สภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเพาะเลี้ยง Bacteriophage T4r เพื่อเพิ่มขนาดของ plaque

Optimization of Culture Method for Enlarging Plaque Formation of Bacteriophage T4r

ศิริธร เลิศพานิช พิมพ์สุดา อุดคำมี และวิภา ตังคนานนท์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

กมล บุษบา

ภาควิชาคณิตศาสตร์และสถิติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

Bacteriophage หรือ Phage เป็นไวรัสของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรีย *E.coli* B. แบคทีเรียที่ถูกจู่โจมจะแตกกลายเป็น plaque ใสท่ามกลางการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r สามารถทำได้ 2 วิธี คือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ NaCl ในการเพิ่มขนาดของ plaque ใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Experiment) ที่มีสองปัจจัย จำนวน 9 ซ้ำ ปัจจัยแรกได้แก่ความเข้มข้นของ NaCl ซึ่งมี 4 ระดับคือ 0.085, 0.15, 0.30 และ 0.40 M ปัจจัยที่สองได้แก่ชนิดของ *E.coli* B. สองชนิดคือ *E.coli* B/3 และ *E.coli* B/4 มีการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงรวมทั้งการตรวจวัดขนาดและจำนวน plaque เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของ NaCl พบว่าขนาดของ plaque ที่วัดได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 23.278 - 228.661 μm และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนจำนวน plaque ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.644 – 20.267 PFU/ml และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อพิจารณาอิทธิพลของชนิดของ *E.coli* B. พบว่าขนาดของ plaque ที่วัดได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 167.603 – 128.481 μm และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนจำนวน plaque ทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.661 – 9.564 PFU/ml และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน

คำสำคัญ : ไวรัสของแบคทีเรีย แฟกทอเรียล อาหารแข็ง อาหารเหลว

Abstract

Bacteriophage is a virus that can infect on bacteria, *E.coli* B. The infected bacteria will lyse and occur clear zone that called "plaque". It is on a lown of bacteria. The cultivation of bacteriophage T4r has two methods. One is broth and the other is solid agar method The optimum concentration of NaCl for increasing plaque size was studied. Factorial experiment was used for design of the experiment. There are 2 factors with 9 replications. The first factor, NaCl, has 4 concentration levels (0.085, 0.15, 0.30 and 0.40 M). The second factor, *E.coli* B, has 2 levels (*E.coli* B/3 and *E.coli* B/4). The measurement of size and number of plaque were used for controlling the culture condition. To assess the effect of NaCl concentration, we found that total plaque sizes have range 23.278 - 228.661 μm and total numbers of plaque have

range 0.644 - 20.267 PFU/ml and their differences were significant at 0.05 level. To assess the effect of *E.coli* B. , we found that total plaque sizes have range 167.603 -128.481 μm and total numbers of plaque have range 7.661 - 9.564 PFU/ml and their differences were not significant at 0.05 level.

Keywords : Bacteriophage , E.coli B , T4r , Factorial experiment

1. บทนำ

bacteriophage หรือ phage เป็นไวรัสที่สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยอาศัยแบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับ phage ที่ใช้ศึกษาเป็น phage ชนิด T-even phage นั่นคือ phage T4 ซึ่งเป็น phage ที่มีขนาดใหญ่ โครงสร้างของ phage T4 ประกอบด้วยส่วนหัวที่มีรูปร่างเป็น icohexahedral และส่วนหางที่มีรูปร่างซับซ้อนสวยงาม phage T4 มีกรดนิวคลิอิกชนิด dsDNA มีลำดับเบสที่ครบสมบูรณ์ phage T4 จึงถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษารูปร่างลักษณะของไวรัส เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมสำหรับ phage T4 คือแบคทีเรีย *E.coli* B เนื่องจากที่ผิวของ *E.coli* B ในชั้น lipopolysaccharide มี receptor ที่เหมาะสมสำหรับ phage T4 ลักษณะการติดเชื้อของ phage T4 จะเป็นแบบ lytic infection โดยเมื่อ phage T4 บุกรุกแบคทีเรีย และมีการเพิ่มจำนวนจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกเกิดเป็นบริเวณใสเรียกว่า "plaque" การศึกษาลักษณะการติดเชื้อของ phage T4 นั้น จึงสามารถสังเกตได้จากลักษณะของ plaque ที่เกิดขึ้นซึ่ง plaque ที่มีขนาดใหญ่ก็จะทำให้ง่ายต่อการสังเกต [1]

สำหรับในห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยี ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์นั้น ในปฏิบัติการเพาะเลี้ยง phage เพื่อศึกษาลักษณะการติดเชื้อพบว่า ลักษณะของ plaque ที่ได้มีขนาดเล็กซึ่งยากต่อการสังเกตลักษณะการติดเชื้อ ดังนั้นการเพิ่มขนาดของ plaque ให้มีขนาดใหญ่จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้การศึกษาลักษณะการติดเชื้อเป็นไปได้ง่ายขึ้น ซึ่งต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างร่วมกันโดยพบว่าอัตราการเกาะติด (adsorption) ในช่วงแรกมีผลต่อขนาดและจำนวน plaque ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดที่สำคัญคือตัวเซลล์เจ้าบ้านและสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยสารประกอบในอาหารที่มีส่วนสำคัญในการช่วยการเกาะติดระหว่างเซลล์แบคทีเรียและ phage เกิดขึ้นได้ดีคือ L-tryptophan และสารประกอบพวก cation เช่น NaCl, $MgCl_2$ โดย phage แต่ละชนิดจะต้องการสารเหล่านี้ในปริมาณที่ต่างกัน [2] ดังนั้นในการพัฒนาขนาดของ plaque จึงต้องทำการเพาะเลี้ยง phage โดยคำนึงถึงความเข้มข้นของสารอาหารทั้งสองตัวเป็นหลัก

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

การวิจัยนี้ต้องการพัฒนาขนาดของ plaque ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยศึกษาการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaCl สำหรับการเพาะเลี้ยง T4r และการวัดขนาดและจำนวน plaque

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

ดำเนินการตามวิธีของวิภาและ Pelczer and Chan [3, 4]

3.2 วิธีการเตรียม phage stock [3]

วิธีการ titrate หาปริมาณ phage และวิธีการเตรียม phage stock ที่มี titer สูงดำเนินการตามพิมพ์สุดาและศิริธร [5]

3.3 วิธีการหาสูตรต้นแบบในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r

การหาสูตรต้นแบบทำได้โดยนำอาหารสองสูตรมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและ bacteriophage T4r โดยดำเนินการตามวิธีของพิมพ์สุดาและศิริธร [5]

3.4 วิธีการหาปริมาณ NaCl ที่เหมาะสมในการเพิ่มขนาดของ plaque

ดำเนินการโดยการนำสูตรต้นแบบของ Difco ซึ่งมีปริมาณ NaCl 0.085 M ในสูตรอาหารนั้น และนำ NaCl ซึ่งเป็นเกลือที่เหมาะสมในการเพิ่มขนาดของ plaque มาหาปริมาณการใช้ที่เหมาะสมและประเมินคุณภาพความสามารถของ *E.coli* B

ที่จะเกิดโคโลนี เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r ต่อไป โดยแบ่งการทดลอง เป็น 6 ระดับตามปริมาณความเข้มข้นของ NaCl ดังนี้

ระดับที่ 1 ความเข้มข้นของ NaCl 0.085 M

ระดับที่ 2 ความเข้มข้นของ NaCl 0.150 M

ระดับที่ 3 ความเข้มข้นของ NaCl 0.300 M

ระดับที่ 4 ความเข้มข้นของ NaCl 0.400 M

ระดับที่ 5 ความเข้มข้นของ NaCl 1.500 M

ระดับที่ 6 ความเข้มข้นของ NaCl 2.000 M

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* B/3 และ *E.coli* B/4 ในอาหาร tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้ว streak บน 1.5% tryptic soy agar หรือสูตรต้นแบบของ difco ซึ่งได้เพิ่มปริมาณ NaCl ตามระดับที่ 1-6 ใน petri dish เพื่อให้แยกเป็นกลุ่มเซลล์เดียว (โคโลนี) ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง

3.5 การหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NaCl กับ *E.coli* B

วัดขนาดและนับจำนวน plaque โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลขนาด 4 × 2 โดยใช้จำนวนซ้ำ 9 ซ้ำ ปัจจัยแรกได้แก่ความเข้มข้นของ NaCl ซึ่งมี 4 ระดับ คือ 0.085, 0.15, 0.30 และ 0.40 M ปัจจัยที่สองได้แก่ชนิดของ *E.coli* B ซึ่งมี 2 ระดับ คือ *E.coli* B/3 และ *E.coli* B/4 จากนั้นใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการของ Games-Howell โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่น 10.0 [6]

สำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยง การวัดขนาดและจำนวน plaque ดำเนินการวิจัยตามวิธีของพิมพ์สุดา และศิริธร [5]

4. ผลการวิจัย

4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

E.coli B. ที่เพาะเลี้ยงได้เมื่อนับด้วย Haemacytometer จะได้เซลล์ช่วง log phase ประมาณ 10^8 เซลล์/ml

4.2 วิธีการเตรียม phage stock

phage ที่ทราบความเข้มข้นที่ก่อให้เกิด plaque น้อยที่สุด คือ 10^{-5}

4.3 วิธีการหาสูตรต้นแบบในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r

จากการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มขนาดของ plaque พบว่าอาหารสูตรมาตรฐานและสูตรสำเร็จไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ0.05 ดังนั้นสามารถที่จะเลือกใช้อาหารสูตรใดก็ได้สำหรับการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r แต่เนื่องจากอาหารสูตรสำเร็จมีค่าเฉลี่ยของขนาดและจำนวนสูงกว่าอาหารสูตรมาตรฐาน ดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตรสำเร็จของ Difco มาเป็นสูตรต้นแบบในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r

4.4 วิธีการหาปริมาณ NaCl ที่เหมาะสมในการเพิ่มขนาดของ plaque

จากการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *E.coli* B ซึ่งสังเกตจากความสามารถของ *E.coli* B ที่จะเกิดโคโลนี พบว่า *E.coli* B สามารถเกิดเป็น โคโลนีได้ในช่วงความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.085, 0.15, 0.30, และ 0.40 M ดังตารางที่ 1 ดังนั้นจึงนำปริมาณการใช้ NaCl ดังกล่าวมากำหนดใช้สำหรับการวางแผนการทดลองเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ NaCl ในการเพิ่มขนาดของ plaque

ตารางที่ 1 ระดับและความเข้มข้น NaCl (M)ในการเพิ่มขนาดของ plaque และผลประเมินความสามารถของ *E. coli* ที่จะเกิดโคโลนี

ระดับ	ความเข้มข้น NaCl	ผลประเมินความสามารถ
1	0.085 M	เกิดโคโลนีชัดเจน
2	0.15 M	เกิดโคโลนีชัดเจนแต่น้อยกว่า
3	0.30 M	เกิดโคโลนีจำนวนน้อย
4	0.40 M	เกิดโคโลนีจำนวนน้อย
5	1.50 M	ไม่เกิดโคโลนี
6	2.00 M	ไม่เกิดโคโลนี

4.5 วิธีการหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NaCl กับ *E.coli* B

จากการนำอาหารมาใช้ในการเพาะเลี้ยง bacterio-phage T4r แล้ววัดขนาดและนับจำนวน plaque เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปัจจัยทั้งสองไม่มีปฏิสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการนำอาหารมาใช้ในการเพาะเลี้ยง bacterio-phage T4r แล้ววัดขนาด plaque เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ 1 (ความเข้มข้นของ NaCl) ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 2 สามารถเรียงลำดับขนาดของ plaque ได้จากมากไปน้อยคือระดับที่ 1 (0.085 M), ระดับที่ 2 (0.15 M), ระดับที่ 3 (0.30 M) และระดับที่ 4 (0.40 M) โดยมีขนาดของ plaque โดยเฉลี่ยเป็น 228.61, 204.94, 135.33 และ 23.28 μm ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของ NaCl มีผลต่อขนาด plaque แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อทำการทดสอบการเท่ากันของค่าแปรปรวนด้วยสถิติ Levene [6] แล้วพบว่าค่าความแปรปรวนของแต่ละระดับมีค่าแตกต่างกันอย่างยิ่ง (p - value < 0.0001) ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยทีละคู่ด้วยวิธีของ Games-Howell [6] ซึ่งเป็นวิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในกรณีที่ค่าแปรปรวนของแต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน ผลที่ได้ ให้ผลสอดคล้องกันทั้งขนาดและจำนวนของ plaque ดังนั้นจึงเลือกวิธีการดังกล่าวซึ่งพบว่าระดับที่ 1 (0.085 M), ระดับที่ 2 (0.15 M) และระดับที่ 3 (0.30 M) มีความแตกต่างกับระดับที่ 4 (0.40 M) อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

ตารางที่ 2 ขนาดของ plaque โดยเฉลี่ยจำแนกตามระดับความเข้มข้นของ NaCl (ขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 18 หน่วย)

NaCl	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
1	228.62[a]	31.332	166.017	291.205
2	204.94[a]	31.332	142.351	267.538
3	135.33[a]	31.332	72.740	197.927
4	23.28[b]	31.332	-39.316	85.872

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการนำอาหารมาใช้ในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r แล้วนับจำนวน plaque เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ 1 (ความเข้มข้นของ NaCl) ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 3 ซึ่งสามารถเรียงลำดับจำนวนของ plaque ได้จากมากไปน้อยคือระดับที่ 1 (0.085 M), ระดับที่ 2 (0.15 M), ระดับที่ 3 (0.30 M) และระดับที่ 4 (0.40 M) โดยมีจำนวนของ plaque โดยเฉลี่ยเท่ากับ 20.27, 8.91, 4.63 และ 0.64 PFU/ml ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของ NaCl มีผลต่อจำนวน plaque แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อทำการทดสอบการเท่ากันของค่าแปรปรวนด้วยสถิติ Levene [6] แล้วพบว่าค่าความแปรปรวนของแต่ละระดับมีค่าแตกต่างกันอย่างยิ่ง (p – value = 0.002) ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยทีละคู่ด้วยวิธีของ Games-Howell [6] ซึ่งเป็นวิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในกรณีที่ค่าแปรปรวนของแต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน ผลที่ได้ให้ผลสอดคล้องกันทั้งขนาดและจำนวนของ plaque จึงเลือกวิธีการดังกล่าวซึ่งพบว่าระดับที่ 1 (0.085 M), ระดับที่ 2 (0.15 M) และระดับที่ 3 (0.30 M) มีความแตกต่างกับระดับที่ 4 (0.40 M) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05)

ตารางที่ 3 จำนวนของ plaque โดยเฉลี่ยจำแนกตามระดับความเข้มข้นของ NaCl (ขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 18 หน่วย)

NaCl	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
1	20.27[a]	3.076	14.121	-26.412
2	8.91[a]	3.076	2.769	15.060
3	4.63[a]	3.076	-1.520	10.771
4	0.64[b]	3.076	-5.501	6.790

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการนำอาหารมาใช้ในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r แล้ววัดขนาดและจำนวนของ plaque เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ 2 (ชนิดของ *E.coli* B) ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ สามารถเรียงลำดับขนาดและจำนวนของ palque จากมากไปน้อยคือระดับที่ 2 (*E.coli* B/4) และระดับที่ 1 (*E.coli* B/3) ตามลำดับ โดยมีขนาดของ plaque โดยเฉลี่ยคือ 167.60 และ 128.48 μm ตามลำดับ และมีจำนวนของ plaque โดยเฉลี่ย 9.56 และ 7.66 PFU/ml ตามลำดับ และพบว่าชนิดของ *E.coli* B ไม่มีผลต่อทั้งขนาดและจำนวนของ plaque โดยความแตกต่างทั้งของขนาดและจำนวนของ plaque ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value > 0.05)

ตารางที่ 4 ขนาดของ plaque โดยเฉลี่ยจำแนกตามชนิดของ *E.coli* B (นาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 18 หน่วย)

E.coli	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
3	128.48[a]	22.155	84.220	172.741
4	167.60[a]	22.155	123.342	211.863

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 5 จำนวนของ plaque โดยเฉลี่ยจำแนกตามชนิดของ *E.coli* B (นาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 18 หน่วย)

E.coli	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
3	7.66[a]	2.175	3.315	12.007
4	9.56[a]	2.175	5.219	13.910

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการทดลองศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaCl ในแต่ละระดับต่อการเพิ่มขนาดและจำนวน plaque ให้ผลดังภาพที่ 1 และเมื่อวัดขนาดและจำนวนของ plaque แล้วนำมาเขียนกราฟจะได้ดังภาพที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นขนาดและจำนวนของ plaque จะลดลง

จากการทดลองศึกษาผลของ *E.coli* B ในแต่ละระดับต่อการเพิ่มขนาดและจำนวนของ plaque ให้ผลดังภาพที่ 3 เมื่อวัดขนาดและจำนวน plaque แล้วนำมาเขียนกราฟจะได้ดังภาพที่ 4 จะเห็นว่า *E.coli* B/4 ให้ค่าของขนาดและจำนวน plaque มากกว่า *E.coli* B/3

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

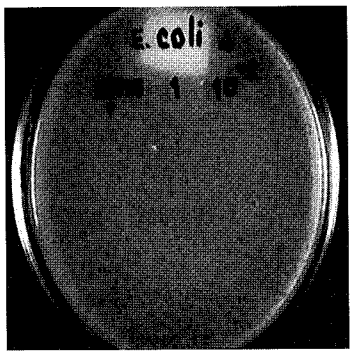
จากการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ NaCl ในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r เพื่อเพิ่มขนาดของ plaque โดยมีการนำสูตรอาหารมาตรฐานซึ่งมีปริมาณ NaCl (0.085 M) อยู่ และนำสูตรอาหารมาตรฐานดังกล่าวมาเพิ่ม NaCl ลงไปในปริมาณ 3.80, 12.58, 18.43 กรัม โดยกำหนดให้เป็นปัจจัยที่ 1 ซึ่งมีระดับ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ทำการทดลองกับ *E.coli* B/3 และ *E.coli* B/4 โดยกำหนดให้เป็นปัจจัยที่ 2 ซึ่งมีระดับ 1 และ 2 ตามลำดับ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้คือ plaque ที่เกิดขึ้นมาวัดขนาดและจำนวน ได้ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

อิทธิพลของระดับความเข้มข้นของ NaCl ที่มีต่อขนาดของ plaque พบว่า ระดับที่ 1 ความเข้มข้น NaCl (0.085 M) มีขนาดของ plaque โดยเฉลี่ยใหญ่สุดคือ 228.661 μm รองมาคือ ระดับที่ 2 (0.15 M), ระดับที่ 3 (0.30 M) และระดับที่ 4 (0.40 M) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 23.278 μm เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Games-Howell ซึ่งเป็นวิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยทีละคู่ในกรณีที่ค่าแปรปรวนของแต่ละกลุ่มไม่เท่ากันพบว่าระดับที่ 1, 2 และ 3 มีความแตกต่างกับระดับที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญ

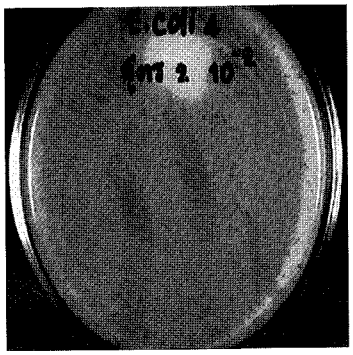
อิทธิพลของชนิดของ *E.coli* B ที่มีต่อขนาดของ plaque พบว่า ระดับที่ 1 (*E.coli* B/3) มีขนาดของ plaque โดยเฉลี่ย 128.481 μm และระดับที่ 2 (*E.coli* B/4) มีขนาดของ plaque โดยเฉลี่ย 167.603 μm ค่าเฉลี่ยจากทั้ง 2 ระดับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาเฉพาะปัจจัยที่ 1 ซึ่งได้แก่ความเข้มข้นของ NaCl ซึ่งมีมี 4 ระดับ โดยระดับที่ 1, 2, 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อสังเกตจากค่าเฉลี่ยพบว่าระดับ

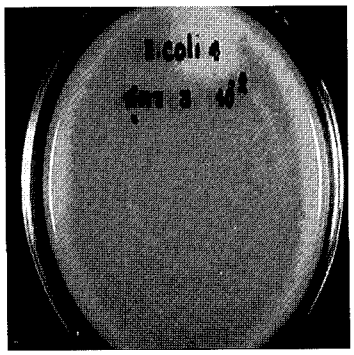
ที่ 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของ NaCl 0.085 M ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุดทั้งขนาดและจำนวนของ plaque ดังนั้นอาหารสูตรดังกล่าวจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง bacterio-phage T4r ดังนั้นการเติม NaCl เพิ่มลงไปมีส่วนเพิ่มขนาดของ plaque แต่ต้องมีปริมาณที่เหมาะสมถ้าหากมีปริมาณที่มากเกินไปก็จะยับยั้งการเพิ่มขนาดได้ [7] สำหรับปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ชนิดของ *E.coli* B ทั้ง 2 ชนิด (*E.coli* B/3 และ *E.coli* B/4) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อสังเกตค่าเฉลี่ยพบว่า *E.coli* B/4 ให้ค่าเฉลี่ยทั้งขนาดและจำนวนของ plaque สูงกว่า แสดงว่า *E.coli* B/4 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r แต่เนื่องจากปัจจัยทั้งสองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยง bacteriophage T4r สามารถเลือกใช้ *E.coli* B กับสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl อยู่ในช่วง 0.085-0.30M



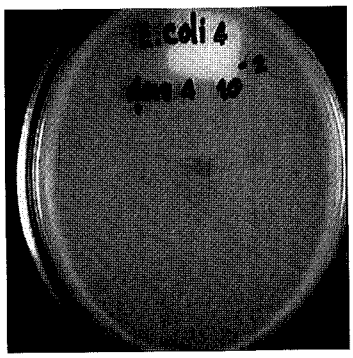
ระดับที่ 1 (0.085 M)



ระดับที่ 2 (0.15 M)

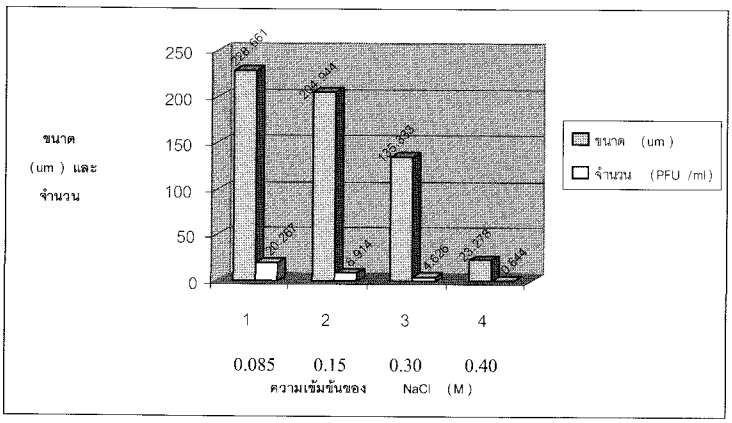


ระดับที่ 3 (0.30 M)

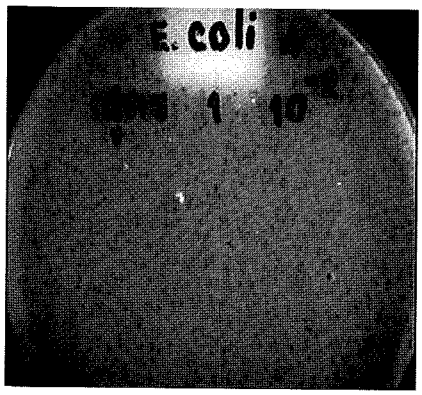


ระดับที่ 4 (0.40 M)

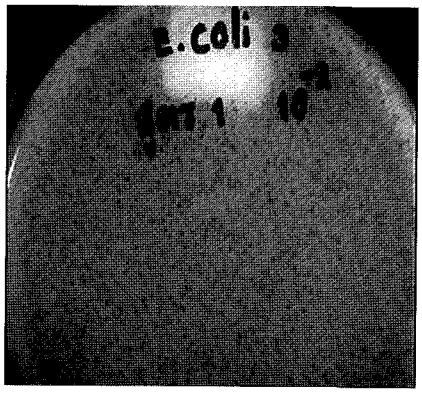
ภาพที่ 1 ขนาดของ plaque จำแนกตามระดับความเข้มข้นของ NaCl 4 ระดับ



ภาพที่ 2 ขนาดและจำนวนโดยเฉลี่ยของ plaque จำแนกตามระดับความความเข้มข้นของ NaCl 4 ระดับ (ขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม คือ 18 หน่วย)

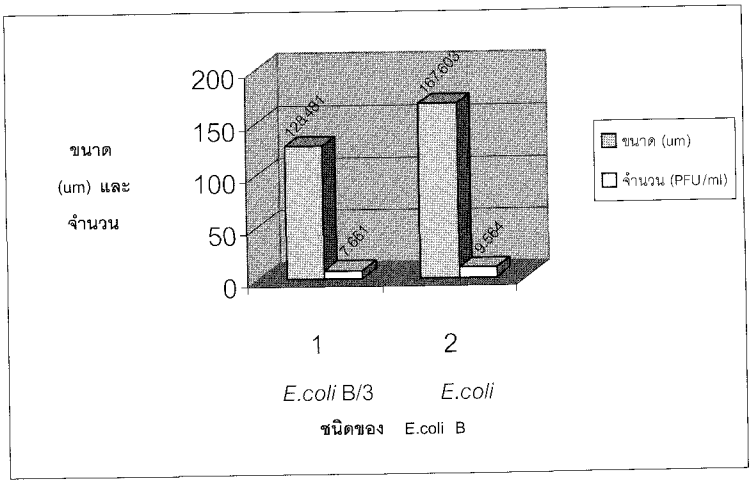


E.coli B/3



E.coli B/4

ภาพที่ 3 ขนาดของ plaque จำแนกตามชนิดของ *E.coli* B



ภาพที่ 4 ขนาดและจำนวนโดยเฉลี่ยของ plaque จำแนกตามชนิดของ *E. coli* B 2 ชนิด (ขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 18 หน่วย)

จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl (M) ต่าง ๆ คือ 0.085, 0.15, 0.30 และ 0.40 โดยระดับความเข้มข้นของ NaCl มีผลต่อ phage แต่ละชนิดต่างกัน จากการทดลองช่วงความเข้มข้นของ NaCl ที่สามารถทำให้เกิด plaque อยู่ในช่วงระหว่าง 0.085 - 0.30 M ถือว่าเป็นช่วงที่เคบ เนื่องจากมีการศึกษามาแล้วว่าถ้าความเข้มข้นของ NaCl มากเกิน 2.00 M จะมีผลทำให้การเกาะติดของ phage ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ [8] แต่จากการทดลองความเข้มข้นของ NaCl เพียงแค่ 0.40 M ทำให้ไม่เกิด plaque อาจเนื่องมาจากสมบัติเฉพาะตัวของ phage T4r ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิสได้ในระดับที่ต่ำ และอาจเนื่องมาจากมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น อุณหภูมิของ 0.7% Agar ซึ่งใช้สำหรับการ diffusion ของ phage ร้อนเกินไป

การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่มีต่อจำนวน plaque สรุปได้ว่า ระดับที่ 1 (0.085 M) ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque สูงสุดคือ 20.267 PFU/ml รองมาคือระดับที่ 2 (0.15 M), ระดับที่ 3 (0.15 M) และ ระดับที่ 4 (0.40 M) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque ต่ำสุดคือ 0.644 PFU/ml เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Games-Howell [6] ซึ่งเป็นวิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยทีละคู่ในกรณีที่ค่าแปรปรวนของแต่ละกลุ่มไม่เท่ากันพบว่า ระดับที่ 1, 2 และ 3 มีความแตกต่างกับระดับที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาอิทธิพลของชนิดของ *E.coli* B ที่มีต่อจำนวน plaque สรุปได้ว่า *E.coli* B/3 มีจำนวน plaque โดยเฉลี่ย 7.661 PFU/ml และ *E.coli* B/4 มีจำนวน plaque โดยเฉลี่ย 9.564 PFU/ml ซึ่งค่าเฉลี่ยทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากการตรวจสอบข้อมูลพบว่าขนาดและจำนวน plaque ที่ได้แปรผกผันกับระดับความเข้มข้นของ NaCl

6. เอกสารอ้างอิง

[1] ชโลบล อยู่สุข, ปราณี สิทธิสาร, พันทิพา สินรัชตานนท เพ็ญจิตร เปรมะบุตร, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา. ไวรัสวิทยา. ใน : คู่มือปฏิบัติการและการสาธิต จุลชีววิทยาทั่วไปและทางการแพทย์. ชโลบล อยู่สุข, มลวิภา วงศ์สกุล, สโรชิน รัตนดิลก ณ ภูเก็ต, สถิต สิริสิงห์. ผู้เรียบเรียง. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2535: น. 161-172.

[2] Alan Garen. Physiological Effects of rII Mutation in Bacteriophage T4. Virology 1961; 14: 151-163.

[3] วิภา ตังคนานนท์. ไวรัสวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, 2540.

[4] Pelczar,M.J. and E.C.S. Chan. Laboratory Exercises in Microbiology. 4th ed. Mogan Hill Book company, NewYork, 1965.

[5] พิมพ์สุดา อุดคำมี, ศิริธร เลิศพานิช. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเพาะเลี้ยง Bacteriophage T4r เพื่อเพิ่มขนาดของ plaque. โครงการปัญหาพิเศษวิทยา-ศาสตรบัณฑิตภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, 2545: 1-59.

[6] SPSS Inc. SPSS® Base 10.0 User's Guide Chicago, IL . 1999.

[7] Adams, M.H. Bacteriophages. Interscience publishers,New York,1959.

[8] Herriott, R.M. "Nucleic acid-free T2 virus "ghosts" with specific biological action". J. Bacteriol 61.1951: pp. 752.