บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

1. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

1.1 ชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

จากการใช้ 0.06 M phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.2 M glycerol เตรียม suspension ของ Z. mobilis CM 141 ปรากฏว่าเซลล์รูปร่างไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าการทดสอบในขั้นตอนนี้ phosphate buffer ไม่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เตรียมโปรโตพลาสต์ ส่วนการใช้ 0.01 M Tris HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % (TBS) มาเตรียม suspension ของเชื้อ Z. mobilis CM 141 ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นก้อนผิวเซลล์ขรุขระคล้ายผิวแตกสะเก็ดและเซลล์เกาะติดกันเป็นกลุ่ม ๆ แสดงว่า TBS มีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์ Z. mobilis เกิดเป็นสฟีโรพลาสต์และโปรโตพลาสต์ได้ จึงเลือก TBS เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และจากการทดลองของ Weiss (1976) และงานวิจัยของ Birdsell และ Cota-Robles (1967) ก็เลือกใช้ TBS ทำการเตรียมสฟีโรพลาสต์และโปรโตพลาสต์ของเชื้อ E. coli B แบคทีเรียกรัมลบรูปแท่งเช่นเดียวกับ Z. mobilis

1.2 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

จากการเลือกใช้ TBS และแบ่งความเข้มข้นเป็น 3 ระดับ พบว่าการใช้ TBS ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01 M ไม่ได้มีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์มีลักษณะเกิดเป็นโปรโตพลาสต์ ส่วนการใช้ 0.001 M TBS ทำให้เซลล์ Z. mobilis มีแนวโน้มเป็นโปรโตพลาสต์มากขึ้น เพราะผิวเซลล์ขรุขระลดลงกว่าการใช้ 0.01 M TBS ซึ่งก็ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Okamoto et al (1983) ที่เลือกใช้ 0.003 M TBS ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ Streptococcus lactis ที่เป็นแบคทีเรียกรัมบวก แต่ส่วนมากแล้วมีการใช้ 0.01 M TBS ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 <u>ความเข้มข้นของ K_2 EDTA ที่เหมาะสม</u>

K_2 EDTA ที่เติมใน suspension ของ <u>Z. mobilis</u> CM 141 (1 : 10, ปริมาตร K_2 EDTA ต่อปริมาตร suspension) หลังจากเติม lysozyme แล้วประมาณ 15 นาที นั้น การใช้ 0.1 และ 0.001 M K_2 EDTA ไม่ทำให้เซลล์มีแนวโน้มที่จะเป็นโปรโตพลาสต์ ส่วนการใช้ 0.01 M K_2 EDTA ปรากฏว่าทำให้เซลล์เกิดเป็นลักษณะ spheroplast มีแนวโน้มที่จะเป็นโปรโตพลาสต์มากขึ้น แม้ว่าเซลล์ยังคงเกาะกลุ่มกันอยู่ และในงานวิจัยของ Weiss (1976) ที่ใช้ 0.01 M K_2 EDTA ในการเตรียมโปโตพลาสต์ของ <u>E. coli</u> ML 30 เช่นเดียวกับ Birdsell และ Cota-Robles (1967) ซึ่งใช้ 0.01 EDTA เตรียมสฟีโรพลาสต์ของ <u>E. coli</u> B ด้วย

1.4 <u>ความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสม</u>

จากการใช้ 0.001 M TBS เตรียม suspension ของ <u>Z. mobilis</u> CM 141 แล้วเติม lysozyme ตามด้วย 0.01 M K_2 EDTA ผลก็ยังไม่สามารถทำให้เกิดเป็นโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ได้ เพราะเกิดเป็นสฟีโรพลาสต์เท่านั้น จึงได้ทำการเติม NaCl ลงไปใน suspension ด้วย ปรากฏว่า NaCl 1.0 % ไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเลย ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าความเข้มข้นที่มากเกินไปของ NaCl มีผลทำให้ lysozyme กับ K_2 EDTA ไม่สามารถสลายผนังเซลล์ได้เลย ส่วนการใช้ NaCl 0.2 % ทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นสฟีโรพลาสต์ และในการใช้ NaCl 0.5 % ทำให้เซลล์เกิดเป็นโปรโตพลาสต์สมบูรณ์ที่สุดคือ เซลล์มีลักษณะกลมใส และพบว่าการใช้ NaCl นี้ยังทำให้เซลล์โปรโต-พลาสต์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ จากงานวิจัยของ Chen et al (1986) ได้ทำการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ <u>Enterococcus faecium</u> พบว่าการเติม NaCl 0.5 % หลังจากเติม lysozyme แล้วจึงจะทำให้เกิดเซลล์โปรโตพลาสต์ และงานวิจัยของ Metcalf และ Deibel (1969) พบว่าเชื้อ <u>Streptococcus faecium</u> ที่เติม lysozyme ลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปแล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 นาที จึงเติม NaCl 0.5 ถึง 1.0 % จะทำให้เกิดการสลายเซลล์อย่างรวดเร็ว

1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการใช้ 0.001 M TBS เตรียม suspension ของ Z. mobilis CM 141 แล้วเติม lysozyme จากนั้นเติม NaCl 0.5 % แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 10 นาที จึงเติม 0.01 M K_2 EDTA นำเชื้อไปบ่มพบว่าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เซลล์เกิดโปรโต-พลาสต์ได้ลักษณะที่สมบูรณ์กว่าการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ อาจจะเป็นเพราะว่าการทำงานของ lysozyme ร่วมกับ K_2 EDTA ในการย่อยสลายผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ มีความเหมาะสมกว่า แม้ว่างานวิจัยในการเตรียมโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่จะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ

1.6 การหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์

เมื่อความเข้มข้นของ lysozyme เป็น 2.0, 1.0, 0.5, 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า Z. mobilis Cm 141 เกิดโปรโตพลาสต์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยแล้ว 71, 89, 80, 69 และ 52 % ตามลำดับ ส่วนเชื้อ Z. mobilis IFO 13756 เกิดโปรโตพลาสต์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยแล้ว 63, 77, 81, 66 และ 46 % ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นของ lysozyme ที่ใช้ในช่วง 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้โปรโตพลาสต์ทั้งสองสายพันธุ์ได้มากที่สุด แต่ถ้าความเข้มข้น lysozyme มากหรือน้อยกว่านี้จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์ลดลง อาจเป็นเพราะว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนที่พอเหมาะระหว่างปริมาณของเชื้อกับความเข้มข้นของ lysozyme ด้วย จากงานวิจัยของ Okamoto et al (198) พบว่าการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ Streptococcus lactis นั้น ความเข้มข้น lysozyme ที่เหมาะสมเป็น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าความเข้มข้นมากหรือน้อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กว่านี้โปรโตพลาสต์เกิดน้อยลง Metcalf และ Deibel (1969) พบว่าการใช้ lysozyme เข้มข้น 10 ถึง 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เชื้อ Streptococcus faecium เกิดการสลายเซลล์ได้ แต่เมื่อความเข้มข้น lysozyme เพิ่มขึ้นจาก 40 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะไม่มีการสลาย จากงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์อีกหลายคนแสดงให้เห็นว่าเชื้อแต่ละชนิดจะใช้ความเข้มข้นของ lysozyme ที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ไม่เท่ากัน และถ้าหากความเข้มข้นของ lysozyme มากหรือน้อยกว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วก็ไม่สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้

อนึ่ง การเตรียมโปรโตพลาสต์จะทำได้ง่ายในแบคทีเรียกรัมบวกเป็นส่วนใหญ่ เพราะชั้น peptidoglycan อยู่นอกสุดของเซลล์สามารถสัมผัสกับ lysozyme ได้ทันที ส่วนแบคทีเรียกรัมลบนั้นมีชั้นของ lipopolysaccharide กับ lipoprotein หุ้มอยู่ด้านนอก จึงยากต่อการที่ lysozyme จะเข้าไปถึงชั้น peptidoglycan ต้องใช้สาร chelating agent เช่น EDTA ทำลายชั้นนอกสุดเพื่อช่วยให้ lysozyme เข้าไปย่อยสลาย peptidoglycan ได้ แต่ถึงกระนั้นในรายงานวิจัยแบคทีเรียกรัมลบก็จะทำให้เกิดเพียงสฟีโรพลาสต์เท่านั้น และ Weiss (1976) ก็ได้ประสบผลสำเร็จในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ E. coli ML 30 และงานวิจัยเตรียมโปรโตพลาสต์ของ Z. mobilis เป็นข้อมูลในการเตรียมโปรโตพลาสต์ในแบคทีเรียกรัมลบซึ่งในการเตรียมนี้ได้ข้อมูลที่น่าสนใจหลายประการเช่น

1. อายุของเชื้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ใช้เชื้ออายุประมาณ 12 ชั่วโมง และได้ทดลองใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองด้วยวิธีเดียวกันก็ไม่เกิดโปรโตพลาสต์

2. ความหนาแน่นของเชื้อที่เหมาะสม ทำได้โดยนำเชื้อจากที่ เพาะเลี้ยงใน YPG broth 10 มิลลิลิตร มาแบ่งออกเป็นสองส่วน ๆ ละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแมคการ์ดนี นำไปเหวี่ยงให้เชื้อตกตะกอนแล้วแต่ละส่วนทำ suspension ให้มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. อุณหภูมิที่คงที่ขณะบ่มเชื้อ จากอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 °ซ ที่ใช้บ่มเชื้อและคงที่ตลอดเวลาที่ทำการทดลองมีผลทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด และ

4. คือ การเติม NaCl 0.5 % ทำให้ suspension มีสภาพของอิออนที่เหมาะสมต่อการทำงานของ lysozyme ร่วมกับ K_2 EDTA

2. <u>ศึกษาการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์</u>

การเจือจางโปรโตพลาสต์ในน้ำกลั่นทำให้เซลล์โปรโตพลาสต์แตกเมื่อนำไป spread plate บนอาหาร YPG agar โคโลนีที่เจริญเป็นของเซลล์ปกติที่ต้านทาน lysozyme เท่านั้น ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เจือจางใน 0.001 M TBS เมื่อ spread plate บนอาหาร YPG agar ที่มีสารช่วยป้องกันการแตก (osmotic stabilizers) โคโลนีที่เจริญจะมีทั้งของเซลล์โปรโตพลาสต์และเซลล์ต้านทาน lysozyme ทำให้สามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์อย่างประมาณได้โดยคิดจากโปรโตพลาสต์ที่เกิด 80 %

เชื้อที่เจริญบน YPG agar ที่มีซูโครส 20 % ไม่สามารถเห็นเป็นโคโลนีได้ และอาหารเหลวเยิ้ม อาจเนื่องจากการใช้น้ำตาลซูโครสของ <u>Z. mobilis</u> ทำให้เกิดสารประกอบบางชนิดที่มีผลทำให้ agar เหลวเยิ้มได้ ดังนั้นซูโครสจึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็น osmotic stabilizers ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ <u>Z. mobilis</u> เพื่อเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ เชื้อที่เจริญบน YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol และ YPG agar ที่มี 0.5 M lactose จะเห็นเป็นโคโลนีโดยไม่แตกต่างกันเลย จึงสามารถใช้ทั้ง glycerol หรือ lactose เป็น osmotic stabilizers ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ <u>Z. mobilis</u> เพื่อเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ และได้ทดลองใช้ YPG agar ที่มี 0.5 M NaCl ปรากฏว่าเชื้อไม่เจริญแสดงว่า 0.5 M NaCl ทำให้เชื้อตายหมด เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ในอาหาร YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol ของ <u>Z. mobilis</u> CM 141 และ IFO 13756 เป็น 39 และ 47 % ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ และการเปลี่ยนโปรโต-พลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ของ Z. mobilis CM 141 และ IFO 13756 ในการวิจัยครั้งนี้น่าจะช่วยในการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ หรือกับสายพันธุ์อื่น ๆ เข้าด้วยกันเพื่อให้ได้ลักษณะใหม่ที่อาจจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาขั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมสารละลาย lysozyme ด้วย Tris-HCl buffer ก่อนนำไปใช้นั้นปรากฏว่าทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ไม่ดี จึงใช้วิธีการเติมผง lysozyme ลงใน suspension ของเชื้อทันทีแล้วจึงเขย่าให้ละลาย

2. ปกติ 0.001 M Tris-HCl buffer นั้นค่า pH เท่ากับ 7.5 เมื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายเข้มข้นของ NaOH แล้วจึงจะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ดี

3. การล้างโปรโตพลาสต์เพื่อป้องกันการแตกของโปรโตพลาสต์จะใช้ 0.001 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % เท่านั้น แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ถ้าหมุนเหวี่ยงเชื้อด้วยความเร็วมากกว่านี้ โปรโตพลาสต์มีโอกาสแตกได้

4. ลักษณะเชื้อที่อยู่ในช่วงพอดีสำหรับนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์คือ สังเกตความขุ่นของ YPG broth จะขุ่นสม่ำเสมอ แต่ถ้าเชื้อเริ่มจะตกตะกอนโดยส่วนบนของอาหารเหลวจะใส แสดงว่าอายุเชื้อมากเกินไปไม่สามารถเตรียมโปรโตพลาสต์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved