขนาดประมาณ 3 มม.	++	-
	i, สีขาวรูปร่างหลายเลี่ยม ขนาดประมาณ 3 มม.	++	-

หมายเหตุ

++ หมายถึง litmus milk มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นไม่มีสีและแข็งตัว (clot) ภายใน 24 ชั่วโมง

+ หมายถึง litmus milk มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นไม่มีสีและแข็งตัว (clot) ภายใน 48 ชั่วโมง

- หมายถึง litmus milk มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นไม่มีสีและแข็งตัว (clot) หลังจาก 48 ชั่วโมง เป็นต้นไป หรือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

เมื่อนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบกับ Litmus milk มา streak plate 2 ครั้ง จนได้โคโลนีเดี่ยวของทุกเชื้อ มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้ผลดังตารางที่ 5 และจากตารางที่ 5 สรุปแล้วแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้ 20 ไอโซเลท (isolate) คือ 1) FSCMU 44-01 (B7009), 2) FSCMU 44-02 (A7021), 3) FSCMU 44-03 (B7021), 4) FSCMU 44-04 (D7021), 5) FSCMU 44-05 (L7021), 6) FSCMU 44-06 (BMJ), 7) FSCMU 44-07 (CMJ), 8) FSCMU 44-08 (FMJ), 9) FSCMU 44-09 (GMJ), 10) FSCMU 44-10 (IMJ), 11) FSCMU 44-11 (JMJ), 12) FSCMU 44-12 (aMJ), 13) FSCMU 44-13 (Bสต), 14) FSCMU 44-14 (Cสต), 15) FSCMU 44-15 (Eสต), 16) FSCMU 44-16 (F สต), 17) FSCMU 44-17 (Rสต), 18) FSCMU 44-18 (cสต), 19) FSCMU 44-19 (hสต), 20) FSCMU 44-20 (iสต) ซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทุกไอโซเลท มีรูปร่างทั้งแบบท่อนและแบบกลม โดยส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม คือมีรูปร่างกลม 19 ไอโซเลท และมีรูปร่างท่อน 1 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lopeze และ Mayo (1997) ซึ่งพบแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกรูปร่างกลม 61.11 เปอร์เซ็นต์ และรูปท่อน 38.89 เปอร์เซ็นต์ และ Medina และคณะ (1995) ศึกษาการแยกแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากเนยแข็งที่ผลิตโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกในน้ำนมดิบและนมที่เกิดเคิร์ดมีรูปร่างกลมทั้งหมด (อ้างโดยน้อมจิตต์, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

รหัสเชื้อ/ตัวอย่างน้ำนมดิบ	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี																	
	1. Limus milk	2. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)				3. ทน อุณหภูมิ 55 องศา-เซลเซียส 15 นาที	4. สามารถ Oxidized และ Fermented น้ำตาล						5. ความทนเกลือ (%)			6. Catalase	7. VP test	Gram stain
		10	37	44	55		mannitol		lactose		glucose		2	4	6.5			
							O	F	O	F	O	F						
B/7009	++	$-G^-$	$++G^-$	$++G^-$	$-G^-$	-	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-	++	G^+ bacilli
A/7021	+	$-G^-$	$-G^-$	$-G^-$	$-G^-$	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	+	G^+ cocci
B/7021	++	$-G^-$	$+++G^-$	$+++G^-$	$-G^-$	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	G^+ cocci
D/7021	++	$-G^-$	$+++G^-$	$+++G^-$	$-G^-$	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	G^+ cocci
L/7021	++	$-G^-$	$++G^-$	$+++G^-$	$-G^-$	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	++	G^+ cocci
B / MJ	++	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	++	-	-	++	+++	++	++	++	++	-	-	-	G^+ cocci
C / MJ	++	$-G^-$	$+++G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	++	-	-	+++	+++	++	++	++	++	+	-	+	G^+ cocci
F / MJ	(+)	$-G^-$	$+++G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	++	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	G^+ cocci
G / MJ	++	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	++	-	-	+++	+++	++	++	++	++	+	-	+	G^+ cocci
I / MJ	++	$+G^-$	$+++G^-$	$++G^-$	$-G^-$	+	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	+	G^+ cocci
J / MJ	++	$-G^-$	$+++G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	++	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	G^+ cocci
a / MJ	++	$-G^-$	$++G^-$	$+G^-$	$-G^-$	+	-	-	++	++	+++	+++	++	++	-	-	+	G^+ cocci
B / สต	(+)	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	-	-	G^+ cocci
C / สต	(+)	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	-	+++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	G^+ cocci
E / สต	(+)	$+G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$+G^-$	++	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	G^+ cocci
F / สต	(+)	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	G^+ cocci
R / สต	(+)	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	-	+++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	G^+ cocci
c / สต	(+)	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	G^+ cocci

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ/ตัวอย่างน้ำนมดิบ	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี																	
	1. Limus milk	2. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)				3. ทนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที	4. การทดสอบความสามารถในการ Oxidized และ Fermented น้ำตาล						5. ความทนเกลือ (%)			6. Catalase	7. VP test	Gram stain
		10	37	44	55		mannitol		lactose		glucose		2	4	6.5			
							O	F	O	F	O	F						
h / สต	++	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$-G^-$	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	G^+ cocci
i / สต	(+)	$-G^-$	$+++ G^-$	$+++ G^-$	$+G^-$	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	G^+ cocci

หมายเหตุ : 1) ในคอลัมน์การทดสอบใน Litmus milk เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาล lactose

Litmus milk ++ คือ litmus milk มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและแข็งตัว (clot) ภายใน 24 ชั่วโมง

\+ คือ litmus milk มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและแข็งตัว (clot) ภายใน 48 ชั่วโมง

\- คือ litmus milk มีการแข็งตัวและเปลี่ยนสี โดยใช้เวลามากกว่า 48 ชั่วโมงขึ้นไป

(+) คือ litmus milk มีการแข็งตัวและเปลี่ยนสี โดยใช้เวลามากกว่า 72 ชั่วโมงขึ้นไป

2) ในคอลัมน์การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ผล +++, ++, และ + คือ MRS broth มีการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง (หรือสีเขียวอ่อน) สีเขียว และมีสีตามเดิมซึ่งมีการเจริญในระดับต่ำ เกิดตะกอนในปริมาณน้อย ตามลำดับ ผล – คือ MRS broth ยังคงเป็นสีน้ำเงินตามเดิม และ G^- คือไม่พบฟองก๊าซภายในหลอดดักก๊าซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(MRS broth ⟶ Approx. Formula/Liter* ⟶ Dextrose 20.0 gm, Ammonium Citrate 2.0 gm, Sodium Acetate 5.0 gm, Meat Peptone 10.0 gm, Tween 80 1.0 gm, Disodium Phosphate 2.0 gm, Beef Extract 10.0 gm, Magnesium Sullfate 0.1 gm, Yeast Extract 5.0 gm, Manganese Sulfate 0.05 gm. โดยการเตรียม MRS broth สำเร็จรูปตามที่ระบุในฉลากของบริษัทผู้ผลิตแล้วทำการเติมอินดิเคเตอร์ คือ Bromocresol green ร้อยละ 2 ลงไป ในอัตราส่วน MRS broth 1,000 มิลลิลิตรจะใช้ Bromocresol green ร้อยละ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร)

3) ในคอลัมน์การทดสอบการทนต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ผล ++ และ + คือ มีโคโลนีขึ้นตามแนวการทำ streak plate ภายในระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนผล – คือ ไม่มีโคโลนีขึ้นตามแนวการทำ streak plate

4) ในคอลัมน์การทดสอบความสามารถในการ Oxidized และ Fermented น้ำตาล glucose, lactoseและ mannitol ผล +++,++, และ + คือ Hugh & Leifson medium มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองทั้งหลอด Hugh & Leifson medium มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองมากกว่าสีม่วง และ Hugh & Leifson medium มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแต่น้อยกว่า หรือใกล้เคียงกับสีม่วง ตามลำดับ ส่วนผล – คือ Hugh & Leifson medium ยังคงมีสีม่วงตามเดิม

5) ในคอลัมน์การทดสอบความสามารถทนเกลือ NaCl ผล ++ และ + คือ MRS broth มีการขุ่นและตกตะกอนในปริมาณมาก และมีการตกตะกอนในปริมาณปานกลาง- น้อยตามลำดับ ส่วนผล – คือ MRS broth ไม่มีการขุ่นและตกตะกอน

6) ในคอลัมน์การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย H_2O_2 (catalase test) ผล + คือเกิดฟองก๊าซหลังจากหยดสารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 3 และผล – คือ ไม่เกิดฟองก๊าซหลังจากหยดสารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 3

7) ในคอลัมน์การทดสอบ Voges-Proskauer (VP test) ผล ++ และ + คือ เกิดสีแดงภายในเวลา 30 นาที และ ภายใน 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนผล – คือ เป็นสีน้ำตาลเข้มอมเหลืองตามเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การคัดแยกแบคทีริโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก และการทำให้แบคที-ริโอฟาจมีความบริสุทธิ์

4.3.1 ก. การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารละลายเชื้อแบคทีเรีย (host) และสารลายใส (phage lysate)

จากตารางที่ 6 เมื่อทำการตรวจนับจำนวนฟาจที่ได้จากตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส B ได้จำนวนฟาจมากที่สุดคือฟาจกลุ่มที่ 1 ที่เป็นชุดการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร+ สารละลายใสที่เป็นพวกชุดเติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร รหัสฟาจที่ 9 ได้จำนวนฟาจเท่ากับ $2.4x10^{6}$ pfu/ml และตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B 7021 ได้จำนวนฟาจน้อยที่สุด คือฟาจกลุ่มที่ 5 ที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร+ สารละลายใสที่เป็นพวกชุดเติม Mitomycin C 200 ไมโครลิตร รหัสฟาจที่ 1 ได้จำนวนฟาจเท่ากับ $1.0x10^{3}$ pfu/ml

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนฟาจที่ตรวจนับได้จากตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบ

ตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบ	กลุ่ม	รหัสของ plaque (ฟาจ)	จำนวน plaque ที่ตรวจนับได้			ปริมาณ plaque ที่คำนวณได้ (pfu/ml)
			10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B 7021	1	2	>250	45	69	$4.5x10^{5}$
	1	3	139	127	66	$1.39 x10^{4}$
	1	4	16	32	87	$3.2 x10^{5}$
	2	4	>250	169	148	$1.69 x10^{6}$
	2	8	>250	36	28	$3.6 x10^{5}$
	2	10	>250	84	69	$8.4 x10^{5}$
	5	1	10	10	11	$1.0 x10^{3}$
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L 7021	2	8	62	50	74	$6.2 x10^{3}$
		10	42	30	84	$4.2 x10^{3}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบ	กลุ่ม	รหัสของ plaque (ฟาจ)	จำนวน plaque ที่ตรวจนับได้			ปริมาณ plaque ที่คำนวณได้ (pfu/ml)
			10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	
ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B 7009	1	2	73	109	144	7.3×10^3
	2	7	79	70	59	7.9×10^3
สหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส C	2	9	29	35	19	2.9×10^3
สหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส B	1	6	219	>250	240	2.19×10^4
		9	>250	240	232	2.4×10^6
		10	178	168	>250	1.78×10^4
	2	7	128	213	>250	1.28×10^4
		10	51	40	86	5.1×10^3
สหกรณ์โคนมแม่โจ้ รหัส **G**	2	7	49	120	100	4.9×10^3

หมายเหตุ: ปริมาณฟาจทั้งหมดที่ตรวจนับได้ รายงานค่าจาก dilution แรกที่อ่านได้ เนื่องจากจำนวนฟาจที่ตรวจนับได้มีปริมาณไม่แน่นอน อาจเป็นผลมาจาก ยังคงมีการเจริญของฟาจเกิดขึ้นอีก เนื่องจากฟาจสามารถเจริญและแบ่งตัวเพิ่มปริมาณมากขึ้นโดยใช้เวลาน้อย ดังนั้นในตัวอย่างที่มีความเจือจางสูงยังคงนับจำนวน plaques ได้ปริมาณสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.1 ข. แสดงลักษณะ plaque ที่ได้จากตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) 7021 รหัส B ได้ plaque ที่มีลักษณะต่างกันมากที่สุดคือ จำนวน 37 ลักษณะ คือ

1. สี่เหลี่ยมคางหมูขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1x1 มม., 2. สี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x1.5 มม., 3. สามเหลี่ยมขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 4. วงกลมเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 5. วงกลมขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 6. สี่เหลี่ยมคางหมู เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x1 มม., 7. สี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1x2 มม., 8. สามเหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1x2 มม., 9. สามเหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5x1มม., 10. วงกลมขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 11. วงกลมขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 12. ถังเบียร์แคบ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1x0.5 มม., 13. จุดไข่ปลาขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 14. สามเหลี่ยมลักษณะเบี้ยวขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1มม., 15. สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 16. จุดไข่ปลาขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 17. ลูกน้ำ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 18. รูปจันทร์เสี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 19. วงกลมเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม., 20. ถังเบียร์ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1x0.5 มม., 21. สี่เหลี่ยมคางหมู เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5x1 มม., 22. รูปท่อนขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 23. ห้าเหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x3 มม., 24. วงกลมขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 25. ห้าเหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 26. วงกลมเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 มม., 27. รูปท่อนสั้น เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 28. รูปสี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x1 มม., 29. สี่เหลี่ยมคางหมูลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3x1.5มม., 30. จุดไข่ปลา เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 31. รูปท่อนสั้น เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 32. รูปสี่เหลี่ยมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5x0.5 มม., 33. จุดไข่ปลา เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 34. สี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่าน-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ศูนย์กลางประมาณ 1.5x1 มม., 35. วงรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 36. จุดไข่ปลา เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 37. จุดไข่ปลา เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม.

รองลงมาคือ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส C 28 ลักษณะ คือ 1. รูปท่อนงอ ความยาวประมาณ 3 มม., 2. รูปตัววี ขนาดประมาณ 3 มม., 3. รูปท่อนสั้นขนาดประมาณ 2 มม., 4. รูปเส้นงอ ขนาดประมาณ 3 มม., 5. รูปสามเหลี่ยมเบี้ยว ขนาดฐานประมาณ 3 มม ความยาวประมาณ 4 มม. (มีแบคทีเรียเจริญอยู่)., 6. วงกลมขนาดเล็ก ขนาดไม่ถึง 1 มม., 7. สามเหลี่ยมเบี้ยวขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 0.5x1 มม., 8. สี่เหลี่ยมผืนผ้าเบี้ยวขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 2.5 มม ความกว้างไม่ถึง 0.5 มม., 9. รูปตัววี ขนาดฐานประมาณ 5.5 มม ความยาวประมาณ 4.5 และ5 มม., 10. จุดไข่ปลา ขนาดไม่ถึง 0.5 มม., 11. รูปแคปซูลลักษณะโป่ง ความยาวประมาณ 4 มม 12. รูปท่อนสั้น ความยาวประมาณ 2 มม., 13. รูปจันทร์เสี้ยว ขนาดประมาณ 3x3 มม., 14. รูปสามแฉก ขนาดประมาณ 3x3 มม., 15. วงกลมเบี้ยวขนาดเล็ก ขนาดไม่ถึง 1 มม., 16. รูปเครื่องหมายถูก ความยาวประมาณ 2.5 มม., 17. รูปเส้นเพรียว ความยาวประมาณ 3.5 มม., 18. รูปจุดไข่ปลา ขนาดไม่ถึง 1 มม., 19. รูปตัวยูขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 3 มม., 20. รูปท่อนงอ ขนาดประมาณ 1.5 มม., 21. รูปตัวยู ขนาดประมาณ 1 ซม., 22. วงกลมขนาดเล็ก ขนาดไม่ถึง 1 มม., 23. รูปกระสุนปืน ขนาดฐานประมาณ 2 มม ความยาวประมาณ 5 มม., 24. รูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ขนาดฐานประมาณ 1 มม ความยาวประมาณ 8 มม., 25. รูปท่อนงอ ความยาวประมาณ 3x3.5 มม., 26. รูปท่อนตรงขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 0.5x3 มม., 27. สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดลักษณะเบี้ยว ขนาดประมาณ 2.5x4 ซม., 28. รูปเส้นตรง ความยาวประมาณ 3-4 มม.

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L 7021 20 ลักษณะ คือ 1. รูปพระจันทร์เสี้ยวขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 2. รูปเขาควายขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม., 3. สามเหลี่ยมตรงขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม., 4. รูปท่อนขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 1 มม. ความกว้างประมาณ 0.5 มม., 5. สี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน ความยาวประมาณ 1.5x0.5 มม., 6. รูปพระจันทร์เสี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มม, 7. รูปเส้นขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 1-1.5 มม., 8. จุดไข่ปลาขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 9. ท่อนโค้ง ขนาดฐานประมาณ 0.5 มม. ความยาวประมาณ 2.5 มม., 10.รูปพระจันทร์เสี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 11.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 12. วงกลมเบี้ยว เส้นผ่าน-ศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 13. รูปท่อนขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 มม., 14. รูปท่อน ขนาดฐานประมาณ 0.5 มม. ความยาวประมาณ 4 มม., 15. สามเหลี่ยมเบี้ยว ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม., 16. รูปเส้นขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.5 มม., 17. รูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว ลักษณะเบี้ยว ขนาดฐานประมาณ 2.5 มม., 18. ความกว้างประมาณ 1.5 มม., 19. รูปตัว Y ความยาวประมาณ 6 มม., 20. รูปตัว L ความยาวประมาณ 3.5 มม. ขนาดฐานประมาณ 3 มม. (มีแบคทีเรียเจริญอยู่)

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนม แม่โจ้ รหัส G 18 ลักษณะ คือ 1. สามเหลี่ยม ขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 1 มม., 2. จุดไข่ปลาขนาดไม่ถึง 0.5 มม., 3. วงกลมเบี้ยวขนาด ประมาณ 1 มม., 4. รูปท่อนตรง ขนาดฐานประมาณ 0.5 มม ความยาวประมาณ 3 มม., 5. รูปสามเหลี่ยมค่อนข้างเบี้ยวขนาดประมาณ 4x4.5 มม., 6. รูปท่อนงอ ขนาดประมาณ 0.5x3-4 มม., 7. รูปท่อนตรง ความยาวประมาณ 0.5x4-5 มม., 8. รูปสามเหลี่ยมเบี้ยว ขนาด ประมาณ 1.5x1.5 มม., 9. รูปตัววี ลักษณะแคบ ขนาดประมาณ 2.5x2.5 มม., 10. รูปตัววี ขนาดใหญ่ ความหนาประมาณ 0.5 มม ความยาวประมาณ 5 มม., 11. รูปตัวยูขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 3 มม., 12. รูปท่อนขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 0.5x1.5 มม., 13. รูปสามเหลี่ยม เบี้ยว ขนาดประมาณ 2x4 มม., 14. สามเหลี่ยมขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 1.5 มม., 15. รูปท่อนขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 0.5x1.5 มม., 16. รูปเครื่องหมายถูกความยาว ประมาณ 5 มม., 17. รูปสามเหลี่ยมเบี้ยว ขนาดประมาณ 2 มม., 18. รูปจันทร์เสี้ยว ความยาว ประมาณ 7 มม.

4.3.2 ตัวอย่าง plaque ที่แยกได้จากเชื้อแลกติกจากน้ำนมดิบที่คัดเลือกมา ทำการแยกฟาจให้ได้ฟาจที่บริสุทธิ์

ผลในขั้นตอนการทำให้ฟาจบริสุทธิ์จำนวนฟาจที่ได้จะลดลงจากเดิมเนื่องมาจาก ว่าการทำให้ฟาจบริสุทธิ์จะต้องทำให้ได้ฟาจที่มีลักษณะเดิมเหมือนฟาจตัวแรก คือได้ฟาจที่ มีความบริสุทธิ์สำหรับใช้ทดสอบที่มีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

จากผลการทดลองจะพบว่าตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่แยกได้จาก ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B 7021 เหลือลักษณะ plaque ที่ได้ 7 ลักษณะ คือ 1. สี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x1.5 มม., 2. สี่เหลี่ยมคางหมู เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x1 มม., 3. สี่เหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1x2 มม., 4. ถังเบียร์แคบ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1x0.5 มม., 5. วงกลมเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม., 6. ห้าเหลี่ยมลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2x3 มม., 7. สี่เหลี่ยมคางหมูลักษณะเบี้ยว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3x1.5 มม.

ตัวอย่างเชื้อแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L7021 เหลือลักษณะ plaque ที่ได้ 2 ลักษณะ คือ 1. รูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว ลักษณะเบี้ยว ขนาดฐานประมาณ 2.5 มม. ความกว้างประมาณ 1.5 มม., 2. รูปตัว Y ความยาวประมาณ 6 มม.

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส B เหลือลักษณะ plaque ที่ได้ 6 ลักษณะ คือ 1. รูปตัวยูขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 3 มม., 2. รูปสามเหลี่ยม ความยาวประมาณ 3 มม., 3. รูปเครื่องหมายถูก ขนาดประมาณ 5 มม., 4. รูปคล้ายเลขหนึ่งไทย ขนาดประมาณ 1 ซม., 5. รูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ขนาดฐานประมาณ 1 มม. ความยาวประมาณ 8 มม., 6. สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดลักษณะเบี้ยว ขนาดประมาณ 2.5x4 ซม.

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส C เหลือลักษณะ plaque ที่ได้ 1 ลักษณะ คือ 1. รูปตัวยูขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 3 มม.

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส G เหลือลักษณะ plaque ที่ได้ 1 ลักษณะ คือ 1. รูปจันทร์เสี้ยว ความยาวประมาณ 7 มม.

สรุปแล้วแยกแบคทีริโอฟาจจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 44 องศาเซลเซียส ได้ 56 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีริโอฟาจจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 39 ไอโซเลท (isolate) คือ 1. ϕFSCMU 40-001 (*Lactobacillus* exp 7), 2. ϕFSCMU 40-002 (*Lactobacillus* exp 11), 3. ϕFSCMU 40-003 (*Lactobacillus* control 14), 4. ϕFSCMU 40-011 (exp 4 ของ A 7010 (40)), 5. ϕFSCMU 40-012 (exp 6 ของ A 7010 (40), 6. ϕFSCMU 40-031 (exp 7 ของ C 7010 (40)), 7. ϕFSCMU 40-032 (exp 8 ของ C 7010 (40)), 8. ϕFSCMU 40-033 (Control 2ของ C 7010 (40)), 9. ϕFSCMU 40-034 (Control 5 ของ C 7010 (40)), 10. ϕFSCMU 40-061(3.2 ของ F7010 (40)), 11. ϕFSCMU 40-062 (6.7 ของ F7010 (40)), 12. ϕFSCMU 40-063 (6.9 ของ F7010 (40)), 13. ϕFSCMU 40-064 (6.10 ของ F7010 (40)), 14. ϕFSCMU 40-091 (exp 4 ของ I 7010 (40)), 15. ϕFSCMU 40-092 (exp 5ของ I 7010 (40)), 16. ϕFSCMU 40-093 (exp 7 ของ I 7010 (40)), 17. ϕFSCMU 40-094 (Control 3 ของ I 7010 (40)), 18. ϕFSCMU 40-095 (Control 5 ของ I 7010 (40)), 19. ϕFSCMU 40-096 (Control 11 ของ I 7010 (40)),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

20. ϕFSCMU 40-111 (exp 2 ของ B มล (40)), 21. ϕFSCMU 40-112 (exp 3 ของ B มล (40)), 22. ϕFSCMU 40-113 (exp 8 ของ B มล (40)), 23. ϕFSCMU 40-114 (Control 4 ของ B มล (40)), 24. ϕFSCMU 40-131 (exp 5 ของ D มล (40)), 25. ϕFSCMU 40-132 (Control 9 ของ D มล (40)), 26. ϕFSCMU 40-171 (exp 4 ของ K มล (40)), 27. ϕFSCMU 40-172 (Control 8 ของ K มล (40)), 28. ϕFSCMU 40-221 (Control 1 ของ L7009 (40)), 29. ϕFSCMU 40-381 (V MJ (40) exp 8), 30.ϕFSCMU 40-382 (V MJ (40) control 12), 31. ϕFSCMU 40-431 (H สต (40) control 3), 32. ϕFSCMU 40-432 (H สต (40) control 14), 33. ϕFSCMU 40-433 (H สต (40) control 15), 34. ϕFSCMU 40-0001 (1.2 ของ *streptococcus*), 35. ϕFSCMU 40-0002 (1.3 ของ *streptococcus*), 36. ϕFSCMU 40-0003 (1.5 ของ *streptococcus*), 37. ϕFSCMU 40-0004 (3.8 ของ *streptococcus*), 38. ϕFSCMU 40-0005 (5.4 ของ *streptococcus*), 39. ϕFSCMU 40-0006 (6.4 ของ *streptococcus*) (เรณู และคณะ 2552) และจากแบคทีริโอฟาจจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบที่บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส 17 ไอโซเลท คือ 1. ϕFSCMU 44-011 (exp 7ของ B7009 (44)), 2. ϕFSCMU 44-012 (Control 4 ของ B7009 (44)), 3. ϕFSCMU 44-031 (1.2 ของ B7021 (44)), 4. ϕFSCMU 44-032 (1.3 ของ B7021 (44)), 5. ϕFSCMU 44-033 (1.4 ของ B7021 (44)), 6. ϕFSCMU 44-034 (2.4 ของ B7021 (44)), 7. ϕFSCMU 44-035 (2.8 ของ B7021 (44)), 8. ϕFSCMU 44-036 (2.10 ของ B7021 (44)), 9. ϕFSCMU 44-051 (exp 8ของ L7021 (44)), 10. ϕFSCMU 44-052 (exp 10 ของ L7021 (44)), 11. ϕFSCMU 44-091 (G MJ (44) exp 7), 12. ϕFSCMU 44-131 (B สต (44) exp 7), 13. ϕFSCMU 44-132 (B สต (44) control 6), 14. ϕFSCMU 44-133 (B สต (44) exp 10), 15. ϕFSCMU 44-134 (B สต (44) control 9), 16. ϕFSCMU 44-135 (B สต(44) control 10), 17. ϕFSCMU 44-141 (C สต (44) exp 9)

หมายเหตุ: แบคทีริโอฟาจจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้มาจากการทดลองในโครงการวิจัยการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อแบคทีริโอฟาจของสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เรณู ปิ่นทองและคณะ 2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การทดสอบความต้านทานต่อแบคทีริโอฟาจ การทดสอบความต้านทานของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกต่อแบคทีริโอฟาจโดยวิธี spot test

จากตารางที่ 7 แสดงว่าแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก h สต (FSCMU 44-19) ซึ่งแยกได้จากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง รหัส h มีความต้านทานต่อฟาจน้อยที่สุด คือ ถูกย่อยสลายโดยฟาจจำนวน 43 ไอโซเลท ส่วนแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ (FSCMU 44-10) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากสหกรณ์โคนมแม่โจ้ รหัส I มีความต้านทานต่อฟาจมากที่สุด คือ ถูกทำลายโดยฟาจเพียง 8 ไอโซเลท ส่วนแบคทีเรียตัวที่เหลือก็ไม่ทนต่อฟาจได้มากกว่าเชื้อมาตรฐาน *Lb. bulgaricus* TISTR 892, *Lb. bulgaricus* TISTR 895 และ *S. thermophilus* TISTR 894 ซึ่งถูกย่อยสลายโดยฟาจ 18, 12 และ 33 ไอโซเลท ตามลำดับ

นอกจากนี้แบคทีเรียที่ถูกย่อยสลายโดยฟาจหรือไม่มีความต้านทานต่อฟาจจะเกิด plaque 4 ลักษณะคือ

1. plaque ขนาดเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร
2. plaque ขนาดใหญ่ 3-5 มิลลิเมตร
3. plaque ที่มีลักษณะเป็นวงแหวนใสขนาด 2-3 มิลลิเมตร ล้อมรอบบริเวณขุ่นมัวที่มีแบคทีเรียเจริญเรียกลักษณะนี้ว่าเกิด lysogen คือ แบคทีเรียนี้มีความต้านทานต่อฟาจได้ โคโลนีจึงไม่ถูกย่อยสลายทั้งหมด ดังนั้นแบคทีเรียนี้จะไม่เกิดบริเวณใสทั้งหมดในบริเวณที่หยด phage lysate
4. plaque ที่มีลักษณะคล้าย lysogen แต่มีบริเวณใสเล็ก ๆ ตรงกลางบริเวณพื้นขุ่นที่ล้อมรอบด้วยวงแหวนใส

ส่วนแบคทีเรียที่ต้านทานต่อฟาจจะไม่ถูกย่อยสลายโดยฟาจ ทำให้บริเวณพื้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียเจริญจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น

ลักษณะ plaque บนจานเลี้ยงเชื้อเมื่อหยด phage lysate ของ ϕFSCMU 40-061(3.2 ของ F7010 (40)) กับ h สต (FSCMU 44-19), *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895 คือ (+) (เกิด plaque ขนาดเล็ก) และ IMJ (FSCMU 44-10) คือ * (เกิดลักษณะ lysogen)

ฟาจที่ย่อยสลายแบคทีเรียได้มากที่สุดคือ ฟาจ ϕFSCMU 40-061(3.2 ของ F7010 (40)) สลายแบคทีเรียที่ 40 องศาเซลเซียสได้ 31 ไอโซเลท จากทั้งหมด 32 ไอโซเลท (เรณู ปิ่นทองและคณะ2552) และสามารถสลายแบคทีเรียที่ 44 องศาเซลเซียส ได้ 16 ไอโซเลท จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งหมด 17 ไอโซเลท คือ รวม ϕFSCMU 40-061(3.2 ของ F7010 (40)) สามารถย่อยสลายแบคทีเรียได้รวม 47 ไอโซเลท ซึ่งมากที่สุด จึงนำไปใช้ทดสอบในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ตามการศึกษาการหมักในนมของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีริโอฟาจของแบคทีเรีย จำนวนทั้งหมด 56 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลท (isolate) แบคทีรีโอฟาจ	
	ย่อยสลายแบคทีเรีย[3.]	ไม่ย่อยสลายแบคทีเรีย
1. B7009 (FSCMU 44-01)[1.]	33	23
2. L7021 (FSCMU 44-05)	36	20
3. GMJ (FSCMU 44-09)	39	17
4. B สต (FSCMU 44-13)	31	25
5. C สต (FSCMU 44-14)	41	15
6. CMJ (FSCMU 44-07)	41	15
7. h สต (FSCMU 44-19)	43	13
8. B7021 (FSCMU 44-03)	41	15
9. Clone[2.] of L7021 exp.8 (FSCMU 44-051)	39	17
10. Clone of B7009 (44) control 4 (FSCMU 44-012)	33	23
11. Clone of C สต exp.9 (FSCMU 44-141)	38	18
12. Clone of B สต exp.10 (FSCMU 44-131)	35	21
13. Clone of B สต control 6 (FSCMU 44-132)	38	18
14. Clone of B7021 1.3 (FSCMU 44-032)	40	16
15. Clone of B7021 2.8 (FSCMU 44-035)	39	17
16. Clone of B7021 2.10 (FSCMU 44-036)	40	16
17.IMJ (FSCMU 44-10)	8	48

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลท (isolate) แบคทีรีโอฟาจ	
	ย่อยสลายแบคทีเรีย	ไม่ย่อยสลายแบคทีเรีย
18. *Lb. bulgaricus* TISTR 892	18	38
19. *Lb. bulgaricus* TISTR 895	12	44
20. *S. thermophilus* TISTR 894	33	23

หมายเหตุ: 1. ชื่อแบคทีเรียได้ตั้งรหัสตามสถาบันที่แยกเชื้อได้ คือ FSCMU หมายถึง FS : Food Science and Technology Dept., CMU: Chiang Mai University กำกับด้วยตัวเลขของอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ และ ลำดับตัวเลขตามที่มาของนมดิบที่นำมาแยกเชื้อ ในที่นี้ FSCMU 44-01 (B7009(44)) ตัวเลข 44 คือ แบคทีเรียได้จากการบ่มเชื้อที่ 44 องศาเซลเซียส และแยกได้จากนมดิบจากเกษตรกรผู้ผลิตรายย่อยของสมาชิกโรงงานนม อสค. ห้วยแก้วรหัส 7009 ตัวเลข 01 หมายถึง เป็นเชื้อลำดับที่ 1 จากเชื้อที่มีที่มาจากแหล่งเดียวกัน

2. แบคทีเรียที่เป็น clone หมายถึงเชื้อที่แยกได้เมื่อแบคทีเรียตั้งต้นมีปฏิกิริยา Lysogenic กับฟาจที่ทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อแบบ spot test เช่น Clone of L7021 exp 8 (FSCMU 44-051) เป็นเชื้อที่แยกได้จากโคโลนีของเชื้อ L7021 ที่เกิดปฏิกิริยา Lysogenic ต่อฟาจ เมื่อทดสอบ spot test

3. แบคทีริโอฟาจที่ย่อยสลายแบคทีเรียได้ plaque 4 ลักษณะรวมกันคือ ขนาดใหญ่ ขนาดเล็ก ลักษณะ lysogen และลักษณะ lysogen ที่มีจุดใสขนาดเล็กอยู่ตรงกลาง

4.5 การวินิจฉัย (identify) เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

4.5.1 การวินิจฉัยยืนยันของเชื้อที่มีรูปร่างเป็น cocci โดยการทำ 16S rRNA sequencing (รูปที่ 1) และ 4.5.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการย่อยสลาย Arginine การใช้น้ำตาล Arabinose, Mannitol และ Sorbitol แสดงดังตารางที่ 8

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการวินิจฉัย (identify) ยืนยันของเชื้อที่มีรูปร่างเป็น cocci โดยการทำ 16S rRNA sequencing และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ย่อยสลาย Arginine การใช้น้ำตาล Arabinose, Mannitol และ Sorbitol เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก จากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำนวน 20 ไอโซเลท และ เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมาตรฐานจำนวน 4 ไอโซเลท จะได้ *E.faecium* 10 ไอโซเลท, *E. faecalis* 3 ไอโซเลท และ*E.durans* 5 ไอโซเลท

เมื่อจำแนกแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกตามแหล่งที่มาของน้ำนมดิบ สามารถจำแนกได้

1. รหัส 7009 เป็น *E.faecium* 1 สายพันธุ์ ได้แก่

    1. *E.faecium* FSCMU 44-01 (B7009)

2. รหัส 7021 เป็น *E. faecalis* 2 สายพันธุ์ และ *E.faecium* 2 สายพันธุ์ ได้แก่

    1. *E. faecalis* FSCMU 44-02 (A7021)
    2. *E. faecalis* FSCMU 44-05 (L7021)
    3. *E.faecium* FSCMU 44-03 (B7021)
    4. *E.faecium* FSCMU 44-04 (D7021)

3. สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) เป็น *E.durans* 4 สายพันธุ์, *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ และ *Leuconostoc* sp. 1 สายพันธุ์ ได้แก่

    1. *E.durans* FSCMU 44-06 (BMJ)
    2. *E.durans* FSCMU 44-07 (CMJ)
    3. *E.durans* FSCMU 44-11 (JMJ)
    4. *E.durans* FSCMU 44-12 (aMJ)
    5. *E. faecalis* FSCMU 44-09 (GMJ)
    6. *Leuconostoc* sp. FSCMU 44-10 (IMJ)

ไม่ได้รับการวินิจฉัย 1 สายพันธุ์ ได้แก่ FMJ

4. สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) เป็น *E.faecium* 6 สายพันธุ์ และ *E.durans* 1 สายพันธุ์ ได้แก่

    1. *E.faecium* FSCMU 44-13 (Bสต)
    2. *E.faecium* FSCMU 44-14 (Cสต)
    3. *E.faecium* FSCMU 44-16 (Fสต)
    4. *E.faecium* FSCMU 44-17 (Rสต)
    5. *E.faecium* FSCMU 44-18 (c สต)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. *E.faecium* FSCMU 44-20 (i สต)

7. *E.durans* FSCMU 44-19 (h สต)

ไม่ได้รับการวินิจฉัย 1 สายพันธุ์ ได้แก่ E สต

ส่วนเชื้อแบคทีเรียแลกติกมาตรฐาน *S. thermophilus* TISTR 894 เป็น *E.faecium* ซึ่งการทดสอบนี้สามารถบอกคุณลักษณะของเชื้อได้เพียงบางเชื้อเท่านั้น เนื่องมาจากว่าคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่เป็นไปตามความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อซึ่งการระบุเชื้อจากการทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการใช้น้ำตาล Arabinose, Mannitol และ Sorbitol สามารถจำแนกเชื้อได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แสดงการ identify เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีรูปร่างเป็น cocci และผลการทดสอบการย่อยสลาย Arginine การใช้น้ำตาล Arabinose, Mannitol และ Sorbitol

เชื้อ	เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ได้รับการวินิจฉัยสายพันธุ์	ผลการระบุเชื้อจากการทำ sequence ของยีน 16S rRNA	การย่อยสลาย Arginine		การ Oxidized และ Fermented น้ำตาล					
					Arabinose		Mannitol		Sorbitol	
			O	F	O	F	O	F	O	F
1. B	เกษตรกรรายย่อย (รหัส 7009) (FSCMU 44-01) (*E.faecium*)	*E. faecalis* *E. faecium* *E.durans* %ID = 99%	++	+	+++	+++	++	++	-	-
2. A	เกษตรกรรายย่อย (รหัส 7021) (FSCMU 44-02) (*E. faecalis*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	+++	+++	+	+	-	-	+++	+++
3. B	เกษตรกรรายย่อย (รหัส 7021) (FSCMU 44-03) (*E.faecium*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
4. D	เกษตรกรรายย่อย (รหัส 7021) (FSCMU 44-04) (*E.faecium*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เชื้อ	เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ได้รับการวินิจฉัยสายพันธุ์	ผลการระบุเชื้อจากการทำ sequence ของยีน 16S rRNA	การย่อยสลาย Arginine		การ Oxidized และ Fermented น้ำตาล					
					Arabinose		Mannitol		Sorbitol	
			O	F	O	F	O	F	O	F
5. L	เกษตรกรรายย่อย (รหัส 7021) (FSCMU 44-05) (*E.faecalis*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	-	+++	-	+	++	+++	+++	+++
6. B	สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) (FSCMU 44-06) (*E.durans*)	-	+	+	-	+	-	-	-	-
7. C	สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) (FSCMU 44-07) (*E.durans*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 99%	+	+	+++	+++	-	-	-	-
8. F	สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) (FSCMU 44-08)	-	++	+++	+++	+++	-	-	-	-
9. G	สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) (FSCMU 44-09) (*E.faecalis*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 99%	-	+	++	+++	-	-	++	-
10. I	สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) (FSCMU 44-10) (*Leuconostoc* sp.)	-	-	-	++	+	-	-	-	-
11.J	สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (MJ) (FSCMU 44-11) (*E.durans*)	-	+	+	-	+	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เชื้อ	เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ได้รับการวินิจฉัยสายพันธุ์	ผลการระบุเชื้อจากการทำ sequence ของยีน 16S rRNA	การย่อยสลาย Arginine		การ Oxidized และ Fermented น้ำตาล					
					Arabinose		Mannitol		Sorbitol	
			O	F	O	F	O	F	O	F
12.a	สหกรณ์โคนมแม่ใจ้ (MJ) (FSCMU 44-12) (*E.durans*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 98%	++	+	+++	+++	-	-	-	-
13.B	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-13) (*E.faecium*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	-
14. C	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-14) (*E.faecium*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	+++	+	+++	+++	+++	++	-	-
15. E	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-15)	-	+	-	+++	+++	-	-	-	-
16. F	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-16) (*E.faecium*)	-	++	+	+++	+++	++	++	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เชื้อ	เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ได้รับการวินิจฉัยสายพันธุ์	ผลการระบุเชื้อจากการทำ sequence ของยีน 16S rRNA	การย่อยสลาย Arginine		การ Oxidized และ Fermented น้ำตาล					
					Arabinose		Mannitol		Sorbitol	
			O	F	O	F	O	F	O	F
17. R	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-17) (*E.faecium*)	-	+++	+	+++	+++	+++	++	-	-
18. c	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-18) (*E.faecium*)	-	+++	+	+++	+++	++	++	-	-
19. h	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-19) (*E.durans*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 100%	+	+	+++	+++	-	-	-	-
20. i	สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) (FSCMU 44-20) (*E.faecium*)	-	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	-
21.	*S. thermophilus* (TISTR 894) (*E.faecium*)	*E. faecalis* *E.faecium* *E.durans* %ID = 99%	-	-	-	-	++	+++	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เชื้อ	เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ได้รับการวินิจฉัยสายพันธุ์	ผลการระบุเชื้อจากการทำ sequence ของยีน 16S rRNA	การย่อยสลาย Arginine		การ Oxidized และ Fermented น้ำตาล					
					Arabinose		Mannitol		Sorbitol	
			O	F	O	F	O	F	O	F
22.	*Lb. acidophilus* (TISTR 1034)	*Lb. murinus* %ID = 100%	-	-	-	-	-	-	++	+
23.	*Lb. bulgaricus* (TISTR 892)	*Lb. murinus* %ID = 99%	-	++	-	-	+++	+++	+++	+++
24.	*Lb. salivarius* (TISTR 1112)	*Lb. murinus* %ID = 99%	-	-	-	-	-	-	++	++

หมายเหตุ : 1. ในคอลัมน์การทดสอบการย่อยสลาย Arginine ผล +++, ++, และ + คือ TSSA มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูเข้ม สีชมพูหรือชมพูอ่อน และสีแดงอ่อนตามลำดับ ส่วนผล – คือ TSSA มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองอ่อน สีส้มอ่อน หรือยังคงมีสีส้มตามเดิม

2. ในคอลัมน์การทดสอบความสามารถในการ Oxidized และ Fermented น้ำตาล Arabinose Mannitol และ Sorbitol ผล +++,++, และ + คือ Hugh & Leiffson medium มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองโดยตลอดทั้งหลอด และอาจพบหรือไม่พบฟองก๊าซขนาดเล็กจำนวนน้อยตามแนวการ stab และ Hugh & Leifson medium มีการเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองในพื้นที่ส่วนใหญ่ (4/5, 3/4, หรือ 2/3) และ Hugh & Leifson medium มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเพียงบางส่วน (1/2 หรือ 1/3) ตามลำดับ ส่วนผล – คือ Hugh & Leifson medium ยังคงมีสีม่วงตามเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 การจำแนกเชื้อ *Enterococcus* โดยการใช้น้ำตาล Arabinose, Mannitol และ Sorbitol

เชื้อ	ผลการระบุเชื้อจากการใช้น้ำตาล		
	Arabinose	**Mannitol**	**Sorbitol**
E. faecalis	-	+	+
E.faecium	+	+	-
E.durans	-	-	-

+ = 90% are positive

(+) = 75-90% are positive

v = 26-74% are positive

(-) = 11-25% are positive

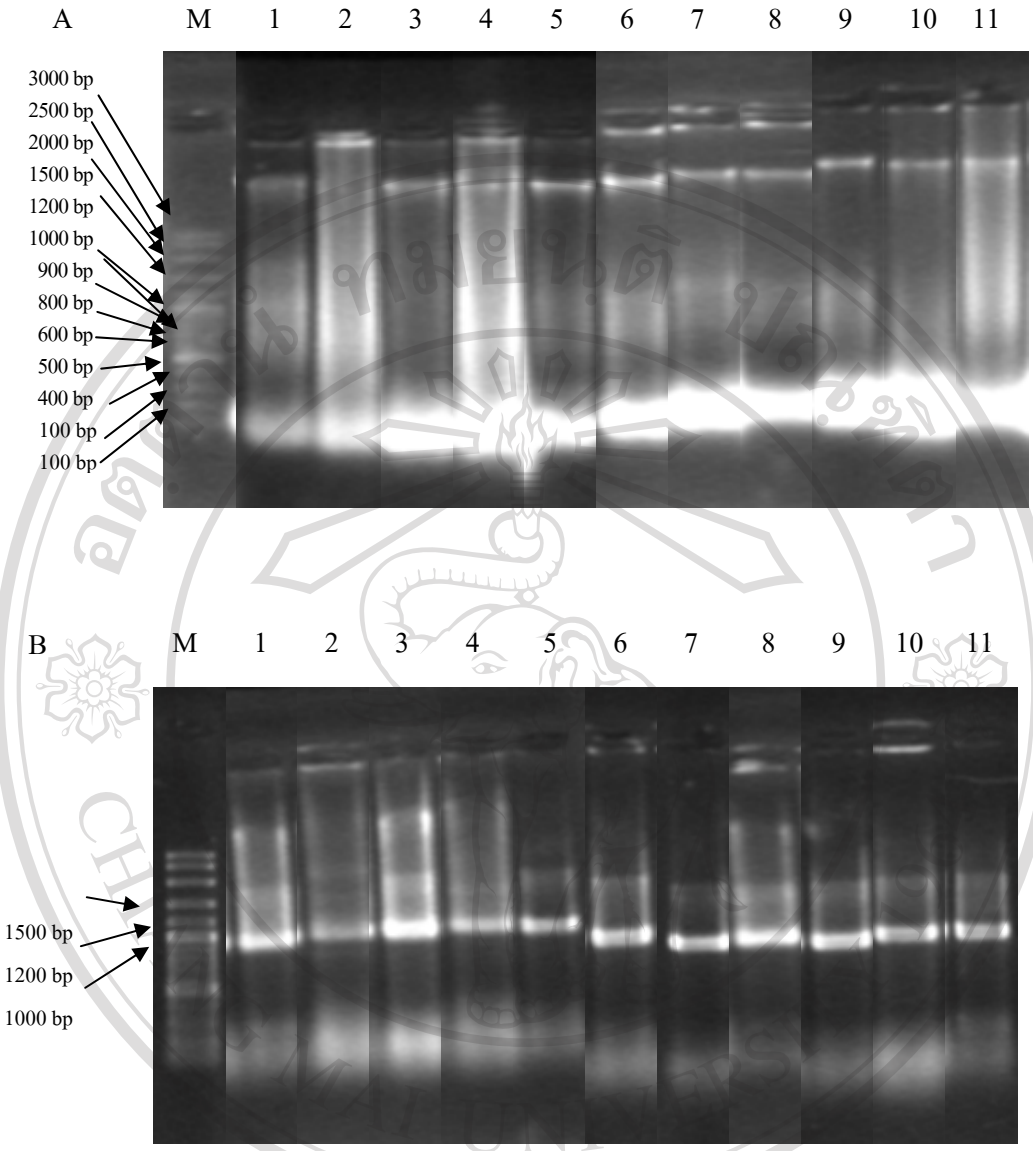
- = 10 or less are positive

ที่มา: Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. 1995. John G. Oholt., Noel R. Krieg., Peter H.A. Sneath, James T. Staley., Stanley T. Williams. Williams&Wilkins ; Batimore. 535-540.

Manero, A. and Blanch A.R.(1999) Indentification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. Applied and Enviromental Microbiology. 65 (10) : 4425-4430.

จากรูปที่ 1 แสดง DNA และ 16S rRNA สำหรับวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก โดยวิธี sequencing technique เชื้อแบคทีเรียแลกติกมาตรฐาน *S. thermophilus* TISTR 894 วินิจฉัยได้เป็น *E.faecium*, *Lb. acidophilus* TISTR 1034, *Lb. bulgaricus* TISTR 892, *Lb. salivarius* TISTR 1112 วินิจฉัยได้เป็น *Lb. murinus* เหมือนกันทั้ง 3 ชนิด เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากแหล่งน้ำนมดิบ คือ B สต (FSCMU 44-01) วินิจฉัยได้เป็น *E.faecium*, D7021 (FSCMU 44-04) วินิจฉัยได้เป็น *E.faecium*, A7021 (FSCMU 44-02) วินิจฉัยได้เป็น *E. faecalis*, Cสต (FSCMU 44-14) วินิจฉัยได้เป็น *E.faecium*, B7021 (FSCMU 44-03) วินิจฉัยได้เป็น *E.faecium*, L7021 (FSCMU 44-05) วินิจฉัยได้เป็น *E. faecalis*, และ GMJ (FSCMU 44-09) วินิจฉัยได้เป็น *E. faecalis* ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1 แสดงการยืนยันเชื้อที่มีรูปร่างเป็น cocci โดยการทำ 16S rRNA sequencing แถวบน (A) DNA

M. DNA MARKER

1. DNA ของ *S. thermophilus* TISTR 894
2. DNA ของ *Lb. acidophilus* TISTR 1034
3. DNA ของ *Lb. bulgaricus* TISTR 892
4. DNA ของ *Lb. salivarius* TISTR 1112

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. DNA ของ B สต(44) (FSCMU 44-13)
6. DNA ของ D7021(44) (FSCMU 44-04)
7. DNA ของ A7021(44) (FSCMU 44-02)
8. DNA ของ C สต(44) (FSCMU 44-14)
9. DNA ของ B7021(44) (FSCMU 44-03)
10. DNA ของ L7021(44) (FSCMU 44-05)
11. DNA ของ GMJ(44) (FSCMU 44-09)

แถวล่าง (B) PCR

M. PCR marker (Vivantis,USA)

1. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ *S. thermophilus* TISTR 894
2. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ *Lb. acidophilus* TISTR 1034
3. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ *Lb. bulgaricus* TISTR 892
4. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ *Lb. salivarius* TISTR 1112
5. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ B สต(44) (FSCMU 44-13)
6. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ D7021(44) (FSCMU 44-04)
7. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ A7021(44) (FSCMU 44-02)
8. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ C สต(44) (FSCMU 44-14)
9. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ B7021(44) (FSCMU 44-03)
10. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ L7021(44) (FSCMU 44-05)
11. PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วของ GMJ(44) (FSCMU 44-09)

4.5.3 การยืนยันเชื้อ *Streptococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep

จากตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการยืนยันเชื้อ *Streptococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep กับเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำนวน 6 ไอโซเลท จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำนวน 5 ไอโซเลท เป็น *E.faecium* และมี 2 ไอโซเลท ที่เป็น *Leuconostoc* spp. (ตารางที่ 11) น้อมจิตต์ (2542) แยก *E.faecium* KUPB 20 ได้จากน้ำนมดิบเช่นกัน จากฟาร์มโคนมในจังหวัดเพชรบูรณ์ บ่ม 4-6 ชั่วโมง ที่ 42-44 องศาเซลเซียส ให้กรดร้อยละ 0.72 จากนมที่มีของแข็งทั้งหมดร้อยละ 15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก F7010 (40) (FSCMU 40-06) วินิจฉัยได้เป็น *E. faecium* เป็นแบคทีเรียที่ปลดปล่อยฟาจ F7010 (40-061) 3.2 (ϕFSCMU 40-061) ซึ่งใช้ในการทดสอบความต้านทานของแบคทีเรีย IMJ และ h สต ต่อฟาจในน้ำนม (หัวข้อ 4.4) ทั้ง IMJ (FSCMU 44-10) และ h สต (FSCMU 44-19) ได้รับการวินิจฉัยในที่นี้เป็น *Leuconostoc* spp. ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกโดยวิธี gene sequencing technique และ API test kit จะวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้ตรงกัน ยกเว้น h สต (FSCMU 44-19) เมื่อวินิจฉัยโดยวิธี gene sequencing technique จะได้เป็น *E.durans* (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบเชื้อ *Streptococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep

TESTS	**Active Ingredients**	**Results**					
		B7021	**B สต**	**IMJ**	***S.thermophilus* TISTR 894**	**F7010**	**h สต**
VP	sodium pyruvate	-	-	+	+	-	+
HIP	hippuric acid	+	-	-	-	+	-
ESC	esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	-
PYRA	Pyroglutamic acid-β-naphthylamide	+	+	-	+	+	+
αGAL	6-bromo-2-naphthyl-αD-galactopyranoside	-	-	-	-	-	-
βGUR	naphthol ASBI-glucuronic acid	-	-	-	-	+	-
βGAL	2-naphthyl-βD-galactopyranoside	+	+	+	+	+	-
PAL	2-naphthyl phosphate	-	-	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 10 (ต่อ)

TESTS	Active Ingredients	Results					
		B7021	B สต	IMJ	*S.thermophilus* TISTR 894	F7010	h สต
LAP	L-leucine-β-naphthylamide	+	+	+	+	+	+
ADH	L-arginine	+	+	-	+	+	-
RIB	D-ribose	+	+	+	+	+	+
ARA	L-arabinose	+	+	+	+	+	+
MAN	D-mannitol	+	+	-	-	+	-
SOR	D-sorbitol	-	-	-	-	-	-
LAC	D- lactose (bovine origin)	+	+	+	+	+	+
TRE	D-trehalose	+	+	+	+	+	+
INU	inulin	-	-	-	-	-	-
RAF	D-raffinose	-	-	+	+	+	-
AMD	starch (2)	+	-	-	+	-	-
GLYG	glycogen	-	-	-	+	-	-
βHEM	hemolyse	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 11 แสดงผลการระบุเชื้อ *Streptococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep

เชื้อแบคทีเรีย	ผลการระบุเชื้อ
B7021 (FSCMU 44-03)	*E.faecium*, %ID = 92.4%
B สต (FSCMU 44-13)	*E.faecium*, %ID = 92.8%
IMJ (FSCMU 44-10)	*Leuconostoc* spp, %ID = 99.1%
S. thermophilus TISTR 894	*E.faecium*, %ID = 89.9%
F7010 (40) (FSCMU 40-06)	*E.faecium*, %ID = 98.7%
h สต (FSCMU 44-19)	*Leuconostoc* spp, %ID = 85.2%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5.4 การยืนยันเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

จากตารางที่ 12, 13 เมื่อทำการยืนยันเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB โดยทำการทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน 2 ไอโซเลท จะเห็นได้ว่าเมื่อทดสอบกับเชื้อมาตรฐานคือ *Lb. salivarius* TISTR 1112 ชุดทดสอบ API 50 CHB ระบุได้เป็นเชื้อ *Lb.plantarum* ส่วน *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ชุดทดสอบ API 50 CHB ระบุได้เป็นเชื้อ *L. cremoris* ในผลการระบุเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep และ API 50 CHB สามารถยอมรับได้ ถ้าค่า % ID มากกว่าหรือเท่ากับ 80 % ในกรณีที่ค่า % ID ไม่ถึง 80 % ต้องทำการทดสอบเพิ่มนอกเหนือจากจำนวนการทดสอบที่มีอยู่ในแถบ strip และจากผลการทดลองเชื้อมาตรฐานที่นำมาทดสอบเมื่อทำการยืนยันเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB จะได้เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ไม่ตรงกับเชื้อดั้งเดิม อาจเนื่องมาจากการ subculture หรือ อาจเกิดการปนเปื้อนจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกโดยวิธี gene sequencing technique และ API test kit จะวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้ต่างกัน คือ

1. *L. salivarius* TISTR 1112 เป็น *L. murinus* และ *L. plantarum* ตามลำดับ
2. *L. bulgaricus* TISTR 895 เป็น *L. helveticus* และ *L. cremoris* ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แสดงผลการทดสอบเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

TESTS	**Active Ingredients**	**Results**	
		Lb. salivarius **TISTR 1112**	***Lb. bulgaricus*** **TISTR 895**
GLY	Glycerol	-	-
RRY	Erythritol	-	-
DARA	D-Arabinose	-	-
LARA	L- Arabinose	-	-
RIB	D-Ribose	+	-
DXYL	D-Xylose	+	-
LXYL	L- Xylose	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 12 (ต่อ)

TESTS	Active Ingredients	Results	
		Lb. salivarius TISTR 1112	*Lb. bulgaricus* TISTR 895
ADO	D-Adonitol	-	-
MDX	Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-
GAL	D-Galactose	-	-
GLU	D-Glucose	+	+
FRU	D-Fructose	+	+
MNE	D-Mannose	+	-
SBE	L-Sorbose	+	+
RHA	L-Rhamnose	-	-
DUL	Dulcitol	-	-
INO	Inositol	-	-
MAN	D-Mannitol	-	-
SOR	D-Sorbitol	+	-
MDM	Methyl-αD-Mannopyranoside	-	+
MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-
NAG	N-AcetylGlucosamine	+	+
AMY	Amygdalin	-	-
ARB	Arbutin	+	-
ESC	Esculin ferric citrate	+	+
SAL	Salicin	+	-
CEL	D-Cellobiose	+	-
MAL	D-Maltose	+	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 12 (ต่อ)

TESTS	**Active Ingredients**	**Results**	
		Lb. salivarius **TISTR 1112**	***Lb. bulgaricus*** **TISTR 895**
LAC	D-Lactose (bovine origin)	+	+
MEL	D-Melibiose	+	-
SAC	D-Saccharose (sucrose)	+	-
TRE	D-Trehalose	-	-
INU	Inulin	-	-
MLZ	D-Melezitose	-	-
RAF	D-Raffinose	+	-
AMD	Amidon(starch)	-	-
GLYG	Glycogen	-	-
XLT	Xylitol	-	-
GEN	Gentiobiose	+	-
TUR	D-Turanose	+	-
LYX	D-Lyxose	-	-
TAG	D-Tagatose	-	-
DFUC	D-Fucose	-	-
LFUC	L-Fucose	-	-
DARL	D-Arabitol	-	-
LARL	L-Arabitol	-	-
GNT	potassium Gluconate	-	-
2KG	potassium 2-KetoGluconate	-	-
5KG	potassium 5-KetoGluconate	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 13 แสดงผลการระบุเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

เชื้อแบคทีเรีย	ผลการระบุเชื้อ
Lb. salivarius TISTR 1112 (FSCMU 40-51)	*Lb.plantarum* 1, %ID = 78.6%
Lb. bulgaricus TISTR 895 (FSCMU 40-50)	*L. cremoris* 2, %ID = 94.1% *L. helveticus*, %ID = 5.6 % *Lb. delbrueckii*, %ID = 0.1%

4.6 การศึกษาความสามารถในการใช้ Amino acid ความสามารถในการสร้างกรด และความสามารถในการสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol ในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10

4.6.1 การศึกษาความสามารถในการใช้ Amino acid

จากตารางที่ 14 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการศึกษาความสามารถในการใช้ Amino acid ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกพบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกทุกตัวไม่สามารถใช้กรดอะมิโน Lysine, Histidine, และ Tryptophan ได้ แต่เมื่อทำการทดสอบการใช้กรดอะมิโน Tyrosine เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L 7021 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 892 สามารถใช้กรดอะมิโน Tyrosine ได้ ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L 7021 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 892 ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถจะสร้างกลิ่นที่ไม่ดีในผลิตภัณฑ์ และทำให้รสชาติผลิตภัณฑ์นมเสีย (Madera et al.,2003) ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ (FSCMU 44-10), h สต (FSCMU 44-19) และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ซึ่งไม่สามารถย่อยสลาย Amino acid ได้จึงถูกนำไปใช้ทดสอบในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ตามการศึกษาการหมักในนมของเชื้อแบคทีเรีย ผลิตกรดแลกติก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีในการคัดเลือกในอุตสาหกรรมนม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 14 แสดงความสามารถในการใช้ Amino acid ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

เชื้อแบคทีเรีย	กรดอะมิโน			
	Lysine	**Tyrosine**	**Histidine**	**Tryptophan**
h สต(FSCMU 44-19)	-	-	-	-
B สต(FSCMU 44-13)	-	-	-	-
CMJ(FSCMU 44-07)	-	-	-	-
L 7021(FSCMU 44-05)	-	+	-	-
IMJ(FSCMU 44-10)	-	-	-	-
B 7009 (FSCMU 44-01)	-	-	-	-
Lb. acidophilus TISTR 1034	-	-	-	-
Lb. bulgaricus TISTR 326	-	-	-	-
Lb. bulgaricus TISTR 892	-	+	-	-
Lb. bulgaricus TISTR 895	-	-	-	-
L. lactis TISTR 785	-	-	-	-
Lb. salivarius TISTR 1112	-	-	-	-
E. faecalis TISTR 1482	-	-	-	-
E. faecium TISTR 1283	-	-	-	-
S. thermophilus TISTR 458	-	-	-	-
S. thermophilus TISTR 894	-	-	-	-

หมายเหตุ : 1. เครื่องหมาย + หมายความว่ามีการเกิด clear zone โดยรอบโคโลนีที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อของ MRS agar ซึ่งเติมกรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ

2. เครื่องหมาย - หมายความว่าไม่มีการเกิด clear zone โดยรอบโคโลนีที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อของ MRS agar ซึ่งเติมกรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6.2 ความสามารถในการสร้างกรดและการสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol

จากตารางที่ 15 จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่นำมาทดสอบการสร้างกรดในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ทุกไอโซเลท สร้างกรดได้ในอัตราที่ช้า และสร้างกรดได้ดีเมื่อมีระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง จึงทำให้นมขาดมันเนยร้อยละ 10 มีการแข็งตัวที่ระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาทดสอบการสร้างกรดในนมขาดมันเนย ร้อยละ 10 ทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol ในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ได้ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์หมักได้ ยกเว้นเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เป็นเชื้อมาตรฐาน ซึ่งไม่สามารถสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol ในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ (FSCMU 44-10), h สต (FSCMU 44-19) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความทนและไม่ทนต่อแบคทีริโอฟาจตามลำดับ สามารถสร้างกรดได้ใกล้เคียงกับเชื้อมาตรฐาน และสามารถสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol ในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์นมได้ (Madera et al.,2003) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ศึกษาการหมักในนม

ตารางที่ 15 แสดงการสร้างกรดในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

เชื้อแบคทีเรีย	ปริมาณกรดในชั่วโมงที่					การแข็งตัวของนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ในชั่วโมงที่					VP Test
	0	4	6	8	24	0	4	6	8	24	
h สต (FSCMU 44-19)	0.08	0.15	0.20	0.23	0.59	-	-	-	-	++	++
B สต (FSCMU 44-13)	0.08	0.15	0.20	0.25	0.60	-	-	-	-	++	++
CMJ (FSCMU 44-07)	0.08	0.12	0.18	0.21	0.60	-	-	-	-	++	++
L 7021(FSCMU 44-05)	0.07	0.09	0.12	0.15	0.56	-	-	-	-	++	++
I MJ (FSCMU 44-10)	0.08	0.13	0.16	0.20	0.55	-	-	-	-	++	++
B 7009 (FSCMU 44-01)	0.06	0.10	0.19	0.26	0.53	-	-	-	-	++	++
Lb. acidophilus TISTR 1034	0.08	0.10	0.13	0.18	0.37	-	-	-	-	(+)	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 15 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ปริมาณกรดในชั่วโมงที่					การแข็งตัวของนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ในชั่วโมงที่					VP Test
	0	4	6	8	24	0	4	6	8	24	
Lb. bulgaricus TISTR892	0.08	0.09	0.11	0.18	0.45	-	-	-	-	(+)	++
Lb. bulgaricus TISTR 895	0.09	0.14	0.17	0.20	0.41	-	-	-	-	(+)	-
Lb. delbrueckii TISTR 326	0.08	0.10	0.12	0.18	0.36	-	-	-	-	(+)	-
L. lactis TISTR 785	0.07	0.10	0.13	0.19	0.39	-	-	-	-	(+)	-
Lb. salivarius TISTR 1112	0.06	0.08	0.11	0.13	0.20	-	-	-	-	(+)	-
E. faecalis TISTR 1482	0.08	0.14	0.19	0.23	0.59	-	-	-	-	++	++
E. faecium TISTR 1283	0.08	0.16	0.21	0.28	0.60	-	-	-	(+)	++	++
S. thermophilus TISTR 458	0.06	0.12	0.18	0.24	0.51	-	-	-	-	+++	+
S. thermophilus TISTR 894	0.06	0.11	0.16	0.20	0.59	-	-	-	-	+++	++

หมายเหตุ : การแข็งตัวของนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ผล ++ คือ หางนมร้อยละ10 มีการแข็งตัวและมีน้ำเวย์สีเหลืองใสปริมาณน้อยแยกชั้นออกมาทางด้านชั้นบนของหลอด

: ผล +++ คือ หางนมร้อยละ 10 มีการแยกชั้นระหว่างส่วนของแข็งกับน้ำเวย์สีเหลืองขุ่นในสัดส่วน 1:1 หรือ หางนมร้อยละ 10 มีสภาพกึ่งแข็งโดยมีส่วนของแข็งมากกว่าของเหลวด้านบน เนื่องจากโปรตีนเคซีนในนมแข็งตัวมานานแล้ว ส่วนที่แข็งตัว (เคิร์ด) จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) จึงปรากฏเป็นน้ำเวย์ใสเพิ่มขึ้น) (White, et al. 1968).

: ผล (+) คือ หางนมร้อยละ 10 ไม่มีการแข็งตัวแต่มีความข้นหนืดสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมหรือมีความข้นหนืดมากจนเกือบแข็งตัว ผล – คือ หางนมร้อยละ 10 ไม่มีการแข็งตัวและไม่มีการข้นหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

การทดสอบ Voges-Proskauer test (VP Test) ผล ++ และ + คือ เกิดวงแหวนสีแดงขึ้นที่ด้านบนของสารละลายผสมหลังจากหยดสารละลาย L-naphthol เข้มข้นร้อยละ 6 และ KOH เข้มข้นร้อยละ 16 ภายในเวลา 20 นาที และ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ผล – คือ ไม่เกิดวงแหวนสีแดงขึ้นที่ด้านบนของสารละลายผสมหลังจากหยดสารละลาย L-naphthol เข้มข้นร้อยละ 6 และ KOH เข้มข้นร้อยละ 16 โดยใช้เวลาสังเกตผลมากกว่า 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.7 การศึกษาการหมักในนมของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

หลังจากเลี้ยงเชื้อในนมผงขาดมันเนยร้อยละ 10 บ่มเชื้อ IMJ และ h สต ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ส่วน *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บ่มเชื้อในสภาพไร้อากาศ ตรวจนับจำนวนเชื้อ % กรด และ pH ทุก 2 ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, และ 14 ชั่วโมง ในสภาวะไม่เติมแบคทีริโอฟาจ (no phage) และเติมแบคทีริโอฟาจ (ฟาจ, with phage) จาก F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061) ทำการทดลองที่เหมือนกัน 3 ครั้งๆละ 2 ซ้ำ ปรากฏผลดังข้างล่างนี้

4.7.1 โดยภาพรวมค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ % กรด และpH ของเชื้อ IMJ, h สต, *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 แสดงในภาพที่ 2 จากภาพที่ 2 (a,c) แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ %กรด (% titratable acidity) และ pH ระหว่างเชื้อ IMJ และ h สต ในกรณีของ IMJ ในสภาวะไม่เติมฟาจและเติมฟาจมีความเปลี่ยนแปลงจากเดิมคือ7.66-7.53 เปลี่ยนเป็น 10.08-11.34 $\log_{10}$cfu/ml, 0.152-0.147 เปลี่ยนเป็น 0.520-0.499 % และ pH จากเดิม 6.44-6.39 เปลี่ยนเป็น 4.75-4.86 ตามลำดับ ส่วน สายพันธุ์ h สต ภาพที่ 2 (b,d) 6.66-7.88 เปลี่ยนเป็น 19.01-8.97 $\log_{10}$cfu/ml, 0.154-0.124 เปลี่ยนเป็น 0.404-0.329 % และ pH จากเดิม 6.30-6.35 เปลี่ยนเป็น 4.80-4.94 ตามลำดับ หลังจากบ่มเชื้อนาน 14 ชั่วโมง จะเห็นว่าหลังจากเติมฟาจมีผลทำให้จำนวนเซลเปอร์เซนต์กรดของเชื้อ h สต เปลี่ยนแปลงลดลงมากกว่า IMJ อย่างชัดเจน นอกจากนี้เชื้อ h สต ยังมีปริมาณฟาจเจริญร่วม 5.63-9.81 $\log_{10}$pfu/ml มากกว่าฟาจเจริญร่วมกับเชื้อ IMJ 5.02-7.51 $\log_{10}$ pfu/ml

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895จำนวนเซล เปอร์เซนต์กรด และ pH ของเชื้อ ในกรณีของ *S. thermophilus* TISTR 894 (ภาพที่ 3 (e,g)) ในสภาวะไม่เติมฟาจและเติมฟาจมีความเปลี่ยนแปลงจากเดิมคือ 6.79-6.66 เปลี่ยนเป็น 13.87-11.76 $\log_{10}$cfu/ml, 0.147-0.134 เปลี่ยนเป็น 0.607-0.533 % และ pH จากเดิม 6.43-6.44 เปลี่ยนเป็น 4.41-4.46 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 (ภาพที่ 3 (f,h)) 6.70-6.78 เปลี่ยนเป็น 13.92-13.00 $\log_{10}$cfu/ml, 0.149-0.136 เปลี่ยนเป็น 0.703-0.697 % และ pH จากเดิม 6.43-6.44 เปลี่ยนเป็น 4.41-4.46 ตามลำดับ หลังจากบ่มเชื้อนาน 14 ชั่วโมง จะเห็นว่าหลังจากเติมฟาจมีผลทำให้จำนวนเซล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซนต์กรด และpH ของเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894 เปลี่ยนแปลงมากกว่า *Lb. bulgaricus* TISTR 895 อย่างชัดเจน แต่ระดับ pH ปรากฏความแตกต่างไม่ชัดเจนเท่ากับจำนวนเชื้อและเปอร์เซนต์กรด นอกจากนี้เชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894 ยังมีปริมาณฟาจเจริญร่วม 5.40-10.08 $\log_{10}$pfu/ml มากกว่าฟาจเจริญร่วมกับเชื้อ *Lb. bulgaricus* TISTR895 5.12-7.93 $\log_{10}$pfu/ml

สรุป การวิเคราะห์ทดลองนี้ทำให้ทราบดังนี้

1) ฟาจของF7010(40)3.2 (ได้ให้ชื่อรหัสเป็นϕFSCMU40-061) สามารถมีผลทำลายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำพวกกรัมบวก รูปร่างเซลกลม (Gram positive cocci) ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ IMJ(FSCMU 44-10) สายพันธุ์ h สต (FSCMU 44-19) และ *S. thermophilus* TISTR 894 ได้ โดยทำให้แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดเจริญและมีจำนวนเซล รวมทั้งผลิตกรดลดลง แต่ไม่มีผลต่อ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีเซลรูปร่างแท่ง ติดสีกรัมบวก (Gram positive rod)

2) การทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ มีความต้านทานต่อฟาจ F7010(40) 3.2ได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก h สต ส่วน *Lb. bulgaricus* TISTR 895 มีความต้านทานต่อฟาจ F7010(40)3.2 (หรือ ϕFSCMU40-061) ได้มากกว่าเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894

3) ฟาจϕFSCMU40-061) เจริญร่วมกับ *S. thermophilus* TISTR 894 ได้มากที่สุด รองลงมา คือเจริญร่วมกับ เชื้อ h สต ลำดับถัดไปเป็น *Lb. bulgaricus* TISTR 895 และ เชื้อ IMJ น้อยที่สุด

นอกจากนี้จากการทดลองนี้แสดงว่า พลาค (plaque) จากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกF7010(40)3.2 ซึ่งใช้เตรียมเป็นสารละลายฟาจ (phage lysate) มีแนวโน้มที่จะเป็นแบคทีริโอฟาจมากกว่าเป็นแบคทีริโอซิน (bacteriocin) เนื่องจากมีการเพิ่มปริมาณร่วมกับแบคทีเรีย ส่วนแบคทีริโอซินจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ไม่เพิ่มขึ้นหลังจากแบคทีเรียได้ผลิตขึ้นแล้ว (Kilic, et al.1996)

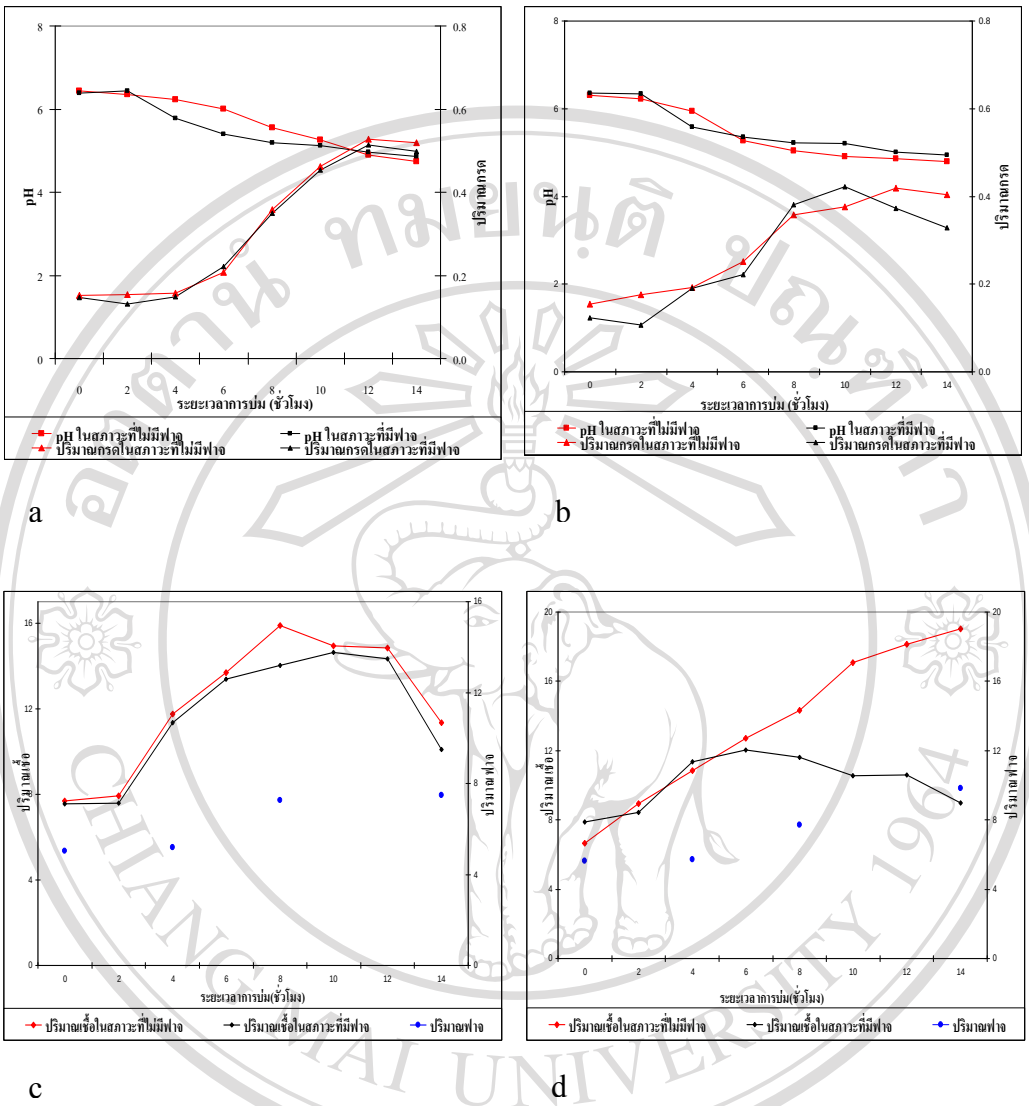
การทดลองนี้ให้ผลเหมือนงานวิจัยของ Madera et al.,2003 ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก *L. lactis* สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อฟาจ เปรียบเทียบกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

L. lactis สายพันธุ์ที่ไม่มีความต้านทานต่อฟาจ ซึ่งแยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมทำเนยแข็ง เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อนมผงขาดมันเนยร้อยละ 11 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าสายพันธุ์ทนฟาจยังคงมีจำนวนเซลและผลิตกรดในสภาวะไม่เติมฟาจและเติมฟาจได้เท่ากัน และมีจำนวนฟาจเจริญร่วมได้น้อยกว่าตัวอย่าง *L. lactis* สายพันธุ์ที่ไม่มีความต้านทานต่อฟาจ รวมทั้งพบจำนวนเซลแบคทีเรียและสร้างกรดได้น้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมฟาจ เหตุผลของสายพันธุ์สามารถต้านทานต่อฟาจได้ เนื่องจากฟาจไม่สามารถเข้าเกาะกับเซลแบคทีเรีย (adsorption)ได้ดี และบางส่วนเกิดจากแบคทีเรียมียีนส์ป้องกันไม่ให้ฟาจสร้างดีเอนเอได้ (genetic abortive infection mechanism) (Deng et al., 1999)

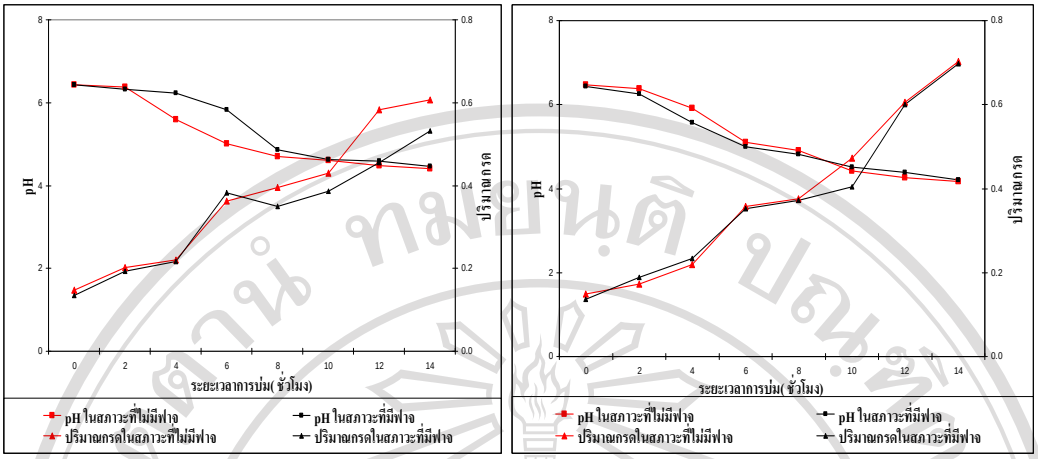
นอกจากนี้อัตราการสร้างกรดของ IMJ, h สต, *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 น้อยกว่า *L. lactis* อาจเนื่องจากพันธุกรรมของเชื้อเองและการใช้สารละลายนมที่มีปริมาณของแข็งจากนมผงขาดมันเนยน้อยกว่า (ร้อยละ10) ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

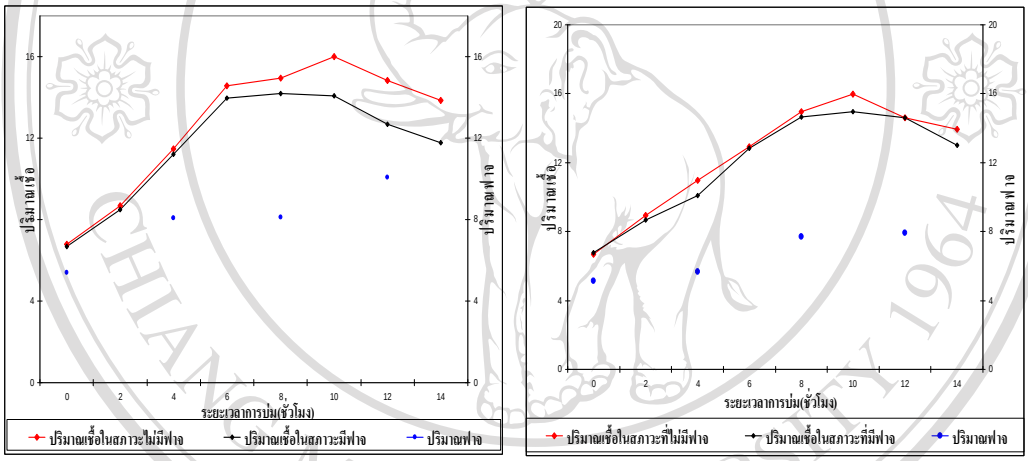


รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และปริมาณกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ(■,▲) และมีฟาจ (■,▲) กับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ (●) และมีฟาจ (●) กับปริมาณ plaque ของฟาจ (●) ของเชื้อจากตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่โจ้ รหัส I (a, c) และสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง รหัส h (b, d) ในนมขาดมันเนยร้อยละ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



e f



g h

รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และปริมาณกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ (■,▲) และมีฟาจ (■ ,▲) กับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ (●) และมีฟาจ (●) กับปริมาณ plaque ของฟาจ (●) ของ *S. thermophilus* TISTR 894 (e, g) และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 (f, h) ในนมขาดมันเนยร้อยละ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.7.2 ผลเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียไม่เติมฟาจและเติมฟาจ ปริมาณเชื้อ ปริมาณกรด และ pH ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแต่ละชนิดในสภาวะที่เติมฟาจ F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061) และไม่เติมฟาจ แสดงดังตารางที่ 16 พบว่าเชื้อ IMJ มีปริมาณเซลล์ และปริมาณกรด ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในสภาวะไม่เติมฟาจและเติมฟาจ แสดงว่าแบคทีเรียนี้มีความต้านทานต่อฟาจ ϕF7010(40)3.2 (หรือϕFSCMU40-061) ถึงแม้จะมี pH ลดลงเล็กน้อยเมื่อเติมฟาจ เชื้อ h สต มีปริมาณเซลล์ลดลงมากเมื่อเติมฟาจ แต่มีกรดและ pH ไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 สภาวะ สำหรับ *S. thermophilus* TISTR 894 มีปริมาณเซลล์ และปริมาณกรดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และมี pHลดลงน้อยกว่าเมื่อเติมฟาจ ส่วน *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ปริมาณเซลล์ ปริมาณกรด และ pH ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในสภาวะไม่เติมฟาจและเติมฟาจ แสดงว่าเชื้อนี้มีความต้านทานต่อฟาจชนิดนี้มากที่สุด เชื้อ IMJ มีผลระหว่าง h สต และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 จึงมีความทนต่อฟาจเป็นอันดับรอง และทนต่อฟาจสูงกว่า h สต เล็กน้อย เนื่องจาก h สต ผลิตกรดลดลงเมื่อเติมฟาจ แต่ IMJ ไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 สภาวะ สำหรับ *S. thermophilus* TISTR 894 มีความต้านทานต่อฟาจน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม *S. thermophilus* TISTR 894 ในสภาวะไม่เติมฟาจสามารถผลิตปริมาณกรดได้ไม่แตกต่างกับ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 และเชื้อทั้ง 2 ชนิดผลิตกรดได้สูงกว่าเชื้อ IMJ และ h สต

เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำพวกกรัมบวก รูปร่างเซลกลม (Gram positive cocci) ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ IMJ (FSCMU 44-10) h สต (FSCMU 44-19) และ *S. thermophilus* TISTR 894 จะทนต่อฟาจ F7010(40) 3.2 (ϕFSCMU40-061) ได้น้อยกว่า *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีเซลรูปร่างแท่ง ติดสีกรัมบวก (Gram positive rod) ทำให้ฟาจ F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061) ไม่สามารถเข้าทำลายได้ง่าย เนื่องจากฟาจสายพันธุ์นี้มีความจำเพาะ (specific) กับโฮสต์ที่เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีเซลรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก (Gram positive cocci) มากกว่า (Douglas,1975; Madera, et al. 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแต่ละตัวในสภาวะที่มีฟาจและไม่มีฟาจด้านปริมาณเชื้อ ปริมาณกรด และ pH

	Lactic Acid Bacteria	Log(cfu/ml)	% Acidity	pH
1	IMJ No Phage	12.24^{bc}	$.317^{bc}$	5.69^{c}
2	IMJ With Phage	11.61^{b}	$.308^{bc}$	5.51^{b}
3	h สต No Phage	13.47^{d}	$.291^{ab}$	5.42^{b}
4	h สต With Phage	10.18^{a}	$.268^{a}$	5.50^{b}
5	*S. thermophilus* TISTR 894 No Phage	12.63^{c}	$.369^{d}$	5.20^{a}
6	*S. thermophilus* TISTR 894 With Phage	11.63^{b}	$.331^{c}$	5.42^{b}
7	*Lb. bulgaricus* TISTR 895 No Phage	12.36^{bc}	$.381^{d}$	5.20^{a}
8	*Lb. bulgaricus* TISTR 895 With Phage	11.95^{bc}	$.373^{d}$	5.14^{a}

หมายเหตุ ค่า $P \leq 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

-ค่าเฉลี่ยจากการทดลองที่เหมือนกัน 3 ครั้งๆละ 2 ซ้ำ

-ค่าที่มีอักษรกำกับเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

- IMJ - เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่โจ้รหัส I หรือมีรหัสใหม่ว่า FSCMU 44-10

- h สต - เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วางรหัส h หรือมีรหัสใหม่ว่า FSCMU 44-19

- *S. thermophilus* TISTR 894 - *Streptococcus thermophilus* TISTR 894

- *Lb. bulgaricus* TISTR 895 - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 895

- No phage - ไม่เติมแบคทีริโอฟาจ

-With phage - เติมแบคทีริโอฟาจแยกจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก F7010(40)3.2 หรือตั้งรหัสใหม่เป็น FSCMU40-061 และรหัสใหม่ของฟาจนี้คือ ϕFSCMU40-061

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เลี้ยงเชื้อในนมผงขาดมันเนยร้อยละ 10 บ่มเชื้อ IMJ และ h สต ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส

ส่วน *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนเชื้อ % กรด และpH ทุก 2 ชั่วโมง ที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ชั่วโมง

สรุป การทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ มีความต้านทานต่อฟาจ F7010(40)3.2ได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก h สต และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 มีความต้านทานต่อฟาจ F7010(40)3.2 (หรือ ϕFSCMU40-061) ได้มากกว่าเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894

4.7.3 ปริมาณฟาจ F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061)ในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เพาะเลี้ยงในนมผงขาดมันเนยร้อยละ 10

จะเห็นว่าปริมาณฟาจ F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061) เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ในนมผงขาดมันเนยร้อยละ 10 ในขณะเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง มีจำนวนฟาจใกล้เคียงกันคือ 5.02-5.63 $\log_{10}$pfu/ml หลังจากบ่มต่อไปที่ 4, 8 และ 14 ชั่วโมง จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตราที่ไม่เท่ากัน โดยจำนวนฟาจที่เลี้ยงร่วมกับ *S. thermophilus* TISTR 894 จะมีอัตราการเจริญรวดเร็วที่สุดและมีปริมาณฟาจมากที่สุด 5.40-10.08 $\log_{10}$pfu/ml รองลงมาคือสายพันธุ์ h สต(FSCMU 44-19) มีฟาจ 5.63-9.81 $\log_{10}$pfu/ml ส่วนในแบคทีเรียสายพันธุ์ IMJ(FSCMU 44-10) และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 มีปริมาณฟาจเจริญร่วมน้อยกว่า 2 สายพันธุ์แรก คือ 5.02-7.51 และ 5.12-7.93 $\log_{10}$pfu/ml ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกสายพันธุ์ IMJ(FSCMU44-10) มีความต้านทานต่อฟาจ F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061)ได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีเซลรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก(Gram positive cocci) อีก 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ h สต (FSCMU 44-19) และ *S. thermophilus* TISTR 894 ส่วน *Lb. bulgaricus* TISTR 895 มีปริมาณฟาจน้อยกว่า 2 สายพันธุ์คือ h สต (FSCMU 44-19) และ *S. thermophilus* TISTR 894 เช่นกัน อาจเนื่องจาก *Lb. bulgaricus* TISTR 895 เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีเซลรูปร่างแท่ง ติดสีกรัมบวก (Gram positive rod) ทำให้ฟาจ F7010(40)3.2 (ϕFSCMU40-061)ไม่สามารถเข้าทำลายได้ง่าย เนื่องจากฟาจสายพันธุ์นี้มีความจำเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(specific)กับโฮสต์ที่เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีเซลรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก(Gram positive cocci)ได้แก่ 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ h สต (FSCMU 44-19) และ *S. thermophilus* TISTR 894 (Douglas,1975; Madera et al., 2003)

นอกจากนี้จากการทดลองนี้แสดงว่า พลาค (plaque) จากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกF7010(40)3.2 ซึ่งใช้เตรียมเป็นสารละลายฟาจ (phage lysate) มีแนวโน้มที่จะเป็นแบคทีริโอฟาจ มากกว่าเป็นแบคทีริโอซิน(bacteriocin) เนื่องจากมีการเพิ่มปริมาณร่วมกับแบคทีเรีย ส่วนแบคทีริโอซินจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ไม่เพิ่มขึ้นหลังจากแบคทีเรียได้ผลิตขึ้นแล้ว (Kilic, et al.1996)

จากตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18 เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณฟาจในแต่ละคู่ของแบคทีเรียทุกตัว จะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเรียงลำดับปริมาณฟาจจากน้อยที่สุดไปมากสุดใน bacteria จะเห็นได้ว่า IMJ มีจำนวนฟาจน้อยที่สุด รองลงมาคือ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกของตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง- แม่วาง รหัส h และเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจาก *S. thermophilus* TISTR 894 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณฟาจเจริญร่วมกับแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแต่ละสายพันธุ์

เชื้อแบคทีเรีย	**ปริมาณฟาจ log10 (pfu/ml)**			
	ชั่วโมงที่ 0	**ชั่วโมงที่ 4**	**ชั่วโมงที่ 8**	**ชั่วโมงที่ 14**
IMJ (FSCMU 44-10)	5.02±0.06	5.18±0.09	7.28±0.05	7.51±0.03
h สต (FSCMU 44-19)	5.63±0.04	5.71±0.03	7.70±0.02	9.81±0.02
S. thermophilus TISTR 894	5.40±0.04	8.09±0.01	8.13±0.01	10.08±0.01
Lb. bulgaricus TISTR 895	5.12±0.13	5.65±0.04	7.70±0.03	7.93±0.02

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลองที่เหมือนกัน 3 ครั้งๆ ละ 2 ซ้ำ

- LAB –Lactic acid bacteria เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก
- log10(pfu/ml)= Phage titers in log10 of plagues forming unit per millilitres of each LAB.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- บ่มเชื้อ IMJ (FSCMU 44-10) และ h สต (FSCMU 44-19) ที่ 44 องศา-เซลเซียส
- บ่มเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ที่ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟาจในแต่ละคู่ของแบคทีเรียทุกตัว (Pair T-Test of mean)

Pair No.	Phage titers in LAB pairs	Mean	Std. Deviation	t	df	P
Pair 1	log10(pfu/ml) h สต	6.21	1.78	3.404	11	.006
	log10(pfu/ml) IMJ	5.33	1.13			
Pair 2	log10(pfu/ml) h สต	6.21	1.78	-4.839	11	.001
	log10(pfu/ml) *S. thermophilus* TISTR 894	7.67	2.35			
Pair 3	log10(pfu/ml)hสต	6.21	1.78	2.662	11	.022
	log10(pfu/ml) *Lb. Bulgaricus* TISTR 895	5.59	1.28			
Pair 4	log10(pfu/ml) IMJ	5.33	1.13	-5.229	11	.000
	log10(pfu/ml) *S. thermophilus* TISTR 894	7.67	2.35			
Pair 5	log10(pfu/ml) IMJ	5.33	1.13	-2.632	11	.023
	log10(pfu/ml) *Lb. Bulgaricus* TISTR 895	5.59	1.28			
Pair 6	log10(pfu/ml) *S. thermophilus* TISTR 894	7.67	2.35	5.664	11	.000
	log10(pfu/ml) *Lb. bulgaricus* TISTR 895	5.59	1.28			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ ค่า $P \leq 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

- ค่าเฉลี่ยจากการทดลองที่เหมือนกัน 3 ครั้งๆละ 2 ซ้ำ
- LAB –Lactic acid bacteria เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก
- log10(pfu/ml) = Phage titers in log10 of plagues forming unit per millilitres of each LAB.

4.7.4 การตรวจกิจกรรมการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมนม

จากตารางที่ 19 ทำให้ทราบว่าเมื่อเติมฟาจลงในแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ, h สต, *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895 เลี้ยงในนมผงขาดมันเนยร้อยละ 10 เป็นเวลา 0 4 8 14 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40-44 องศาเซลเซียส ทำให้ผลิตกรดแลกติก ลดลงเป็นร้อยละ 2.92, 7.93,10.21และ 2.31 ตามลำดับ และสอดคล้องกับจำนวนฟาจที่สามารถเกาะ (adsorb) บนแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกทั้ง 4 สายพันธ์คือ 5.33, 6.2, 7.67 และ 5.59 Log10 (pfu/ml) ตามลำดับ ยืนยันว่าแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 มีฟาจที่สามารถเกาะ(adsorb) บนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ได้น้อย คือ 5.33 และ 5.59 Log10 (pfu/ml) ตามลำดับ ทำให้ผลิตกรดแลกติกลดลงร้อยละ 2.92 และ 2.31 ตามลำดับ ซึ่งลดลงน้อยกว่า h สต ร้อยละ 7.93 และ *S. thermophilus* TISTR 894 ร้อยละ10.21 เพราะว่าแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก 2 สายพันธุ์ หลังนี้มีจำนวนแบคทีริโอฟาจ มาเกาะมากกว่าคือ 6.2 และ 7.67 Log10 (pfu/ml) ตามลำดับ ถ้าคำนึงถึงจำนวนฟาจที่เกาะแบคทีเรียจะเห็นว่าแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ สามารถทนฟาจได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ส่วนแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก *S. thermophilus* TISTR 894 สามารถทนฟาจได้น้อยที่สุด รองลงมาคือ h สต เพราะว่ามีฟาจเกาะมากเป็นอันดับหนึ่งและสอง ซึ่งกิจกรรมการปนเปื้อนของฟาจสามารถดูได้จาก % การลดการผลิตกรดของกล้าเชื้อ ถ้ากล้าเชื้อสร้างกรดลดลงมากกว่าร้อยละ10 แสดงว่ากล้าเชื้อปนเปื้อนด้วยฟาจ (Harrigan, 1998.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบ % titratable acidity ของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ, h สต, *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ในสภาวะที่ไม่เติมและเติมฟาจ[2]

Pair	Lactic acid bacteria no phage and with phage[1]	% titratable acidity produced (mean)[2]	% acidity reduction[3]	Log10(pfu/ml)[4]
Pair 1	IMJ No Phage	0.317		nd[5]
	IMJ With Phage	0.308	2.92	5.33
Pair 2	hสต No Phage	0.291		nd
	h สต With Phage	0.268	7.93	6.2
Pair 3	*S. thermophilus* TISTR 894 No Phage	0.369		nd
	S. thermophilus TISTR 894 With Phage	0.331	10.21	7.67
Pair 4	*Lb. bulgaricus* TISTR 895 No Phage	0.381		nd
	Lb. bulgaricus TISTR 895 With Phage	0.373	2.31	5.59

หมายเหตุ 1. คือ แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก IMJ, h สต, *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ในสภาวะที่ไม่เติม (No Phage) และเติมฟาจ (With Phage)

2. ค่าเฉลี่ยของ % titratable acidity วัดที่ 0 2 4 6 8 10 12 14 ชั่วโมง

3. % กรดลดลงหลังจากเติมฟาจ = {(% กรดไม่เติมฟาจ - % กรดเมื่อเติมฟาจ (% กรดไม่เติมฟาจ)}100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. จำนวนฟาจ Log10 (pfu/ml)ในแบคทีเรียแลกติก IMJ(FSCMU 44-10), h สต (FSCMU 44-19), *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ที่เติมฟาจที่ 0, 4, 8 และ 14 ชั่วโมง

5. nd = not done

6. ในอุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักสามารถตรวจการปนเปื้อนของฟาจในผลิตภัณฑ์ได้จากกิจกรรมการสร้างกรดของกล้าเชื้อ ถ้ากล้าเชื้อมีกิจกรรมผลิตกรดลดลงมากกว่าร้อยละ 10 ถือว่าเชื้อเริ่มต้นมีฟาจปนเปื้อน อ้างอิงจากหนังสือบทปฏิบัติการ (Laboratory Methods in Food Microbiology, 3rd ed. Academic Press. p. 257) ของ Harrigan (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved