ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำนมดิบหมักกรดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA

Study of bacterial strains isolated from raw milk preseved in acetic acid by nucleotide sequence analysis of 16s rDNA gene

โดย

นางสาวลัดดาวรรณ เพชรเรือนทอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

Department of Fisheries Science Faculty of Agricultural Technology

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

Bangkok 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำนมดิบหมักกรดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA

Study of bacterial strains isolated from raw milk preseved in acetic acid by nucleotide sequence analysis of 16s rDNA gene

ชื่อนักศึกษา นางสาวลัดดาวรรณ เพชรเรือนทอง
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์)

ภาควิชารับรองแล้ว
.....
(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 9 เดือน พ.ค. พ.ศ. 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20529

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ชื่อเรื่อง ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำนมดิบหมักกรดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA

Study of bacterial strains isolated from raw milk preseved in acetic acid by nucleotide sequence analysis of 16s rDNA gene

T099332

โดย

นางสาวลัดดาวรรณ เพชรเรือนทอง

ปพ.
ล245ศ
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99332.....
วัน,เดือน,ปี.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำนมดิบหมักกรดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA

Study of bacterial strains isolated from from raw milk preseved in acetic acid by nucleotide sequence analysis of 16s rDNA gene

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยกรดอะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยทิ้งไว้นาน 6 เดือน ทำการ Spread Plate เพื่อหาโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แตกต่างกันหลังจากนั้นแยก Single Colony และ Pure Culture ด้วยวิธี Streak Plate นำมาบ่มในลักษณะคว่ำจานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมงซึ่งพบแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน 4 ชนิด เมื่อนำมาย้อมแกรม พบว่าแบคทีเรียชนิดที่ 1, 3 และ4 เป็นแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียชนิดที่ 2 เป็นแกรมบวก แล้วสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด และใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่ได้ไปศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA จำนวน 600 คู่เบส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ที่แตกต่างกันเมื่อนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน พบว่า

แบคทีเรียชนิดที่ 1 คือ *Chromobacterium violaceum* มีความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ในธนาคารยีน 100 % แบคทีเรียชนิดที่ 2 คือสกุล *Staphylococcus* sp. แนวโน้มได้แก่ชนิด *S. sciuri* 99 %, *S. lentus* 99%, *S. vitulus* 98%, *S. pulvereri* 98%, *S. cohnii* 97%, *S. saprophyticus* 97%, *S. nepalensis* 97%, *S. hominis* 97% และ *S.epidermidis* 97% แบคทีเรียชนิดที่ 3 คือสกุล *Ralstonia* sp. แนวโน้มได้แก่ชนิด *R. basilensis* 98%, *R. eutropha* 97%, และ *R. campinensis* 96% และแบคทีเรียชนิดที่ 4 คือ *Burkholderia cepacia* มีความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ในธนาคารยีน 100 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ในการจัดทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำปัญหาพิเศษขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ พี่แอน ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาปัญหาต่างๆตลอดการทดลอง พร้อมทั้งแก้ไขปัญหาข้อบกพร่อง จนปัญหาพิเศษเล่มนี้เสร็จอย่างสมบูรณ์ ขอขอบคุณ คุณบุปผา คุณสุดารัตน์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่

ขอขอบใจ ปุ้ยที่ให้ความช่วยเหลือในทุกทุกเรื่องตลอดการทดลอง ขอบใจ ออฟ เอฟ นก หญิง แชมป์ และอีกหลายคนที่ไม่ได้เอ่ยนามที่อยู่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนในด้านเงินทุนและให้กำลังใจข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอบคุณพี่เต็ก พี่เขียว และพี่ส้ม ที่คอยให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำปัญหาพิเศษ

ลัดดาวรรณ เพชรเรือนทอง

พฤษภาคม 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลองและวิจารณ์	22
สรุปและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แร่ธาตุที่สำคัญและปริมาณที่พบในน้ำนม	3
2	ร้อยละของความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดที่พบโดยใช้โปรแกรม Blast	31
3	ร้อยละของความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดที่พบโดยใช้โปรแกรม Blast	33
4	เปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของ *Burkholderia*, *Pseudomon*, *Ralstonia*	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	8
2	การศึกษาชนิดของแบคทีเรีย	18
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 24 ชั่วโมง	22
4	การย้อมแกรมแบคทีเรีย	23
5	ผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย	24
6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA	25
7	Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 1	27
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 1 โดยใช้ ไพรเมอร์ Forward DNA	28
9	Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 2	29
10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 2 โดยใช้ ไพรเมอร์ Forward DNA	30
11	Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 3	32
12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 3โดยใช้ ไพรเมอร์ Forward DNA	33
13	Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 4	34
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 4โดยใช้ ไพรเมอร์ Forward DNA	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

น้ำนมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีปริมาณความชื้นและความเป็นกรดด่างหรือระดับพีเอชที่เป็นกลาง ซึ่งเหมาะสมต่อการทำให้จุลินทรีย์ต่าง ๆ สามารถเติบโตได้ดี นมจึงเป็นอาหารที่เกิดการเน่าเสียได้ง่าย องค์ประกอบของอาหารที่พบในน้ำนม ได้แก่ น้ำ ไขมัน โปรตีน น้ำตาลแลคโตส และเถ้า (Ash) โดยมีปริมาณเฉลี่ย 87 3.66 3.42 4.92 และ 0.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การใช้นมหมักกรดเลี้ยงไรแดงมีหลักการเช่นเดียวกับการทำสูตรอาหารต่าง ๆ เช่นน้ำต้มฟาง น้ำต้มมูล น้ำปุ๋ยหมัก และเลือดสัตว์เพื่อเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียและโปรโตซัว โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะอาศัยอยู่ได้ในธาตุอาหารที่ละลายอยู่ในน้ำ เช่น ไขมัน โปรตีน แป้ง และเกลือแร่ต่าง ๆ (Bellosillo, 1957) จุลินทรีย์ที่พบในน้ำนมดิบมาจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ อาหารสัตว์ ปุ๋ย เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดน้ำนม ดิน น้ำ คนรีดนม และเต้านมสัตว์เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียถือเป็น จุลินทรีย์ตัวหนึ่งที่พบในน้ำนมบูด และมีความสามารถในการสังเคราะห์ (Synthetic capacity) โดยแบคทีเรียพวกที่ดำรงชีวิตแบบอิสระ สามารถสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในโปรโตปลาสซึมของเซลล์ได้

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่พบในนมหมักกรดที่ใช้เลี้ยงไรแดงนั้นถือเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้ทราบว่าไรแดงซึ่งเป็นอาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนนั้น ไรแดงสามารถดำรงชีวิตและเจริญเติบโตโดยอาศัยพวกแบคทีเรียชนิดใดบ้างเป็นอาหาร

เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่ มีความเชื่อมโยงกับเทคโนโลยีสารสนเทศ การหาและใช้ข้อมูลที่มีอยู่ในยีน ข้อมูลที่สำคัญ คือ ข้อมูลลำดับอักษรของดีเอ็นเอ อักษรแต่ละตัว คือสารเคมีที่เรียกว่า เบส ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ A T G C ยีนต่างๆ มีการเรียงตัวของเบส 4 ชนิดนี้แตกต่างกันไปในแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น AGTC ATGC AATCCG เป็นต้น เมื่อรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ก็สามารถใช้แยกสิ่งมีชีวิตว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือไม่ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน (Altschul et al., 1997) โดยในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในนมหมักกรดโดยใช้เทคนิคการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตคือจะมีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกัน

วัตถุประสงค์

(1) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่พบในนมหมักกรดที่ใช้เป็นอาหารในการเลี้ยงไรแดงโดยใช้ 16s rDNA sequence

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

1. องค์ประกอบและคุณสมบัติของนม

นม หมายถึงของเหลวที่สะอาดและบริสุทธิ์ กลั่นได้จากเต้านมโคที่มีสุขภาพสมบูรณ์ ปราศจากโคโลสตรัม (Colostrum) ประกอบด้วยไขมันไม่น้อยกว่า 3.5 เปอร์เซ็นต์ และ Milk solidsnon-fat (Snf) ประกอบด้วยไขมันไม่น้อยกว่า 8.25 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการทดลองนี้เป็นการใช้นมหมักกรด ได้แก่ น้ำนมเหลืองเป็นน้ำนมที่รีดได้ในช่วงระหว่าง 15 วันก่อนสัตว์คลอด และหลังจากคลอด เป็นนมที่มีกลิ่นแรง รสชาติขม มีสีเหลืองออกแดงและมีความเหนียวข้น น้ำนมดิบที่มีจุลินทรีย์สูงเกินมาตรฐาน และน้ำนมที่เหลือตกค้างในโรงนมระหว่างการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ โดยนำนมเหล่านี้มาหมักกรดอะซิติก 2% เก็บได้นานประมาณ 6 เดือน ประโยชน์เพื่อเป็นอาหารของลูกวัวได้อีกด้วย

การศึกษาถึงองค์ประกอบของนมมีความสำคัญต่อการปฏิบัติต่อนมเป็นต้น ว่าการเก็บรักษาการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์นม วัวนมแต่ละพันธ์แตกต่างกันมีผลต่อองค์ประกอบในนมที่แตกต่างกันจะเห็นในทางเคมีน้ำนมเป็นสิ่งที่มีความซับซ้อนมาก ประกอบด้วยสารประกอบหลายร้อยชนิด องค์ประกอบบางชนิดถึงแม้จะมีปริมาณน้อย แต่มีความสำคัญมากที่เดียว

ถ้าพิจารณาอย่างแท้จริง จะพบว่าน้ำนมเป็นสิ่งที่มีความซับซ้อน ประกอบด้วยสารประกอบเป็นร้อย ๆ ชนิด องค์ประกอบบางชนิดมีปริมาณเล็กน้อย แต่มีบทบาทที่ทำให้น้ำนมมีความสำคัญ จะกล่าวถึงรายละเอียดของคุณลักษณะขององค์ประกอบที่สำคัญของนม เช่น ลิปิด โปรตีน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ (Ash) เม็ดสี วิตามิน เอนไซม์ ตลอดจนองค์ประกอบอื่น ๆ

(1) ลิปิด (Lipid) เป็นคำใช้เรียกสารประกอบไขมันไม่ว่าจะเป็น Fat หรือ Oil ซึ่งจัดเป็นสารประกอบที่เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ ในตาราบางเล่มอาจใช้ Fat แทนลิปิดเป็นสารประกอบที่ละลายในอีเทอร์

(2) แลคโตส (Lactose) เป็นคาร์โบไฮเดรตหลักในน้ำนม และยังพบสารประกอบอื่น ๆ เช่น ซีรีโบรไซด์ กลูโคส กาแลคโตส และซูโครส ในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนั้นยังพบน้ำตาลอะมิโน เช่น เฮกโซมีน อะเซทิลแลคโตซามีน และโอลิโกแซคคาไรด์ สารประกอบเหล่านี้แม้จะมีปริมาณน้อยแต่มีบทบาทสำคัญต่อน้ำนม เป็นต้นว่า ในกระบวนการให้ความร้อน สารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อกลิ่นของนมน้ำนมแลคโตสให้คุณค่าทางอาหารที่ดีสำหรับทารก ในอุตสาหกรรมยาจะใช้แลกโตสเป็นสารเคลือบตัวยา นอกจากนี้แลคโตสยังใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อรา *Penicillium notaturm* ซึ่งใช้ผลิตยาเพนนิซิลิน และเป็นอาหารที่ดีสำหรับแลคติกแบคทีเรีย ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว เนยแข็ง

(3) โปรตีนนม (Milk Proteins) เป็นโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ส่วนใหญ่แล้วโปรตีนนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยกรดอะมิโน 150 หน่วย

(4) เอนไซม์ (Enzymes) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สร้างขึ้นจากเซลล์สิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงในเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์ จะถูกยับยั้งด้วยความร้อน

(5) แร่ธาตุ และเกลือแร่ น้ำนมประกอบด้วยธาตุหลักทั้งหมด 7 ชนิด นอกจากนั้นเป็นธาตุที่พบในปริมาณน้อย น้ำนมเป็นแหล่งสำคัญของแคลเซียม ความสมดุลของแคลเซียม และฟอสฟอรัส ในน้ำนมคล้ายกับที่พบในระบบโครงกระดูกของคนในวัยเจริญเติบโต (วรรณา, 2540)

ตารางที่1 แร่ธาตุที่สำคัญและปริมาณที่พบในน้ำนม

แร่ธาตุ	ปริมาณที่พบ (กรัม/ควอร์ต)
โพแทสเซียม	1.31
แคลเซียม	1.18
คลอรีน	0.91
ฟอสฟอรัส	0.91
โซเดียม	0.55
ซัลเฟอร์	0.28
แมกนีเซียม	0.11

ที่มา : วรรณา, 2540

2. แบคทีเรีย

แบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างแบบง่าย ๆ โดยประกอบด้วยเซลล์เดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะแบบ Procaryotic Cell ดำรงชีวิตแบบอิสระ สามารถสร้างสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในโปรโตรพลาสซึมของเซลล์ได้

แบคทีเรียมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น รูปกลม รูปไข่ ทรงกระบอก หรือเป็นเกลียว แต่โดยทั่วไปแล้วจัดแบ่งแบคทีเรียตามลักษณะรูปร่างดังนี้

(1) ทรงกลม (Coccus) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปกลม หรือรูปไข่ อาจอยู่เป็นเซลเดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นกลุ่ม หรือต่อกันเป็นลูกโซ่

(2) ทรงกระบอก (Bacillus) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน อาจอยู่เป็นท่อนเดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นสาย บางชนิดอาจเป็นท่อนสั้นๆ บางชนิดอาจเป็นท่อนยาว

(3) แบบเกลียว (Spirillum) เป็นแบคทีเรียที่มีท่อนยาว หรือสั้น แต่จะโค้งงอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียบางชนิดมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน เปลี่ยนแปลงหลายแบบ ทั้งนี้เพราะไม่มีผนังเซลล์ที่จะทำให้รูปร่างคงลักษณะอยู่ได้

3. แบคทีเรียและการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

จุลินทรีย์ที่เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้น้ำนมเกิดการเปลี่ยนแปลงและเสื่อมเสีย ก่อให้เกิดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจต่อผู้ผลิต ผู้ดำเนินการทางด้านการแปรรูป ผู้แทนจำหน่าย และผู้บริโภค จุลินทรีย์บางชนิดที่มีในน้ำนมยังก่อให้เกิดความเจ็บป่วย นอกจากนี้ปริมาณของจุลินทรีย์รวมทั้งสิ่งที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาในน้ำนมยังเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ประเมินคุณภาพของน้ำนมด้วย ดังนั้นในด้านการผลิตผลิตภัณฑ์นมให้มีคุณภาพดีเป็นที่ยอมรับ น้ำนมดิบที่ใช้จะต้องมีคุณภาพที่ดีด้วย

ชนิดของแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตในน้ำนมได้ดีมีหลายชนิด แต่บางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีนักจึงมีการแข่งขันกันเองระหว่างแบคทีเรียด้วยกัน อย่างไรก็ตาม สามารถแบ่งแบคทีเรียเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (James, 2002)

3.1 แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในน้ำนม แบ่งตามผลิตผลที่เกิดขึ้น ได้แก่

(1) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เจริญเติบโตได้ดีใน น้ำนม ใช้คาร์บอนจากน้ำตาลแลคโตสโดยเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติค ผลของการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสอาจจะมีกรดอะซิติค คาร์บอนไดออกไซด์และก๊าสไฮโดรเจนเกิดขึ้น แบคทีเรียพวกนี้จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และอาจต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส จึงสามารถทำลายได้

(2) แบคทีเรียพวกโคไล อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส พบในลำไส้ ปุ๋ยคอก น้ำ และพืชต่าง ๆ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดแลคติคไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังทำให้โปรตีนสลายตัวเกิดกลิ่นเหม็น

(3) แบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทิริค สามารถเจริญเติบโตในน้ำนมได้ไม่ดีนัก เพราะเป็นแบคทีเรียพวกแอนแอโรบิค ซึ่งไม่ต้องการออกซิเจนและสามารถสร้างสปอร์ได้อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตก็คือ 37 องศาเซลเซียส พบว่าโปแตสเซียมไนเตรทและเกลือแกงมีผลต่อการทำลายแบคทีเรียพวกนี้

(4) แบคทีเรียที่ผลิตกรดโปรปีโอนิค เป็นพวกที่ชอบสร้างสปอร์ ชอบอุณหภูมิไม่มากนักประมาณ 30 องศาเซลเซียส จะผลิตกรดโปรปีโอนิค คาร์บอนไดออกไซด์ และสาร อื่น ๆ

(5) แบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเน่าเสีย แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนหรือเคซีนในน้ำนม ทำให้เกิดก๊าสแอมโมเนีย สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 แบคทีเรียที่เจริญเติบโตตามอุณหภูมิ ซึ่งแต่ละชนิดจะชอบอุณหภูมิไม่เหมือนกัน ได้แก่

(1) แบคทีเรียไซโครไฟล์หรือไซโครโทรป (Psychrophiles or Psychrotrophs) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำ แบคทีเรียพวกไซโครโทรป เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิประมาณ 7 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า ส่วนแบคทีเรียพวกไซโครไฟล์นั้นแป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่ 15 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้ที่ 0 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ในน้ำนมเป็นกลุ่มของไซโครโทรป แบคทีเรียกลุ่มนี้จะก่อให้เกิดปัญหาการเสื่อมเสียของน้ำนมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มไซโครโทรปมากขึ้น แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *Microbacterium spp., Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Streptococcus* spp.

(2) แบคทีเรียมีโซไฟล์ (Mesophiles) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคืออุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกายคือ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้แต่ไม่สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูง และพบมากในน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วไม่ได้มาตรฐานที่กำหนดไว้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Microbacterium* spp., *Psedomonas* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., ซึ่งเป็นพวก Aerobic mesophilic microorganism นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียบางกลุ่มได้แก่ *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. และแบคทีเรียพวกแลคติคแอซิดอื่น ๆ รวมทั้งเชื้อโรคบางชนิด

(3) แบคทีเรียเทอร์โมดิวริค (Thermodurics) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีชีวิตรอดอยู่ได้ที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ คือที่ระดับอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และสามารถคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที หรือที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 16 วินาที แต่จะไม่เจริญที่อุณหภูมิดังกล่าว แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Anthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., และ *Streptococcus* spp.,

(4) แบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ (Thermophiles) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถเจริญได้ที่ 37 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Bacillus* spp. ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ และทนต่อความร้อน สำหรับกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ และตรวจพบคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus thermophilus, *L. bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* โดยทั่วไปในน้ำนมดิบมีแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่น้อย แต่ก็ยังเพียงพอที่จะทำให้เกิดปัญหากับน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ได้

4. ปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ปัญหาที่พบมากคือการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งมีผลต่อการเกิดโรคและการเน่าเสียของนม และทั้งหมดนี้คือปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโต (Edgar, 1998) จำแนกปัจจัยมีผลดังนี้

4.1 โภชนะ แบคทีเรียต้องการโภชนะเฉพาะอย่างสำหรับการเจริญเติบโตซึ่งจะแตกต่างไปตามชนิดของแบคทีเรียแต่แบคทีเรียทุกชนิดต้องการแหล่งของพลังงาน โดยทั่วไปคือน้ำตาลกลูโคสและสารประกอบพวกไนโตรเจน ปกติแบคทีเรียจะใช้อินทรียวัตถุเป็นอาหาร โดยสารประกอบนี้ต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ต้องสามารถละลายในน้ำได้และมีขนาดของโมเลกุลที่เล็กพอที่จะแตกตัวลงเป็นส่วนเล็ก ๆ ได้ง่าย เพื่อที่จะผ่านเข้าไปในเยื่อไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังต้องมีเกลือและน้ำที่มากพออีกด้วย ในกรณีที่อินทรียวัตถุยังมีการแตกตัวเป็นชิ้นเล็กไม่พอที่จะใช้ประโยชน์ แบคทีเรียจะผลิตเอ็นไซม์มาย่อยสลายอินทรียวัตถุเหล่านี้ โดยจะใช้พลังงานที่ได้เพื่อสร้างสารประกอบภายในเซลล์ที่จะใช้ในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ต่อไป

4.2 อุณหภูมิ แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับอุณหภูมิค่อนข้างจำกัดซึ่งการเจริญแบคทีเรียของแต่ละชนิดชอบอุณหภูมิไม่เท่ากัน โดยหลักการอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียจะเติบโตได้ในระหว่างอุณหภูมิเหนือจุดเยือกแข็ง จนถึงอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนในไซโตพลาสซึมตกตะกอน อุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนตกตะกอนอาจเรียกว่าเป็นอุณหภูมิสูงสุดและจุดเยือกแข็งอาจจะเป็นอุณหภูมิต่ำสุด ถ้าอุณหภูมิลดลงจนต่ำกว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่แบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้จะทำให้แบคทีเรียชะงักการเจริญเติบโต แต่แบคทีเรียจะยังไม่ตาย แบคทีเรียสามารถทนอากาศเย็นได้ถึง -250 องศาเซลเซียส เป็นเวลาถึง 10 ชั่วโมง แต่จะทนไม่ได้ถ้ามีการแช่แข็งแล้วปล่อยให้ละลายแล้วมีการทำการแช่ซ้ำ เมื่ออุณหภูมิใกล้จุดเยือกแข็งกิจกรรมภายในแบคทีเรียจะหยุดเกือบทั้งหมด เพราะส่วนประกอบภายในของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ เมื่อมีสถานการณ์เช่นนี้เกิดขึ้น แบคทีเรียจะไม่สามารถดูดซึมอาหารได้จึงเพียงแต่ทรงชีพอยู่ แต่ถ้ามีการเพิ่มอุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียสามารถทนได้ แบคทีเรียจะตายเพราะความร้อนจะทำให้โปรตีนตกตะกอนทำหน้าที่ต่อไปไม่ได้ดังนั้นถ้าให้ความร้อนที่ 71 องศาเซลเซียส เพียงไม่กี่วินาทีแบคทีเรียจะถูกทำลาย ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีโดยไม่ต้องมีการสร้างสปอร์

4.3 ความชื้น แบคทีเรียจะไม่เจริญเติบโตถ้าไม่มีความชื้น แบคทีเรียบางชนิดจะตายทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ขาดความชื้น แต่บางชนิดก็ทนได้เป็นเดือน ถ้าเป็นสปอร์แล้วจะทนทานต่อการขาดความชื้นได้เป็นปี

4.4 ออกซิเจน แบคทีเรียต้องการออกซิเจน ในกระบวนการเมตาโบลิซึม เหมือน ๆ กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตเรียกว่าแอโรบิค แบคทีเรีย (Aerobic Bacteria) แต่มีแบคทีเรียบางพวกจะตายถ้ามีออกซิเจน พวกนี้เรียกว่าแอนแอโรบิค แบคทีเรีย (Anaerobic Bacteria) แบคทีเรียพวกนี้ถ้าได้รับออกซิเจนเพียงระยะชั่วระยะเวลาสั้นก็จะทำให้ตายได้ แต่กิจกรรมภายในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ก็ยังต้องการออกซิเจน โดยจะดึงเอาออกซิเจนจากส่วนประกอบทางเคมีของอาหารที่ได้รับเข้าไป แต่ก็มีแบคทีเรียที่แตกต่างไปจากทั้ง 2 พวกคือ สามารถอยู่ได้ไม่ว่าจะมีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจนก็ตาม แบคทีเรียพวกนี้เรียกว่า แฟคคัลแตตีฟแอนแอโรบิคแบคทีเรีย (Facultative Anaerobic Becteria)

4.5 ความเข้มข้นของกรดและเกลือของสารละลายที่จะใช้เป็นอาหารมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สำหรับความเป็นกรดส่วนใหญ่จะดูได้จากค่า pH ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะทนต่อความเป็นกรดได้ไม่เท่ากัน โดยทั่วไปจะเจริญเติบโตได้ดีที่ pH เท่ากับ 7 นอกจากนี้ความเข้มข้นของเกลือในสารละลายอาหารก็มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียคือ ถ้ามีเกลือมากเกินก็จะทำให้แบคทีเรียไม่เจริญเติบโต

5. ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน ซึ่งลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแสดงได้ดังภาพที่ 1 โดยมี 4 ระยะ คือ

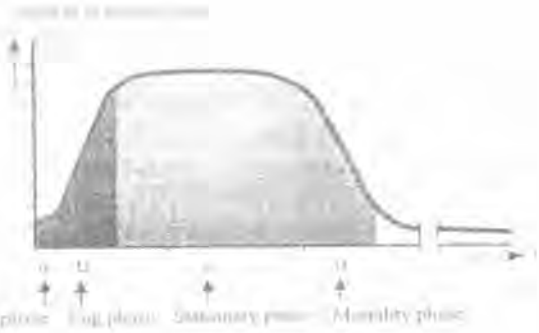
3.1 ระยะพักฟื้น (Lag Phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียเริ่มขยายตัวเพิ่มจำนวนเนื่องจากเมื่อเริ่มต้นเขี่ยเชื้อใส่เข้าไปในอาหารที่จะเลี้ยง แบคทีเรียจะปรับตัวอยู่ระยะหนึ่ง ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อที่จะนำมาเขี่ยมักถูกเก็บอยู่ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ จึงต้องใช้ระยะนี้เป็นระยะพักฟื้น

5.2 ระยะเจริญ (Log Phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียจะขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจำนวนที่เพิ่มไม่สามารถจะใช้การนับจำนวนจาก 1 เป็น 2 ตามธรรมดา แต่เป็นการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะต้องใช้การนับเป็นแบบลอก (Log)

5.3 ระยะอยู่ตัว (Stationary Phase) หลังจากการเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วแล้ว และในไม่ช้าอาหารที่มีอยู่ก็จะหมด ของเสียที่ขับมาก็จะมากขึ้น อัตราการเพิ่มก็จะลดลงแบคทีเรียก็จะเริ่มตายลงทีละน้อยจนถึงขั้นที่การเพิ่มจำนวนพอกับการตาย จึงเรียกว่าระยะอยู่ตัว

5.4 ระยะเสื่อม (Mortality Phase) เป็นระยะที่มีการหยุดการสร้างเซลล์เพิ่มเติมและเซลล์ที่มีอยู่ก็เริ่มตายลง จนในที่สุดทุกเซลล์ก็จะตายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
ที่มา : Gosta (1989)

6. คุณสมบัติต่าง ๆ ในน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างในการเจริญเติบโต การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทำให้สภาพแวดล้อมของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากการใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการเจริญเติบโต และสามารถวัดผลที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากการเจริญเติบโตได้ (สมยศ, 2541)

6.1 ผลจากการใช้โภชนะเฉพาะอย่างสำหรับการเจริญเติบโต เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจะผลิตกลิ่นเฉพาะออกมา เช่น กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นคาวปลา และกลิ่นข้าวมอลท์ เป็นต้น แบคทีเรียบางชนิดทำให้โปรตีนแข็งตัว ซึ่งเป็นผลมาจากกรดหรือน้ำย่อยโภชนะเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แบคทีเรียบางชนิดทำให้เกิดสีในน้ำนม เช่น การเกิดสีน้ำเงินจากเชื้อ *Bacillus cyanogenes* นอกจากนี้การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยังทำให้เกิดรสขมขึ้นได้เนื่องจากการที่น้ำย่อยไลเปส (Lipase) ไปแยกไขมันออกเป็นกลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (Fatty Acid) ในการตรวจวัดแบคทีเรียเบื้องต้นอาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีกลิ่นและรสในน้ำนม แต่การจะเกิดกลิ่น สี และรสนั้น จะต้องมีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก พบว่าในการเกิดกลิ่นขึ้นนั้นจะต้องมีเชื้อแบคทีเรียอยู่ถึง 5 ล้านโคโลนีต่อมิลลิลิตร หรืออาจเพิ่มขึ้นเป็นร้อยเท่าในน้ำนมที่เสียแล้ว

6.2 ผลจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ ที่ค่อนข้างจะจำกัดแบคทีเรียแต่ละชนิดจะชอบอุณหภูมิไม่เท่ากัน การเพิ่มอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยอาจทำให้กลายเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่วนใหญ่ในน้ำนมได้ ทำให้มีการกำหนดว่าน้ำนมที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส เป็นน้ำนมที่ไม่ดีเพราะอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูง ดังนั้นการตรวจสอบอาจทำได้โดยการวัดอุณหภูมิโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3 ผลจากการเปลี่ยนแปลงออกซิเจน แบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถวัดได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียได้ คือถ้ามีแบคทีเรียจำนวนมากจะมีอัตราการใช้ออกซิเจนที่เร็วกว่าการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียที่น้อยกว่า

6.4 ผลจากความเข้มข้นของกรดและเกลือที่ใช้เป็นอาหาร แบคทีเรียแต่ละชนิดจะทนต่อความเป็นกรดได้ไม่เท่ากัน โดยทั่วไปแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีที่ pH เท่ากับ 7 หากมีเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรดเพิ่มขึ้นก็สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลง pH ที่เกิดขึ้นจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธี Clot On Boiling Test (C.O.B.) ในการตรวจวัดได้ เนื่องจากน้ำนมจะแข็งตัวในน้ำร้อนเพราะกรดมีผลกระทบต่อ Heat Stability ของน้ำนมและยังใช้วิธีไตเตรต (Titration) ในการตรวจสภาพความเป็นกรดได้ด้วยโดยให้ด่างทำปฏิกิริยากับกรดที่เกิดในน้ำนม

6.5 ผลจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เกิดจากกลุ่มของแบคทีเรียชนิดต่างๆ สามารถแบ่งเป็นกลุ่ม ๆ จากสิ่งที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (นิธิยา, 2527) ดังนี้

(1) กลุ่มที่สร้างกรด (Acid Producers) เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรสเปรี้ยว และความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตสที่มีอยู่ในน้ำนม โดยผลิตกรดแลคติคทำให้น้ำนมมีเกิดการตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งถือได้ว่าน้ำนมนั้นเสียไม่ควรที่จะนำมาใช้บริโภคต่อไปแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Sterptococcus lactis, S.cremoris , Lactobacillus plantarum, L.casei, L. acidophilus, L. bulgaricus* spp. และ Coliform Bacteria

(2) กลุ่มที่สร้างก๊าซ (Gas Producer) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้างก๊าซขึ้นหลังจากใช้น้ำตาลแลคโตสแล้ว ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถูกสร้างจากแบคทีเรียในกลุ่ม Coliform Bacteria และ *Clostriadium butyricum* ส่วนพวกแลคติคแอซิดแบคทีเรียชนิด Heterofermentative จะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น ก๊าซที่ถูกผลิตขึ้นจะทำให้น้ำนมเป็นฟองและดันตะกอนในน้ำนมแตกกระจาย

(3) กลุ่มที่สร้างเมือก (Ropiness) เกิดจากการสร้างแคปซูลของแบคทีเรียในขณะเจริญ ซึ่งเป็นสารพวกมิวซินและกาแลกแทน ทำให้น้ำนมมีความหนืดสูงเมือกหรือยาเหนียว ๆ เป็นเส้นสายยาว ๆ การเกิดเมือกได้ทั้งบริเวณผิวหน้าและเกิดได้ทั่วทั้งหมด ได้แก่ *Alcaligenes* spp. , *Aerobacter aerogenes*, *E. coli*, *Entervacter* spp. , *S. lactis* เป็นต้น

(4) กลุ่มย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic) จะสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมและทำให้เกิดเคซีนตกตะกอน เมื่อ *Micrococcus* spp. และ *Streptocoocu faecalis* เจริญขึ้นจะย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากขุ่นเป็นใส ซึ่งเกิดเมือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำนมยังสามารถเสื่อมเสียได้จาก *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Flavobacterium* spp., *Pseudominas* spp., *Protus* spp. ในสภาวะที่เป็นด่าง

(5) กลุ่มที่ย่อยสลายไขมัน (Lytolytic) จะสร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสลายไขในให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนขึ้นจากกรดบิวทิริก และกรดคาโปรอิก ได้แก่ *Pseudomonas* spp. และ *Archromobacter* spp. รวมทั้งยีสต์และราบางชนิด

(6) แบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมมีกลิ่น รส และสีผิดปกติ (Flavor Color Change) เมื่อแบคทีเรียในน้ำนมเจริญเติบโตจะผลิตสารเมตาบอไลท์ขึ้น สารเหล่านี้มีผลทำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติต่าง ๆ เช่น การเกิดกลิ่นคาวปลา การเกิดสีน้ำเงินในน้ำนม ซึ่งแบคทีเรียที่พบจะอยู่ในกลุ่มของ *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Serraria* spp.

7. องค์ประกอบทางเคมี

แบคทีเรียแต่ละชนิดประกอบด้วยเซลล์ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต โดยมีโปรโตพลาสซึมอยู่ภายใน ล้อมรอบด้วยเซลเมมเบรน และยังมีผนังเซลห่อหุ้มอีกชั้นหนึ่ง ทำให้เซลล์มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น และคงรูปร่างได้ดี

โปรโตพลาสซึมเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีความหนืดคล้ายไข่ขาว จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีพบว่า ประกอบด้วยน้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ นอกจากนี้ยังมีสารที่สามารถแตกตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป

ธาตุต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน โดยจะพบเป็นส่วนประกอบของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังพบวิตามินต่างๆ อีกหลายชนิด เช่น วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง วิตามินบีหก กรดโฟลิคไบโอติน กรดแพนโทธีนิค และกรดนิโคตินิค เป็นต้น (บัญญัติ, 2526) สารประกอบทางเคมีที่พบในแบคทีเรียได้แก่

(1) โปรตีน โปรตีนที่พบในเซลแบคทีเรียมี ประมาณ 40-70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำนักแห้ง โดยจะพบอยู่ใน ส่วนของไรโบโซม เอนไซม์ เซลเมมเบรน และที่ผนังเซลล์ โดยยึดเกาะกับกรด Muramic โปรตีนในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไปทั้งชนิด และปริมาณ

(2) ไขมัน ไขมันที่พบในแบคทีเรียมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ และ ฟอสโฟลิปิด 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไขมันส่วนใหญ่จะอยู่เป็นส่วนประกอบที่ผนังเซลล์

(3) โพลีแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ที่พบในเซลแบคทีเรีย โดยทั่วไปมีประมาณ 5-30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จะพบเป็นส่วนสำคัญของผนังเซล และแคปซูล

(4) กรดนิวคลีอิค กรดนิวคลีอิคที่พบในแบคทีเรียมีประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบด้วย DNA ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ และ RNA มีไม่แน่นอน เปลี่ยนแปลงได้ตามระยะการเจริญของเซล

(5) รงควัตถุ ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น Photosynthetic Bacteria ซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงได้นั้น จะพบว่ามีรงควัตถุ อยู่หลายชนิดที่สำคัญ คือ Bacteriochlorophyll และ Carotenoid เป็นต้น ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้จะไม่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ แต่จะทำให้เกิดสีกับเซลแบคทีเรีย

8. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ

Cousin (1982) ได้ศึกษาพบว่าการเสื่อมเสียของน้ำนมที่อุณหภูมิต่ำ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำนม แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเกิดการเสื่อมเสีย เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ คือ กลุ่ม Psychrotroph ที่สำคัญได้แก่ *Pseudomonas* เพราะสามารถสร้างเอ็นไซม์ออกมาสลายโปรตีน และไขมันในนมได้ดี ทำให้นมมีกลิ่นหืน และรสขมตาม จุลินทรีย์ ในกลุ่มนี้ไม่ทนต่อการพาสเจอร์ไรส์ จุลินทรีย์ที่ทนต่อการพาสเจอร์ไรส์ และสามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิต่ำ เรียกว่า Thermoduric Psychrotroph ที่สำคัญคือ *Bacillus* เนื่องจากสามารถสร้าง สปอร์ซึ่งไม่สามารถถูกทำลายโดยอุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ และทำให้นมที่ผ่านพาสเจอร์ไรส์แล้ว เมื่อเก็บรักษาไว้ระยะเวลานาน มีรสขม กลิ่นหืนเกิดกรด และแก๊สได้

การศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบจากถังรวมของฟาร์มโคนมจำนวน 10 ฟาร์มในเขตพัฒนานิคม โดยวิธีการนับจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวน Coloform Bacteria ซ้ำ 2 ครั้ง ห่างกัน 1 เดือน พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของฟาร์มที่ผลิตน้ำนมมีจำนวน Coloform Bacteria ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อลิตร และ 50เปอร์เซ็นต์ ของฟาร์มที่ผลิตน้ำนมมีจำนวน Coloform Bacteria ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อลิตร และ 50 เปอร์เซ็นต์ของฟาร์มที่ผลิตน้ำนมที่มีสุขาภิบาลดี มีจุลินทรีย์รวม ไม่เกิน 2.5×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ Coloform Bacteria ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อลิตร (เบญจวรรณ และ ศุภชัย, 2537)

Rugelj (1987) ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำนมดิบในประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีจุลินทรีย์รวมทั้งหมดเฉลี่ย 5.6×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร องค์ประกอบของจุลินทรีย์จากค่าเฉลี่ยเป็นเปอร์เซ็นต์ ของจุลินทรีย์รวมมีดังต่อไปนี้ Coliform Bacteria 23.76 เปอร์เซ็นต์ Thermoduric Bacteria 5.56เปอร์เซ็นต์ Psychrotrophs 26.51เปอร์เซ็นต์ Lipolytic Bacteria 12.05 เปอร์เซ็นต์ และ Proteolytic Bacteria 5.54 เปอร์เซ็นต์ และ Correlation ระหว่างจุลินทรีย์รวมกับ Coliform เท่ากับ 0.74 ในขณะที่ Kikuchi et al. (1996) รายงานว่า จุลินทรีย์ในนมดิบ และนมพาสเจอร์ไรส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในประเทศญี่ปุ่น มี SPC ในช่วง $1.04x10^5$ - $1.05x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร Gram-negative Bacteria ระหว่าง $5x10^2$ - $2.5x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร Lactic Acid Bacteria ระหว่าง $1.02x10^6$ - $1.08 x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร Thermoduric Bacteria อยู่ประมาณ 102 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

Bylund (1995) กล่าวว่าน้ำนมที่มีคุณภาพดีไม่ควรมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หรือมีในปริมาณที่น้อย แต่จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดลกติกจากน้ำนมดิบแหล่งต่าง ๆ มีจำนวนและชนิดแตกต่างกันซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสุขาภิบาลฟาร์ม การรีดนม และอุณหภูมิที่ใช้เก็บน้ำนมดิบในระดับฟาร์ม (Bramely et al., 1990) ซึ่งผลของอุณหภูมิที่ใช้เก็บน้ำนมดิบรวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อเห็นได้จากการเก็บน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกโดยใช้อาหารแข็ง MRS ได้ 3.2×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Vaughan et al., 1994) ขณะที่การเก็บน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกโดยใช้อาหารแข็ง BCP ได้ถึง 10^8 -10^9 โคโลนีต่อมิลลิกรัม (Isono et al., 1994)

มีการศึกษาการแยกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มแลกติก จากนมม้าตัวเมีย ในประเทศ Mongolia โดยการศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA พบแบคทีเรียในกลุ่ม Coccus ได้แก่ *Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides* , *Leuc. pseudomesenteroides* , *Lactococcus (Lc.) garvieae* , *Lc. lactis* spp. *Streptococcus (Sc.) parauberis* และ *Enterococcus (Ec.) faecium* ซึ่งอัตราที่พบคือ 45, 19, 7, 8, 16, และ 6% ตามลำดับ (Adachi and Ogawa, 2004)

Robin (2003) ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียก่อนและหลังการพาสเจอไรด์พบแบคทีเรียสายพันธุ์หลักเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus* ssp. โดยการศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA

Akineden et al. (2001) ศึกษาถึงการจำแนกสายพันธุ์ ของ *Staphylococcus* sp. จากนมที่เก็บตัวอย่างจากวัว 60 ตัว ในฟาร์มทั้งหมด 8 ฟาร์ม และสถานที่ตั้งแตกต่างกัน ในประเทศเยอรมัน นำมาเปรียบเทียบลักษณะทาง Phenotype และ Genotype แล้วศึกษาความหลากหลายของสารพิษ ใช้เทคนิค PCR ในการศึกษาถึงลักษณะเฉพาะของ Species โดยใช้ 23s rRNA และยีนที่สร้างสารพิษ Staphylococcal Enterotoxin (SE) ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ

Scherrer et al. (2004) ทำการจำแนก *Staphylococcus* sp. ได้ 293 สายพันธุ์จากตัวอย่างนมแพะ และนมแกะ 127 ตัวอย่างจากประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ศึกษาถึงลักษณะ Phenotype และGenotype แล้วจำแนกด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR แตกต่างกัน 5 แบบ คือ 500, 580, 660, 740 และ 820 คู่เบส ซึ่งมี Staphylococcal Enterotoxin (SE) แตกต่างกันไป การสร้างสารพิษนี้ มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. หน่วยย่อยและโครงสร้างของ DNA

DNA (Deoxyribonucleic Acid) ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ แต่ละโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยสารประกอบไนโตรจีนัส เบส (Nitrogmous Base) น้ำตาล ดีออกซีไรโบส (Deoxy-ribose Sugar) และหมู่ฟอสเฟส

ส่วนสำคัญที่ประกอบเป็นรหัสพันธุกรรมก็คือไนโตรจีนัส เบส ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

(1) พิวรีน (Purine) ได้แก่ อะดินิน (Adenine-A) และกวานิน (Guanine-G)

(2) ไพริมิดีน (Pyrimidine) ได้แก่ ไซโตซิน (Cytosine-C) และ ไทมีน (Thymine-T)

เบสนี้จะต่อกับน้ำตาลดีออกซีไรโบส และมีหมู่ฟอสเฟสเป็นตัวเชื่อมระหว่างตำแหน่ง 5' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่ง กับตำแหน่ง 3' ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่งด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ดังนั้นเมื่อต่อกันเป็นสายยาว สายนิวคลีโอไทด์นำจะมีปลาย 2 ด้านคือ ด้าน 3' แกละ 5'

สายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายเรียงตังขนานกลับทิศทางกัน และพันกันเป็นเกลียวคู่เกิดเป็นโครงสร้างของ DNA โดยมีน้ำตาลและเบสอยู่รอบนอกโมเลกุล ส่วนไนโตรจีนัสเบสอยู่ด้านใน การจับกันของโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายนี้ เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสของแต่ละสาย โดย A จับกับ T ด้วยพันธะไฮโตรเจน 2 พันธะ และ C จับกับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ สายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายนี้ จึงต้องมีลำดับเบสคล้องจองกัน

10. เทคนิคการศึกษาดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คตรโฟเรซิส

หลักการของเทคนิคนี้เป็นเช่นเดียวกับโปรตีนอิเล็คโตรโฟเรซิส ในการแยกโปรตีนนั้น โมเลกุลต่าง ๆ จะเคลื่อนที่ไปบนแผ่นเจลตามประจุสุทธิ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุล แต่โมเลกุลของดีเอ็นเอนั้นมีประจุเป็นลบทั้งหมด จึงแยกจากกันตามขนาดเท่านั้น โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่เร็วกว่า

ในรายละเอียดนั้นมีข้อแตกต่างกันเล็กน้อยคือ ในส่วนของเจล การแยกโปรตีน (ไอโซไซม์) ใช้สตาร์ชเจลเป็นส่วนใหญ่ ส่วนดีเอ็นเอจะแยกบนอะกาโรส (Agarose) หรือโพลีอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide Gel) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลที่จะแยก

ในการตรวจสอบผลไอโซไซม์และโปรตีนย้อมได้ด้วยปฏิกิริยาจำเพาะและสีหลายชนิดส่วนดีเอ็นเอย้อมด้วยเอธิเดียมโปรไมด์ (Ethidium Bromide) ซึ่งจะมีสีส้มเมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต หรือซิลเวอร์ออกไซด์ (Silver Oxide) ซึ่งทำให้เกิดสีดำในแสงธรรมชาติ

การย้อมดีเอ็นเอด้วยสีจะไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนตำแหน่งที่ใกล้ ๆ กันได้ ดังนั้นถ้ามีท่อนส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการแยกจำนวนมาก เมื่อย้อมแล้วก็จะเห็นเป็นปื้น ทั้งยังไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทราบว่าดีเอ็นเอที่สนใจนั้นปรากฏอยู่บริเวณใด การย้อมสีจะใช้ได้เมื่อท่อนส่วนของดีเอ็นเอที่นำมาแยกมีจำนวนน้อย

11. เอนไซม์โพลีเมอเรส (Polymerase)

เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยนำเอานิวคลีโอไทด์มาต่อเข้าที่ปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอที่มีอยู่ ทั้งนี้สายดีเอ็นเอนั้นจะต้องจับอยู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ จากคุณสมบัติของเอ็นไซม์นี้ได้พัฒนาเป็นเทคนิคต่าง ๆ ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ เช่น เทคนิค PCR เทคนิคการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ

12. เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นสั้น ๆ ได้โดยชิ้นดีเอ็นเอนั้นไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์ และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสทั้งหมด วิธีการทำโดยในขั้นแรกจำเป็นต้องทราบลำดับเบสช่วงสั้น ๆ ของปลายด้าน 3' ของสายดีเอ็นเอ เป้าหมายจากนั้นก็สังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสคล้องจองกับปลายด้าน 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งเรียกว่าไพรเมอร์ โดยทั่วไปไพรเมอร์จะมีความยาวประมาณ 20 – 30 คู่เบส (Newton and Graham, 1994) เพิ่มอุณหภูมิจนดีเอ็นเอเส้นคู่แยกออกจาก จากนั้นลดอุณหภูมิ ไพรเมอร์นี้จะจับกับปลายด้าน 3' ของดีเอต้นแบบ ดังนั้นไพรเมอร์ที่จำเป็นจึงต้องมี 2 ตัว เพื่อจับกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอทั้งสองสาย เมื่อเติมนิวคลีโอไทด์ทุกชนิดลงในปฏิกิริยา เอนไซม์โพลีเมอเรสก็จะทำงาน ดีเอ็นเอสายใหม่ก็จะถูกสร้างขึ้นจากดีเอ็นเอสายคู่ 1 ชิ้น เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอสายาคู่ 2 ชิ้น เมื่อเริ่มกระบวนการในรอบที่ 2 โดยเพิ่มอุณหภูมิ ดีเอ็นเอสายคู่ก็จะแยกออกจากกันได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว 4 สาย ไพรเมอร์ก็จะเข้าจับ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาก็จะได้ดีเอ็นเอสายคู่ 4 สาย เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เป็นเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ ดังนั้นดำเนินปฏิกิริยา 30 รอบก็จะได้สาย ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขึ้นนับล้านเท่า ปฏิกิริยาเหล่านี้ใช้เวลาไม่นาน เทคนิคนี้ช่วยให้สามารถทำการศึกษาต่าง ๆ ได้ แม้ตัวอย่างที่ได้มาจะมีจำนวนน้อยมาก เช่น ดีเอ็นเอจากเกล็ดปลาหรือจากตัวอย่างปลาหายาก ทั้งนี้เพื่อนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ไปศึกษาด้วยเทคนิคอื่น ๆ อาทิ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA (Sequencing) เพื่อหาลำดับเบสที่ถูกต้องในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (อุทัยรัตน์, 2543)

13. เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่

เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่ มีความเชื่อมโยงกับเทคโนโลยีสารสนเทศอยู่มาก การหาและใช้ข้อมูล ที่มีอยู่ในยีน ข้อมูลที่สำคัญ คือ ข้อมูลลำดับอักษรของดีเอ็นเอ อักษรแต่ละตัว คือ สารเคมีที่เรียกว่า เบส ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ A T G C ยีนต่าง ๆ มีการเรียงตัวของเบส 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดนี้แตกต่างกันออกไป เช่น AGTC ATGC AATCCG เป็นต้น เมื่อรู้ลำดับการเรียงตัวของยีน ก็จะสามารถรู้ได้ว่า มันมีหน้าที่อย่างไร ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนอะไรภายในเซลล์ เปรียบเสมือนได้รู้ "แผนงานละเอียด" ของสิ่งมีชีวิตนั้นทีเดียว นักวิทยาศาสตร์จึงต้องการ ที่จะล่วงรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ไม่ว่าจะเป็น ของจุลชีพซึ่งมีอยู่หลายล้านเบสหรือของคน ซึ่งมีอยู่ประมาณ 3,500 ล้านเบส ดีเอ็นเอทั้งสิ้นในสิ่งมีชีวิต หนึ่ง ๆ เรียกว่า จีโนม ของมัน การหาลำดับเบสมากมาย ในจีโนมเช่นนี้ ทำได้โดยตัดแบ่งออกเป็นชิ้น ๆ แล้วไปหาลำดับ ในแต่ละชิ้น จากนั้นเอากลับมาปะติดปะต่อกันใหม่ คล้ายกับเอาหน้าหนังสือที่ฉีกขาดไปแล้วกลับมาต่อใหม่

ทั้งหมดนี้เป็นงานยืดยาวมหาศาล ไม่เพียงต้องใช้การ วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น แต่ต้องใช้เทคโนโลยี - สารสนเทศ (Information Technology - IT) ช่วยในการเก็บและวิเคราะห์ ข้อมูล การวิเคราะห์ทำได้ หลายด้าน เช่น วิเคราะห์ความเหมือนและความต่างระหว่างยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน กับสิ่งมีชีวิต แตกต่างกัน วิเคราะห์โครงสร้างและหน้าที่ของยีน รวมถึง โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นผลผลิต ของยีน การพัฒนาอินเทอร์เน็ตทำให้สามารถเข้าถึง ข้อมูลเหล่านี้ได้ไม่ว่าจะอยู่ที่ใดในโลก มีการพัฒนา Software สำหรับการวิเคราะห์เหล่านี้ รวมถึงช่วยให้เข้าถึงข้อมูลสาธารณะที่มีอยู่แล้วในอินเตอร์เน็ต พัฒนาการเช่นนี้เป็นสิ่งที่ ประเทศกำลังพัฒนาเช่นประเทศไทยควรตระหนักและพยายาม เพิ่มขีดความสามารถของตน ในการเข้าถึงและใช้ข้อมูลเหล่านี้ให้เป็นประโยชน์ พัฒนาการนี้แตกต่าง ไปจาก แนวโน้ม อีกประการหนึ่ง คือ การปกปิดข้อมูลที่มีประโยชน์ในเชิงการค้าซึ่งก็มีมากขึ้นด้วยเช่นกัน

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสในดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ทางชีววิทยา-สมัยใหม่โดยทั่วไป ได้พัฒนามาเป็นวิทยาการแขนงใหม่ที่อาจเรียกว่า ชีวสารสนเทศ Bioinformatics เป็นศาสตร์ที่ผสมระหว่าง ชีววิทยา กับ สารสนเทศศาสตร์ ซึ่งกำลังมาแรง และเป็นที่ต้องการของวงการอุตสาหกรรม และวงการวิชาการเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างยิ่ง ชีวสารสนเทศไม่เพียงมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์มาก ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน และสารชีวภาพอื่น ๆ ซึ่งการศึกษาโมเลกุลเหล่านี้ต้องใช้เทคนิค เช่น การฉายรังสีเอกซ์ เข้าไปในผลึกของมัน แล้วนำภาพที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์ ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีสารสนเทศ ทำให้การวิเคราะห์โครงสร้างเหล่านี้ง่ายดายขึ้น ละเอียดขึ้น และให้ข้อมูลที่นำไปใช้ในการออกแบบยา วัคซีน หรือ ตรวจวินิจฉัยโรคได้ดียิ่งขึ้น (ยงยุทธ, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. นมวัวสด
2. กรดอะซิติก
3. หลอดทดลอง ขนาด 10 ml
4. ปิเปต
5. จานเลี้ยงเชื้อ
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ NB
7. โซเดียมคลอไรด์
8. Loop เขี่ยเชื้อ
9. Water bath
10. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
11. ไลโซไซม์
12. 10 %SDS
13. สารละลายฟีนอลอิ่มตัว
14. หลอด Eppendorf
15. 3 M Sodium acetate
16. 99% Ethanol
17. 70 % Ethanol
18. 10 mg/ml RNase
19. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1)
20. สารละลาย คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอร์ฮอล์ (24:1)
21. บัฟเฟอร์ TE pH 7.5 (Tris-HCL 10mM, EDTA 1 mM)
22. บัฟเฟอร์ TE pH 8.0 (Tris-HCL 50mM, EDTA 5 mM)
23. อะกาโรส
24. Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
25. บัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCL 0.89M, Boric Acid 0.89M, EDTA 0.02M)
26. สีย้อมเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. หาจำนวนโคโลนีที่พบในนมหมักกรด

1.1 นำน้ำนมมาหมักกับกรดแล้วหมักกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และทำการ Serial Dilution เพื่อหาแบคทีเรียที่เกิดขึ้นทุก ๆ วันตั้งแต่ 0, 1, 2, 3 , วัน

1.2 นำน้ำนมหมักกรด 1 ml มาเจือจางในน้ำเกลือปริมาตร 9 ml และทำการเจือจางต่อไปอีก 7 ครั้ง ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 10,10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} และ10^{-7}เท่า

1.3 ปิเปตสารละลายในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 ml ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA และทำการ Spread Plate

1.4 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นในแต่ละชนิด

1.5 นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Pure Culture) โดยวิธีการ Streak Plate

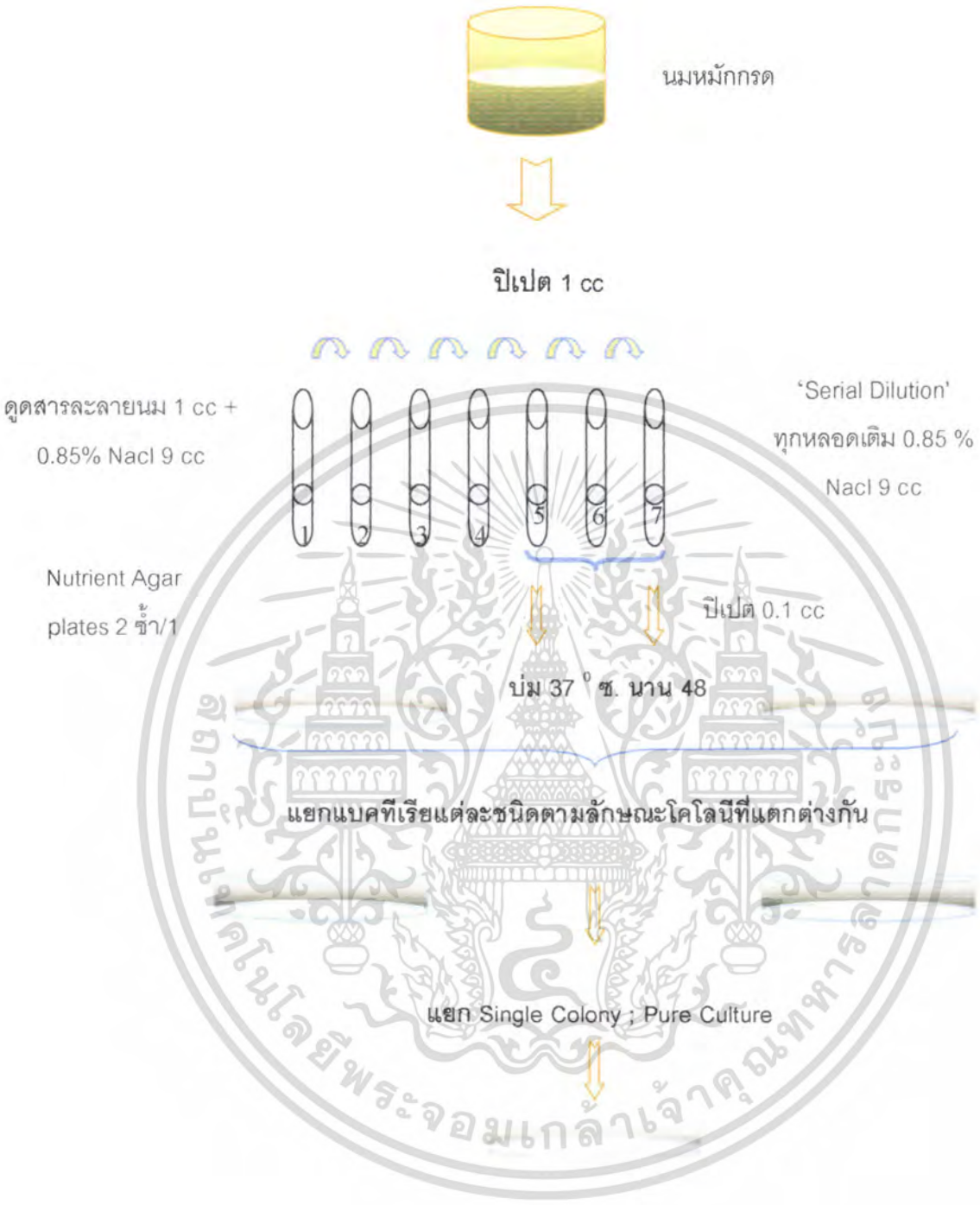
(1) เตรียมอาหาร NA (Nutrient Agar) ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ

(2) ใช้ Loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โคโลนีเดี่ยวแล้วมาเขี่ยบนจานเลี้ยงเชื้อ โดยลากไปมา บนผิวของอาหาร 4-5 เส้น จำนวน 4 แนว ซึ่งเชื้อจะเรียงตัวอยู่ห่าง ๆ กันเป็นโคโลนีเดี่ยว

(3) นำมาบ่มในลักษณะคว่ำจานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมง

1.6 บันทึกรูปร่างและลักษณะของแต่ละโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การย้อม Gram Stain

(1) หยดน้ำกลั่น 1หยดบนสไลด์แก้วที่สะอาด

(2) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างด้วย Loop ที่เผาฆ่าเชื้อมาแล้ว นำมาบนหยดน้ำแล้วกระจายให้ได้ความหนาแน่นที่เท่า ๆ กัน บนผิวสไลด์

(3) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

(4) Fix ตัวอย่างด้วยความร้อน โดยลนตัวอย่างด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ผ่านไปมา 3 ครั้ง

(5) ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปย้อมสี Gram

(6) นำตัวอย่างมาหยดด้วย Crytal Violet ให้ท่วมตัวอย่างและทิ้งไว้นาน 1 นาที

(7) ล้างเบา ๆ ด้วยน้ำประปา จนน้ำที่ไหลผ่านตัวอย่างไม่มีสีปนออกมา

(8) หยดด้วย Iodine ให้ท่วมตัวอย่าง และทิ้งไว้นาน 1 นาที

(9) ล้างด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ หรือ อะซีโทน 3-4วินาที หรือไม่มีสีออกมา

(10) ล้างเบาๆด้วยน้ำประปา

(11) ย้อม Safranin ให้ท่วมตัวอย่างและทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที

(12)ล้างเบา ๆ ด้วยน้ำประปาและซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายเลนส์วัตถุขนาด 100X (ต้องใช้ Oil immersion)

3. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA

3.1 วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย

(1) นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ มา Streak บนอาหารแข็ง NA

(2) นำ Plate ไปบ่มที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

(3) นำ Loop มาเขี่ยเชื้อทั้งหมด และกระจายในบัฟเฟอร์ TE pH8.0 400 ul ที่มีไลโซไซม์ 2mg/ml

(4) บ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที

(5) เติม 10 เปอร์เซ็นต์ SDS ลงไป 20 ul ผสมให้เข้ากัน

(6) เติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัว 420 ul ผสมให้เข้ากันพลิกหลอดกลับไปมา

(7) ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

(8) ดูดส่วนใสด้านในมาใส่ในหลอด Eppendorf ใหม่

(9) สกัดซ้ำตามข้อ 6 – 7 อีก 2 ครั้ง

(10) ดูดส่วนใสมาเติม 3 M Sodium Acetate 40 ulและเติม 99 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 880 ul

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(11) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(12) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

(13) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 500 ul

(14) ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE pH7.5 100 ul

(15) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.2 การตรวจสอบและศึกษาปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอโดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

(1) เปิดเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ อย่างน้อย 10 นาทีก่อนการใช้งาน

(2) นำคิวเวตควอทซ์มาเติมบัฟเฟอร์ TE 2 ml

(3) นำไป Set ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ให้เป็น 0

(4) ปิเปตดีเอ็นเอ 5 ul ลงในคิวเวตที่มีบัฟเฟอร์ TE

(5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm

(6) บันทึกผลการทดลอง

3.3 การเตรียมอะกาโรสเจล

(1) ชั่งอะกาโรสมา 0.8 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

(2) เทบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์

(3) นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ จนอะกาโรสละลายหมด

(4) ทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของสารละลายอะกาโรสเย็นลง ประมาณ 50 องศาเซลเซียส

(5) ปิเปตสารละลายสีย้อมเจลลงไป 5 ไมโครลิตร

(6) เทใส่ลงในแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้ (ใส่หวีไว้แล้ว)

(7) ทิ้งไว้อย่างน้อย 20 - 30 นาทีเพื่อให้อะกาโรสแข็งตัว

3.4 การศึกษาดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส

(1) นำอะกาโรสเจลมาวางบนอ่าง (Chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ TBE

(2) ต่อ Chamber เข้ากับ Power Supply

(3) หยอดจีโนมิกดีเอ็นเอ 5ไมโครลิตร ที่มี Tracking Dye 2 ไมโครลิตรในแต่ละเลน

(4) ให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

(5) นำเจลขึ้นมาส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณ DNA (รุ่น HBTDCM 055 220, USA ยี่ห้อ Touch Down Hybaid)

3.5.1 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา

(1) 10X PCR Buffer 5 ul

(2) $Mgcl_2$ 3 ul

(3) dNTP 1 ul

(4) Primer1 2.5 ul

(5) Primer2 2.5 ul

(6) Genomic DNA 2 ul

(7) Tag DNA Polymerase 0.5 ul

(8) H_2O 33.5 ul

3.5.2 ปฏิกิริยาการเพิ่มขยาย (Amplification) เกิดขึ้นโดยกระบวนการ 3 ขั้นตอนซึ่งควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามกำหนดโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติดังนี้

(1) Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

(2) Denaturration 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Primer annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Primer extention 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1นาที

(3) Final extention 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที

3.5.3 นำผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิคดีเอ็นเอ มาตกตะกอนเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ

3.5.4 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอน นำไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ 16s rDNA Sequence

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวน ลักษณะของโคโลนี และชนิดของแกรมของแบคทีเรียที่พบในนมหมักกรด
- บันทึกผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย
- บันทึกผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA
- บันทึกผลลำดับเบสในดีเอ็นเอจากโครมาโตแกรมของดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

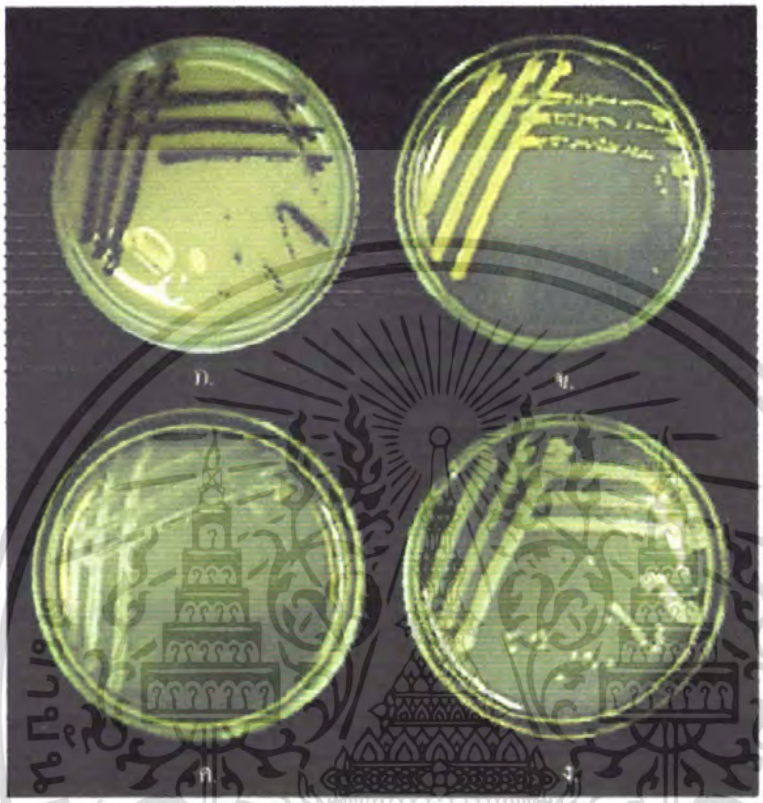
วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน (www.nlm.nih.gov)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ธนบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่พบในน้ำนมดิบหมักกรด



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 24 ชั่วโมง

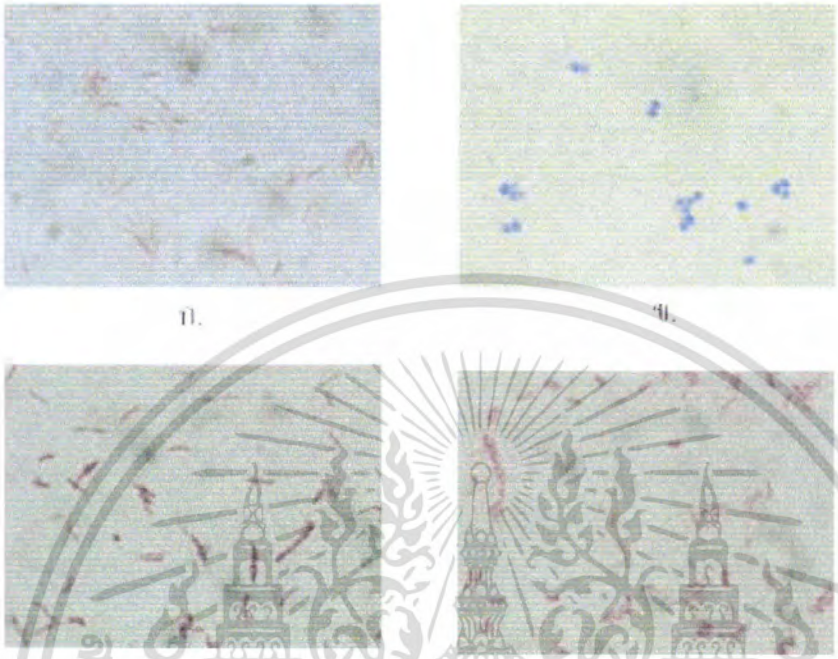
ก. แบคทีเรียชนิดที่ 1 ข. แบคทีเรียชนิดที่ 2

ค. แบคทีเรียชนิดที่ 3 ง. แบคทีเรียชนิดที่ 4

เมื่อทำการ Spread Plate เพื่อหาโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน หลังจากนั้นแยก Single Colony และ Pure Culture ด้วยวิธี Streak Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำมาบ่มในลักษณะคว่ำจานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมง พบแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ดังภาพที่ 3 โดยแบคทีเรียชนิดที่ 1 (ภาพที่ 3 ก) โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีม่วงเข้ม แบคทีเรียชนิดที่ 2 (ภาพที่ 3 ข) โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาวแกมเหลือง แบคทีเรียชนิดที่ 3 (ภาพที่ 3 ค) โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก และแบคทีเรียชนิดที่ 4 (ภาพที่ 3 ง) โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น โคโลนีมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับโคโลนีของแบคทีเรียชนิดที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ลักษณะการติดสีแกรมของแบคทีเรียแต่ละชนิด



ก. ข.

ค. ง.

ภาพที่ 4 การย้อมแกรมแบคทีเรีย

ก. แบคทีเรียชนิดที่ 1 ข. แบคทีเรียชนิดที่ 2

ค. แบคทีเรียชนิดที่ 3 ง. แบคทีเรียชนิดที่ 4

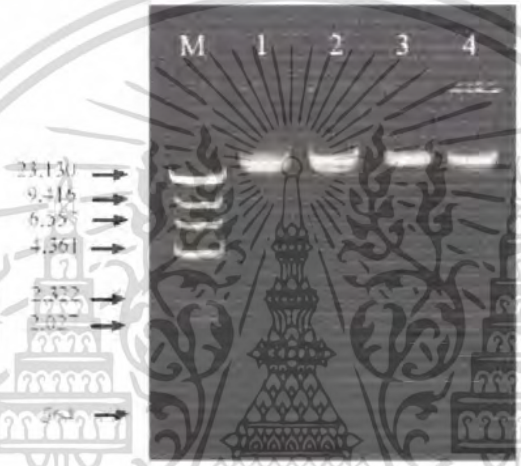
นำ Single Colony ของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมาย้อมสีด้วยวิธี Gram Stain พบว่า แบคทีเรียชนิดที่ 1 (ภาพที่ 4 ก) แสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นท่อนยาว ๆ ติดสีแดงเกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า Gram Negative แบคทีเรียชนิดที่ 2 (ภาพที่ 4 ข) แสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะกลม ติดสีน้ำเงิน เกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า Gram Positive แบคทีเรียชนิดที่ 3 (ภาพที่ 4 ค) แสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นท่อนยาว ๆ ติดสีแดงกระจัดกระจายทั่วไป เรียกว่า Gram Negative และ แบคทีเรียชนิดที่ 4 (ภาพที่ 4 ง) แสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ๆ ติดสีแดง เกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า Gram Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

3.1 ผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 1, 2, 3 และ 4 เพื่อทำการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีแถบเดียวขนาดใหญ่ ไม่พบการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอขนาดเล็ก และแถบจีโนมิกดีเอ็นเออยู่ที่ตำแหน่งที่สูงกว่าชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 23,130 คู่เบส (ภาพที่11) โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 5 ผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดที่ 1

2 จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดที่ 2

3 จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดที่ 3

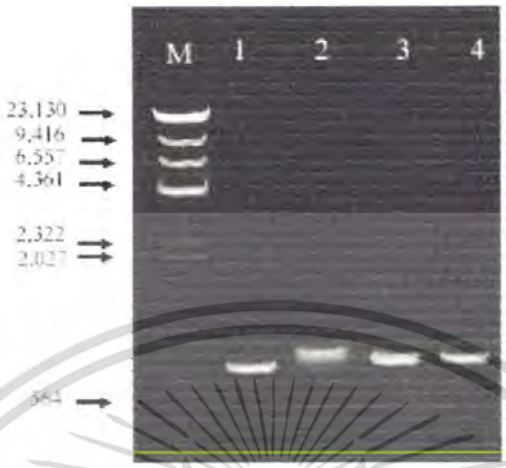
4 จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดที่ 4

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ แบคทีเรียชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA (5'-TCCTACGCGAGGCAGCAGT-3') และไพรเมอร์ Reverse DNA (5'-TTGTGCGGGCCCCCGTCAGT-3') พบว่าผลิตภัณฑ์ ของยีน 16S rDNA ที่ได้จากแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 มีแถบเดียวและอยู่ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 600 คู่เบสและมีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียชนิดที่ 1

2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียชนิดที่ 2

3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียชนิดที่ 3

4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียชนิดที่ 4

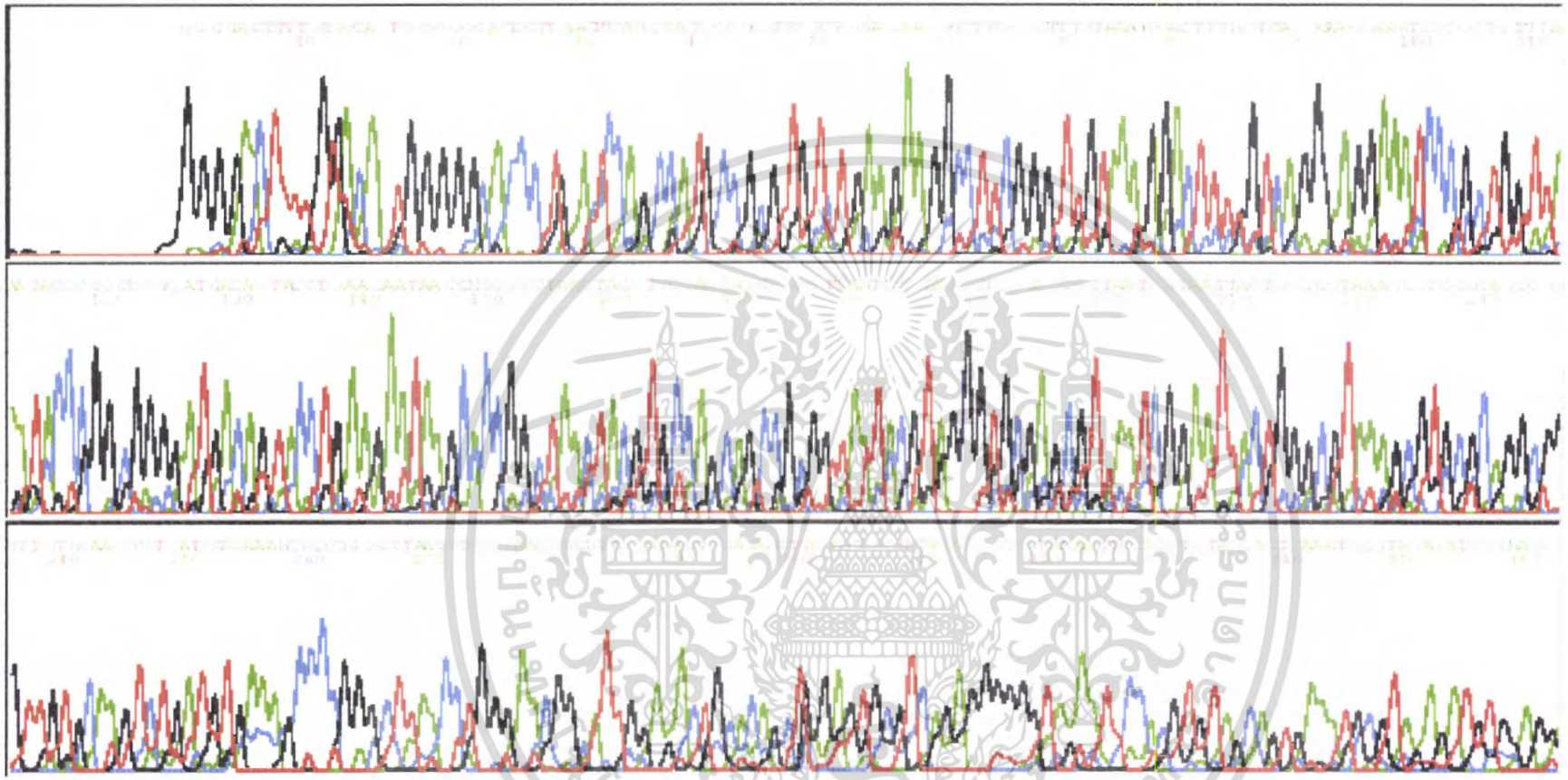
เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ทั้ง 4 ชนิด ที่ได้ไม่มีการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอื่น ๆ จึงมีแถบเดียว เนื่องจากไพรเมอร์ที่นำมาใช้ คือ Forward DNA และไพรเมอร์ Reverse DNA มีความจำเพาะกับยีนบริเวณ 16S rDNA รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีความเหมาะสม จึงทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้คือ 600 คู่เบส โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มาตกตะกอน เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนอื่น ๆ และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA

(1) ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ 16s rDNA จากเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA พบว่าแบคทีเรียชนิดที่ 1 ที่แยกได้จากนมหมักกรด มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA มีจำนวน 598 คู่เบส (ภาพที่ 7 - 8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 1

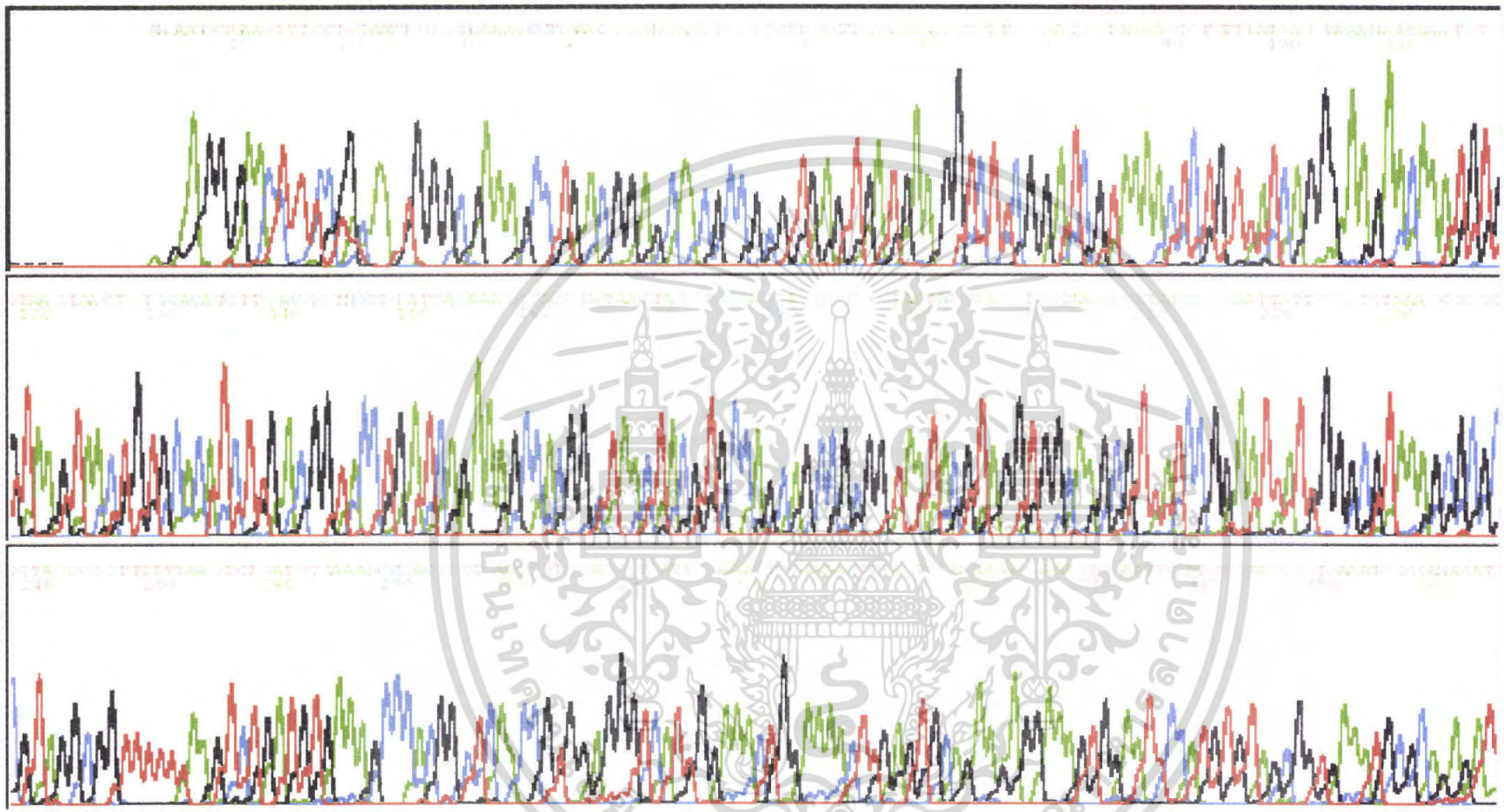
1	TCCTA	CGCGA	GGCAG	CAGTG	GGGAC	TTTTG	GACAA	TGGGG	GCAAC	CCTGA	50
51	TCCAG	CCATG	CCGCG	TGTCT	GAAGA	AGGCC	TTCGG	GTTGT	AAAGG	ACTTT	100
101	TGTCA	GGGAG	GAAAT	CCCGC	TGGTT	AATAC	CGGGC	GGGGA	TGACA	GTACC	150
151	TGAAG	AATAA	GCACC	GGCTA	ACTAC	GTGCC	AGCAG	CCGCG	GTAAT	ACGTA	200
201	GGGTG	CGAGC	GTTAA	TCGGA	ATTAC	TGGGC	GTAAA	GCGTG	CGCAG	GCGGT	250
251	TGTGC	AAGTC	TGATG	TGAAA	GCCCC	GGGCT	TAACC	TGGGA	ACGGC	ATTGG	300
301	AGACT	GCACA	GCTAG	AGTGC	GTCAG	AGGGG	GGTAG	AATTC	CACGT	GTAGC	350
351	AGTGA	ATGC	GTAGA	GATGT	GGAGG	AATAC	CGATG	GCGAA	GGCAG	CCCCC	400
401	TGGGA	TGACA	CTGAC	GCTCA	TGCAC	GAAAG	CGTGG	GGAGC	AAACA	GGATT	450
451	AGATA	CCCTG	GTAGT	CCACG	CCCTA	AACGA	TGTCA	ACTAG	CTGTT	GGGGG	500
501	TTTGA	ATCCT	TGGTA	GCGTA	GCTAA	CGCGT	GAAGT	TGACC	GCCTG	GGGAG	500
551	TACGG	CCGCA	AGGTT	AAAAC	TCAAA	GGAAC	TGACG	GGGGC	CCGCA	CAA	600

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rDNA จำนวน 598 คู่เบส ของแบคทีเรียชนิดที่ 1 มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแบคทีเรียชนิดที่ 1 (ภาพที่ 8) มีความเหมือนกับแบคทีเรียกลุ่ม *Chroromobacterium* sp. ได้แก่ *Chroromobacterium violaceum* เท่ากับ 100 % สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่มีสีม่วง และลักษณะการการติดสีย้อมแกรมแสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นท่อนยาว ๆ ติดสีแดงเกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ซึ่งเป็นแกรมลบ สอดคล้องกับการทดลองของ Almeida et al., (2004) และ Lawrence and Tucker (2001) นอกจากนี้ *Chroromobacterium violaceum* จัดอยู่ในกลุ่ม Purple Bacteria มีการดำรงชีวิตแบบอิสระพบอยู่ในดินและน้ำ นอกจากนี้สามารถแยกได้จากน้ำนมดิบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ และแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่บริเวณเขตร้อน เป็นตัวก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพในการลดพิษของโลหะหนัก (Anon, 2005)

(2) ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ 16S rDNA จากเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA พบว่าแบคทีเรียชนิด ที่แยกได้จากนมหมักกรด มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีจำนวน 599 คู่เบส (ภาพที่ 9 -10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 2

1	TCCTA	CGCGA	GGCAG	CAGTA	GGGAA	TCTTC	CGCAA	TGGGC	GAAAG	CCTGA	50
51	CGGAG	CAACG	CCGCG	TGAGT	GATGA	AGGTC	TTCGG	ATCGT	AAAAC	TCTGT	100
101	TGTTA	GGGAA	GAACA	AATTT	GTTAG	TAACT	GAACA	AGTCT	TGACG	GTACC	150
151	TAACC	AGAAA	GCCAC	GGCTA	ACTAC	GTGCC	AGCAG	CCGCG	GTAAT	ACGTA	200
201	GGTGG	CAAGC	GTTAT	CCGGA	ATTAT	TGGGC	GTAAA	GCGCG	CGTAG	GCGGT	250
251	TTCTT	AAGTC	TGATG	TGAAA	GCCCA	CGGCT	CAACC	GTGGA	GGGTC	ATTGG	300
301	AAACT	GGGAA	ACTTG	AGTGC	AGAAG	AGAGA	GTGGA	ATTCC	ATGTG	TAGCG	350
351	GTGAA	ATGCG	CAGAG	ATATG	GAGGA	ACACC	AGTGG	CGAAG	GCGGC	TCTCT	400
401	GGTCT	GTAAC	TGACG	CTGAT	GTGCG	AAAGC	GTGGG	GATCA	AACAG	GTTTA	450
451	GATAC	CCTGG	TAGTC	CACGC	CGTAA	ACGAT	GAGTG	CTAAG	TGTTA	GGGGG	500
501	TTTCC	GCCCC	TTAGT	GCTGC	AGCTA	ACGCA	TTAAG	CACTC	CCCCT	GGGGA	550
551	GTACG	ACCGC	AAGGT	TGAAA	CTCAA	AGGAA	CTGAC	GGGGA	CCCGC	ACAA	600

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rDNA จำนวน 599 คู่เบส ของแบคทีเรียชนิดที่ 2 มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแบคทีเรียชนิดที่ 2 (ภาพที่ 10) มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* sp ดังตารางที่ 2 สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของโคโลนีในที่มีสีขาวแกมเหลือง และลักษณะการการติดสีย้อมแกรมแสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นกลม และสอดคล้องกับ Kenneth (2005) *Staphylococcus* sp. เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ชนิด *Staphylococcus epidermidis* พบบริเวณผิวหนัง ไม่ทำให้เกิดโรค เป็น Normal Flora *Staphylococcus aureus* จะมีโคโลนีสีเหลือง ติดสีน้ำเงินเกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ซึ่งเป็นแกรมบวกนอกจากนี้ *Staphylococcus* sp. เป็นพวก Facultative Anaerobic มักเป็นตัวก่อโรค ทำให้เกิดการอักเสบของเต้านมในวัว ซึ่งสามารถปนเปื้อนมาในน้ำนมดิบจากขั้นตอนการรีดนม ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ อาเจียน คลื่นไส้ (บัญญัติ, 2526)

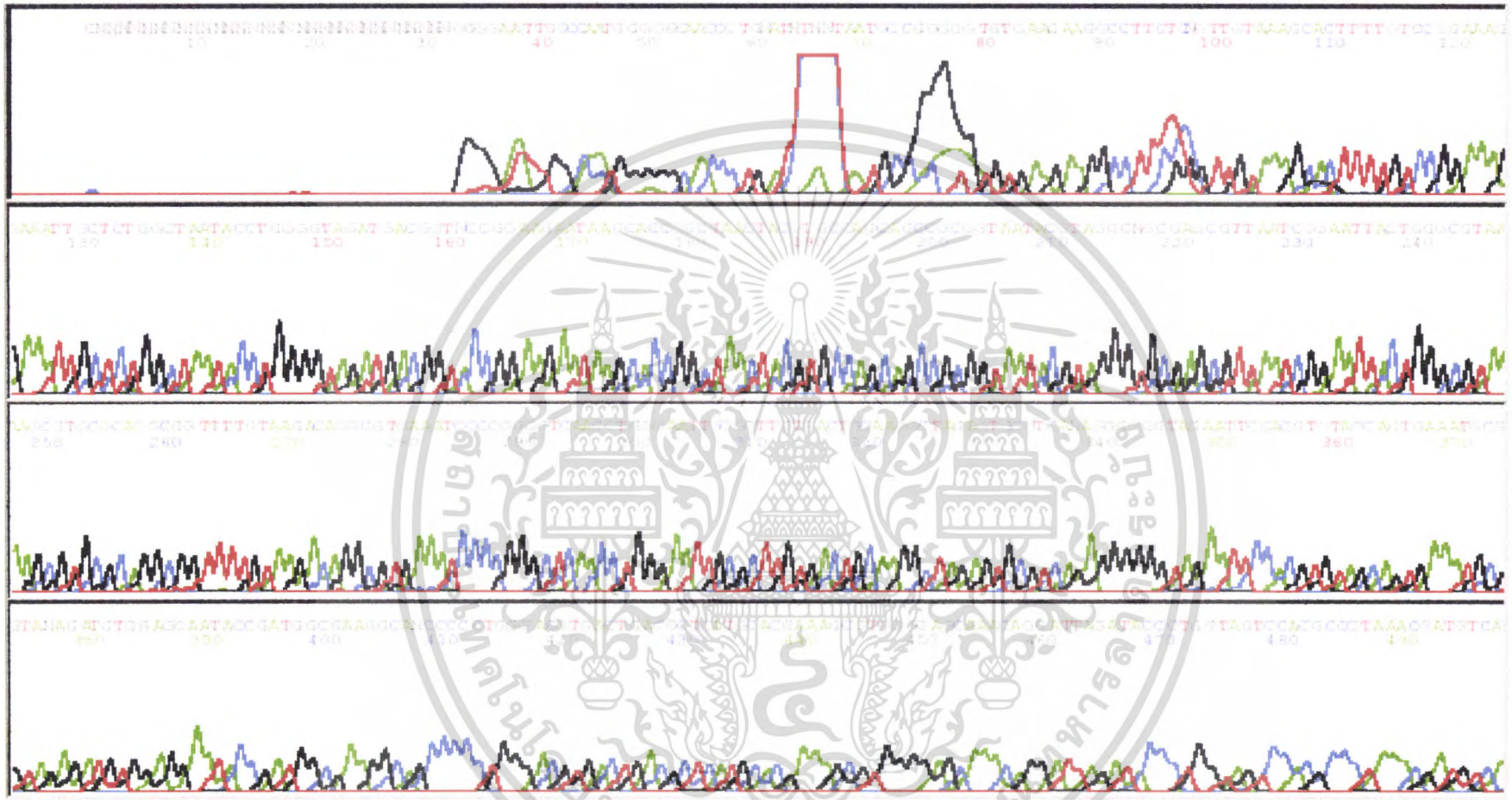
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2 ร้อยละของความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดที่พบโดยใช้โปรแกรม Blast

ชนิดของแบคทีเรียที่พบ	ร้อยละของความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
Staphylococcus sciuri	99
Staphylococcus lentus	99
Staphylococcus vitulus	98
Staphylococcus pulvereri	98
Staphylococcus cohnii	97
Staphylococcus saprophyticus	97
Staphylococcus nepalensis	97
Staphylococcus hominis	97
Staphylococcus epidermidis	97

(3) ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ 16s rDNA จากเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 3 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA พบว่าแบคทีเรียชนิดที่ 3 ที่แยกได้จากนมหมักกรด มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA มีจำนวน 598 คู่เบส (ภาพที่ 11 - 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 3

1	TCCTA	CGCGA	GGCAG	CAGTG	GGGAA	TTTTG	GACAA	TGGGG	GCAAC	CCTGA	50
51	TCCAG	CAATG	CCGCG	TGTGT	GAAGA	AGGCC	TTCGG	GTTGT	AAAGC	ACTTT	100
101	TGTCC	GGAAA	GAAAT	CCTC	TGCCC	TAATA	CGGCG	GGGGG	ATGAC	GGTAC	150
151	CGGAA	GAATA	AGCAC	CGGCT	AACTA	CGTGC	CAGCA	GCCGC	GGTAA	TACGT	200
201	AGGGT	GCGAG	CGTTA	ATCGG	AATTA	CTGGG	CGTAA	AGCGT	GCGCA	GGCGG	250
251	TTTTG	TAIGA	CAGGC	GTGAA	ATCCC	CGGGC	TTAAC	CTGGG	AATGG	CGCTT	300
301	GTGAC	TGCAA	GGCTA	GAGTG	TGTCA	GAGGG	GGGTA	GAATT	CCACG	TGTAG	350
351	CAGTG	AAATG	CGTAG	AGATG	TGGAG	GAATA	CCGAT	GGCGA	AGACA	GCCCC	400
401	CTGGG	ACATG	ACTGA	CGCTC	ATGCA	CGAAA	GCGTG	GGGAG	CAAAC	AGGAT	450
451	TAGAT	ACCCT	GGTAG	TCCAC	GCCCT	AAACG	ATGTC	AACTA	GTTGT	TGGGG	500
501	ATTCA	TTTCT	TCAGT	AACGT	AGCTA	ACGCG	TGAAG	TTGAC	CGCCT	GGGGA	550
551	GTACG	GTCGC	AAGAT	TAAAA	CTCAA	AGGAA	CTGAC	GGGGG	CCCGC	ACAA	600

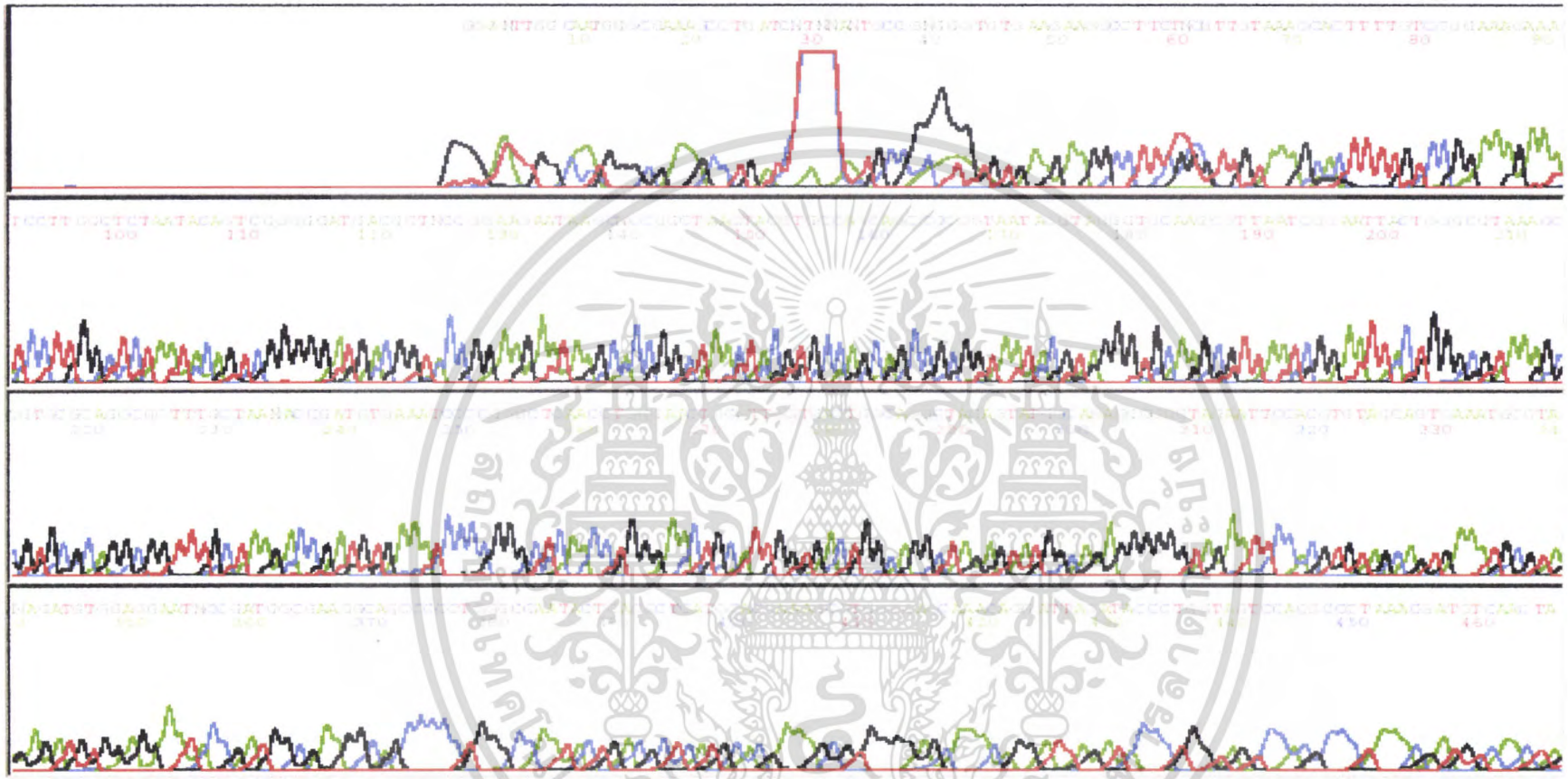
ภาพที่12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 3 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rDNA จำนวน 599 คู่เบส ของแบคทีเรียชนิดที่ 3 มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแบคทีเรียชนิดที่ 2 (ภาพที่ 12) มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Ralstonia* sp. ดังตารางที่ 2 สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่มีสีขาว และลักษณะการการติดสีย้อมแกรมแสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นแท่งยาว ติดสีแดงเกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ซึ่งเป็นแกรมลบ และเป็นลักษณะของเชื้อ *Ralstonia* sp. สอดคล้องกับ Jewell (2000) พบว่า *Ralstonia* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่ง พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Burkholderia cepacia*

ตารางที่3 ร้อยละของความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดที่พบโดยใช้โปรแกรม Blast

ชนิดของแบคทีเรียที่พบ	ร้อยละของความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
Ralstonia basilensis	98
Ralstonia eutropha	97
Ralstonia campinensis	96
Cupriavidus gilardii	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 Chromatogram ของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 4

(4) ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ 16S rDNA จากเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 4 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA พบว่าแบคทีเรียชนิดที่ 4 ที่แยกได้จากนมหมักกรด มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีจำนวน 599 คู่เบส (ภาพที่ 13 - 14)

1	TCCTA	CGGGA	GGCAG	CAGTG	GGGAA	TTTTG	GACAA	TGGGC	GAAAG	CCTGA	50
51	TCCAG	CAATG	CCGCG	TGTGT	GAAGA	AGGCC	TTCGG	GTTGT	AAAGC	ACTTT	100
101	TGTCC	GGAAA	GAAAT	CCTTG	GTCCT	AATAT	GGCCG	GGGGA	TGACG	GTACC	150
151	GGAAG	AATAA	GCACC	GGCTA	ACTAC	GTGCC	AGCAG	CCGCG	GTAAT	ACGTA	200
201	GGGTG	CGAGC	GTTAA	TCGGA	ATTAC	TGGGC	GTAAA	GCGTG	CGCAG	GCGGT	250
251	TTGCT	AAGAC	CGATG	TGAAA	TCCCC	GGGCT	CAACC	TGGGA	ACTGC	ATTGG	300
301	TGACT	GGCAG	GCTAG	AGTAT	GGCAG	AGGGG	GGTAG	AATTC	CACGT	GTAGC	350
351	AGTGA	AATGC	GTAGA	GATGT	GGAGG	AATAC	CGATG	GCGAA	GGCAG	CCCCC	400
401	TGGGC	CAATA	CTGAC	GCTCA	TGCAC	GAAAG	CGTGG	GGAGC	AAACA	GGATT	450
451	AGATA	CCCTG	GTAGT	CCACG	CCCTA	AACGA	TGTCA	ACTAG	TTGTT	GGGGA	500
501	TTCAT	TTCCT	TAGTA	ACGTA	GCTAA	CGCGT	GAAGT	TGACC	GCCTG	GGGAG	550
551	TACGG	TCGCA	AGATT	AAAAC	TCAAA	GGAAT	CTGAC	GGGGA	CCCGC	ACAA	600

ภาพที่14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่ 4 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rDNA จำนวน 599 คู่เบส ของแบคทีเรียชนิดที่ 4 มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแบคทีเรียชนิดที่ (ภาพที่ 14) มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Burkholderia* sp. และเหมือนกับ *Burkholderia cepacia* เท่ากับ 100 % สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่มีสีขาว และลักษณะการการติดสีย้อมแกรมแสดงให้เห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นแท่งตรงสั้น ๆ หรือ หรือโค้งงอเล็กน้อย ติดสีแดงเกาะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เป็นแกรมลบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Burkholderia* sp. สอดคล้องกับ Jewell (2000) ซึ่งพบว่า *Burkholderia cepacia* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน มีความกว้าง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ยาว 1.5-3.0 ไมโครเมตร เป็นสมาชิกใน Genus Pseudomonas สามารถจำแนกได้โดยลำดับเบสจาก 16s rDNA และส่วนประกอบของกรดไขมัน ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Ralstonia* ดังตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของ *Burkholderia, Pseudomon, Ralstonia*

Charracteristics 16s rRNA similarity (%)	*Burkholderia*	*Pseudomonas*	*Ralstonia*
Burkholderia	100	83	9 0
Pseudomonas	83	100	80
Ralstonia	90	80	100

ที่มา: Yabuuchi et al. (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและข้อเสนอแนะ

น้ำนมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีปริมาณความชื้นและความเป็นกรดด่างหรือระดับพีเอชที่เป็นกลางซึ่งเหมาะสมต่อการทำให้จุลินทรีย์ต่าง ๆ น้ำนมที่มีการเติมกรดก็เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ในเริ่มแรกทำให้น้ำนมเกิดการเน่าเสียได้ช้า แต่ก็ยังมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถเจริญได้และจุลินทรีย์เหล่านี้ก็เป็นอาหารของไรแดง ผลจากการทดลองพบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 4 ชนิดเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16s rDNA ไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ที่แตกต่างกันและมีจำนวนเบสใกล้เคียง 600 คู่เบส

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด พบว่าทั้ง 4ชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rDNA แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในธนาคารยีน พบว่า

(1) แบคทีเรียชนิดที่ 1 คือ *Chromobacterium violaceum*

(2) แบคทีเรียชนิดที่ 2 สรุปได้ว่าเป็นสกุล *Staphylococcus* sp. แต่มีโอกาสเป็นได้หลายชนิดคือ *S. sciuri* 99 %, *S. lentus* 99%, *S. vitulus* 98%,*S. pulvereri* 98%, *S. cohnii* 97%, *S. saprophyticus* 97%, *S. nepalensis* 97%, *S. hominis* 97% และ *S. epidermidis* 97%

(3) แบคทีเรียชนิดที่ 3 สรุปได้ว่าเป็นสกุล *Ralstonia* sp. แต่มีโอกาสเป็นได้หลายชนิดคือ *R. basilensis* 98%, *R. eutropha* 97%, และ *R. campinensis* 96%

(4) แบคทีเรียชนิดที่ 4 คือ *Burkholderia cepacia*

ข้อเสนอแนะ

อาจต้องมีการทำ Biochem Test ในแบคทีเรียชนิดที่ 2 และ 3 เพื่อให้สามารถจำแนกชนิดได้ รวมทั้งนำแบคทีเรียที่ได้ในแต่ละชนิดไปศึกษาการเลี้ยงไรแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2527. เคมีนมและผลิตภัณฑ์นม. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

เบญจวรรณ อรรถพันธ์ และ ศุภชัย อึ้งวานิชบรรณ. 2537. การวิเคราะห์น้ำนมรวมเพื่อหาแนวทางปรับปรุงสุขศาสตร์น้ำนมและแก้ปัญหาเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม. โครงการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์. 2537. จุฬาฯ, กรุงเทพฯ. 15น.

บัญญัติ ศรีสุขงาม. 2526. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ เล่ม 1. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยงยุทธ ยุทธวงศ์. เทคโนโลยีชีวภาพ-โอกาสของไทย. เมษายน 2005. *http:/ www.Google. com.*

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2540. นมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาการผลิตสัตว์คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 210 น.

สมยศ ตันติวงศ์วาณิช. 2541. การศึกษาการใช้ไนซินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 139-143.

Adachi, Y. and Y. Ogava 2004. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. Animal Science. 75 : 245-252.

Akineden, O., C.Annemuller, A. A. Hassan, C. Lammler, W. Wolter and M. Zschock. 2001. Toxin Genes and other Characteristics of *stephylococccus enterotoxin* (SE) Isolates from Milk of Cows with Mastitis. Clinical and Diagostic Laboratory Immunology. 8 : 959-964.

Almeida, R. D., P. B. Trevilato, L. A. Bartoleti, J. L. P. Modena, E. S. Hanna, G. B. Gregoracci and M. Brocchi. 2004. Bacteriophages and insertion sequences of *Chromobacterium violaceum* ATTCC 12472. Genetics and Molecular Research. 3 : 76-86.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Altschul, Stephen F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database searchprograms", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Bellosillo, G.C. 1957. The biology of *Moina macocopa* Strauss. With special reference to artificial culture. Philippine Journal of Science. 63 : 307-349.

Bramley, A. J. and C. H. McKinnon. 1990. the microbiology of raw milk, pp. 163-206. In R. K. Robinson (ed.). Dairy Microbiology : the Microbiology of milk. 2nd ed. Elsevier Applied science Publisher, London.

Bylund, G. 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak, Sewden. 436 p.

Cousin, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrohic microorganisms in milk and dairy product :A reviel. J.Food trot. 45:172-207.

Edger, S. D. 1998. Milk and Dairy Product Technology (translate from Germany). Marcel Dekker Inc., New York

Gosta, B. 1989. Dairy Processing handbook. Tetra Pak Propessing Systems. n.p.

Isono. Y., I. Shingn and S. Shimizu. 1994. Identification and Characteristics of lactic acid bacteria isolated from masai fermented milk in Northern Tanzania. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (4) : 660-664.

James, V. C. 2002. The Microbiology of Raw Milk. Pp.39-84. R.K.Robinson,eds. Dairy Microbiology Handbook. A John Wiley & Sons,Inc,New York.

Jewell, S. N.. 2000. Purification and characterization of a novel protease from Burkholderia strain 2.2N.

Kenneth, T. 2005. *Staphylococcus aureus*. Electron micrograph from visual unlimited, with permission.

Lawrence, H. S. and A. G. Tucker. 2001. Necrotizing External Otitis and *Chromobacterium violaceum*. European Journal for the Practitioner, Clinician and Resesearcher. 11: 306-307.

Newton, C. R. and A. Graham. 1994. PCR. Bios Scientific Publishers, U. K. 161 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Robin, E. 2005. Effects of Processing on Survival of Milk Borne Bacteria. April 2005. *http:/ www.Google.com.*

Rojelj, I. 1987. Bacteriological guality of raw milk as milk quality parameter. Zbornik Biotechnisks fakultete UniverZe Edvarda kardelja Ljubljani (Yugslavia) kmtijstvo. 323-331.

Scherrer, D., Cortis, Muehlherr JE, Zweifel C. Stephan R. 2004. Phenotopic and genotypic characteristics of *staphylococcus aureus* isolates from raw bulk tank milk samples of goats and sheep. Vet maicrobial. 101 : 101-107.

Vaughan, E. E., E. Caplice, R. Looney, N. O. Rourke, H. Coveney, C. Daly and G. F. Fitzgerald. 1994. Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. J. Appl. Bacterial. 76:118-123.

Anon. 2005. *Chromobacterium violaceum*. April 2005. *http:/ www. brgene.lnce.br.com. 2005.*

Yabuuchi,E. Kosuku, I. Yano, H. Hotta and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two Burkholderia and extracellular protease.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้