บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. <u>การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์</u>

1.1 <u>ศึกษาหาชนิดบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม</u>

เซลล์ Z. mobilis CM 141 ที่ทำ suspension ใน 0.06 M phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.2 M glycerol ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและยังคงมีชีวิตอยู่ ส่วนเซลล์ Z. mobilis CM 141 ที่ทำ suspension ใน 0.01 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % ส่วนใหญ่รูปร่างเปลี่ยนไปมีลักษณะเป็นก้อนผิวขรุขระคล้ายตกสะเก็ดเซลล์เกาะติดกันเป็นกลุ่ม ๆ มีเซลล์บางส่วนยังคงมีรูปร่างเป็นแท่งอย่างเดิม แสดงว่า Tris-HCl buffer เหมาะสมกว่า phosphate buffer

1.2 <u>ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์</u>

ผลจากการใช้ Tris-HCl buffer ที่แบ่งความเข้มข้นเป็น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.01 และ 0.001 M pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % พบว่าเซลล์ Z. mobilis CM 141 ที่ทำ suspension ใน 0.1 M Tris-HCl buffer ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ส่วนเซลล์ Z. mobilis CM 141 ที่ทำ suspension ใน 0.01 M Tris-HCl buffer ลักษณะเซลล์เปลี่ยนแปลงเหมือนผลการวิจัยในข้อ 1.1 และเซลล์ Z. mobilis ที่ทำ suspension ใน 0.001 M Tris-HCl buffer เปลี่ยนแปลงมีลักษณะเป็นก้อนที่มีผิวขรุขระน้อยลงแต่เซลล์ยังคงเกาะติดกันเป็นกลุ่ม ๆ แสดงว่า 0.01 M Tris-HCl buffer เหมาะสมที่สุดในการทดลอง

1.3 <u>ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ K_2 EDTA</u>

เซลล์ Z. mobilis ที่ทำ suspension ใน 0.001 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % เมื่อเติม lysozyme และ K_2 EDTA ลงไปได้ผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนี้คือ ใน 0.1 M K_2 EDTA ทำให้เซลล์เกาะกลุ่มตายเป็นส่วนใหญ่ บางเซลล์แตกอย่างเห็นได้ชัด ส่วนใน 0.01 M K_2 EDTA ดีที่สุดคือ เซลล์มีลักษณะเป็นก้อนผิวขรุขระน้อยลง บางส่วนของเซลล์ใสเป็นลักษณะของสฟีโรพลาสต์ แต่เซลล์ยังคงเกาะติดกันเป็นกลุ่ม ๆ และใน 0.001 M K_2EDTA เซลล์มีลักษณะเป็นสฟีโรพลาสต์เช่นกัน แต่เกิดน้อยกว่า

1.4 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaCl

เซลล์ Z. mobilis CM 141 ที่ทำ suspension ใน 0.001 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % เมื่อเติม lysozyme แล้วจึงเติม NaCl และสุดท้ายเติม 0.01 M K_2 EDTA ได้ผลดังนี้คือ การเติม NaCl 1 % ไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงเลย ส่วนการเติม NaCl 0.5 % ได้ผลการทดลองดีที่สุดคือทำให้เซลล์เปลี่ยนไปเป็นโปโตพลาสต์มีรูปร่างกลมใส เซลล์ไม่เกาะติดกันจะแยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และการเติม NaCl 0.2 % ทำให้เซลล์เป็นลักษณะสฟีโรพลาสต์ รูปรี ผนังเซลล์บางส่วนยังเหลืออยู่อย่างเห็นได้ชัด

1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เซลล์ Z. mobilis CM 141 ที่ทำ suspension ใน 0.001 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % เมื่อเติม lysozyme แล้วเติม NaCl 0.5 % สุดท้ายเติม 0.01 M K_2 EDTA pH 7.0 ได้ผลดังนี้คือ ชุดที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เซลล์เปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลมใส ลักษณะสมบูรณ์กว่า และจำนวนมากกว่าการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ

1.6 การหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์

ผลจากการใช้ Lysozyme ความเข้มข้น 5 ระดับ เกิดโปรโตพลาสต์ของเชื้อ Z. mobilis CM 141 ; IFO 13756 ตามตารางที่ 6 และตารางที่ 7 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์มากที่สุดสำหรับ Z. mobilis CM 141 และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์มากที่สุดสำหรับ Z. mobilis IFO 13756

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์ของ Z. mobilis CM 141

Lysozyme (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% ของโปรโตพลาสต์ ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
2.0	73.93	74.80	64.63	71.12
1.0	91.96	90.49	84.89	89.11
0.5	85.40	78.51	79.00	80.97
0.2	65.25	74.07	69.13	69.48
0.1	51.21	51.55	53.66	52.14

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์ของ Z. mobilis IFO 13756

Lysozyme (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% ของโปรโตพลาสต์ ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
2.0	66.93	55.39	69.58	63.96
1.0	77.35	78.51	76.19	77.35
0.5	81.14	82.15	82.45	81.91
0.2	56.66	77.28	67.00	66.98
0.1	538.91	40.50	59.31	46.24

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ศึกษาการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

เมื่อทำการเจือจางโปรโตพลาสต์ทั้งของ Z. mobilis CM 141 และ IFO 13756 ในน้ำกลั่นแล้วทำ spread plate บนอาหาร YPG agar และทำการเจือจางโปรโตพลาสต์ของเชื้อทั้งสองใน 0.001 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % แล้วทำ sprend plate บนอาหาร YPG agar ที่มีซูโครส 20 % และ YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol และ YPG agar ที่มี 0.5 M lactose แล้วพบว่าลำดับความเจือจางที่ 10^{-4} สามารถสังเกตและนับโคโลนีได้ง่าย โดยสังเกตเห็นโคโลนีได้ชัดในเวลา 4 ถึง 5 วัน

เชื้อที่เกลี่ยบน YPG agar จะเจริญได้เฉพาะเซลล์ที่ต้านทาน lysozyme ตามภาพที่ 3 และ 5

เชื้อที่เกลี่ยบน YPG agar ที่มีซูโครส 20 % เจริญได้แต่ไม่เห็นเป็นโคโลนี เนื่องจากอาหารวุ้นเหลวเยิ้ม

เชื้อที่ spread plate บน YPG agar ที่มี 0.5 M lactose สามารถเจริญได้เห็นเป็นโคโลนีตามภาพที่ 7 และ 8

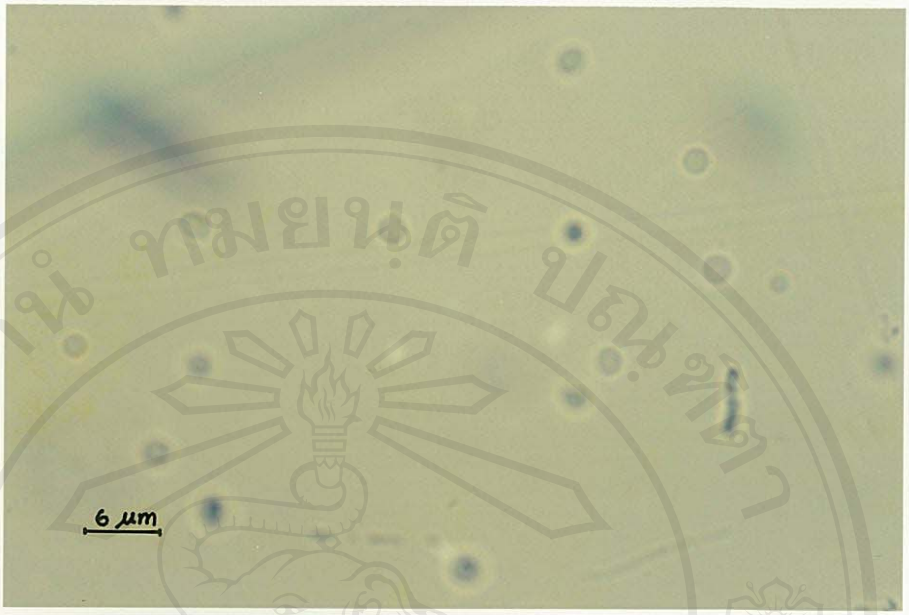
เชื้อที่เกลี่ยบน YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol สามารถเจริญได้เห็นเป็นโคโลนีตามภาพที่ 4 และ 6 แล้วทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์เดิมได้ตามตารางที่ 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 แสดงการหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ของ *Z. mobilis* CM 141 และ IFO 13756

	จำนวนโคโลนีบน YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol 4 จาน	จำนวนโคโลนีบน YPG agar 4 จาน	จำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ 80%
Z. mobilis CM 141	169	66	103	39.01
Z. mobilis IFO 1375 6	151	52	99	47.59

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโปรโตพลาสต์ของ Z. mobilis CM 141

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโปรโตพลาสต์ของ Z. mobilis IFO 13756

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 แสดงโคโลนีของ Z. mobilis CM 141 ที่ต้านทาน lysozyme เจริญบนอาหาร YPG agar

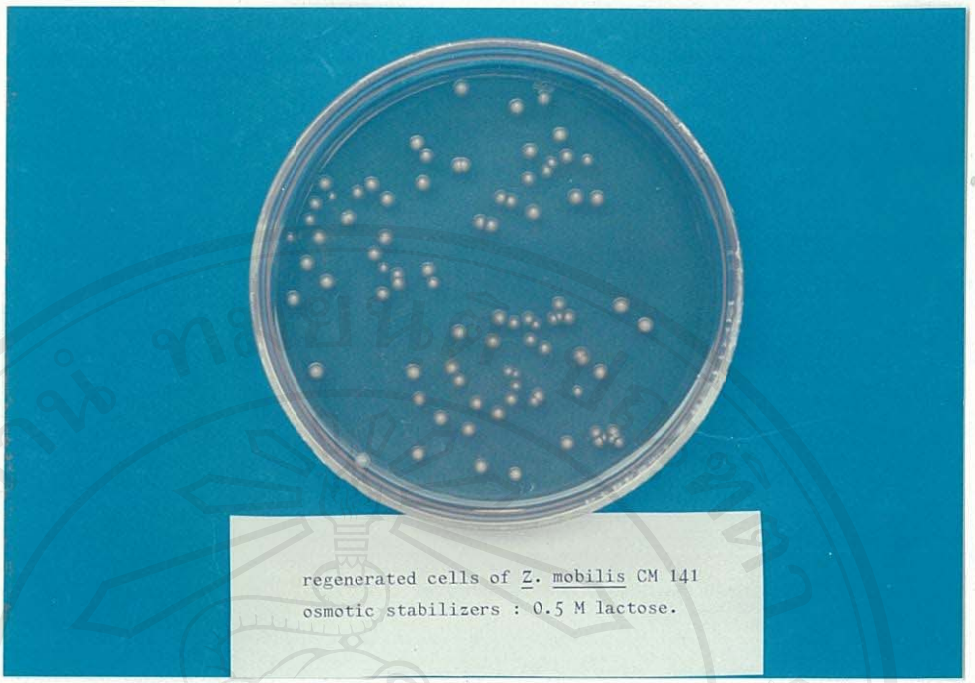
ภาพที่ 4 แสดงโคโลนีของ Z. mobilis CM 141 เจริญบนอาหาร YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

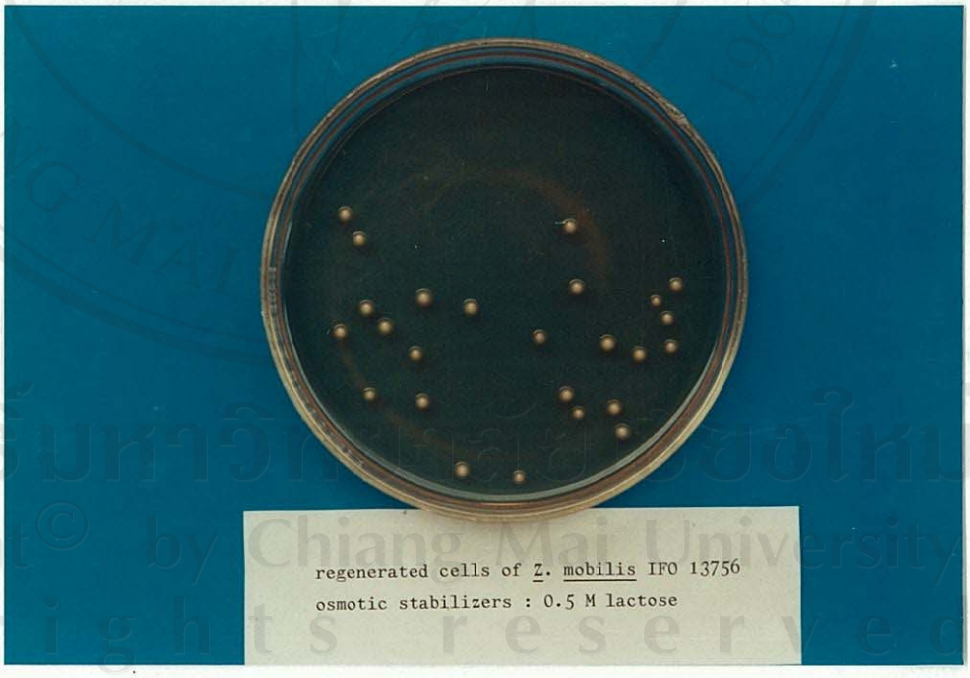
ภาพที่ 5 แสดงโคโลนีของ Z. mobilis IFO 13756 ที่ต้านทาน lysozyme เจริญบนอาหาร YPG agar

ภาพที่ 6 แสดงโคโลนีของ Z. mobilis IFO 13756 เจริญบนอาหาร YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 7 แสดงโคโลนีของ Z. mobilis CM 141 เจริญบนอาหาร YPG agar ที่มี 0.5 M lactose



ภาพที่ 8 แสดงโคโลนีของ Z. mobilis IFO 13756 เจริญบนอาหาร YPG agar ที่มี 0.5 M lactose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved