



การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติคแบคทีเรียโอฟาจสำหรับการควบคุม *Staphylococcus aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม

โดย

นายพีระพัฒน์ แจ่มพะเนียด



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร



การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติคแบคทีเรียโอฟาจสำหรับการ
ควบคุม *Staphylococcus aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LYTIC BACTERIOPHAGE FOR
BIOCONTROL OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN MILK AND DAIRY PRODUCTS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2017
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติคแบคทีเรียโอฟาจสำหรับ
	การควบคุม <i>Staphylococcus aureus</i> ในนมและผลิตภัณฑ์นม
โดย	พีระพัฒน์ แจ่มพะเนียด
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	
.....	ประธานกรรมการ
(ดร. พรศรี เจริญพานิช)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)	
.....	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง วันดี เทียงธรรม)	

58401208 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : การควบคุมทางชีวภาพ, นมและผลิตภัณฑ์นม, แบคทีเรียโอฟาจ, สเตปไฟโลคอคคัส

นาย พีระพัฒน์ แจ่มพะเนียด: การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติคแบคทีเรียโอฟาจ สำหรับการควบคุม *Staphylococcus aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท

Staphylococcus aureus เป็นสปิชีส์หนึ่ง ซึ่งมีความสามารถในการก่อโรคได้รุนแรงที่สุดในสกุล *Staphylococcus* การปนเปื้อนเชื้อนี้สามารถพบได้บ่อยครั้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในนมและผลิตภัณฑ์นม โดยทั่วไปการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในอุตสาหกรรมอาหาร มักใช้สารเคมี และ/หรือ ยาปฏิชีวนะเป็นหลัก วิธีการควบคุมดังกล่าวมักก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบ ได้แก่ การก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งนำไปสู่การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย และก่อให้เกิดปัญหาในด้านความปลอดภัยของผู้บริโภค รวมทั้งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการตกค้างของสารเคมี ในปัจจุบันการใช้แบคทีเรียโอฟาจสำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจซึ่งไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อผลิตภัณฑ์อาหาร ผู้บริโภค หรือสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* 01 ซึ่งคัดแยกได้จากนมดิบโดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสัตว์หนองโพ จังหวัดราชบุรี พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้ สำหรับเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ควบคุม *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม จากตัวอย่าง 105 ตัวอย่างซึ่งถูกเก็บมาสำหรับคัดแยกไลติคแบคทีเรียโอฟาจทั้งหมด น้ำดื่มโค ของเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ รวมถึงน้ำทิ้งจากร้านค้าในตลาดสดทั้งในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี พบไลติคแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* 01 ทั้งหมด 23 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ได้แบคทีเรียโอฟาจทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง (Sau_RP01- Sau_RP30) จากผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 30 ตัวอย่าง ในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นพบว่าแบคทีเรียโอฟาจ 21 ตัวอย่าง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้แบคทีเรียโอฟาจทุกตัวอย่างไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียข้ามสกุลได้ จากการศึกษาลักษณะจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง พบว่าจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้มีขนาดใหญ่กว่า 19 kbp เมื่อเปรียบเทียบกับ Lambda DNA/Styl marker จากการวิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *EcoRI*, *Styl*, *HindIII* และ *SacI* ทำให้สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียโอฟาจได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังใช้ผลจากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นประกอบการตัดสินใจเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 มีระดับการเกิดโซนใสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือก

แบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง จัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* การศึกษาผลของอัตราส่วนแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ในการติดเชื้อ (multiplicity of infection, MOI) พบว่าแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้ มีอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้ออยู่ที่ MOI 0.1 อีกทั้งที่ MOI 0.1 แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ถึง $10.32 \pm 0.27 \log \text{CFU/ml}$ เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียโอฟาจตัวอย่างอื่น ๆ ณ เวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ถึง $12.03 \pm 1.08 \log \text{PFU/ml}$ ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สำหรับการศึกษาต่อไป จากผลการศึกษาการเจริญของ แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีระยะแฝง (latent period) เท่ากับ 30 นาที และค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ (Burst size) เท่ากับ $901.27 \pm 244.28 \text{ PFU/infected cell}$ การศึกษาผลของอุณหภูมิและ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่กว้าง ตั้งแต่ pH 5-10 จากการทดลองการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมโคพาสเจอร์ไรส์ โดยจำลองสภาวะการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งในปริมาณสูงและต่ำ พบว่าการใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (10^8 PFU/ml) สำหรับการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีระดับการปนเปื้อนสูง (10^7 CFU/ml) สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ $1.44 \pm 0.51 \log \text{CFU/ml}$ ตั้งแต่ชั่วโมงแรกและลดได้ $3.81 \pm 0.16 \log \text{CFU/ml}$ ในชั่วโมงที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม ขณะที่การจำลองสภาวะการปนเปื้อนในระดับต่ำ (10^4 CFU/ml) พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ $1.95 \pm 0.13 \log \text{CFU/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม ตั้งแต่ชั่วโมงแรกและลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 8 อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลองในทั้งสองชุดการทดลอง

58401208 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : BACTERIOPHAGE, BIOCONTROL, MILK AND MILK PRODUCTS,
STAPHYLOCOCCUS

MR. PHIRAPHAT CHAENGPHANIAD : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
LYTIC BACTERIOPHAGE FOR BIOCONTROL OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN MILK AND
DAIRY PRODUCTS THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR RUJIKAN NASANIT, Ph.D.

Staphylococcus aureus is one of the most virulent species in the genus *Staphylococcus*. The contamination of this bacterium can be frequently found, especially in milk and dairy products. Generally, chemicals and/or antibiotics have been used to control foodborne pathogens in food industry. These methods often have negative effects. They can cause mutation which leads to antibiotic resistances of bacteria and negative impact on consumer health as well as the environmental impact due to chemical residues. Nowadays, using bacteriophages for control of pathogenic bacteria is an interesting alternative because it has no negative effect on food products, consumers or environment. Therefore, this study aimed to isolate bacteriophages specific to *S. aureus* 01 isolated from raw milk obtained from Nong Pho Veterinary Clinic, Ratchaburi province. In addition, some properties of *S. aureus* 01-specific bacteriophages were investigated as the guideline for controlling *S. aureus* in milk and dairy products. A total of 105 samples were collected for bacteriophage isolation. These include raw milk, livestock drinking water, waste from livestock farms samples as well as sewage samples from shops in fresh food markets in Nakhon Pathom and Ratchaburi provinces. *S. aureus* 01-specific bacteriophages were found in 23 out of 105 samples. Thirty sample of lytic bacteriophages (Sau_RP01- Sau_RP30) were obtained after purification process. The host range tests of all 30 isolates showed that 21 isolates could infect all *S. aureus* strains used in this study. In addition, all bacteriophage isolates had no cross-genus infectivity. The genomes of these bacteriophages were larger than 19 kbp compared to Lambda DNA/Styl marker. The restriction analysis of bacteriophage genome using 4 restriction enzymes which included *EcoRI*, *Styl*, *HindIII* and *SacI* could classify these bacteriophages into 10 groups. Nonetheless, the results of host range test were also used for selection of bacteriophages for further studies. It was found that Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15

and Sau_RP29 produced the largest clear zones level. These 4 bacteriophages were therefore selected for the morphological study under the transmission electron microscopy. The results showed that these bacteriophages were members of *Siphoviridae* family. The determination of multiplicity of infection (MOI) indicated that the optimal MOI of these bacteriophages were at MOI 0.1. In addition, at this MOI, Sau_RP15 could reduce *S. aureus* 01 titer by 10.32 ± 0.27 log CFU/ml when compared to the controlled experiment within 2 h which was higher than other bacteriophages. Moreover, the titer of this bacteriophage also increased by 12.03 ± 1.08 log PFU/ml within 5 h. Therefore, Sau_RP15 was selected for further studies. The single-step growth curve of Sau_RP15 revealed that Sau_RP15 had 30 min of latent period and burst size of 901.27 ± 244.28 PFU/infected cell. The effects of temperature and pH on the survival of Sau_RP15 showed that Sau_RP15 was stable at 4, 28 and 37 °C and in the broad pH range of 5-10. The control of *S. aureus* 01 in pasteurized milk samples showed that at high contamination level (10^7 CFU/ml) Sau_RP15 could reduce *S. aureus* 01 titer by 1.44 ± 0.51 log CFU/ml after the first hour of treatment and by 3.81 ± 0.16 log CFU/ml at 8 hours when compared to the controlled experiment. At low contamination level (10^4 CFU/ml) Sau_RP15 reduced *S. aureus* 01 titer by 1.95 ± 0.13 log CFU/ml after the first hour of treatment and *S. aureus* 01 titer could not be detected at 8 hours. However, the bacteriophage titers were relatively constant throughout the experimental period in both cases.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผศ.ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยดูแลและให้คำปรึกษามาตลอด และยังใส่ใจในทุกปัญหาที่ผู้วิจัยได้ประสบพบเจอ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ด้วยความจริงใจ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. บุชราภรณ์ งามปัญญา และ รศ.ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อ.สพ.ญ. วันดี เทียงธรรม ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ อ.ดร.พรศรี เจริญพานิช ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้ความรู้คำแนะนำในเรื่องต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณพิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเขย และคุณนุชนาฏ เลี้ยงอำนวย เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมีต่าง ๆ เพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณวัลพิไล ยอดยิ่งทวีลาภ และคุณศิลา ศรียา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกติดต่อประสานงานในการดำเนินการยื่นคำร้องต่าง ๆ จนสำเร็จลงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณเอกชัย สร้อยน้ำ เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ ซึ่งให้โฮสต์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ยังคอยให้คำปรึกษาและติดตามผลเสมอมา

และที่สำคัญที่สุด ขอขอบพระคุณ คุณแม่พรทิพย์ แจ้งพะเนียด ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ รวมถึงแรงผลักดันต่าง ๆ ที่ทำให้ผู้วิจัยมีชีวิตที่ดีเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่เคยทำงานร่วมกันมา คอยร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมาโดยตลอดจนทำให้ผ่านอุปสรรคต่าง ๆ นานามาได้ ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

พีระพัฒน์ แจ้งพะเนียด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ณ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 นมและผลิตภัณฑ์นม.....	5
2.2 การปนเปื้อน <i>Staphylococcus aureus</i> ในนมและผลิตภัณฑ์นม	7
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4 โรคอาหารเป็นพิษสาเหตุจาก <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.5 แนวทางการควบคุม <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.6 แบคทีเรียโอฟาจ	15
2.6.1 ประวัติของแบคทีเรียโอฟาจ	15
2.6.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาจ.....	17
2.7 แนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจสำหรับเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ.....	26

2.8 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียไฟฟ้าเชิงพาณิชย์.....	32
2.8.1 การกำหนดแนวทางเพื่อความปลอดภัยสำหรับการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียไฟฟ้า.....	32
2.8.2 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียไฟฟ้าที่ผ่านการรับรอง.....	34
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	35
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	35
3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	35
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	36
3.2 วิธีการทดลอง.....	37
3.2.1 สายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะการเจริญเติบโต	37
3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียไฟฟ้า.....	38
3.2.3 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียไฟฟ้า.....	39
3.2.4 การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียไฟฟ้า	40
3.2.5 การหาความหนาแน่นของแบคทีเรียไฟฟ้า	40
3.2.6 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียไฟฟ้าในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	40
3.2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไฟฟ้า.....	41
3.2.8 การสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียไฟฟ้า.....	41
3.2.9 การวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียไฟฟ้าโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ...	42
3.2.10 การหาอัตราส่วนของแบคทีเรียไฟฟ้าต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ.....	43
3.2.11 การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียไฟฟ้า.....	44
3.2.12 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียไฟฟ้า	45
3.2.13 การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียไฟฟ้า.....	45
3.2.14 การควบคุม <i>S. aureus</i> 01 ในนมพาสเจอร์ไรส์.....	45
3.2.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	47

บทที่ 4 ผลทดลอง	48
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ	48
4.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	57
4.3 การสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจ	60
4.4 การวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	61
4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ	66
4.6 การหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ	68
4.7 การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ	74
4.8 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ	75
4.9 การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ	76
4.10 การควบคุม <i>S. aureus</i> 01 ในนมโคพาสเจอร์ไรส์	77
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	79
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	87
ภาคผนวก.....	90
รายการอ้างอิง	94
ประวัติผู้เขียน	107



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	คำจำกัดความของนมพร้อมดื่มประเภทต่าง ๆ.....6
2	องค์ประกอบของนมจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทต่าง ๆ.....7
3	พารามิเตอร์แสดงสภาวะการเจริญของ <i>S. aureus</i> และการผลิตเอนโทโรทอกซิน.....11
4	การจัดหมวดหมู่แบคทีเรียโอฟาจที่สามารถติดเชื้อในแบคทีเรียและอาร์เคียตาม เกณฑ์การจัดจำแนกของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส.....21
5	สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....38
6	อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง.....43
7	ผลการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจและลักษณะของพลาซมิด.....50
8	ผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น.....58
9	การจัดกลุ่มแบคทีเรียโอฟาจโดยอาศัยรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> และ <i>Styl</i>63
10	ค่าเฉลี่ยขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29.....66



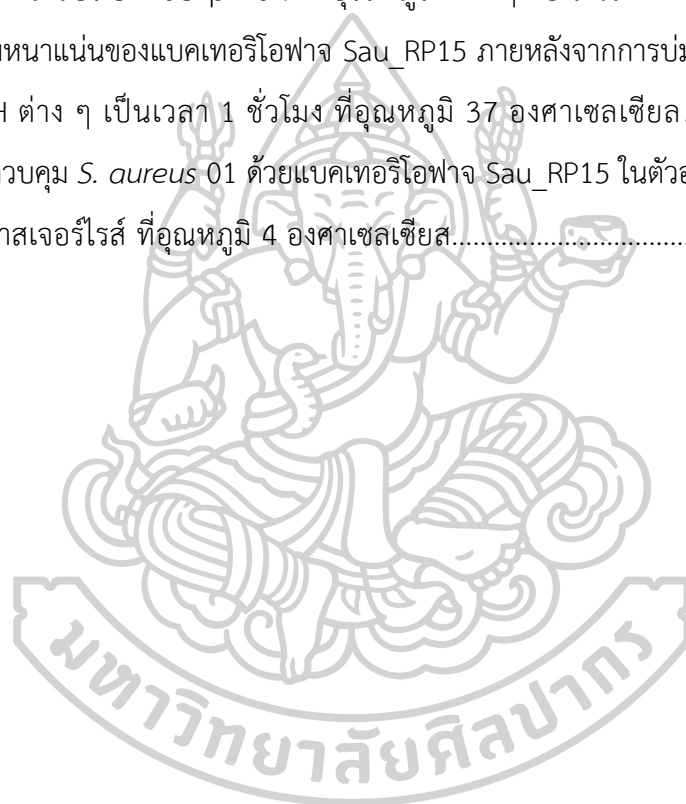
สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1	การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาตามวิธีของ Baltimore.....18
2	การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาตามวิธีของ Bradley.....19
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาในวงศ์ต่าง ๆ.....23
4	วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอฟา.....26
5	ลักษณะของพลาสมิดที่ปรากฏบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย.....48
6	ลักษณะโชนัสที่ปรากฏบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย.....57
7	ผลการสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟา และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis.....60
8	ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Syl</i> และ <i>EcoRI</i> พร้อมทั้งตรวจสอบรูปแบบที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis.....64
9	ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindII</i> และ <i>SacI</i> พร้อมทั้งตรวจสอบรูปแบบที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis.....65
10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน.....67
11	ความหนาแน่นของ <i>S. aureus</i> และ ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟา Sau_RP4 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) ต่าง ๆ ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง.....70
12	ความหนาแน่นของ <i>S. aureus</i> และ ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟา Sau_RP11 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) ต่าง ๆ ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง.....71
13	ความหนาแน่นของ <i>S. aureus</i> และ ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟา Sau_RP15 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) ต่าง ๆ ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง.....72

รูปที่

หน้า

14	ความหนาแน่นของ <i>S. aureus</i> และ ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP29 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) ต่าง ๆ ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง.....	73
15	กราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15.....	74
16	ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายหลังจากการบ่มแบคทีเรียโอฟาจ ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ pH 6.9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	75
17	ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายหลังจากการบ่มแบคทีเรียโอฟาจ ที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	76
18	การควบคุม <i>S. aureus</i> 01 ด้วยแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ในตัวอย่าง นมพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	78





บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่ร่างกายต้องการในแต่ละวัน แต่หากเกิดการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรค ก็อาจส่งผลกระทบต่อร่างกายของผู้บริโภคและอาจทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตได้ อาหารถือเป็นเส้นทางหลักในการส่งผ่านโรคต่าง ๆ ที่มีต้นเหตุมาจากแบคทีเรียก่อโรคมากกว่า 200 โรค (Oliver et al., 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งนมและผลิตภัณฑ์นมที่ถือว่าเป็นเครื่องดื่ม และ/หรือ อาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมและยังเป็นที่ต้องการอย่างมากในกลุ่มผู้บริโภคที่มีความหลากหลายอีกทั้งเหมาะสมกับคนทุกเพศทุกวัย นมและผลิตภัณฑ์นมเป็นแหล่งสำคัญของแคลเซียมและโปรตีนที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต ช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอและยังช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคความดันโลหิต เป็นต้น โดยพบว่าในนมพร้อมดื่ม 100 กรัม จะมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 3.3, 3.5 และ 3.4 กรัมตามลำดับ และยังมีปริมาณแคลเซียม 135 มิลลิกรัม อีกทั้งยังประกอบด้วยสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกายประเภทอื่นอีกหลายชนิด องค์ประกอบทางเคมีเหล่านี้ทำให้มันจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด (Ibrahim et al., 2015) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* และ *Pseudomonas pyocyanea* ซึ่งมักพบได้ทั่วไปในนมดิบ และมีความชุก 75 52 42 36 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Pourhassan and Najafabadi, 2011) จากความชุกที่พบสังเกตได้ว่า *S. aureus* มีความชุกมากที่สุดรองมาจาก *E. coli* อีกทั้ง *S. aureus* ยังเป็นแบคทีเรียก่อโรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ จากรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำปี พ.ศ. 2560 พบว่าปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญมีสาเหตุมาจากอาหารเป็นพิษ *S. aureus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอันดับต้น ๆ ที่ปนเปื้อนในอาหาร และพบการระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้ในประเทศไทยและมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง หากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อน *S. aureus* จะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรง ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจถึงช็อกได้ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคในสัตว์ เช่น โรคเต้านมอักเสบในโคนม ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรโคนมในประเทศไทย เพราะนอกจากจะทำให้คุณภาพของน้ำนมเสื่อมลงแล้ว ปริมาณน้ำนมก็ลดลงอีกด้วย อีกทั้งยังต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการรักษาโรค และเสียเวลาในการทำมาสะอาดอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมไปถึงมีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของเชือดังกล่าวไปยังโคนมตัวอื่น ๆ ในฟาร์ม

โดยทั่วไปแล้ว *S. aureus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 7-48 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสำหรับการแช่แข็งและมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส ได้ดี (Stewart, 2003) อย่างไรก็ตามความสามารถในการมีชีวิตจะลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ -20-0 องศาเซลเซียส อีกทั้ง *S. aureus* จะถูกทำลายได้ด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งเป็นกระบวนการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที โดยสามารถกำจัด *S. aureus* และแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น ๆ ได้ถึง 95-99 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการปนเปื้อน *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นมก็ยังสามารถเกิดขึ้นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารพร้อมรับประทานที่ผลิตมาจากนมดิบ เช่น ชีส ที่พบการปนเปื้อนได้บ่อยครั้ง จากงานวิจัยของ Jamali และคณะ (2015) พบว่าตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นมทั้ง นมโค นมแพะและชีสที่ขายในร้านค้าปลีกทั้งหมด 2650 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* ถึง 328 ตัวอย่าง (12.4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งการปนเปื้อน *S. aureus* ในนมหรือผลิตภัณฑ์นมนี้อาจมีสาเหตุมาจากในระหว่างกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ความร้อนหรือระยะเวลาที่ใช้สำหรับฆ่าแบคทีเรียก่อโรคในนมดิบนั้นอาจไม่เพียงพอ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นโดยตรงกับผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรืออาจเกิดการปนเปื้อนข้ามภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ (Arqués et al., 2005) โดยในกรณีนี้อาจเกิดการปนเปื้อนข้ามจากนมดิบสู่ผลิตภัณฑ์นมที่แปรรูปแล้ว ซึ่งอยู่ในสายการผลิตเดียวกันหรืออาจใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เดียวกันในระหว่างกระบวนการผลิตตั้งแต่กระบวนการแปรรูป การบรรจุ ตลอดจนการเก็บรักษา ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนข้ามทั้งทางตรงและทางอ้อม ยิ่งไปกว่านั้น *S. aureus* หลาย ๆ สายพันธุ์ยังสามารถสร้าง Staphylococcal enterotoxins (SEs) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *S. aureus* โดยทั่วไป SEs จะทำให้เกิดโรคได้ก็ต่อเมื่อมีปริมาณ *S. aureus* อย่างน้อย 10^5 - 10^8 CFU/กรัม หรือ มิลลิลิตร อีกทั้ง SEs ยังสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้สูง ซึ่งนั่นทำให้อุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์ ไม่สามารถทำลายหรือส่งผลกระทบต่อ SEs ได้ (FDA, 2012; Montville and Matthews, 2008) ดังนั้นการควบคุม *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นมจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่าวิธีการควบคุม *S. aureus* จะมีอยู่หลายวิธีทั้งวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมีแต่ก็มักจะส่งผลเสียโดยอาจทำให้เกิดสารตกค้างหรือทำให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Gao et al., 2006) โดยเมื่อเร็ว ๆ นี้การใช้แบคทีริโอเฟจหรือฟาจ (bacteriophage) เพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีการทางเลือกที่ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหาร และไม่ก่อให้เกิดสารตกค้าง (Mahony et al., 2011) อีกทั้งการใช้แบคทีริโอเฟจนั้นมีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค (Monk et

al., 2010) โดยทั่วไปสามารถพบแบคทีเรียโอฟาจได้ในธรรมชาติ โดยแบคทีเรียโอฟาจแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะสูงต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นแบคทีเรียโอฟาจจึงไม่ทำลายหรือมีผลต่อจุลินทรีย์ปกติที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค อีกทั้งยังไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียซึ่งต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้แบคทีเรียโอฟาจยังจัดเป็น obligate parasite คือสามารถเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัสเฉพาะในเซลล์แบคทีเรียที่จำเพาะเท่านั้น จากคุณสมบัติทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียโอฟาจมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) เพื่อลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่อาจปนเปื้อนในอาหารหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลติคแบคทีเรียโอฟาจสำหรับเป็นทางเลือกในการควบคุม *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม และเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคนี้อีกประการหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์

1. คัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus*
2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้
3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้สำหรับการควบคุม *S. aureus* ในนมโคพาสเจอร์ไรส์

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* 01 จากตัวอย่างนมดิบ น้ำดื่มโคลงเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ รวมถึงน้ำทั้งจากร้านค้าในตลาดสดทั้งในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี
2. ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้ทั้งความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะของจีโนม อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ การเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ รวมทั้งผลของอุณหภูมิและ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ
3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้สำหรับการควบคุม *S. aureus* ในนมโคพาสเจอร์ไรส์ โดยจำลองสภาวะการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งการปนเปื้อนในระดับต่ำและการปนเปื้อนในระดับสูง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจควบคุม *S. aureus* ในอุตสาหกรรมนมและอาหาร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัย อีกทั้งเป็นแนวทางสำหรับการป้องกันผลกระทบเชิงลบที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์นี้



บทที่ 2

ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นมและผลิตภัณฑ์นม

นม หรือ นำนม (milk) เป็นของเหลวที่หลั่งออกมาจากต่อมน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพศเมีย ซึ่งในยุคเริ่มแรก มนุษย์ใช้นมแกะ นมแพะ และนมโคสำหรับการบริโภค แต่ในทุกวันนี้หากกล่าวถึงนม คนส่วนใหญ่มักจะเข้าใจไปในทางเดียวกันว่า คือ นมโค ในขณะที่นมแกะหรือนมแพะ มักจะไม่ค่อยได้รับความสนใจในเชิงพาณิชย์มากเท่ากับนมโค

นม สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ นมเหลว (liquid milk) และ นมสำหรับการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม (manufacturing milk) โดยนมเหลว หมายถึง นมที่ใช้สำหรับการบริโภคโดยตรงหรือนมพร้อมดื่ม (drinking milk) ในขณะที่นมสำหรับการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม หมายถึง นมที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์นม เช่น ชีส โยเกิร์ต และ นมผง เป็นต้น (Safefood, 2008) ตามที่สหภาพยุโรปได้ออกประกาศระเบียบคณะมนตรียุโรปที่ 2597/97 ได้ให้คำนิยามเกี่ยวกับนมพร้อมดื่มประเภทต่าง ๆ ดังตารางที่ 1

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายอยู่ตามท้องตลาด มีอยู่ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ นมพาสเจอร์ไรส์ นมสเตอไรส์ และนมยูเอชที ซึ่งแต่ละประเภทมีกระบวนการผลิตและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จากการรายงานของหนังสือพิมพ์ The Nation ประจำวันที่ 23 มิถุนายน ค.ศ. 2017 รายงานว่าในปี ค.ศ. 2015 ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกนมและผลิตภัณฑ์นมมากที่สุดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีมูลค่ามากถึง 33.1 ล้านเหรียญ ซึ่งสวนทางกับอัตราการบริโภคนมของคนไทย ซึ่งพบว่าคนไทยดื่มนมเฉลี่ยเพียง 14 ลิตรต่อคนต่อปี ขณะที่อัตราการบริโภคนมโดยเฉลี่ยของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อยู่ที่ 60 ลิตรต่อคนต่อปี และอัตราการดื่มนมทั่วโลกอยู่ที่ 100 ลิตรต่อคนต่อปี จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร พบว่าความต้องการในการบริโภคนมภายในประเทศมีแนวโน้ม เพิ่มขึ้นร้อยละ 2.13 ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2013-2017 และคาดว่าในปี ค.ศ. 2018 จะมีความต้องการบริโภคถึง 1,233,483 ตัน ซึ่งถือเป็นสัญญาณที่ดี ประกอบกับการสนับสนุนของภาครัฐ โดยขยายโครงการนมโรงเรียน ซึ่งสะท้อนให้เห็นได้จากการจัดสรรงบประมาณของภาครัฐเพื่อจัดซื้อนมให้นักเรียนตั้งแต่ระดับอนุบาลตอนต้นจนถึงประถมศึกษาตอนปลาย อีกทั้งกระทรวงสาธารณสุขยังสนับสนุนให้ดื่มนมให้เหมาะสมกับวัย ตามโภชนบัญญัติ 9 ประการ โดยระบุให้วัยเด็กที่มีอายุอยู่ในช่วง 1-12 ปี ควรดื่มนมวันละ 3 แก้ว แต่ถ้าเป็นวัยรุ่นสาวที่มีอายุประมาณ 13-25 ปี ควรดื่มนมวันละ 3-4 แก้ว และสำหรับผู้ใหญ่ที่มีอายุ 25 ปี ควรดื่มนมไม่น้อยกว่าวันละ 2 แก้ว ซึ่งโดย

เฉลี่ยแล้วทุกคนควรดื่มนมไม่น้อยกว่าวันละ 2 แก้ว แต่สำหรับหญิงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตรควรดื่มนมไม่น้อยกว่าวันละ 3 แก้ว (1 แก้ว เท่ากับ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร) จากงานวิจัยของ Guetouache (2014) พบว่าในนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 100 กรัม จะมีองค์ประกอบของสารอาหารที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 คำจำกัดความของนมพร้อมดื่มประเภทต่าง ๆ (Safefood, 2008)

ประเภท	คำจำกัดความ
นมดิบ (Raw milk)	นมที่ได้จากเต้านมของโคโดยตรงและไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือผ่านกระบวนการให้ความร้อนแต่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส
นมสด (Whole milk)	นมที่ได้จากเต้านมของโคโดยตรงและนำมาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยไม่ได้สกัดเอาไขมันออกทำให้ยังมีไขมันและสารอาหารครบถ้วน
นมพร่องมันเนย (Semi-skimmed milk)	นมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและสกัดไขมันออกไปบางส่วน
นมขาดมันเนย (Skimmed milk)	นมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและสกัดไขมันออกทั้งหมด เหลือเฉพาะโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต
นมสดพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurized milk)	นมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนต่ำแต่ใช้เวลานาน คือไม่ต่ำกว่า 63-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที หรือทำให้ร้อนไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานอย่างน้อย 16 นาที และให้เย็นลงทันที
นมสเตอริไรส์ (Sterilized milk)	นมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลานาน 12 นาที ความร้อนสูงของระบบสเตอริไรส์จะสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้นมเน่าเสีย
นมยูเอชที (UHT)	นมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 135-150 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2-3 วินาที แล้วนำมาบรรจุด้วยขบวนการปลอดเชื้อ ระบบยูเอชทีจะใช้อุณหภูมิสูงแต่ระยะเวลาการฆ่าเชื้อที่สั้นมากเพื่อไม่ให้คุณภาพของน้ำนมเปลี่ยนแปลงไป

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของนมจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทต่าง ๆ ในหน่วยกรัมต่อ100 กรัมของนม (Guetouache et al., 2014)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	องค์ประกอบของนม (กรัมต่อ100 กรัมของนม)				
	น้ำ	โปรตีน	ไขมัน	น้ำตาลแลคโตส	แร่ธาตุต่าง ๆ
โค	87.2	3.5	3.7	4.9	0.72
แกะ	82.7	3.5	6.4	4.7	0.92
แพะ	86.5	3.6	4.0	5.1	0.82
อูฐ	87.7	3.5	3.4	4.7	0.71

องค์ประกอบเหล่านี้เองที่ทำให้นมจัดเป็นอาหารและ/หรือเครื่องดื่มที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเป็นที่นิยมเหมาะสมกับคนทุกเพศทุกวัย อีกทั้งนมยังเป็นแหล่งของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด หากกระบวนการผลิตหรือแปรรูปไม่เหมาะสม นมหรือผลิตภัณฑ์นมนั้น ๆ จะให้โทษต่อผู้บริโภคมากกว่าให้ประโยชน์

2.2 การปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม

เนื่องจากนมและผลิตภัณฑ์นม มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเหมาะสมอย่างยิ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ รวมไปถึงแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคบางชนิด แต่จุลินทรีย์จะปรับตัวไปได้มากเพียงใดขึ้นอยู่กับประเภทของผลิตภัณฑ์ องค์ประกอบทางเคมี การผลิต และการเก็บรักษา เมื่อไม่นานมานี้ อุตสาหกรรมอาหารได้ให้ความสนใจเป็นพิเศษกับ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) โดยมีงานวิจัยหลายฉบับรายงานการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น

งานวิจัยของ Peles และคณะ (2007) ได้คัดแยก *S. aureus* จากถังนมรวมในฟาร์มโคนมประเทศฮังการี จำนวน 20 ฟาร์ม โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี รวมทั้งใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากผลการทดลองพบ *S. aureus* จากถังนมรวมในฟาร์มทั้งหมด 14 ฟาร์ม โดยมีการปนเปื้อนที่ความหนาแน่นมากกว่า 6.0×10^3 CFU/มิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Stephan และคณะ (2002) ซึ่งพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* จากถังนมรวมในฟาร์มประเทศสวิตเซอร์แลนด์ที่ความหนาแน่น 1.0×10^1 – 3.0×10^3 CFU/มิลลิลิตร

งานวิจัยของ ชนินทร์ และคณะ (2552) ได้คัดแยก *S. aureus* จากตัวอย่างนมดิบซึ่งได้จาก

แม่โคที่กำลังให้นมจำนวน 13 ตัว โดยคละอายุ และคละระยะเวลาการให้นม จากฟาร์มคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมจำนวน 13 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 78 ตัวอย่าง โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี จากผลการทดลองพบ *S. aureus* ในตัวอย่างนมดิบที่ความหนาแน่นระหว่าง 4.15-6.52 log CFU/มิลลิลิตร

งานวิจัยของ Fagundes และคณะ (2010) ได้คัดแยก *S. aureus* จากตัวอย่างนมดิบที่ได้จากโคโดยตรงและจากถังนมรวม ณ เมืองเซาเปาโล ประเทศบราซิล ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันและการระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างนมดิบที่ได้จากโคโดยตรง 208 ตัวอย่าง และจากถังนมรวม 37 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 245 ตัวอย่าง พบ *S. aureus* ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.3 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยของ Singh และคณะ (2011) ได้คัดแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียในตัวอย่างนม 100 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาจากร้านขายนม ณ เมืองชาฮิบ ประเทศอินเดีย ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี พบ *S. aureus* ในตัวอย่างนม คิดเป็น 21.4 เปอร์เซ็นต์ จากแบคทีเรียทั้งหมด 280 ไอโซเลตที่คัดแยกได้

งานวิจัยของ Oliveira และคณะ (2011) ได้คัดแยก *S. aureus* จากตัวอย่างนมดิบและนมพาสเจอร์ไรส์จำนวน 70 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บในเมืองริคอนคาโว ไบอาโน รัฐบาเอีย ประเทศบราซิล โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี จากผลการทดลองพบ *S. aureus* ปนเปื้อนในตัวอย่างนมดิบ 34 ตัวอย่างจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ และปนเปื้อนในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ 6 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่าง คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยของ Tarekne และคณะ (2015) ได้คัดแยกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล พร้อมทั้งวัดระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างนมดิบและผลิตภัณฑ์นมจำนวนทั้งสิ้น 310 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากเมืองไทเกอร์ ประเทศเอธิโอเปีย พบ *S. aureus* จากตัวอย่างนมดิบและในผลิตภัณฑ์นมถึง 120 ตัวอย่าง คิดเป็น 38.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยส่วนมากในตัวอย่างที่พบ *S. aureus* จะมีระดับความหนาแน่นเฉลี่ยประมาณ 4.35 ± 0.97 log CFU/มิลลิลิตร

งานวิจัยของ Islam และคณะ (2017) ได้คัดแยก *S. aureus* จากตัวอย่างนมดิบทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจากตลาดในเมืองชามาลปุระ ฆวานคาอิลละ กิโศรคัญชะและเนตรโกนา ประเทศบังกลาเทศ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี รวมทั้งใช้เทคนิคทาง

ชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันและการระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่คัดแยกได้ จากผลการทดลอง พบ *S. aureus* ในตัวอย่างนมทั้งหมด 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์

การตรวจพบ *S. aureus* ในนมหรือผลิตภัณฑ์นมสามารถเป็นตัวชี้วัดถึงอันตรายต่อสุขภาพที่อาจเกิดขึ้นกับผู้บริโภค ณ พื้นที่นั้น ๆ อีกทั้งยังแสดงให้เห็นถึงกระบวนการผลิต การขนส่งหรือการจัดเก็บที่ไม่ถูกสุขลักษณะจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนขึ้น จากงานวิจัยของ Oliveira และคณะ (2011) ได้อธิบายถึงสาเหตุการปนเปื้อน *S. aureus* ในนมดิบว่าโดยส่วนใหญ่ นั้นที่มีการปนเปื้อนมากได้มาจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Peles และคณะ (2007) ซึ่งระบุว่า การปนเปื้อน *S. aureus* ในถัณมนมมีความสัมพันธ์โดยตรงกับภาวะการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดย *S. aureus* จะแพร่กระจายจากเต้านมสู่เต้านม นอกจากนี้ยังสามารถปรับตัว และเจริญได้ดีในเต้านม ทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการอยู่เนิ่น ๆ เชื้อสามารถปนออกมากับน้ำนม และติดต่อไปสู่เต้านมแม่โคตัวอื่น ๆ ในขณะรีดนม โดยพาหะของเชื้อคือ เครื่องรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และมือของผู้รีดนม (Kajaysri et al., 2014) สำหรับประเทศไทยนั้น โรคเต้านมอักเสบถือเป็นปัญหาสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมเนื่องจากแม่โคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบ จะให้ผลผลิตและคุณภาพของน้ำนมลดลง ทำให้เกษตรกรไม่สามารถจำหน่ายน้ำนมได้ จึงเกิดการสูญเสียรายได้ และเกษตรกรเองยังต้องเสียค่าใช้จ่ายเป็นค่ายา และค่าดูแลรักษาโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบอีกด้วย นอกจากนี้เต้านมที่เคยเกิดการอักเสบและหายแล้วมักจะกลับมาผลิตน้ำนมได้น้อยกว่าเดิม ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ต้นทุนในการผลิตน้ำนมดิบสูงขึ้นและทำให้มีโอกาสขาดทุนสูง (จตุพร, 2549)

โดยทั่วไปนมดิบจากถัณมนมรวมมักถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์นมประเภทต่าง ๆ การปนเปื้อน *S. aureus* ในนมดิบนั้นจะส่งผลต่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายทั้งทางตรงและทางอ้อม หากไม่ได้รับการจัดการหรือควบคุมที่ดี ซึ่งการปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ความร้อนหรือระยะเวลาที่ใช้สำหรับฆ่าแบคทีเรียก่อโรคในนมดิบนั้นอาจไม่เพียงพอ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นโดยตรงกับผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรืออาจเกิดการปนเปื้อนข้ามภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ (Arqués และคณะ, 2005) โดยในกรณีนี้อาจเกิดการปนเปื้อนข้ามจากนมดิบสู่ผลิตภัณฑ์นมที่แปรรูปแล้ว ซึ่งอยู่ในสายการผลิตเดียวกันหรืออาจใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เดียวกันในระหว่างกระบวนการผลิตตั้งแต่กระบวนการแปรรูป การบรรจุ ตลอดจนการเก็บรักษา

ในอุตสาหกรรมนม ปัญหาจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อน *S. aureus* เกิดจากการปนเปื้อนหลังการพาสเจอร์ไรส์ *S. aureus* สามารถมีชีวิตรอดได้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิต่ำและบน

อุปกรณ์การผลิต ความสามารถของแบคทีเรียในการมีชีวิตรอดอยู่บนอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิตมักเป็นสาเหตุของการระบาด (Conly and Johnston, 2008)

2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus (Staphyle เป็นคำในภาษากรีก แปลว่า พวงองุ่น) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1883 โดย Ogston หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1884 Rosenbach ใช้คำนี้ในเชิงการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ตามสายวิวัฒนาการหรืออนุกรมวิธาน โดยระบุในระดับสกุล เป็นสกุล *Staphylococcus* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Micrococcaceae* (Shah, 2003; Todar, 2008) ในช่วงปี ค.ศ. 1974 จินัส *Staphylococcus* ประกอบด้วย 3 สปีชีส์ คือ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* (Buchanan and Gibbons, 1974) แต่ละสปีชีส์แตกต่างกันตามคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) การหมักแมนนิทอล (mannitol) ทั้งสภาวะมีและไม่มีอากาศ การสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) และองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Baird-Parker, 1974) ต่อมา Kloos และ Schleifer (1975) ได้คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus* จากมนุษย์และพบ *Staphylococcus* เพิ่มเป็น 11 สปีชีส์ หลังจากนั้นเป็นต้นมา มีงานวิจัยหลายฉบับซึ่งสามารถคัดแยกและระบุสปีชีส์ของ *Staphylococcus* โดยในปี ค.ศ. 1994 จำนวนสปีชีส์ของสกุลนี้เพิ่มขึ้นเป็น 32 สปีชีส์ (Holt et al., 1994)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5-1.5 ไมโครเมตร) ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ โดยทั่วไปมักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้น ๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่น สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศแต่อัตราการเจริญจะช้ากว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Jay, 2000; Shah, 2003) นอกจากนี้ ยังสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอล และผลิตเอนไซม์คัตตาเลส และโคแอกกูเลส บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลทำให้โคโลนีเป็นเมือก (slime) ช่วยให้มีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งเชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เช่น Nutrient agar (NA), Tryptic soy agar (TSA) และ Brain heart infusion agar (BHI) เป็นต้น การเจริญและการอยู่รอดของ *S. aureus* นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ pH ปริมาณน้ำอิสระที่มีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (water activity, a_w) ปริมาณออกซิเจนและองค์ประกอบของอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์แสดงสภาวะการเจริญของ *S. aureus* และการผลิตเอนโทโรทอกซิน (ICMSF, 1996)

พารามิเตอร์	สภาวะการเจริญของ <i>S. aureus</i>		การผลิตเอนโทโรทอกซิน	
	ช่วงที่เหมาะสม	ช่วงที่สามารถเจริญ	ช่วงที่เหมาะสม	ช่วงที่สามารถผลิต
อุณหภูมิ (°C)	37	7-48	40-45	10-48
pH	6-7	4-10	7-8	4.5-9.6
Water activity	0.98	0.83-0.99	0.98	0.87-0.99

S. aureus สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 7-48 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสำหรับการแช่แข็งและมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส ได้ดี (Stewart, 2003) แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการมีชีวิตจะลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ -10-0 องศาเซลเซียส และสามารถถูกทำลายได้ด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรส์หรือกระบวนการปรุงอาหารที่ใช้ความร้อน คุณสมบัติที่สำคัญของ *S. aureus* อีกประการ คือ สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์ เช่น สภาวะแห้งแล้ง ปริมาณน้ำอิสระต่ำ ความเข้มข้นเกลือและความเค็มของสโมติกสูง (high osmotic pressure) *S. aureus* สามารถตอบสนองต่อสภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระต่ำโดยใช้สารประกอบที่สะสมไว้ในเซลล์ (Montville และ Matthews 2008) จึงทำให้เชื้อนี้สามารถเจริญในช่วงที่มีปริมาณน้ำอิสระตั้งแต่ 0.83-0.99 ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวส่งผลให้ *S. aureus* เจริญได้ในอาหารที่หลากหลายรวมถึงอาหารที่ไม่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ หากรับประทานอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนจะก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) (Argaw and Addis, 2015)

2.4 โรคอาหารเป็นพิษสาเหตุจาก *Staphylococcus aureus*

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก โดยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด 250 โรค มีสาเหตุเกิดจากแบคทีเรียก่อโรคถึงสองในสามของการระบาดของโรค (Le Loir et al., 2003) โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *S. aureus* เป็นหนึ่งในโรคที่เกี่ยวข้องกับอาหารที่แพร่หลายมากที่สุดในโลก สาเหตุเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxins) ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตจาก *S. aureus* สารพิษนี้สามารถทนความร้อนและอาจปนเปื้อนในอาหารทั้งที่มีและไม่มี *S. aureus* อยู่ (Balaban and Rasooly, 2000)

S. aureus สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด ทั้ง Panton-Valentine leukocidin (PVL) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำลายเม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบอย่างรุนแรง หรือ hemolysin เป็นโปรตีนที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกออก (Brewer et al., 2008; Iwatsuki et al., 2006) และสารพิษที่ได้รับความสนใจอีกประเภทคือเอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก coagulase-positive *Staphylococcus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. aureus* การสร้างเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* มักจะมีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส กล่าวคือ สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสได้ก็มักจะสร้างเอนเทอโรทอกซินได้ แต่ก็มี *Staphylococcus* บางสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส แต่สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินได้เช่นกัน แต่โดยส่วนใหญ่ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของ *S. aureus* สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินได้และมักจะเรียกว่า Staphylococcal enterotoxins (SEs) ซึ่งมีด้วยกัน 14 ชนิด คือ SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SHE, SEI และ SEJ (Balaban และ Rasooly, 2000), SEK (Orwin et al., 2001), SEL, SEM, SEN และ SEO (Bhatia and Zahoor, 2007) ตามการจัดจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างของ peptide sequence รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิดด้วย *S. aureus* สามารถผลิตและปลดปล่อยเอนเทอโรทอกซินสู่ภายนอกเซลล์ (exotoxin) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ในช่วงปลาย exponential phase ไปจนถึงช่วงต้นของ stationary phase ของการเจริญและแตกต่างกันตามชนิดของเอนเทอโรทอกซิน

เอนเทอโรทอกซินมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษของ *S. aureus* คือประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 3 สารพิษนี้สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และไม่สูญเสียฤทธิ์ถึงแม้จะถูกแช่แข็ง อีกทั้งทนต่อการถูกทำลายด้วยกรดและเอนไซม์ต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร สารพิษที่จะทำให้เกิดโทษกับผู้บริโภคได้นั้นต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร ซึ่งปริมาณเชื้อ

จะต้องมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แม้ว่าเชื้อจะสร้างเอนโทโรทอกซินได้ แต่ถ้ามีเซลล์ปริมาณน้อยกว่า 10^5 - 10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ก็จะไม่เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อาหารที่มักพบ *S. aureus* ปนเปื้อนและเจริญได้ดี ได้แก่ เนื้อไก่ อาหารทะเล ขนมปังและผลิตภัณฑ์นม หากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเอนโทโรทอกซินที่สร้างจาก *S. aureus* จะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน และเป็นตะคริว อาเจียนอย่างรุนแรง มักไม่มีอาการไข้ ปวดบิตในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ อุจจาระร่วง ปวดศีรษะ เหงื่อออก หนาวสั่น ในรายที่รุนแรงอาจช็อคหรือมีมูกและเลือดปนในอุจจาระ แต่ส่วนใหญ่อาการจะหายเป็นปกติภายใน 1-3 วัน หลังจากขับถ่ายเอาเชื้อและสารพิษออกไปหมดแล้ว ถ้าเกิดในเด็กเล็กและผู้สูงอายุอาการอาจรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ ซึ่งมีรายงานการระบาดวิทยาของ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษอยู่หลายรายงาน ในทวีปยุโรปมีรายงานการสำรวจและควบคุมการเกิดโรคจากการติดเชื้อและสารพิษในอาหารขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ในระหว่างปี ค.ศ. 1999-2000 พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อในกลุ่มของ *Staphylococcus* มากกว่า 3700 ครั้ง (Fueyo et al., 2008) ในประเทศออสเตรเลียมีรายงานการติดเชื้อ *S. aureus* ในผู้ป่วยระหว่างปี ค.ศ. 1990-2006 ซึ่งมีความถี่เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (Nimmo and Coombs, 2008) สำหรับประเทศไทยก็มีรายงานการระบาดเช่นเดียวกัน โดยข้อมูลสถานการณ์โรคอาหารเป็นพิษในปี ค.ศ. 2014 พบว่าจากการตรวจเชื้อก่อโรคของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 603 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.45 ของผู้ป่วยทั้งหมด ในจำนวนนี้พบเชื้อ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุในผู้ป่วยจำนวน 134 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.22 (กรมควบคุมโรค, 2557) และในปี ค.ศ. 2015 พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษสาเหตุจาก *S. aureus* จำนวน 51 รายจากผู้ป่วย 750 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.8

2.5 แนวทางการควบคุม *Staphylococcus aureus*

ตามข้อกำหนดของการควบคุมคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยา กำหนดไว้ว่าอาหารที่มีสุขลักษณะที่ดี จะต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้ง *S. aureus* ด้วย (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2556) ซึ่งในบทเพิ่มเติมท้ายพระราชบัญญัติอาหารของ พ.ศ. 2552 มีข้อกำหนดให้อาหารเกือบทุกประเภทจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 0.1 กรัม หรือ 0.1 มิลลิลิตรในกรณีของเครื่องดื่ม ด้วยเหตุนี้เองการควบคุม *S. aureus* จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง จากที่กล่าวข้างต้นการปนเปื้อน *S. aureus* ในอุตสาหกรรมอาหารมักเกิดจากการปนเปื้อนโดยตรงกับผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ หรืออาจเกิดการปนเปื้อนข้ามภายหลังกระบวนการผลิตที่มีสาเหตุจากการปนเปื้อนนมดิบซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในสายการผลิตเดียวกัน โดยทั่วไป

การปนเปื้อน *S. aureus* ในนมดิบมีสาเหตุมาจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ดังนั้นจึงมีมาตรการควบคุมโรคเต้านมอักเสบในโคนม ซึ่งการรักษาโรคนี้นักใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดปริมาณหรือกำจัด *S. aureus* เป็นหลัก แต่จากหลาย ๆ รายงานพบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อนี้ การดื้อยาพบครั้งแรกต่อยาเพนิซิลลิน (penicillin) ทำให้มีการใช้เมทิซิลลิน (methicillin) ในการรักษาแทน (Vanderhaeghen et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตาม *S. aureus* ก็เกิดการดื้อยาเมทิซิลลินทำให้มีการเปลี่ยนมาใช้ยาแวนโคไมซิน (vancomycin) และเช่นเดียวกับยาเมทิซิลลิน พบว่าในปัจจุบัน *S. aureus* บางสายพันธุ์เกิดการดื้อต่อยาแวนโคไมซินนี้

วิธีการในปัจจุบันสำหรับการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การบำบัดด้วยสารเคมีและกายภาพ การบำบัดด้วยสารเคมี เช่น ผลิตภัณฑ์คลอรีน โอโซน และ น้ำออกซิไดซ์ที่ผ่านการแยกด้วยไฟฟ้า (electrolyzed oxidizing water) (Norhana et al., 2010) สำหรับการบำบัดทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน ความดัน ใต้น้ำหรือการสัมผัสกับแสงแบบพัลส์ (pulsed light) (Bremer et al., 2002; Hierro et al., 2012) กระบวนการผลิตนมหรือผลิตภัณฑ์นมโดยทั่วไปมักจะอาศัยกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยความร้อนที่ใช้จะต้องสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ทั้งหมด และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจทำให้น้ำนมเสียได้ แต่การใช้ความร้อนฆ่าเชื้อโรคอาจทำให้ธาตุอาหารในน้ำนมมีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้อาจพบสารต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมซึ่งไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน (Arqués et al., 2005) กระบวนการฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมอีกวิธีที่น่าสนใจคือ การใช้ความดัน ซึ่งจัดเป็นเทคโนโลยีที่ไม่ใช้ความร้อน (nonthermal processing) หรืออาจทำให้เกิดความร้อนขึ้นน้อยมาก ข้อดีของกระบวนการนี้ทำให้คุณภาพของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและยังเป็นกระบวนการที่สามารถทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและอาหารเกิดการเสื่อมเสียได้ (Alzamora et al., 1998; Hoover et al., 1989) จากงานวิจัยของ Jofré และคณะ (2010) พบว่าการปนเปื้อนที่ระดับความหนาแน่นเริ่มต้นต่าง ๆ ของเชื้อ *S. aureus* จะลดลงและไม่สามารถตรวจสอบได้ เมื่อให้ความดันสูง 900 MPa นาน 5 นาที ซึ่งความดันที่ต่ำกว่าอาจจะต้องใช้เวลาที่นานขึ้น แต่ทั้งนี้การใช้ความดันสูงสำหรับกระบวนการฆ่าเชื้อมีต้นทุนที่สูงจึงยังคงเป็นอุปสรรค และเริ่มมีแนวคิดที่จะลดค่าใช้จ่ายในส่วนของการใช้แรงดันสูง โดยอาศัยความหลากหลายของเทคโนโลยีอื่น ๆ เพื่อการถนอมอาหารให้ได้ประสิทธิภาพและสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Morgan et al., 2000)

จะเห็นได้ว่าทั้งการควบคุมทางกายภาพและวิธีทางเคมีมักจะส่งผลเสียซึ่งอาจทำให้เกิดสารตกค้างหรือทำให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารเปลี่ยนแปลงไป (Gao et al., 2006) ความ

ต้องการบริโภคนมและผลิตภัณฑ์นมที่เพิ่มขึ้นและความคาดหวังของผู้บริโภคถึงคุณค่าทางโภชนาการ รวมถึงความสดใหม่ของผลิตภัณฑ์เป็นตัวแปรสำคัญในการพัฒนากระบวนการหรือทางเลือกใหม่ ๆ โดยเมื่อเร็ว ๆ นี้ การใช้แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) เพื่อควบคุมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีการทางเลือกในการควบคุมการติดเชื้อและการปนเปื้อนเชื้อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Hanlon, 2007)

2.6 แบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจ หรือเฟจ (phage) เป็นกลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย (bacterial virus) และอาร์เคีย (archaeal virus) ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แบคทีริโอเฟจแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว หรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามชนิดเท่านั้น โดยความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีริโอเฟจกับโฮสต์ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการศึกษาด้านชีวโมเลกุล เช่น กลไกการดื้อยาในแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีริโอเฟจ จัดเป็น obligate parasite สามารถเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฉพาะภายในเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการให้ความสนใจในการบำบัดด้วยแบคทีริโอเฟจ (phage therapy) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นตัวช่วยในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

2.6.1 ประวัติของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1896 โดย Ernest Hanbury Hankin ผู้ชำนาญในวิชาแบคทีเรีย (bacteriologist) ชาวอังกฤษ พบสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ในแม่น้ำประเทศอินเดียที่สามารถทำลาย *Vibrio cholerae* แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารต้านจุลินทรีย์นั้นคือสารประเภทใด (Hankin, 1896) และในปี 1915 Frederick William Twort นักพยาธิวิทยา (pathologist) ชาวอังกฤษ พบลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการติดเชื้อและมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังแพร่ไปยังโคโลนีอื่น นอกจากนั้นสิ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อนี้สามารถผ่านการกรองละเอียดและทำให้เกิดการติดเชื้อครั้งต่อไปได้ จึงได้มีการตั้งสมมติฐานไว้อย่างหลากหลาย โดยคาดว่าสิ่งที่สามารถผ่านการกรองละเอียดได้นั้นคล้ายไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ (animal viruses) และพืช (plant viruses) อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวถูกมองข้ามจากนักวิทยาศาสตร์ และไม่มีการศึกษาค้นคว้าต่อ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1917 Félix d'Hérelle

นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสเชื้อสายแคนาดา ได้ทำการวิจัยที่สถาบัน The Pasteur Institute of Paris ในกรุงปารีส (Paris) ประเทศฝรั่งเศส โดยนำตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคบิดมากรองของเหลวที่ได้จากการกรองถูกนำมาผสมกับอาหารที่มี *Shigella dysenteriae* หลังจากนั้นนำไปหมักข้ามคืน ซึ่งพบว่าอาหารที่เดิมของเหลวที่ได้จากการกรอง มีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อ ในขณะที่อาหารที่มีแต่ *S. dysenteriae* เพียงอย่างเดียวมีลักษณะขุ่นกว่า จึงสรุปได้ว่าของเหลวที่ได้จากการกรองนี้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย (Adams, 1959) นอกจากนี้ Félix d'Hérelle ยังเป็นบุคคลแรกที่ได้ใช้คำว่า “แบคเทรีโอฟาจ (bacteriophages)” ในการเรียกไวรัสที่สามารถติดเชื้อเข้า (infect) แบคทีเรีย

2.6.2 โครงสร้างของแบคเทรีโอฟาจ

อนุภาคของแบคเทรีโอฟาจที่มีความสมบูรณ์และมีความสามารถในการติดเชื้อจะประกอบไปด้วย กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม โครงสร้างของยีนทั้งหมดเรียกว่า จีโนม (genome) ที่ประกอบขึ้นจากกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid หรือ DNA) หรือกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid หรือ RNA) อย่างใดอย่างหนึ่ง

แคพซิด (capsid) เป็นโปรตีนเปลือกชั้นนอกของอนุภาคแบคเทรีโอฟาจที่ห่อหุ้มจีโนม ประกอบขึ้นจากโปรตีนสายย่อย เรียกว่า แคพโซเมอร์ (capsomer) โดยแคพโซเมอร์จะมีการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างกัน ทำให้เกิดโครงสร้างแคพซิดที่แข็งแรงมากและทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ เช่น ความเป็นกรด-ด่างสูง ดังนั้นหน้าที่หลักของแคพซิดคือทำหน้าที่ป้องกันจีโนมไม่ให้ถูกทำลายจากสภาวะต่าง ๆ ของสิ่งแวดล้อม

เยื่อหุ้ม (envelope) ในแบคเทรีโอฟาจบางชนิดจะมีเยื่อหุ้มซึ่งมีลักษณะเป็นไลโปโปรตีน (lipoprotein) ที่ประกอบด้วยไขมันและโปรตีน เยื่อหุ้มไวรัสนี้ได้มาจากเยื่อหุ้มผนังเซลล์ของโฮสต์ เยื่อหุ้มของแบคเทรีโอฟาจบางชนิดอาจมีก้านโปรตีน (spike) ยื่นออกไปรอบ ๆ ซึ่งก้านโปรตีนพวกนี้มีสมบัติในการจับตัวอย่างจำเพาะกับโฮสต์เซลล์ โดยไวรัสที่มีเยื่อหุ้ม เรียกว่า enveloped virus และไวรัสที่ไม่มีเยื่อหุ้ม เรียกว่า naked virus หรือ non-enveloped virus

โปรตีนองค์ประกอบ (internal proteins) เป็นโปรตีนที่พบอยู่ภายในอนุภาคแบคเทรีโอฟาจ มักเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง (structural protein) เช่น core protein ที่ทำหน้าที่ในการบรรจุจีโนมของแบคเทรีโอฟาจไว้ภายในหรือเอนไซม์พิเศษที่ไวรัสจำเป็นต้องใช้ใน

การเพิ่มจำนวนแต่ไม่มีในโฮสต์เซลล์ เช่น RNA-dependent RNA polymerase หรือ reverse transcriptase เป็นต้น

2.6.3 การจัดจำแนกแบคทีริโอเฟจ

การจัดจำแนกแบคทีริโอเฟจตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีด้วยกันหลากหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อกำหนด และกฎเกณฑ์ที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น

การจัดจำแนกไวรัสตามวิธีของ Holmes (1948) ซึ่งแบ่งไวรัสตามความจำเพาะของโฮสต์เซลล์ โดยออกเป็น 1 order คือ Virales ประกอบด้วยสมาชิก 3 กลุ่ม คือ Phaginae (จำเพาะต่อแบคทีเรีย), Phytophaginae (จำเพาะต่อพืช) และ Zoophaginae (จำเพาะต่อสัตว์)

การจัดจำแนกแบคทีริโอเฟจตามวิธีของ Baltimore (1971) ซึ่งแบ่งไวรัสตามวิธีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของไวรัส (messenger RNA: mRNA) สำหรับการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (translation) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคภายในโฮสต์เซลล์ โดยแบ่งไวรัสเป็น 7 กลุ่ม (รูปที่ 1) ได้แก่

กลุ่ม I ดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA: dsDNA)

กลุ่ม II ดีเอ็นเอสายบวกเดี่ยว (single-stranded DNA (+): ssDNA(+))

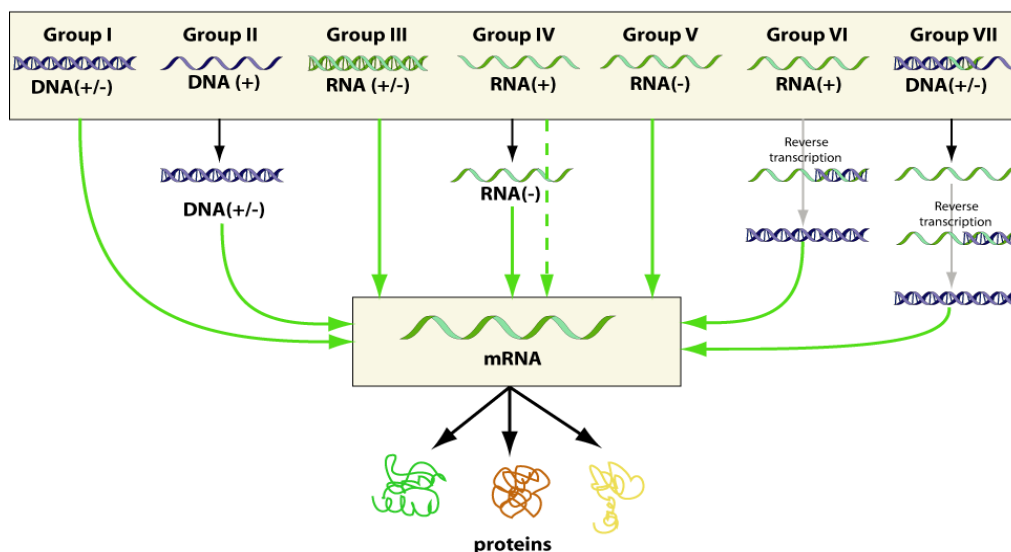
กลุ่ม III อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA: dsRNA)

กลุ่ม IV อาร์เอ็นเอสายบวกเดี่ยว (single-stranded RNA (+): ssRNA(+))

กลุ่ม V อาร์เอ็นเอสายลบเดี่ยว (single-stranded RNA (-): ssRNA(-))

กลุ่ม VI อาร์เอ็นเอสายบวกเดี่ยวที่มีลำดับเบสตรงข้ามกัน (single-stranded RNA (+) reverse: ssRNA (+) reverse)

กลุ่ม VII ดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสตรงข้ามกัน (double-stranded DNA reverse: dsDNA reverse)



รูปที่ 1 การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาตามวิธีของ Baltimore (1971)
(<https://viralzone.expasy.org/254>)

การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาตามวิธีของ Bradley (1967) ซึ่งอาศัยลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียโอฟาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และชนิดของกรดนิวคลีอิก โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม (รูปที่ 2) ได้แก่

กลุ่ม A ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีส่วนหาง (tail) ที่มีซีทที่ยึดหดได้ห่อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่พบปลาย (appendage) เช่น ไยหาง (tail fiber) เป็นโครงสร้างส่วนปลายสุด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีซีทห่อหุ้ม แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีริยางค์ก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

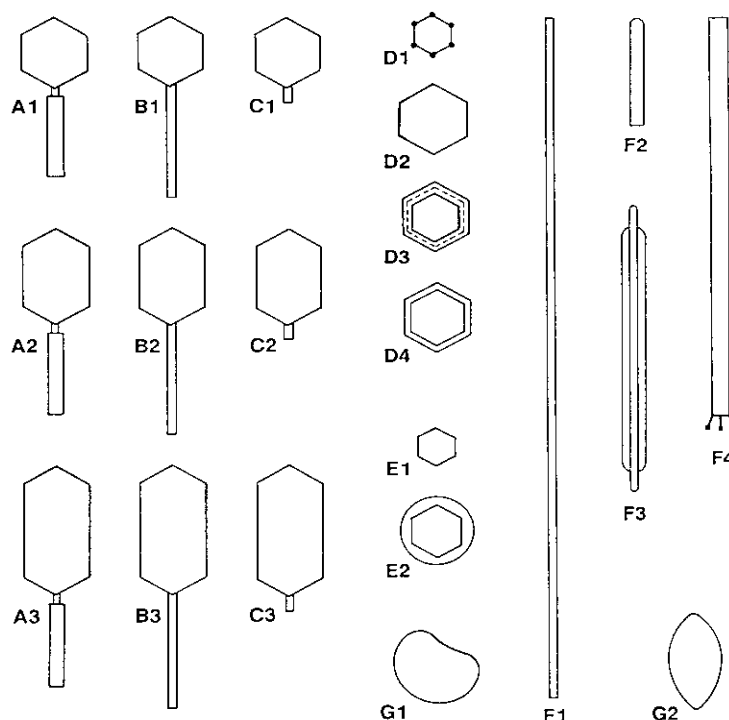
กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีซีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีริยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคปโซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคปซิด (capsid) ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมมีแคปซิดห่อหุ้ม มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างเป็นสายยาวมีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

กลุ่ม G ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน มีเปลือกห่อหุ้ม (envelope) แต่ไม่พบส่วนของแคปซิด มีการดนิวลีอกเป็นดีเอ็นเอสายคู่



รูปที่ 2 การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาตามวิธีของ Bradley (1967)

(<https://www.semanticscholar.org>)

นอกจากวิธีการจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีวิธีการจัดจำแนกวิธีอื่น ๆ อีก แต่ละวิธีก็มีเกณฑ์ในการจัดจำแนกที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงได้มีการจัดตั้งหน่วยงานซึ่งทำหน้าที่จัดจำแนก ไวรัสรวมถึงแบคทีเรียโอฟาขึ้นเรียกว่า คณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (International Committee for Taxonomy of Viruses หรือ ICTV) เพื่อให้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยกำหนดรูปแบบการตั้งชื่อไวรัสซึ่งให้ใช้ภาษาละติน (latin) หรือภาษากรีก (greek) ลงท้ายชื่อ เช่น

Order (-virales)

Family (-viridae)

Subfamily (-virinae)

Genus (-virus)

คณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส แบ่งไวรัสทั้งหมดออกเป็น 10 Order 134 Families (ข้อมูล ณ วันที่ 12 พฤษภาคม ค.ศ. 2018) ซึ่งแบคเทรีโอฟาจถูกจัดอยู่ใน 22 families ดังตารางที่ 4 อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ประเภทของกรดนิวคลีอิกและการมีหรือไม่มีชั้นไขมันห่อหุ้มเป็นเกณฑ์สำหรับการจำแนกไวรัส ดังแสดงในรูปที่ 3 จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทรีโอฟาจที่ผ่านมาซึ่งมีรายงานการค้นพบแบคเทรีโอฟาจที่ถูกตีพิมพ์มากกว่า 4500 รายการ โดยพบว่าร้อยละ 96 จากฟาจที่สามารถติดเชื้อแบคทีเรียและอาร์เคียได้ทั้งหมดมักเป็นแบคเทรีโอฟาจที่มีหาง (tailed phage) ซึ่งจัดอยู่ใน Order *Caudovirales* (Fauquet et al., 2005) และแบ่งออกเป็นอีก 3 Family คือ *Myoviridae*, *Siphoviridae* และ *Podoviridae* จากรายงานมีแบคเทรีโอฟาจที่ถูกจัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* ถึงร้อยละ 61.7 รองลงมาคือ *Myoviridae* ร้อยละ 24.5 และ *Podoviridae* ร้อยละ 13.9 (Ackermann, 1998)

Family *Siphoviridae* เป็นแบคเทรีโอฟาจที่มีส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral symmetry) มีแคพซิดหุ้มจีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) ส่วนหางมีลักษณะยาวและไม่สามารถยืดหดได้ (long noncontractile tail)

Family *Myoviridae* เป็นแบคเทรีโอฟาจที่มีส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral symmetry) มีแคพซิดหุ้มจีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) ส่วนหางมีลักษณะยาวและสามารถยืดหดได้ (long contractile tail)

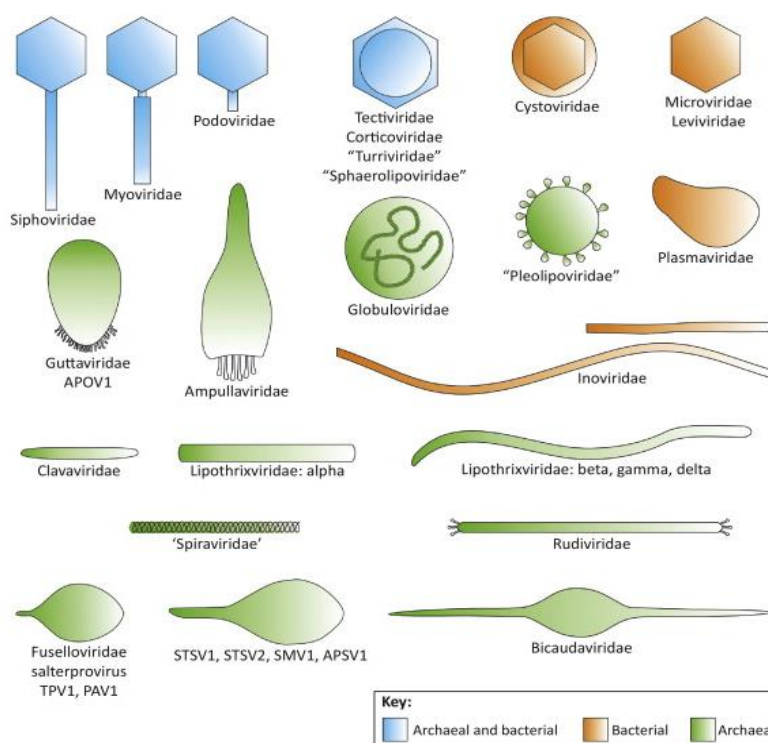
Family *Podoviridae* เป็นแบคเทรีโอฟาจที่มีส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral symmetry) มีแคพซิดหุ้มจีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) ส่วนหางมีลักษณะสั้นและไม่สามารถยืดหดได้ (short noncontractile tail)

ตารางที่ 4 การจัดหมวดหมู่แบคเทอริโอฟาจที่สามารถติดเชื้อในแบคทีเรียและอาร์เคียตามเกณฑ์การจัดจำแนกของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV)

Order	Family	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	จีโนม	โฮสต์
Caudovirales	<i>Myoviridae</i>	non-enveloped, contractile tail	Linear dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
	<i>Siphoviridae</i>	non-enveloped, noncontractile tail (ยาว)	Linear dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
	<i>Podoviridae</i>	non-enveloped, noncontractile tail (สั้น)	Linear dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
Ligamenvirales	<i>Lipothirixviridae</i>	enveloped, รูปแท่ง (rod-shaped)	Linear dsDNA	อาร์เคีย
	<i>Rudiviridae</i>	non-enveloped, รูปแท่ง	Linear dsDNA	อาร์เคีย
Unassigned	<i>Ampullaviridae</i>	enveloped, รูปขวด (bottle-shaped)	Linear dsDNA	อาร์เคีย
	<i>Bicaudaviridae</i>	non-enveloped, รูปผลมะนาว (lemon-shaped)	Circular dsDNA	อาร์เคีย
	<i>Clavaviridae</i>	non-enveloped, รูปแท่ง	Circular dsDNA	อาร์เคีย
	<i>Corticoviridae</i>	non-enveloped, รูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral)	Circular dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
	<i>Cystoviridae</i>	enveloped, ทรงกลม (spherical)	Segmented dsRNA	แบคทีเรีย
	<i>Fuselloviridae</i>	non-enveloped, รูปผลมะนาว	Circular dsDNA	อาร์เคีย
	<i>Globuloviridae</i>	enveloped, ทรงกลม	Linear dsDNA	อาร์เคีย
	<i>Guttavirus</i>	non-enveloped, รูปทรงไข่ (ovoid)	Circular dsDNA	อาร์เคีย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Order	Family	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	จีโนม	โฮสต์
Unassigned	<i>Tectiviridae</i>	non-enveloped, รูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral)	Linear dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
	<i>Pleolipoviridae</i>	enveloped, รูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic)	Circular ssDNA	อาร์เคีย
	<i>Plasmaviridae</i>	enveloped, รูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic)	Circular dsDNA	แบคทีเรีย
	<i>Spiraviridae</i>	non enveloped, รูปร่างเป็นทรงกระบอกกลวง (hollow cylindrical)	Circular ssDNA	อาร์เคีย
	<i>Turriviridae</i>	non enveloped, รูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral)	Linear dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
	<i>Sphaerolipoviridae</i>	non enveloped, รูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral)	Linear dsDNA	แบคทีเรีย, อาร์เคีย
	<i>Microviridae</i>	non-enveloped, รูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral)	Circular ssDNA	แบคทีเรีย
	<i>Inoviridae</i>	non-enveloped, มีลักษณะเป็นเส้น (filamentous)	Circular ssDNA	แบคทีเรีย
	<i>Leviviridae</i>	non-enveloped, ทรงกลม	Linear ssRNA	แบคทีเรีย



รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีริโอเฟจในวงศ์ต่าง ๆ

(<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0966842X14000419-gr1.jpg>)

อย่างไรก็ตามข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับแบคทีริโอเฟจที่ได้นำเสนอในที่นี้เป็นข้อมูลการจัดจำแนก ณ ปัจจุบัน แต่เนื่องจากนักวิจัยหันมาให้ความสนใจกับแบคทีริโอเฟจกันมากขึ้นทำให้ในทุก ๆ ปีมีการค้นพบแบคทีริโอเฟจชนิดใหม่ ๆ ซึ่งยังไม่ถูกศึกษา และมีการคาดการณ์ว่าในอนาคตจะมีแบคทีริโอเฟจถูกค้นพบอีกมาก จึงอาจทำให้มีการจัดจำแนกโดยวิธีที่แตกต่างจากที่บรรยายไว้ในรายงานฉบับนี้ได้

2.6.4 วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจ

วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจ แบ่งออกเป็น 2 วงจร คือ วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) และวงจรชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic cycle) ดังแสดงในรูปที่ 4

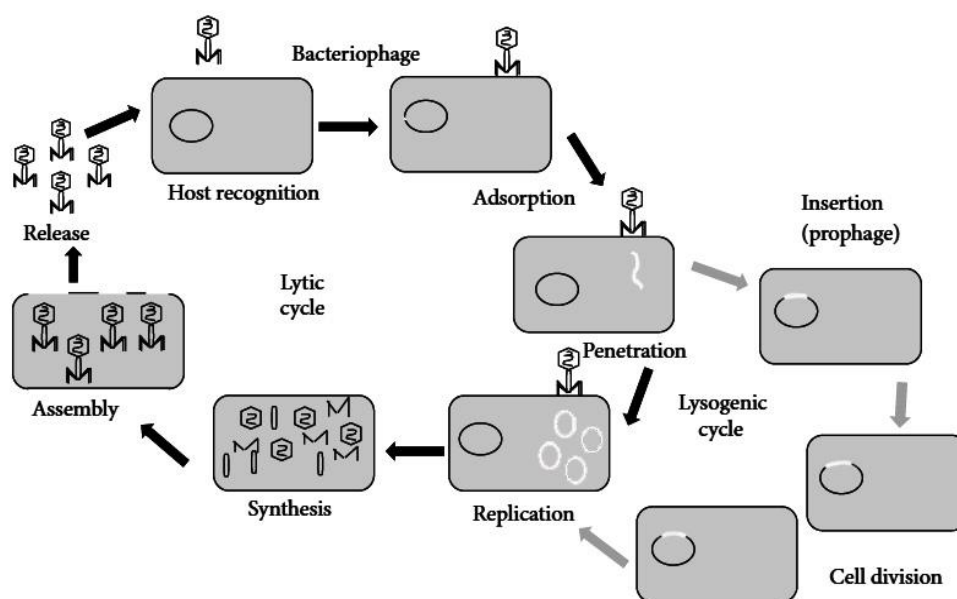
วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) แบคทีริโอเฟจที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธีนี้ เรียกว่า ไลติกหรือไวรุสเฟจ (lytic หรือ virulent phage) ซึ่งการเพิ่มจำนวนแบคทีริโอเฟจในวงจรนี้จะอาศัยองค์ประกอบหรือเมแทบอลิซึมในโฮสต์เซลล์สำหรับการสังเคราะห์แบคทีริโอเฟจรุ่นใหม่และทำให้โฮสต์เซลล์แตกออกเพื่อปล่อยแบคทีริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา โดยสามารถแบ่งขั้นตอนหลัก ๆ ใน

วงจรชีวิตแบบไลติคได้ 5 ขั้นตอน เริ่มจากการยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟาจนโฮสต์เซลล์ (adsorption) แบคทีเรียโอฟาจะเจอกับโฮสต์เซลล์โดยการชนแบบสุ่ม (Elbreki et al., 2014) การยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟาจนโฮสต์เซลล์จะอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งยึดเกาะ (attachment site) ของแบคทีเรียโอฟา กับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) บนโฮสต์เซลล์ ซึ่งอาจเป็นลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดไทโคอิก (teichoic acid) พอริน (porin) พิล (pili) หรือแฟลกเจลลา (flagella) เป็นต้น การยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟากับโฮสต์เซลล์จะถูกกำหนดโดยรีเซพเตอร์ ดังนั้นจึงเป็นขั้นตอนที่มีความจำเพาะสูง (Rakhuba et al., 2010) ซึ่งแบคทีเรียโอฟาส่วนใหญ่มีช่วงโฮสต์ที่แคบและอาจติดเชื้อแบคทีเรียหนึ่งหรือสองสปีชีส์เท่านั้น หลังจากแบคทีเรียโอฟายึดเกาะกับโฮสต์เซลล์แล้ว แบคทีเรียโอฟาจะฉีด (inject) จีโนมเข้าไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของโฮสต์เซลล์ (penetration) ส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่น ๆ ยังคงอยู่ภายนอกโฮสต์เซลล์ จากนั้นจะเริ่มการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของแบคทีเรียโอฟา (biosynthesis) ในช่วงแรกหลังจากแบคทีเรียโอฟาปล่อยจีโนมเข้าโฮสต์เซลล์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนของโฮสต์เซลล์จะหยุดชะงักลงทั้งหมดและเริ่มมีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นในช่วงแรก (early mRNA) ของไวรัส ซึ่งจะสร้างเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายดีเอ็นเอของโฮสต์เซลล์ ในขณะที่ดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอฟาจะมีวิธีป้องกันการย่อยสลายของเอนไซม์ดีเอ็นเอสโดยดัดแปลงองค์ประกอบของเบสไซโตซีน (cytosine) เป็นไฮดรอกซีเมทิลไซโตซีน (5-hydroxymethyl cytosine) นอกจากนี้ อาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นในช่วงแรกจะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับทำให้เกิดการติดเชื้อในโฮสต์เซลล์ ส่วนอาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นในช่วงหลัง (late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของแบคทีเรียโอฟา เช่น แคพซิดหรือหาง เป็นต้น หรือแปลรหัสเป็นโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการแตกสลายของโฮสต์เซลล์เพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอฟารุ่นใหม่ออกมา ขั้นตอนต่อไปเป็นการประกอบตัวของแบคทีเรียโอฟา (assembly) ขั้นตอนนี้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคแบคทีเรียโอฟา เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคพซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคพซิดจะเชื่อมต่อกับชีทห่อหุ้มและส่วนหาง แล้วประกอบกันเป็นอนุภาคแบคทีเรียโอฟาที่สมบูรณ์ (progeny) และขั้นตอนสุดท้ายคือการปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาออกจากโฮสต์เซลล์ (lysis) ในขั้นตอนนี้อาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียโอฟาโปรตีน 2 ชนิด คือ โฮลิน (holin) และเอนโดไลซิน (endolysin) กลไกการทำลายผนังเซลล์ในระยะแรกเป็นการสะสมโฮลิน โดยหน่วยย่อยของโฮลิน (holin monomer) จะ

สอดแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) ของโฮสต์เซลล์ และประกอบเป็นโฮลิน โอลิโกเมอร์ (holin oligomers) ทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มชั้นใน แต่ระหว่างที่มีการสะสมโฮลิน แบคทีเรียโอฟาจจะสร้างตัวยับยั้งโฮลิน (antiholin inhibitor) ร่วมด้วยเพื่อยับยั้งการทำงานของโฮลินจนกว่าจะสะสมได้ความเข้มข้นมากพอ เมื่อเกิดเปลี่ยนแปลงของไอออนไฟฟ้า (depolarization) ส่งผลให้เอนโดไลซินจากไซโตพลาสซึมย้ายผ่านเยื่อหุ้มชั้นในเข้าไปทำลายชั้นเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์ทำให้โฮสต์เซลล์แตกออก แบคทีเรียโอฟาจรุ่นใหม่จึงถูกปลดปล่อยออกมา (Young, 2014)

วงจรชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic cycle) แบคทีเรียโอฟาจที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธีนี้ เรียกว่า เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) ซึ่งวงจรชีวิตแบบไลโซเจนิคจะแตกต่างกับวงจรชีวิตแบบไลติก โดยจะไม่มีการสร้างแบคทีเรียโอฟาจรุ่นใหม่ เนื่องจากจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจจะสอดแทรก (integrate) กับโครโมโซมของโฮสต์เซลล์โดยเกิดจากการรวมตัวกันใหม่ของยีน (genetic recombination) ซึ่งอาศัยเอนไซม์อินทิเกรส (integrase enzyme) เรียกแบคทีเรียโอฟาจระยะนี้ว่า โปรฟาจ (prophage) ซึ่งเมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว โปรฟาจก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกัน ส่งผลให้แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมีโปรฟาจแฝงอยู่ด้วย นอกจากนี้ก็ยังมีโปรฟาจที่จีโนมไม่ได้สอดแทรกกับโครโมโซมของแบคทีเรีย แต่อยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึม การอยู่ร่วมกันระหว่างโฮสต์และเทมเพอเรตฟาจ สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วม (coevolution) ซึ่งปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย ทั้งการเกิดการพัฒนาการการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงจากแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (nonpathogenic strain) เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) (Abedon, 2008)

จากความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของแบคทีเรียโอฟาจจึงสามารถสรุปได้ว่าฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซเจนิค ไม่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงของการบำบัด มีเพียงไลติกฟาจเท่านั้นที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการควบคุมทางชีวภาพและนี้อาจเป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้ทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่มีความปลอดภัยมากที่สุด (Sillankorva et al., 2012)



รูปที่ 4 วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจ (Elbreki et al., 2014)

2.7 แนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจสำหรับเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ

ในปัจจุบันการใช้สารเคมี และ/หรือ ยาปฏิชีวนะ สำหรับควบคุมแบคทีเรียก่อโรคนั้นมักทำให้เกิดผลกระทบเชิงลบทั้งก่อให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นผลให้แบคทีเรียก่อโรคเกิดการกลายพันธุ์ ก่อให้เกิดปัญหาในด้านความปลอดภัยของผู้บริโภค และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการใช้แบคทีริโอเฟจในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคจึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อผลิตภัณฑ์ ผู้บริโภค หรือสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ศึกษาการประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจในการควบคุม *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม โดยงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับกำจัดหรือลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในนมและผลิตภัณฑ์นม ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Garcia และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถของการใช้ไวรัสเรนต์แบคทีริโอเฟจผสม $\phi 88$ และ $\phi 55$ เปรียบเทียบการใช้เทมเพอเรตแบคทีริโอเฟจผสม $\phi H8$ และ $\phi A72$ สำหรับการควบคุม *S. aureus* Sa9 ในผลิตภัณฑ์นมยูเอชทีครบส่วน (ultrahigh temperature whole milk) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง โดยการติดเชื้อ *S. aureus* Sa9 ให้ได้อัตราส่วนของแบคทีริโอเฟจต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) เท่ากับ 100 จากผลการทดลองพบว่าการใช้เทมเพอเรตแบคทีริโอเฟจผสม $\phi H8$ และ $\phi A72$ สามารถลดปริมาณ *S. aureus* Sa9 ได้ 3.5 log unit เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง ในขณะที่

ที่ไวรัลเอนด์แบคทีเรียโอฟาจผสม $\phi 88$ และ $\phi 55$ สามารถลดปริมาณ *S. aureus* Sa9 จนไม่สามารถตรวจสอบได้ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง นอกจากนี้ยังไม่พบการกลับมาเจริญซ้ำของ *S. aureus* Sa9 ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียโอฟาจอาศัยการแพร่แบบไม่ใช้พลังงาน จึงอาจเป็นไปได้ว่าอาหารที่มีลักษณะเหลวหรือมีปริมาณน้ำอิสระสูง ๆ (water activity) จะทำให้แบคทีเรียโอฟาจสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระภายในอาหารจึงอาจช่วยป้องกันการปนเปื้อนซ้ำถึงแม้องค์ประกอบในนมอาจส่งผลต่อการยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟาจกับโฮสต์เซลล์ แต่การใช้อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่สูงจะเป็นการเพิ่มโอกาสการยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟาจได้อีกประการหนึ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสามารถประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจสำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในนมและผลิตภัณฑ์นมได้

นอกจากการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจโดยตรง (whole phage) สำหรับเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพแล้ว ยังมีการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโอฟาจที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ เช่น เอนโดไลซิน (Endolysin) ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Fan และคณะ (2016) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้รีคอมบิแนนท์เอนโดไลซิน (recombinant endolysin) trx-SA1 จากแบคทีเรียโอฟาจ IME-SA1 เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุม *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยงานวิจัยนี้ออกแบบและสร้างรีคอมบิแนนท์เอนโดไลซินเพื่อนำไปทดลองรักษาโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ โดยการฉีดรีคอมบิแนนท์เอนโดไลซินเข้าสู่เต้านมโคนมวันละครั้งเป็นระยะเวลา 3 วัน และติดตามผลของการรักษาทุก ๆ วันจากการวัดปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว (somatic cell) จากนมโคควบคู่กับติดตามความหนาแน่นของ *S. aureus* ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (brain heart infusion agar) ซึ่งความหนาแน่นของ *S. aureus* ในเต้านมจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงภายใน 3 วัน สอดคล้องกับความหนาแน่นของ *S. aureus* ที่ลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่า รีคอมบิแนนท์เอนโดไลซิน trx-SA1 มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ นอกจากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโอฟาจที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ อย่างเช่น เอนโดไลซิน จะสามารถนำมาเป็นแนวทางในการรักษาโรคได้แล้ว เอนโดไลซินก็อาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสารเคมีหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อเสริมประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมชีวภาพได้อีกประการหนึ่ง ดังเช่น งานวิจัยของ Chang และคณะ (2017) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้รีคอมบิแนนท์เอนโดไลซิน LysSA97 ร่วมกับ carvacrol ซึ่งเป็นสารหอมระเหย สำหรับการควบคุม *S. aureus* ในตัวอย่างนมขาดมันเนย นมครึ่งส่วนและตัวอย่าง

เนื้อโค ซึ่งงานวิจัยนี้ออกแบบและสร้างรีคอมบิแนนท์เอนโดไลซินจากแบคทีเรียโอฟาจ SA97 เพื่อนำมาใช้ในประเพณีการต้านจุลินทรีย์ในอาหาร โดยทุกตัวอย่างจะนำมาปลูกถ่าย *S. aureus* RN4420 ให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 10^5 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นแบ่งแต่ละตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ผสม LysSA97 ความเข้มข้น 1.88 ไมโครโมลาร์ สำหรับตัวอย่างนม และ 18.88 ไมโครโมลาร์ สำหรับตัวอย่างเนื้อโค กลุ่มที่ 2 ผสม carvacrol ความเข้มข้น 6.66 มิลลิโมลาร์ และกลุ่มที่ 3 ผสมทั้ง LysSA97 ความเข้มข้น 1.88 ไมโครโมลาร์ และ carvacrol ความเข้มข้น 6.66 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิห้องและเก็บตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าในนมขาดมันเนยที่มีการบำบัดด้วย LysSA97 หรือ carvacrol เพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ได้น้อยกว่า $2 \log$ CFU/มิลลิลิตร ในเวลา 3 ชั่วโมง แต่จำนวน *S. aureus* ลดลงจนน้อยกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด เมื่อบำบัดด้วย LysSA97 ร่วมกับ carvacrol ในเวลา 3 ชั่วโมง ในขณะที่การบำบัดด้วย LysSA97 ร่วมกับ carvacrol ในเนื้อโค สามารถลด *S. aureus* ได้ $2.1 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร ภายใน 3 ชั่วโมง แต่ไม่พบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แบบเสริมกันเมื่อใช้ LysSA97 ร่วมกับ carvacrol ในตัวอย่างนมครบส่วน อาจเนื่องมาจากไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของนมครบส่วนไปรบกวนการออกฤทธิ์ของ LysSA97 และ carvacrol งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า carvacrol สามารถใช้เป็นสารฆ่าแบคทีเรียควบคู่กับเอนโดไลซินได้

ไม่เพียงแต่มีการรายงานถึงแนวทางการควบคุม *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์แล้ว ยังมีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่มีการรายงานถึงความเป็นไปได้สำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในนมและผลิตภัณฑ์นม ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Guenther และคณะ (2009) ศึกษาการใช้ไวรัสเอนโดแบคทีเรียโอฟาจ A511 และ P100 สำหรับควบคุม *L. monocytogenes* สารพันธุกรรม Scott A (serovar 4b) และ WSLC 1001 (serovar 1/2a) ในอาหารพร้อมรับประทานที่ต่างชนิดกัน โดยผู้วิจัยปลูกถ่าย *L. monocytogenes* ให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 1×10^3 CFU/กรัม และปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 3×10^6 - 3×10^8 PFU/กรัม และเก็บตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลว เช่น นมช็อกโกแลต และมอสซาเรลลาในน้ำเกลือ มีปริมาณ *L. monocytogenes* ลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ในขณะที่ตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง เช่น ฮอทด็อก เนื้อไก่ย่างชิ้น แคลมอนรมควัน อาหารทะเล กะหล่ำปลีหั่น และผักกาดหอม ปริมาณ *L. monocytogenes* ลดลงไปถึง 5 log unit จึงสามารถสรุปได้ว่า ไวรัสเอนโดแบคทีเรียโอฟาจ A511 และ P100 มีประสิทธิภาพสำหรับการในการควบคุม *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทานที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน และ

ตัวอย่างงานวิจัยของ Guenther และ Loessner (2011) ศึกษาการใช้ไวรัสแบคทีเรียโอฟาจ A511 สำหรับควบคุม *L. monocytogenes* ใน soft-ripened white mold (Camembert-type) และ red-smear cheese (Limburger-type) โดยผู้วิจัยได้ปลูกถ่าย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A (serovar 4b) หรือ CNL 10³/2005 (serovar 1/2a) ให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 10¹-10³ CFU/ตารางเซนติเมตร ลงบนพื้นผิวของ soft cheese ที่ยังไม่ได้ทำการบ่ม จากนั้นปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจ A511 ให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 3×10⁸ หรือ 1×10⁹ PFU/ตารางเซนติเมตร โดยการปลูกถ่ายเพียงครั้งเดียว (Single treatment) หรือการปลูกถ่ายซ้ำในระหว่างช่วงบ่ม (Repeated treatment) ผลการทดลองพบว่าการปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 3×10⁸ PFU/ตารางเซนติเมตร เพียงครั้งเดียวบน Camembert-type cheese ที่มี *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A ความหนาแน่น 10³ CFU/ตารางเซนติเมตร สามารถลด *L. monocytogenes* ได้ถึง 2.5 log unit หลังสิ้นสุดในช่วง 21 วันของการบ่ม อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายซ้ำในระหว่างช่วงบ่มไม่ได้ส่งผลให้มีการลด *L. monocytogenes* เพิ่มเติมจากเดิม อีกทั้งการปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจในระดับความหนาแน่นที่สูงถึง 1×10⁹ PFU/ตารางเซนติเมตร นั้นมีประสิทธิภาพในการลด *L. monocytogenes* ได้มากกว่าระดับความหนาแน่นที่ต่ำกว่า ในขณะที่ Limburger-type cheese พบการลดลงของ *L. monocytogenes* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มากกว่า 3 log unit หลังการบ่ม 22 วัน สำหรับการปลูกถ่ายซ้ำในระหว่างช่วงบ่มก็ให้ผลไม่แตกต่างกับการปลูกถ่ายเพียงครั้งเดียว และจากผลการปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจ A511 ความหนาแน่น 3×10⁸ PFU/ตารางเซนติเมตร บน Limburger-type cheese ที่มี *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A ที่มีความหนาแน่นเริ่มต้นแตกต่างกันตั้งแต่ 10¹-10³ CFU/ตารางเซนติเมตร พบว่าสามารถลด *L. monocytogenes* จนไม่สามารถตรวจวัดได้ นั้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอฟาจ A511 สามารถควบคุม *L. monocytogenes* ใน soft cheese ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Silva และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอฟาจ P100 สำหรับควบคุม *L. monocytogenes* ในซอฟท์ชีส (soft cheese) โดยผสม *L. monocytogenes* 2 สายพันธุ์ คือ *L. monocytogenes* 1/2a และ *L. monocytogenes* Scott A จากนั้นปลูกถ่าย *L. monocytogenes* ผสมลงบน Minas Frescal และ Coalho cheeses ให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 10⁵ CFU/กรัม ตามด้วยการปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจ P100 ลงบนตัวอย่างชีสทั้งสองให้ได้ความหนาแน่นสุดท้าย 8.3×10⁷ PFU/กรัม บ่มตัวอย่างชีสที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองพบว่าหลังจากแบคทีเรียโอฟาจ P100 ติดเชื้อโฮสต์เซลล์ 30 นาที ปริมาณ *L. monocytogenes* ลดลง 2.3 log unit ใน Minas Frescal และ 2.1 log unit ใน Coalho

cheeses เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโอฟาจ P100 อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน *L. monocytogenes* ลดลงเพียง 1.0 log unit และ 0.8 log unit ในตัวอย่าง Minas Frescal และ Coalho cheeses ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้แบคทีเรียโอฟาจร่วมกับสารเคมี สารต้านจุลินทรีย์หรือการใช้ร่วมกับวิธีการฆ่าเชื้ออื่น ๆ เช่น การใช้ความร้อน ความดัน ใอน้ำหรือการสัมผัสกับแสงแบบพัลส์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพสำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคหรือลดต้นทุนการผลิตในอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Baños และคณะ (2016) ศึกษาความสามารถของเอนเทอโรซิน AS-48 (enterocin AS-48) ซึ่งเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ร่วมกับแบคทีเรียโอฟาจ P100 ในการควบคุม *L. monocytogenes* ในเนื้อ 3 ประเภทคือ เนื้อปลาแฮค แชลมอนดิบและแชลมอนรมควัน โดยผู้วิจัยปลูกถ่าย *L. monocytogenes* ผสมลงบนเนื้อปลาแต่ละชนิดด้วยการสเปรย์ให้มีความหนาแน่นสุดท้ายเท่ากับ 10^3 CFU/ตารางเซนติเมตร จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจ P100 ให้มีความหนาแน่นสุดท้ายเท่ากับ 2.3×10^7 CFU/ตารางเซนติเมตร กลุ่มที่ 2 ผสมเอนเทอโรซิน AS-48 ให้มีความหนาแน่นสุดท้ายเท่ากับ 0.37 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร กลุ่มที่ 3 ปลูกถ่ายแบคทีเรียโอฟาจ P100 ร่วมกับเอนเทอโรซิน AS-48 ด้วยความหนาแน่นเท่าเดิม หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรียโอฟาจ P100 ร่วมกับเอนเทอโรซิน AS-48 สามารถลด *L. monocytogenes* ในเนื้อปลาทั้งสามประเภทให้มีระดับต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด ตั้งแต่วันที่ 1-15 แต่กระนั้นในตัวอย่างแชลมอนรมควันกลับมีการเจริญของ *L. monocytogenes* (regrow) ตั้งแต่วันที่ 16-30 และมีความหนาแน่นเป็น 0.78 log CFU/ตารางเซนติเมตร เมื่อสิ้นสุดช่วงการเก็บรักษา การกลับมาเจริญอีกครั้งของ *L. monocytogenes* อาจมีสาเหตุเนื่องจากการหยุดการทำงานของเอนเทอโรซิน AS-48 หรือเกิดการฟื้นตัวของ *L. monocytogenes* ที่ได้รับความเสียหาย ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการทำงานร่วมกับสารต้านจุลินทรีย์ อย่างเช่น เอนเทอโรซิน AS-48 หรือจากตัวอย่างงานวิจัยของ Tabla และคณะ (2012) ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอฟาจร่วมกับการใช้ความดันสูง (high hydrostatic pressure) เพื่อเสริมประสิทธิภาพสำหรับกระบวนการฆ่าเชื้อและลดต้นทุนสำหรับการใช้ความดันสูงในอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียโอฟาจผสม philPLA35 และ philPLA88 ร่วมกับการใช้ความดันสูงเพื่อลดปริมาณของ *S. aureus* ในนมพลาสเจอร์ไรส์ โดยบ่มนมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความดัน 400 เมกะปาสคาล ซึ่งเป็นความดันที่เหมาะสมในการใช้ร่วมกับแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 2 ชนิด โดยทำการ

ทดสอบที่ระดับการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในนมเริ่มต้นเท่ากับ 10^4 และ 10^6 CFU/มิลลิลิตร และแบคทีเรียโอฟาจผสมความหนาแน่นเท่ากับ 10^8 PFU/มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าการใช้ความดันสูงร่วมกับแบคทีเรียโอฟาจสามารถส่งเสริมการลดการปนเปื้อนของเชื้อได้ที่มีความหนาแน่นเริ่มต้นทั้ง 2 กรณี และพบว่าการใช้ความดันสูงร่วมกับแบคทีเรียโอฟาจสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนได้จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ที่เวลา 4 ชั่วโมง

ถึงแม้จะมีหลายงานวิจัยที่ใช้แบคทีเรียโอฟาจหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียโอฟาจแต่ส่วนใหญ่มีอยู่ในระดับห้องทดลองซึ่งทำการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เนื่องจากยังมีความกังวลเรื่องความปลอดภัยถ้าหากจะนำไปประยุกต์ใช้จริง ซึ่งจากงานวิจัยของ Wong และคณะ (2014) มีความสนใจประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจกับสิ่งมีชีวิตเพื่อดูแนวโน้มถึงความเป็นไปได้ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดยผู้วิจัยได้ศึกษา *Salmonella* Typhimurium lytic bacteriophage, ϕ st1 ที่แยกได้จากมูลไก่ เพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* ในไก่ จากการศึกษาการใช้แบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 ในสภาวะร่างกายไก่ (*in vivo*) โดยใช้ไก่อายุ 1 วันจำนวน 200 ตัวจากฝูงสัตว์ปลอดโรค โดยแบ่งไก่ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว กลุ่มที่ 1 ฉีดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 ฉีดแบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 ความหนาแน่น 10^{12} PFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 3 ฉีด *S. Typhimurium* ความหนาแน่น 10^{10} PFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรและแบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 ความหนาแน่น 10^{12} PFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 4 ฉีด *S. Typhimurium* ความหนาแน่น 10^{10} PFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยการฉีดเข้าที่ลำไส้ใหญ่ของไก่และเก็บตัวอย่างสำหรับตรวจการมีอยู่ของ *S. Typhimurium* จากตัวอย่างตับ หัวใจ ม้ามและมูลไก่ ซึ่งพบว่า *S. Typhimurium* ในอวัยวะของไก่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังเก็บตัวอย่างลำไส้ไก่เพื่อหาปริมาณของ *S. Typhimurium* และแบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* เป็น 2.9 log CFU/มิลลิลิตร ภายใน 6 ชั่วโมงและไม่พบ *S. Typhimurium* หลังผ่านไป 24 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 ลดลงตลอดระยะเวลาการทดลองและลดลงเหลือ 1.9 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการบำบัดด้วยแบคทีเรียโอฟาจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอฟาจ ϕ st1 อาจทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อลดจำนวน *S. Typhimurium* ในไก่ได้ และจากงานวิจัยของ Mohammed Ali และ Jamalludeen (2015) คัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน เพื่อเป็นแนวทางในการนำ

แบคทีเรียโอฟาจไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะ โดยใช้ *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลินผสม 10 สายพันธุ์สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจจากโรงงานบำบัดน้ำเสีย ซึ่งผู้วิจัยคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจ 3 ตัวอย่างมาศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้งหมดมีความเสถียรในช่วง pH 4-10 การมีชีวิตอยู่รอดอยู่ในช่วง pH ที่กว้างอาจทำให้มีความเหมาะสมต่อการให้ยาทางปากในรูปของวัคซีนดีเอ็นเอที่ผลิตจากแบคทีเรียโอฟาจ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการตรวจวัดยีนที่สร้างสารพิษ (toxin encoding gene) โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยค้นหายีนที่ไม่พึงประสงค์ เช่น staphylococcal enterotoxin (*sea*, *seb*, *sec* และ *see*), exfoliating toxin (*eta* และ *etb*) และ toxic shock syndrome toxin (*tst*) ผลจาก PCR แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่ก่อให้เกิดสารพิษเนื่องจากไม่พบยีนที่สร้างสารพิษดังกล่าว ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้อาจสามารถใช้เป็นวิธีการทางเลือกแทนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ แต่ก็ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อประเมินผลในทางคลินิก การหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ของแบคทีเรียโอฟาจ เพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้มีความปลอดภัยสามารถนำไปใช้ประยุกต์ใช้ได้จริง

2.8 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจเชิงพาณิชย์

2.8.1 การกำหนดแนวทางเพื่อความปลอดภัยสำหรับการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจ

ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ต้องได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration) ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded As Safe หรือ GRAS) โดยผลิตภัณฑ์ที่จะได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัยจะต้องมีการตรวจสอบหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อพิสูจน์ถึงความปลอดภัย จากงานวิจัยของ Soni และคณะ (2010) รายงานคุณลักษณะที่พึงประสงค์ของแบคทีเรียโอฟาจที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เพื่อเป็นการกำหนดแนวทางการใช้แบคทีเรียโอฟาจในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนี้ 1) แบคทีเรียโอฟาจจะต้องมีความสามารถในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ในช่วงกว้าง เพื่อให้มั่นใจว่าแบคทีเรียโอฟาจนั้น ๆ จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์ในสปีชีส์หรือสกุลที่เป็นเป้าหมายได้หลายสายพันธุ์ 2) จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจไม่ควรรวมตัวกับจีโนมของโฮสต์ในระหว่างในวงจรการติดเชื้อ 3) ควรทราบลำดับจีโนมที่สมบูรณ์ของแบคทีเรียโอฟาจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ 4) ไม่มียีนที่มีคุณสมบัติก่อโรค หรือสร้างโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ 5) ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์สำหรับการทดลองในสัตว์ 6) สามารถขยายพันธุ์ได้ในโฮสต์ที่ไม่ก่อโรค

7) สามารถขยายสเกลสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

ข้อกังวลด้านความปลอดภัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้แบคทีเรียโอฟาจในอุตสาหกรรมอาหาร มีด้วยกัน 3 ด้าน ได้แก่ ความปลอดภัยด้านพิษวิทยา การเกิดอาการแพ้ที่อาจเป็นผลจากการใช้ผลิตภัณฑ์ และความเสี่ยงจากการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์เข้าสู่สิ่งแวดล้อม

ความปลอดภัยด้านพิษวิทยาของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจต่อผู้บริโภคเป็นสิ่งแรกที่ต้องพิจารณาถึง โดยข้อมูลจากการศึกษาโครงสร้างของแบคทีเรียโอฟาจพบว่าแบคทีเรียโอฟาจประกอบด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ถูกล้อมรอบด้วยสารเคลือบโปรตีน (capsid) ซึ่งจะสลายตัวไปเป็นกรดอะมิโนและกรดนิวคลีอิก ทั้งกรดอะมิโนและกรดนิวคลีอิกพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ และมีการรายงานว่าไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภค นอกจากนี้มีการคาดการณ์ว่าระดับของแบคทีเรียโอฟาจในมนุษย์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกรับประทานเข้าไป อันเป็นผลมาจาก 2 กระบวนการสำคัญ นั่นคือการเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีความเป็นกรดสูง และการสลายตัวของแบคทีเรียโอฟาจโดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสารเคลือบโปรตีนของแบคทีเรียโอฟาจ

อีกประการหนึ่งที่ต้องพิจารณาในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคคือความสามารถของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจในการผลิตสารประกอบที่สามารถก่อให้เกิดการแพ้ ซึ่งควรวิเคราะห์คุณลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจเพื่อตรวจสอบว่าจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจนั้นจะต้องไม่มียีนที่สามารถสารพิษ ยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ยีนที่อาจทำให้แบคทีเรียโอฟาจเกิดการกลายพันธุ์ หรือยีนที่ทำให้แบคทีเรียโอฟาจสามารถรวมตัวเข้ากับสารพันธุกรรมภายในโฮสต์ (Strauch et al., 2007) โดยวิธีการหนึ่งที่เป็นไปได้ในการลดความน่าจะเป็นของการส่งผ่านยีนไม่พึงประสงค์ไปในผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจขั้นสุดท้ายคือการใช้แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคสำหรับการผลิตแบคทีเรียโอฟาจ เช่น การอาศัยโฮสต์ *Listeria innocua* สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *L. monocytogenes*

นอกจากนี้การประเมินความเสี่ยงจากผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยเข้าสู่สิ่งแวดล้อม มีส่วนช่วยในแก้ปัญหาด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งควรมีการประเมินความเสี่ยงของการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ควรพิจารณาองค์ประกอบของของเสีย รวมถึงปริมาณและพื้นที่ที่จะปลดปล่อย เนื่องจากเรายังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียโอฟาจ จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียโอฟาจสามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมเป็นเวลานาน แต่จากข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียโอฟาจกับไดวาเลนต์แคตไอออน (divalent cation) และความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

รังสียูวี และเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ของจุลินทรีย์ (ที่เกิดจากแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม) ซึ่งส่งผลให้แบคทีเรียโอฟาจหยุดการทำงานและสลายตัวอย่างรวดเร็ว หลังถูกหยุดการทำงาน แบคทีเรียโอฟาจจะย่อยสลายไปเป็นกรดอะมิโนและนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อม (Carlton et al., 2005)

2.8.2 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจที่ผ่านการรับรอง

ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจชนิดแรกที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ Agriphage™ (Omnilytics Inc.) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในสหรัฐอเมริกา สำหรับใช้ในการบำบัดและควบคุมโรคใบจุดแบคทีเรีย (bacterial leaf spot) บนพืชผลทางการเกษตร ซึ่งมีสาเหตุจาก *Xanthomonas campestris* และ *Pseudomonas syringae* ทั้งนี้ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจมากมายที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ซึ่งมีความปลอดภัย (GRAS) สามารถผลิตในเชิงพาณิชย์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจ LMP-102 หรือ Listshield™ (Intralytix Inc.) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุม *L. monocytogenes* โดยถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบแต่งอาหารในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และสัตว์ปีกพร้อมรับประทาน (Bren, 2007) ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจ Listex™ P100 (PhageGuard Inc.) ซึ่งสามารถควบคุม *L. monocytogenes* เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจ Listshield™ แต่มักถูกใช้เป็นสารช่วยในกระบวนการผลิต (Processing aid) เหมาะสำหรับอาหารทุกประเภทที่ไวต่อการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคนี (Hagens and Offerhaus, 2008) อีกทั้ง Listex™ ยังได้รับการรับรองว่าเป็นผลิตภัณฑ์อินทรีย์ตามข้อกำหนดของแผนงานเกษตรอินทรีย์แห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจประเภทอื่นๆ ที่มีเป้าหมายเพื่อบำบัดและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น Ecoshield™ (Intralytix Inc.) ซึ่งถูกนำมาใช้ควบคุม *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Sillankorva et al., 2012) หรือ Salmofresh™ (Intralytix Inc.) ซึ่งถูกนำมาใช้ควบคุม *Salmonella enterica* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมถึงผักและผลไม้สดและแปรรูป

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย
1 kb VC marker	Vivantis, USA
6x loading dye	Vivantis, USA
95% ethanol	Alcohol-A, Thailand
Absolute ethanol	Lab Scan, Poland
Agar	TM Media, India
Agarose	Vivantis, USA
Chloroform	RCI Labscan, Thailand
Dextrose	Sisco Research, India
di-Potassium hydrogen orthophosphate	Ajax Finechem, USA
DNaseI	Panreac, Germany
<i>Eco</i> RI (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
Ethidium bromide	Fluka, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka, Germany
Gelatin	Criterion, USA
Glacial acetic acid	RCI Labscan, Thailand
<i>Hind</i> III (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
Hydrochloric acid	RCI Labscan, Thailand
Isoamyl alcohol	Merck, Germany
Lambda DNA	Vivantis, USA
Loading dye	Maestrogen, Taiwan
Magnesium chloride hexahydrate	Fluka, Germany
Magnesium sulfate heptahydrate	Ajax Finechem, USA
Phenol pellet	Panreac, Germany

สารเคมี

Proteinase K

RNase A

Sacl (Restriction enzyme)

Sodium acetate trihydrate

Sodium chloride

Sodium EDTA

Sodium hydroxide

Sodiumdodecylsulfate (SDS)

Soytone

Styl (Restriction enzyme)

Tris base

Tryptone

บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย

Vivantis, USA

Amresco, USA

Vivantis, USA

Himedia, India

RCI Labscan, Thailand

Central Drug House, India

RCI Labscan, Thailand

Sigma-Aldrich, USA

Himedia, India

Vivantis, USA

Amresco, USA

Sisco Research, India

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง**เครื่องมือและอุปกรณ์**

Autoclave

Auto pipette

Centrifuge

Dry bath

Hot air oven

Incubator

Laminar airflow carbinet

LED illuminator

Microcentrifuge

Microwave

Mini Horizontal Gel Electrophoresis

pH meter

Power supply

บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย

Tomy, Korea

Gilson, UK

Hermle, Germany

Major Science, Korea

Binder, Germany

Mettler, Germany

Haier, China

Maestrogen, Taiwan

Wisd, Korea

LG, Thailand

Major Science, Korea

Ohaus, China

Major Science, Korea

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย
Spectrophotometer	Mesulab, China
Vortex mixer	Isolab, Germany
Shaking water bath	Wisd, Korea
0.22 μ m PES syringe filter	Membrane solutions, USA
10 mL Syringe	Nipro, Thailand
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Sartorius, Korea
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius, Korea
เครื่องผลิตน้ำกลั่น	ELGA, UK
เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน	ELGA, UK
ตู้เย็น	Samsung, Korea

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 สายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะการเจริญเติบโต

ในงานวิจัยนี้ใช้ *S. aureus* 01 เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อคัดแยกและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ รวมทั้งใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่างๆของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้ แบคทีเรียดังกล่าวได้รับมาจากโรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ จังหวัดราชบุรี ซึ่งคัดแยกได้จากนมดิบ และเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยเฉพาะเลี้ยง *S. aureus* 01 ในทุก ๆ การทดลอง ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเหลว TSB ในอัตราส่วน 1:10 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ($O.D._{600\text{ nm}} = 1.3$) เพื่อให้ได้ mid-log phase *S. aureus* 01

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (bacteriophage host range) มีจำนวนทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ถูกเก็บรักษาในอาหารเหลว TSB ที่มีกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว พร้อมทั้งต่อเชื้อ (subculture) ซ้ำทุก ๆ 2-3 เดือน โดยปิเปตแบคทีเรียที่ถูกเก็บใน

กลีเซอรอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นใช้ลูป (inoculating loop) เชี่ยเชื้อลงในอาหารวุ้นเอียง TSA (slant agar)

ตารางที่ 5 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	แหล่งที่คัดแยก
<i>Staphylococcus aureus</i> 01	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> DN22	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> SM6	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> CM4	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> CH10	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> TMK3	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> MP128	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> MP34	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> NPT14	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> PNK38	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> KPS13	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i> JB8	โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ	นมดิบ
<i>Salmonella</i> Enteritidis DMST 8536	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	-
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	-

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ

เก็บตัวอย่างทั้งหมด 105 ตัวอย่าง ได้แก่ นมดิบ น้ำดื่มโค ของเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ รวมถึงน้ำทิ้งจากร้านค้าในตลาดสดและที่ที่คาดว่าจะมี *S. aureus* ทั้งในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจด้วยวิธีเพิ่มจำนวน (enrichment method) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Cervený และคณะ (2002) โดยดูดตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้ (supernatant) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมกับ mid-log phase *S. aureus* 01 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ข้ามคั้น จากนั้นปั่นเหวี่ยงของผสมดังกล่าวที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองผ่านตัวกรอง (polyethersulfone syringe filter หรือ PES) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate) ซึ่งเป็นส่วนของสารละลายแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายแบคทีริโอเฟจที่ได้ถูกนำมาทดสอบว่ามีแบคทีริโอเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* หรือไม่ โดยการทำให้ plaque assay ด้วยเทคนิค agar overlay assay ตามวิธีของ Adams (1959) โดยผสมสารละลายแบคทีริโอเฟจ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ mid-log phase *S. aureus* ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม molten soft agar (อาหารเหลว TSB ที่มี agar ความเข้มข้น 0.45 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเทของผสมที่ได้ทับลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตพลาไคที่เกิดขึ้น (plaque formation)

3.2.3 การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอเฟจ

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอเฟจดัดแปลงจากวิธีของ Mohammed Ali และ Jamalludeen (2015) เริ่มจากการเก็บพลาไคที่เกิดขึ้นหลังจากการทำ plaque assay โดยใช้ปิเปตทิปปลายตัด (pipette tip) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับการเจาะพลาไคเดี่ยว (single plaque) ที่ขึ้นอยู่บนผิวหน้าของอาหารแข็ง จากนั้นกระจาย (resuspend) พลาไคเดี่ยวที่เจาะขึ้นมา ใน SM buffer ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคั้น เพื่อให้แบคทีริโอเฟจแพร่ ออกมาจากชิ้นวุ้น สารละลายแบคทีริโอเฟจที่ได้นี้ถูกนำมาทำ plaque assay ซ้ำอย่างน้อย 3 รอบ ตามวิธีข้างต้น เพื่อให้มั่นใจว่าได้แบคทีริโอเฟจที่บริสุทธิ์

เมื่อทำบริสุทธิ์ครบ 3 ครั้งแล้วจะได้แบคทีริโอเฟจที่สร้างพลาไคขนาดสม่ำเสมอทั้งเพลท (homogenous plaque formation) จากนั้นดูด SM buffer ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงไปในเพลท และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคั้น เพื่อชะแบคทีริโอเฟจออกจากผิวหน้าของอาหารแข็ง จากนั้นดูดสารละลายที่ชะออกมาและนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองผ่านตัวกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง ซึ่งเป็นส่วนของ

สารละลายแบคทีริโอเฟจที่มีความบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.4 การเพิ่มปริมาณแบคทีริโอเฟจ

ผสมสารละลายแบคทีริโอเฟจที่มีความบริสุทธิ์จากขั้นตอนที่ 3.2.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร mid-log phase *S. aureus* 01 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ อาหารเหลว TSB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองผ่านตัวกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร ส่วนของของเหลวที่ผ่านการกรองจะนำมาหาความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจโดยการทำ plaque assay ด้วยเทคนิค agar overlay assay

3.2.5 การหาความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ

การหาความหนาแน่นแบคทีริโอเฟจด้วยเทคนิค agar overlay assay ตามวิธีของ Adams (1959) โดยนำแบคทีริโอเฟจที่ผ่านการเพิ่มปริมาณ มาเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย SM buffer ปลอดเชื้อ และดูดสารละลายแบคทีริโอเฟจในแต่ละระดับการเจือจางมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ mid-log phase *S. aureus* 01 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม molten soft agar (อาหารเหลว TSB ที่มี agar ความเข้มข้น 0.45 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเททับลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง TSA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนพลาไคที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพลาไคอยู่ในช่วง 30-300 พลาไค) และนำมาคำนวณค่าความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ ในหน่วย plaque-forming unit/มิลลิลิตร (PFU/มิลลิลิตร) ดังนี้ ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) = (จำนวนพลาไคที่ปรากฏ)/0.1 มิลลิลิตร ×ระดับการเจือจาง

3.2.6 การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

การทดสอบความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นด้วยวิธี spot test ตามวิธีของ Chopin และคณะ (1976) สายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

แสดงในตารางที่ 5 แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ถูกนำมาเลี้ยงจนกระทั่งอยู่ในระยะ mid log phase จากนั้นดูดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ molten soft agar (TSB ที่มี 0.45% agar) ปริมาตร 3 มิลลิตร แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง TSA รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว หยดสารละลายแบคทีเรียโอฟาจความหนาแน่น 10^8 PFU/มิลลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของอาหาร และหยด SM buffer ในปริมาตรเท่ากันสำหรับเป็นตัวควบคุม (control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายแบคทีเรียโอฟาจหรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าแบคทีเรียโอฟาจที่ใช้ในการทดลองนั้นสามารถติดเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้

3.2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) ดัดแปลงจากวิธีของ Wong และคณะ (2014) โดยการหยดแบคทีเรียโอฟาจความหนาแน่นประมาณ 10^9 PFU/มิลลิตร ลงบนตะแกรงทองแดงเคลือบคาร์บอน (copper grid) แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำมาย้อมสีแบบ Negative staining ด้วย uranyl acetate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 นาที บนตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Hitachi Hightech รุ่น HT7700 (ประเทศญี่ปุ่น) ที่กำลังไฟฟ้า 80 kV (ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) จำแนกชนิดของแบคทีเรียโอฟาจอาศัยเกณฑ์ของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (International Committee for Taxonomy of Viruses หรือ ICTV) และหาขนาดของแบคทีเรียโอฟาจจากค่าเฉลี่ยของการวัดผล 10 อนุภาค

3.2.8 การสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจ

การสกัดกรดนิวคลีอิกหรือจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction ซึ่งดัดแปลงจาก Phagehunting Protocols (2013) โดยดูดสารละลายแบคทีเรียโอฟาจความหนาแน่น 10^9 PFU/มิลลิตร ปริมาตร 1 มิลลิตร และ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม DNase I และ RNase A ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม EDTA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ และ Proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งเติม SDS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มของผสมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุกๆ 20 นาที ดูดของผสมที่ได้นี้ลงหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,300×g เป็นเวลา 10 นาที และดูดสารละลายชั้นบนซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวใสไปยังหลอดใหม่ (โดยใช้ทูปปลายตัดเพื่อป้องกันการขาดของกรตนิวคลีอิก) จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาณเท่ากับ ส่วนใสที่ดูดออกมา ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 11,300×g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวใสไปหลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใส และ sodium acetate, pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนกรตนิวคลีอิกที่ความเร็วรอบ 11,300×g เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนด้วย Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งตะกอนให้แห้งและละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนปลอดเชื้อและตรวจสอบจีโนมของแบคทีเรียโอฟาที่สกัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1×TAE หลอมให้เจลละลาย แล้วเทเจลลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber และเท 1×TAE ให้ท่วมเจล จากนั้นนำสารละลายกรตนิวคลีอิกที่สกัดได้ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 นำมาโหลดลงในช่องภายในอะกาโรสเจล พร้อมทั้งให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และส่องด้วยเครื่อง LED illuminator สำหรับการเปรียบเทียบขนาดของกรตนิวคลีอิกจะใช้ Lamda DNA/Styl marker เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.9 การวิเคราะห์กรตนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำสารละลายกรตนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาที่สกัดได้มาทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *Styl*, *HindIII* และ *SacI* โดยสภาวะที่ใช้ในการตัดกรตนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์เหล่านี้ได้ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ จากนั้นตรวจสอบรูปแบบจีโนมของแบคทีเรียโอฟาที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ผสมกับบัฟเฟอร์ 1×TAE พร้อมทั้งให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 30

นาที่ และส่องด้วยเครื่อง LED illuminator สำหรับการเปรียบเทียบขนาดของกรดนิวคลีอิกจะใช้ Lamda DNA/*Hind*III marker และ 1 kb DNA Ladder เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.10 การหาอัตราส่วนของแบคทีริโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ

การหาอัตราส่วนของแบคทีริโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อดัดแปลงจากวิธีของ Yang และคณะ (2010) โดยผสมสารละลายแบคทีริโอฟาจและ mid-log phase *S. aureus* 01 ให้ได้อัตราส่วนของปริมาณแบคทีริโอฟาจต่อปริมาณโฮสต์เซลล์ (MOI, Multiplicity of infection) เท่ากับ 0.1, 1 และ 10 ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยใช้สารละลายที่ไม่มีแบคทีเรีย (bacteria-free suspension) และ สารละลายที่ไม่มีแบคทีริโอฟาจ (phage-free suspension) เป็นการทดลองควบคุม (control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งมีการเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 รวมทั้งวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีริโอฟาจ

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของแบคทีริโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

	MOI 10	MOI 1	MOI 0.1	MOI 0.01
สารละลาย แบคทีริโอฟาจ	10 ⁹ PFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10 ⁹ PFU/มิลลิลิตร (0.3 มิลลิลิตร)	10 ⁹ PFU/มิลลิลิตร (0.03 มิลลิลิตร)	10 ⁹ PFU/มิลลิลิตร (0.003 มิลลิลิตร)
mid-log phase <i>S. aureus</i> 01	10 ⁸ CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10 ⁸ CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10 ⁸ CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10 ⁸ CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)
อาเหลว TSB	24 มิลลิลิตร	26.7 มิลลิลิตร	26.97 มิลลิลิตร	26.997 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 โดยดูโฮสต์เซลล์ที่ผ่านการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread ลงบนอาหารแข็ง TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี) คำนวณความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ในหน่วย colony-forming unit/มิลลิลิตร (CFU/มิลลิลิตร) ดังนี้ ความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 (CFU/มิลลิลิตร) = (จำนวนโคโลนีที่ปรากฏ)/0.1 มิลลิลิตร×ระดับการเจือจาง พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 (CFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (ชั่วโมง)

การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ โดยดูดสารละลายผสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000×g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองผ่านตัวกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate) และวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ ด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ (PFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (ชั่วโมง)

3.2.11 การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ

การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจดัดแปลงจากวิธีของ Chang และคณะ (2005) โดยผสมสารละลายแบคทีเรียโอฟาจและ mid-log phase *S. aureus* ให้ได้ MOI เท่ากับ 0.01 ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้แบคทีเรียโอฟาจยึดเกาะกับโฮสต์เซลล์ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000×g เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นส่วนของแบคทีเรียโอฟาจที่ไม่ยึดเกาะกับโฮสต์เซลล์ (unadsorbed phage) ทิ้งไป เก็บส่วนของตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นส่วนของแบคทีเรียโอฟาจที่ยึดเกาะกับโฮสต์เซลล์ (adsorbed phage) จากนั้นกระจายตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการติดเชื้อแล้วในอาหารเหลว TSB ปริมาตรเท่าเดิม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งมีการเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 นาที โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 นาที และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000×g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองผ่านตัวกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate) และวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ (PFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (นาที) คำนวณความหนาแน่นเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ (burst size) จากอัตราส่วนของความหนาแน่นแบคทีเรียโอฟาจที่ถูกปล่อยออกมาจาก

เซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของระยะแฝง (latent period) ต่อความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรก

3.2.12 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจดัดแปลงจากวิธีของ Phumkhachorn และ Rattanachaikunsopon (2010) นำน้ำกลั่นปลอดเชื้อ pH 6.9 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์และให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 28, 37, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรียโอฟาจปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความหนาแน่นสุดท้ายประมาณ 10^9 PFU/มิลลิลิตร) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที วิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจที่ยังมีชีวิตรอดด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ (PFU/มิลลิลิตร) กับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง (องศาเซลเซียส)

3.2.13 การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ

การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจดัดแปลงจากวิธีของ Jamalludeen และคณะ (2007) ปรับ pH อาหารเหลว TSB ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ pH ตั้งแต่ 2-11 จากนั้นดูอาหารเหลว TSB ที่ผ่านการปรับ pH แล้ว ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์และเติมแบคทีเรียโอฟาจปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความหนาแน่นสุดท้ายประมาณ 10^7 PFU/มิลลิลิตร) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์หาความหนาแน่นของฟาจที่ยังมีชีวิตรอดด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ (PFU/มิลลิลิตร) กับ pH

3.2.14 การควบคุม *S. aureus* 01 ในนมพาสเจอร์ไรส์

การทดสอบในตัวอย่างนมโดยใช้นมโคพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิสูง ตราดัชมิลล์ (Dutch mill selected) ซึ่งมี pH อยู่ในช่วง 6.8-6.9 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จำลองสภาวะการปนเปื้อนแบคทีเรียในปริมาณสูง โดย ผสม mid-log phase *S. aureus* 01 (ความหนาแน่นสุดท้าย 10^7 CFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ

แบคทีเรียโอฟาจ (ความหนาแน่นสุดท้าย 10^8 PFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในนมโคพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 จำลองสภาวะการปนเปื้อนแบคทีเรียในปริมาณต่ำ ผสม mid-log phase *S. aureus* 01 (ความหนาแน่นสุดท้าย 10^4 CFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และแบคทีเรียโอฟาจ (ความหนาแน่นสุดท้าย 10^8 PFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในนมโคพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

สำหรับชุดควบคุมจะแบ่งเป็นชุดควบคุมแบคทีเรียและแบคทีเรียโอฟาจ โดยชุดควบคุมแบคทีเรียจะไม่มีการเติมแบคทีเรียโอฟาจ (phage-free suspension) แต่เติม SM buffer แทนแบคทีเรียโอฟาจ ในขณะที่ชุดควบคุมแบคทีเรียโอฟาจจะไม่มีการเติมแบคทีเรีย (bacteria-free suspension) แต่เติมอาหารเหลว TSB แทนแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิสำหรับเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้กันโดยทั่วไป ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 รวมทั้งวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ

การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 โดยดูตัวอย่างนมที่ผ่านการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread ลงบนอาหารแข็ง TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี) คำนวณความหนาแน่นของ *S. aureus* พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *S. aureus* (CFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (นาท)

การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ โดยดูตัวอย่างนมปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับ SM buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000×g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองผ่านตัวกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate) และวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ ด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ (PFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (ชั่วโมง)

3.2.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ ผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย Duncan's multiple range tests พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 21

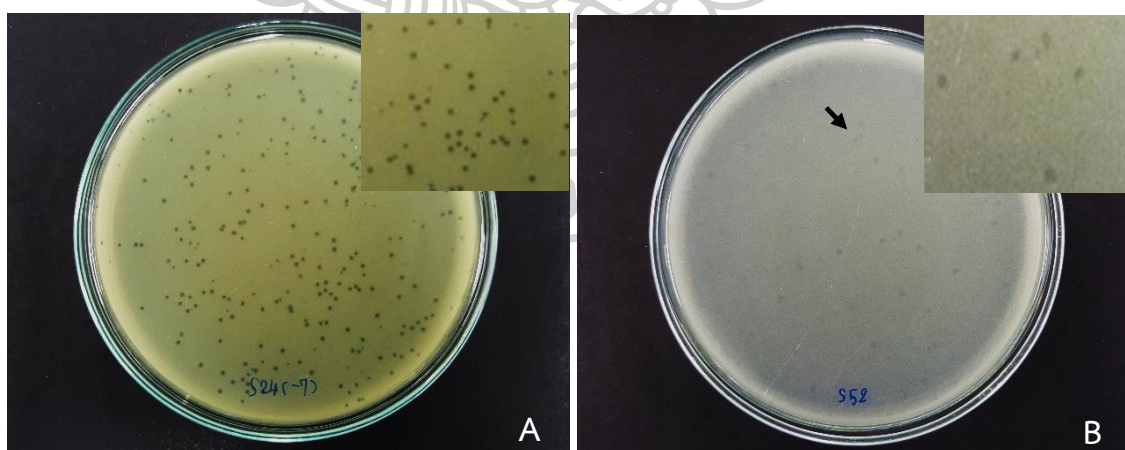


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* 01 จากตัวอย่างทั้งหมด 105 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีเพิ่มจำนวน (enrichment method) เพื่อเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียโอฟาจและ ตรวจสอบแบคทีเรียโอฟาจด้วยเทคนิค agar overlay assay จากผลการทดลองพบว่า 34 ตัวอย่างจากทั้งหมด (32.38%) มีการสร้างพลาไคที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนซึ่งแสดงว่าตัวอย่างนั้น ๆ มีแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* 01 อยู่ โดยพบว่า 23 ตัวอย่างจากทั้งหมด สามารถสังเกตเห็นการเกิดพลาไคที่ปรากฏบนอาหารแข็งโดยมีลักษณะเป็นวงใส (clear plaque) ทั้งที่มีและไม่มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาดแตกต่างกันโดยเฉลี่ยประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ซึ่งแบคทีเรียโอฟาจที่สร้างพลาไคใสจัดเป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติก (lytic bacteriophage) (รูปที่ 5A) และจาก 11 ตัวอย่าง สามารถสังเกตเห็นการเกิดพลาไคที่มีลักษณะขุ่น (turbid plaque) กว่าเมื่อเทียบกับแบบแรก ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic bacteriophage) (รูปที่ 5B) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจที่สร้างพลาไคที่มีลักษณะใสสำหรับศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 5 ลักษณะของพลาไคที่ปรากฏบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย (lawn of bacteria) โดยวิธี agar overlay assay (A) พลาไคใสที่เกิดจากไลติกแบคทีเรียโอฟาจ (lytic bacteriophage) ซึ่งได้จากตัวอย่างมูลโค (B) พลาไคขุ่นที่เกิดจากไลโซเจนิคแบคทีเรียโอฟาจ (lysogenic bacteriophage) ซึ่งได้จากตัวอย่างนมดิบ

หลังจากทำบริสุทธิ์ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 23 ตัวอย่าง โดยใช้เกณฑ์การตัดสินใจจากลักษณะและขนาดของพลาไคที่ปรากฏบนอาหารแข็งซึ่งมีความแตกต่างกัน ได้ไลติกแบคทีเรียโอฟาจ 30 ตัวอย่าง (Sau_RP01-Sau_RP30) ดังแสดงในตารางที่ 7 ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้ถูกเพิ่มปริมาณเพื่อเตรียมเป็น phage stocks ซึ่งมีความหนาแน่นเฉลี่ยประมาณ 10^8 - 10^{10} PFU/มิลลิลิตร



ตารางที่ 7 ผลการคัดแยกแบคทีเรียฟาจและลักษณะของพลาจจากตัวอย่างทั้ง 105 ตัวอย่าง

ลำดับที่	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียฟาจ	ลักษณะของพลาจที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียฟาจ
1	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาจไสขนาดเล็ประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP01
2	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาจไสขนาดเล็ประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP02
3	น้ำดื่มโค	-	-	-
4	น้ำดื่มโค	-	-	-
5	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาจไสขนาดเล็ประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP03
6	นมดิบ	-	-	-
7	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
8	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
9	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
10	น้ำทิ้งจากคอกโค	-	-	-
11	น้ำทิ้งจากคอกโค	-	-	-
12	น้ำดื่มโค	-	-	-
13	น้ำดื่มโค	-	-	-
14	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
15	น้ำดื่มโค	lytic bacteriophage	พลาจไสขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP04
16	น้ำล้างคอกโค	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียโอฟาจ	ลักษณะของพลาสมิดที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียโอฟาจ
17	ฟางที่โคกิน	-	-	-
18	กาบข้าวโพด	-	-	-
19	มูลโค	-	-	-
20	มูลโค	-	-	-
21	มูลโค	-	-	-
22	มูลโค	-	-	-
23	ฟางที่โคกิน	-	-	-
24	มูลโค	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP05
			พลาสมิดขนาดประมาณ 1.5 มม.	Sau_RP06
			พลาสมิดขนาดประมาณ 2 มม.	Sau_RP07
25	มูลโค	-	-	-
26	มูลโค	-	-	-
27	มูลโค	-	-	-
28	มูลโค	-	-	-
29	มูลโค	-	-	-
30	ฟางที่โคกิน	-	-	-
31	น้ำล้างคอกโค	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียโอฟาจ	ลักษณะของพลาสมิดที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียโอฟาจ
32	น้ำคร่ำโค	-	-	-
33	น้ำคร่ำโค	-	-	-
34	นมดิบ	-	-	-
35	นมดิบ	-	-	-
36	นมดิบ	-	-	-
37	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
38	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
39	น้ำล้างคอกโค	-	-	-
40	นมดิบ	-	-	-
41	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 2 มม.	Sau_RP08
			พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP09
			พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP10
			พลาสมิดขนาดประมาณ 1.5 มม.	Sau_RP11
			พลาสมิดขนาดประมาณ 2 มม.	Sau_RP12
42	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP13
43	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP14
44	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP15

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียโอฟาจ	ลักษณะของผลึกที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียโอฟาจ
45	นมดิบ	-	-	-
46	นมดิบ	-	-	-
47	นมดิบ	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP16
48	นมดิบ	-	-	-
49	นมดิบ	-	-	-
50	นมดิบ	-	-	-
51	นมดิบ	-	-	-
52	นมดิบ	lysogenic bacteriophage	ผลึกขนาดประมาณ 2 มม.	-
53	นมดิบ	-	-	-
54	นมดิบ	-	-	-
55	นมดิบ	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP17
56	นมดิบ	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP18
57	นมดิบ	-	-	-
58	นมดิบ	-	-	-
59	นมดิบ	-	-	-
60	นมดิบ	-	-	-
61	นมดิบ	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียฟาจ	ลักษณะของพลาสมิดที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียโฮฟาจ
62	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP19
63	นมดิบ	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP20
64	นมดิบ	-	-	-
65	น้ำล้างเตี๋ยงหมู	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP21
66	น้ำล้างเตี๋ยงหมู	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP22
67	น้ำล้างเตี๋ยงหมู	lysogenic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 1.5 มม.	-
68	น้ำล้างเตี๋ยงหมู	-	-	-
69	น้ำล้างเตี๋ยงหมู	-	-	-
70	น้ำล้างเตี๋ยงไก่	-	-	-
71	น้ำล้างเตี๋ยงไก่	lysogenic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 2 มม.	-
72	นมดิบ	lysogenic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	-
73	นมดิบ	lysogenic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	-
74	นมดิบ	-	-	-
75	นมดิบ	-	-	-
76	น้ำดื่มโค	lytic bacteriophage	พลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP23
77	น้ำดื่มโค	lysogenic bacteriophage	พลาสมิดขนาดประมาณ 1 มม.	-
78	น้ำล้างคอกโค	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

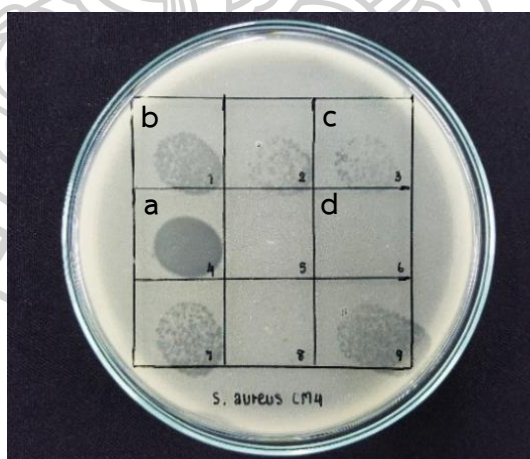
ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียโอฟาจ	ลักษณะของผลึกที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียโอฟาจ
79	ชิ้นส่วนเครื่องไนเก้	-	-	-
80	ชิ้นส่วนเครื่องไนเก้	-	-	-
81	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-	-	-
82	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-	-	-
83	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-	-	-
84	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-	-	-
85	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	lytic bacteriophage	ผลึกใสขอบนอกมีลักษณะขุ่นขนาดประมาณ 2 มม.	Sau_RP24
86	น้ำทิ้งจากร้านชำทะเลไก่	-	ผลึกใสขนาดประมาณ 1 มม.	Sau_RP25
87	น้ำทิ้งจากร้านชำทะเลไก่	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP26
88	น้ำทิ้งจากแผงผัก	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP27
89	น้ำล้างโคร่งไก่	-	-	-
90	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	-	-	-
91	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP28
92	น้ำทิ้งจากแผงอาหารทะเล	lysogenic bacteriophage	ผลึกขุ่นขนาดประมาณ 1 มม.	-
93	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	lytic bacteriophage	ผลึกใสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP29

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ	ประเภทของแบคทีเรียโอฟาจ	ลักษณะของพลาคที่ปรากฏบนอาหารแข็ง	แบคทีเรียโอฟาจ
94	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	lysogenic bacteriophage	พลาคขนาดประมาณ 1 มม.	-
95	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	-	-	-
96	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	lysogenic bacteriophage	พลาคขนาดประมาณ 1 มม.	-
97	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	lysogenic bacteriophage	พลาคขนาดประมาณ 1 มม.	-
98	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	lysogenic bacteriophage	พลาคขนาดประมาณ 1 มม.	-
99	น้ำทิ้งจากร้านขายหมู	-	-	-
100	เนื้อหมู	-	-	-
101	เนื้อหมู	-	-	-
102	น้ำทิ้ง	lytic bacteriophage	พลาคขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หรือน้อยกว่า 1 มม.	Sau_RP30
103	น้ำทิ้ง	-	-	-
104	น้ำทิ้ง	-	-	-
105	น้ำทิ้ง	-	-	-

4.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 30 ตัวอย่าง ในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยทดสอบกับ *S. aureus* จำนวน 12 สายพันธุ์ รวมทั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 8536 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ด้วยวิธี spot test (ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจประมาณ 10^8 PFU/ml) จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียโอฟาจ 21 ตัวอย่างจากทั้งหมด (Sau_RP01, Sau_RP02, Sau_RP03, Sau_RP04, Sau_RP07, Sau_RP08, Sau_RP09, Sau_RP10, Sau_RP11, Sau_RP12, Sau_RP14, Sau_RP15, Sau_RP16, Sau_RP17, Sau_RP18, Sau_RP19, Sau_RP20, Sau_RP21, Sau_RP22, Sau_RP29 และ Sau_RP30) สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมี *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่า Sau_RP04, Sau_RP11, Sau_RP15, Sau_RP16 และ Sau_RP29 ให้ระดับการเกิดโซนใส (clear zone) สูงที่สุดหรือเห็นได้อย่างชัดเจนกับ *S. aureus* ทั้ง 12 สายพันธุ์ ลักษณะโซนใสซึ่งเกิดจากการแบคทีเรียโอฟาจที่มีและไม่มีความสามารถในการติดเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 6 นอกจากนี้แบคทีเรียโอฟาจทั้ง 30 ตัวอย่าง ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียข้ามสกุลได้



รูปที่ 6 ลักษณะโซนใสที่ปรากฏบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* CM4 โดยวิธี spot test โดยกำหนดระดับโซนใสได้เป็น +++ (a), ++ (b), + (c) และ - (e)

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

แบคทีเรียโอฟาจ	สายพันธุ์แบคทีเรีย														
	<i>S. aureus</i> 01	<i>S. aureus</i> DN22	<i>S. aureus</i> SM6	<i>S. aureus</i> CM4	<i>S. aureus</i> CH10	<i>S. aureus</i> TMK3	<i>S. aureus</i> MP128	<i>S. aureus</i> MP34	<i>S. aureus</i> NPT14	<i>S. aureus</i> PNK38	<i>S. aureus</i> KPS13	<i>S. aureus</i> JB8	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	<i>S. Enteritidis</i> DMST 8536	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
Sau_RP01	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP02	+++	++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP03	+++	++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP04	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP05	++	+	+++	-	+	+++	+++	++	++	+++	++	++	-	-	-
Sau_RP06	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP07	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP08	++	+	++	+	+	+++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_RP09	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP10	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP12	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP13	+++	-	+++	+	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP14	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP17	+++	++	+++	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	-	-	-
Sau_RP18	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP19	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP20	+++	+	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

แบคทีเรีย รีโอไฟจ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	<i>S. aureus</i> 01	<i>S. aureus</i> DN22	<i>S. aureus</i> SM6	<i>S. aureus</i> CM4	<i>S. aureus</i> CH10	<i>S. aureus</i> TMK3	<i>S. aureus</i> MP128	<i>S. aureus</i> MP34	<i>S. aureus</i> NPT14	<i>S. aureus</i> PNK38	<i>S. aureus</i> KPS13	<i>S. aureus</i> JB8	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	<i>S. Enteritidis</i> DMST 8536	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
Sau_RP21		+++	+	+++	+	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP22		++	+	+++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	-	-	-
Sau_RP23		+++	-	+	-	-	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP24		+++	-	+	-	-	+++	-	++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP25		+++	-	++	+	-	+++	-	++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP26		+++	-	+	+	-	+++	-	++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP27		+++	-	+	-	-	+++	-	++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP28		+++	-	++	-	-	+++	-	++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP29		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sau_RP30		++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดโซนใส หรือ แบคทีเรียรีโอไฟจไม่มีความสามารถติดเชื้อแบคทีเรีย

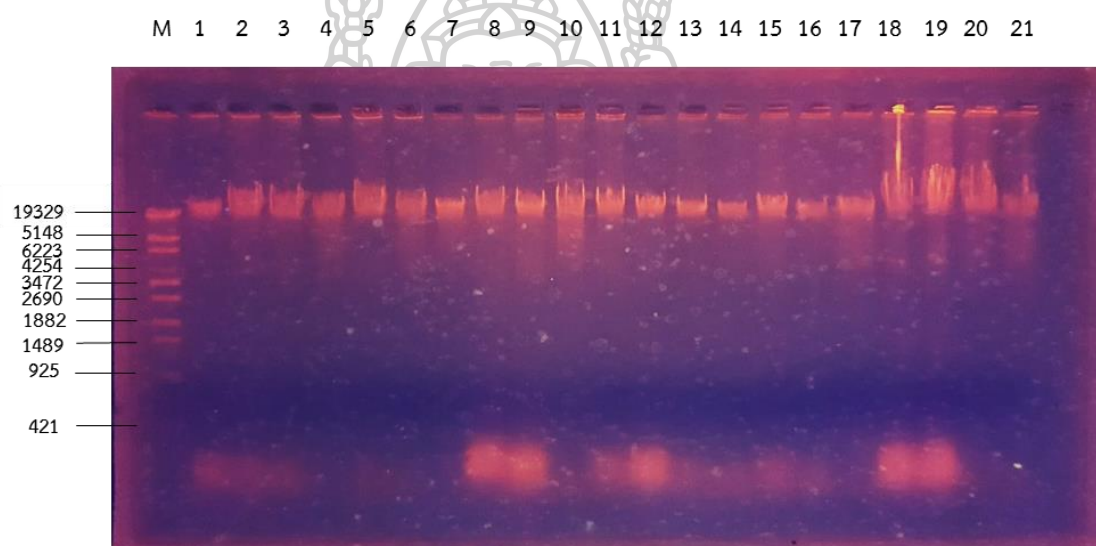
+ หมายถึง เกิดโซนใสระดับต่ำ หรือ แบคทีเรียรีโอไฟจมีความสามารถติดเชื้อแบคทีเรียต่ำ

++ หมายถึง เกิดโซนใสระดับปานกลาง หรือ แบคทีเรียรีโอไฟจมีความสามารถติดเชื้อแบคทีเรียปานกลาง

+++ หมายถึง เกิดโซนใสระดับสูงซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน หรือ แบคทีเรียรีโอไฟจมีความสามารถติดเชื้อแบคทีเรียสูง

4.3 การสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจ

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง (Sau_RP01, Sau_RP02, Sau_RP03, Sau_RP04, Sau_RP07, Sau_RP08, Sau_RP09, Sau_RP10, Sau_RP11, Sau_RP12, Sau_RP14, Sau_RP15, Sau_RP16, Sau_RP17, Sau_RP18, Sau_RP19, Sau_RP20, Sau_RP21, Sau_RP22, Sau_RP29, Sau_RP30) ซึ่งสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบสำหรับสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction และตรวจสอบจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจที่สกัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis จากผลการทดลองพบว่าจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง มีขนาดมากกว่า 19 kbp โดยประมาณ เมื่อเปรียบเทียบกับ Lambda DNA/Styl marker ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลการสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis โดยแถบ M = Lambda DNA/Styl marker, แถบ 1 = Sau_RP01, แถบ 2 = Sau_RP02, แถบ 3 = Sau_RP03, แถบ 4 = Sau_RP04, แถบ 5 = Sau_RP07, แถบ 6 = Sau_RP08, แถบ 7 = Sau_RP09, แถบ 8 = Sau_RP10, แถบ 9 = Sau_RP11, แถบ 10 = Sau_RP12, แถบ 11 = Sau_RP14, แถบ 12 = Sau_RP15, แถบ 13 = Sau_RP16, แถบ 14 = Sau_RP17, แถบ 15 = Sau_RP18, แถบ 16 = Sau_RP19, แถบ 17 = Sau_RP20, แถบ 18 = Sau_RP21, แถบ 19 = Sau_RP22, แถบ 20 = Sau_RP29, แถบ 21 = Sau_RP30

4.4 การวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

วิเคราะห์กรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอฟาจที่สกัดได้ในหัวข้อ 4.3 ทั้ง 21 ตัวอย่าง โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *EcoRI*, *Styl*, *HindIII* และ *SacI* จากผลการทดลองพบว่าการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วย *EcoRI* และ *Styl* ให้รูปแบบการตัดที่ชัดเจนกว่าเมื่อเทียบกับการตัดด้วย *HindIII* และ *SacI* ดังแสดงในรูปที่ 8 และ 9 สำหรับเกณฑ์ในการจัดกลุ่มแบคทีเรียโอฟาจโดยวิเคราะห์จากรูปแบบและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้

การตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Styl* สามารถแบ่งแบคทีเรียโอฟาจเป็น 2 แบบ ได้แก่

แบบที่ 1 จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Styl* โดยได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 23130 bp, 9416-10000 bp, 7000-9416 bp, 6557-7000 bp, 6200 bp, 5200 bp, 4000 bp, 3000-4000 bp, 3000-4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 2000-1500 bp และ 1500-1000 bp ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 11 ตัวอย่าง คือ Sau_RP01, Sau_RP08, Sau_RP10, Sau_RP11, Sau_RP14, Sau_RP15, Sau_RP16, Sau_RP17, Sau_RP18, Sau_RP19, Sau_RP22 และ Sau_RP30

แบบที่ 2 จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Styl* ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 10 ตัวอย่าง คือ Sau_RP02, Sau_RP03, Sau_RP04, Sau_RP07, Sau_RP09, Sau_RP12, Sau_RP20, Sau_RP21 และ Sau_RP29

การตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* สามารถพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันถึง 6 แบบ ได้แก่

แบบที่ 1 ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 23130 bp, 9000-10000 bp และ 6200 bp ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 3 ตัวอย่าง คือ Sau_RP01, Sau_RP02 และ Sau_RP21

แบบที่ 2 ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 23130 bp, 10000-23130 bp และ 7000 bp ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 6 ตัวอย่าง คือ Sau_RP04, Sau_RP08, Sau_RP11, Sau_RP14, Sau_RP16 และ Sau_RP17

แบบที่ 3 ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 23130 bp, 10000-23130 bp และ 6557 bp ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 2 ตัวอย่าง คือ Sau_RP07 และ Sau_RP15

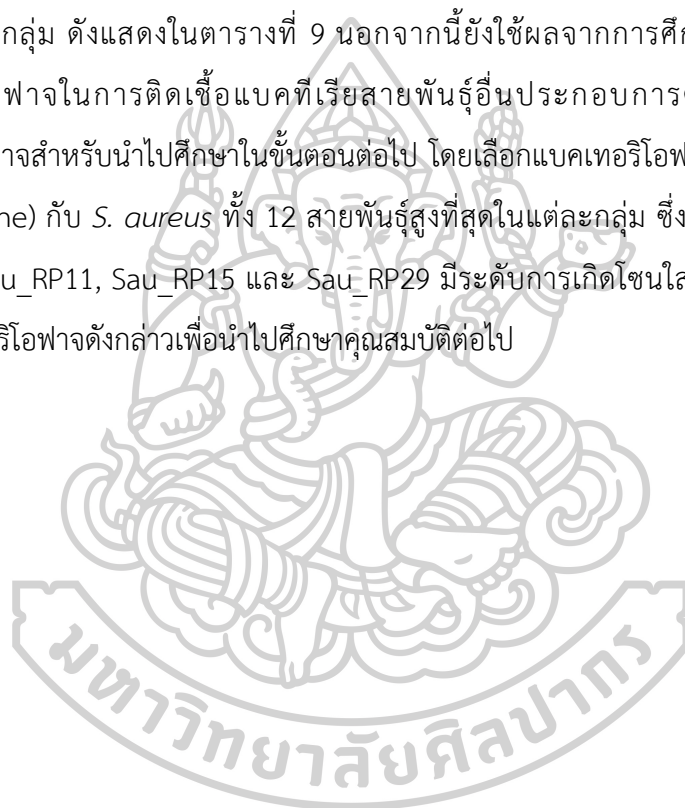
แบบที่ 4 ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 23130 bp, 23130 bp และ 9416 bp ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 6 ตัวอย่าง คือ Sau_RP09, Sau_RP10, Sau_RP12, Sau_RP18,

Sau_RP19 และ Sau_RP30

แบบที่ 5 ได้ขึ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 23130 bp, 9416-7000 bp และ 5200 bp ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 1 ตัวอย่าง คือ Sau_RP22

แบบที่ 6 ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ประกอบด้วยแบคทีเรียโอฟาจ 3 ตัวอย่าง คือ Sau_RP03, Sau_RP20 และ Sau_RP29

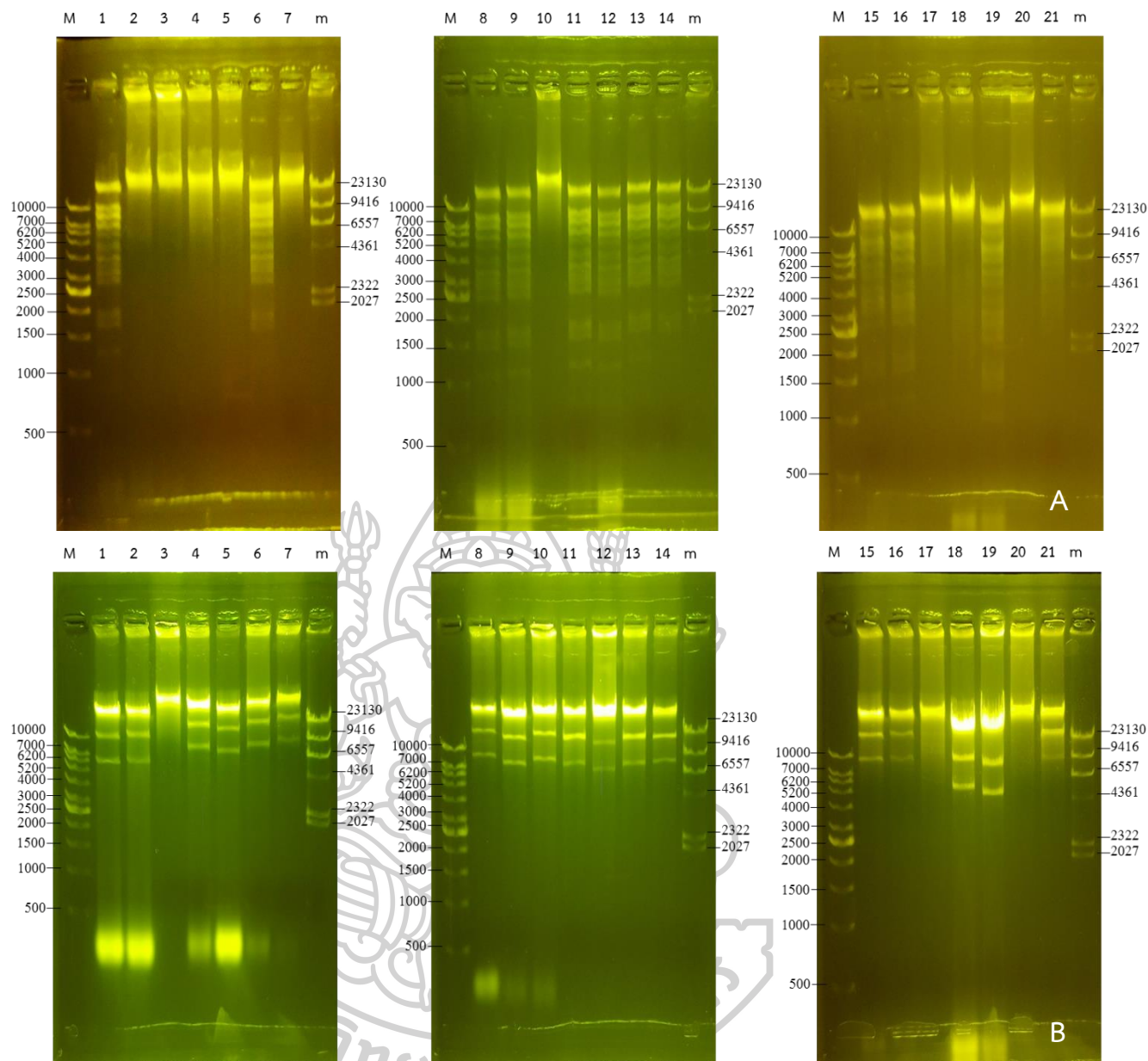
ผลจากการจัดกลุ่มแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง โดยอาศัยรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ Styl เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม สามารถแบ่งแบคทีเรียโอฟาจทั้งหมดออกเป็น 10 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 9 นอกจากนี้ยังใช้ผลจากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นประกอบการตัดสินใจเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจสำหรับนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยเลือกแบคทีเรียโอฟาจที่มีระดับการเกิดโซนใส (clear zone) กับ *S. aureus* ทั้ง 12 สายพันธุ์สูงที่สุดในแต่ละกลุ่ม ซึ่งพบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 มีระดับการเกิดโซนใสสูงที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป



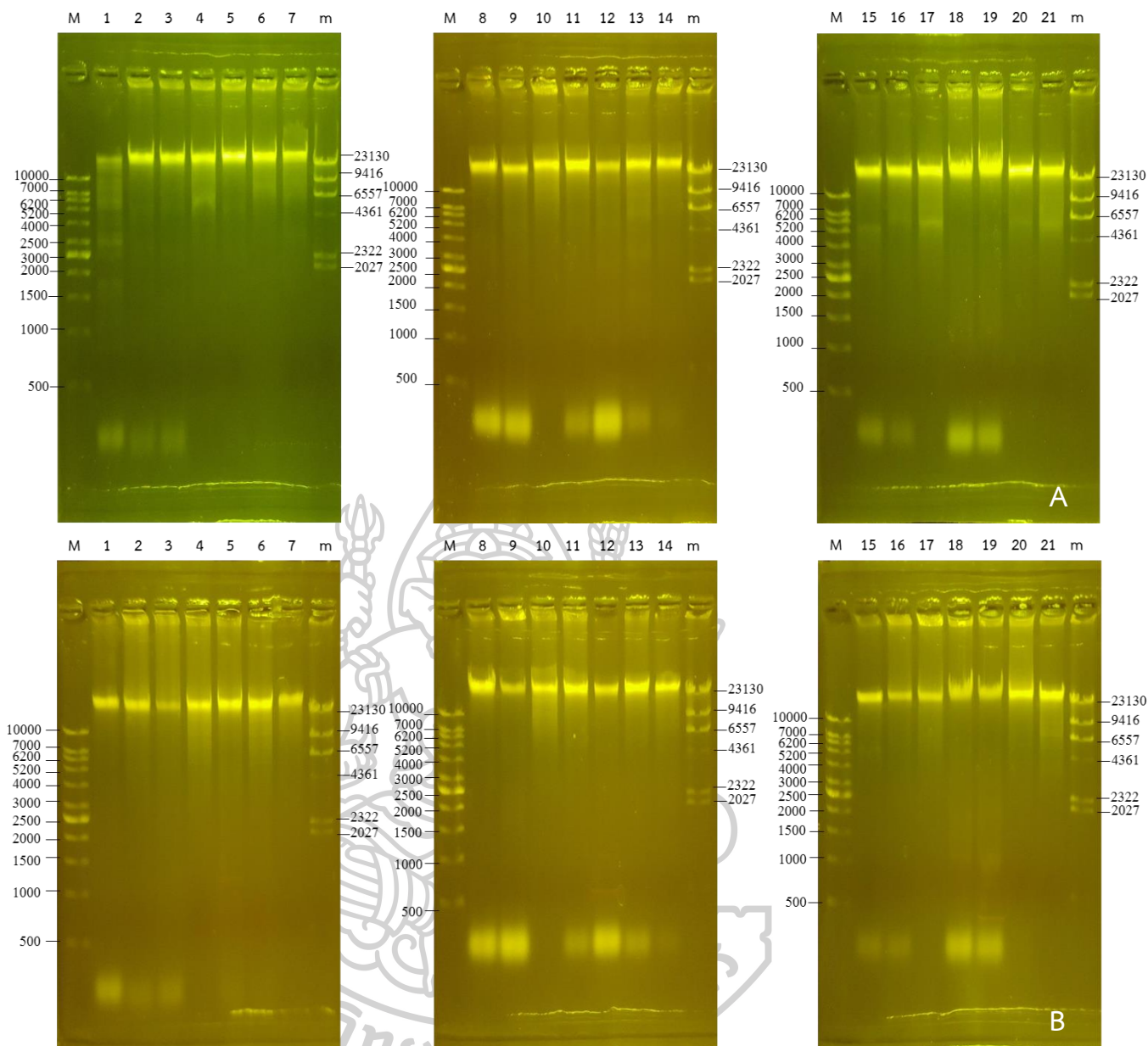
ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มแบคทีเรียโอฟาจโดยอาศัยรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *Styl*

กลุ่ม	ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจ	การตัดจีโนมของ แบคทีเรียโอฟาจด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Styl</i>	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (bp)
1	Sau_RP01	√	>23130 , 9000-10000, 6200
2	Sau_RP02, Sau_RP21	-	>23130 , 9000-10000, 6200
3	Sau_RP08, Sau_RP11 Sau_RP14, Sau_RP16 Sau_RP17	√	>23130, 10000-23130, 7000
4	Sau_RP04	-	>23130, 10000-23130, 7000
5	Sau_RP15	√	>23130, 10000, 6557
6	Sau_RP07	-	>23130, 10000, 6557
7	Sau_RP10, Sau_RP18 Sau_RP19, Sau_RP30	√	>23130, 23130, 9416
8	Sau_RP09, Sau_RP12	-	>23130, 23130, 9416
9	Sau_RP22	√	>23130, 9416-7000, 5200
10	Sau_RP03, Sau_RP20 Sau_RP29	-	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย √ หมายถึง จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจนั้น ๆ สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Styl* และ เครื่องหมาย - หมายถึง จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจนั้น ๆ ไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Styl*



รูปที่ 8 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Styl* (A) และ *EcoRI* (B) พร้อมทั้งตรวจสอบรูปแบบที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis โดยแถบ M = 1 kb DNA Ladder, แถบ m = Lambda DNA/*HindIII* marker, แถบ 1 = Sau_RP01, แถบ 2 = Sau_RP02, แถบ 3 = Sau_RP03, แถบ 4 = Sau_RP04, แถบ 5 = Sau_RP07, แถบ 6 = Sau_RP08, แถบ 7 = Sau_RP09, แถบ 8 = Sau_RP10, แถบ 9 = Sau_RP11, แถบ 10 = Sau_RP12, แถบ 11 = Sau_RP14, แถบ 12 = Sau_RP15, แถบ 13 = Sau_RP16, แถบ 14 = Sau_RP17, แถบ 15 = Sau_RP18, แถบ 16 = Sau_RP19, แถบ 17 = Sau_RP20, แถบ 18 = Sau_RP21, แถบ 19 = Sau_RP22, แถบ 20 = Sau_RP29, แถบ 21 = Sau_RP30



รูปที่ 9 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hind*II (A) และ *Sac*I (B) พร้อมทั้งตรวจสอบรูปแบบที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis โดยแถบ M = 1 kb DNA Ladder, แถบ m = Lambda DNA/*Hind*III marker, แถบ 1 = Sau_RP01, แถบ 2 = Sau_RP02, แถบ 3 = Sau_RP03, แถบ 4 = Sau_RP04, แถบ 5 = Sau_RP07, แถบ 6 = Sau_RP08, แถบ 7 = Sau_RP09, แถบ 8 = Sau_RP10, แถบ 9 = Sau_RP11, แถบ 10 = Sau_RP12, แถบ 11 = Sau_RP14, แถบ 12 = Sau_RP15, แถบ 13 = Sau_RP16, แถบ 14 = Sau_RP17, แถบ 15 = Sau_RP18, แถบ 16 = Sau_RP19, แถบ 17 = Sau_RP20, แถบ 18 = Sau_RP21, แถบ 19 = Sau_RP22, แถบ 20 = Sau_RP29, แถบ 21 = Sau_RP30

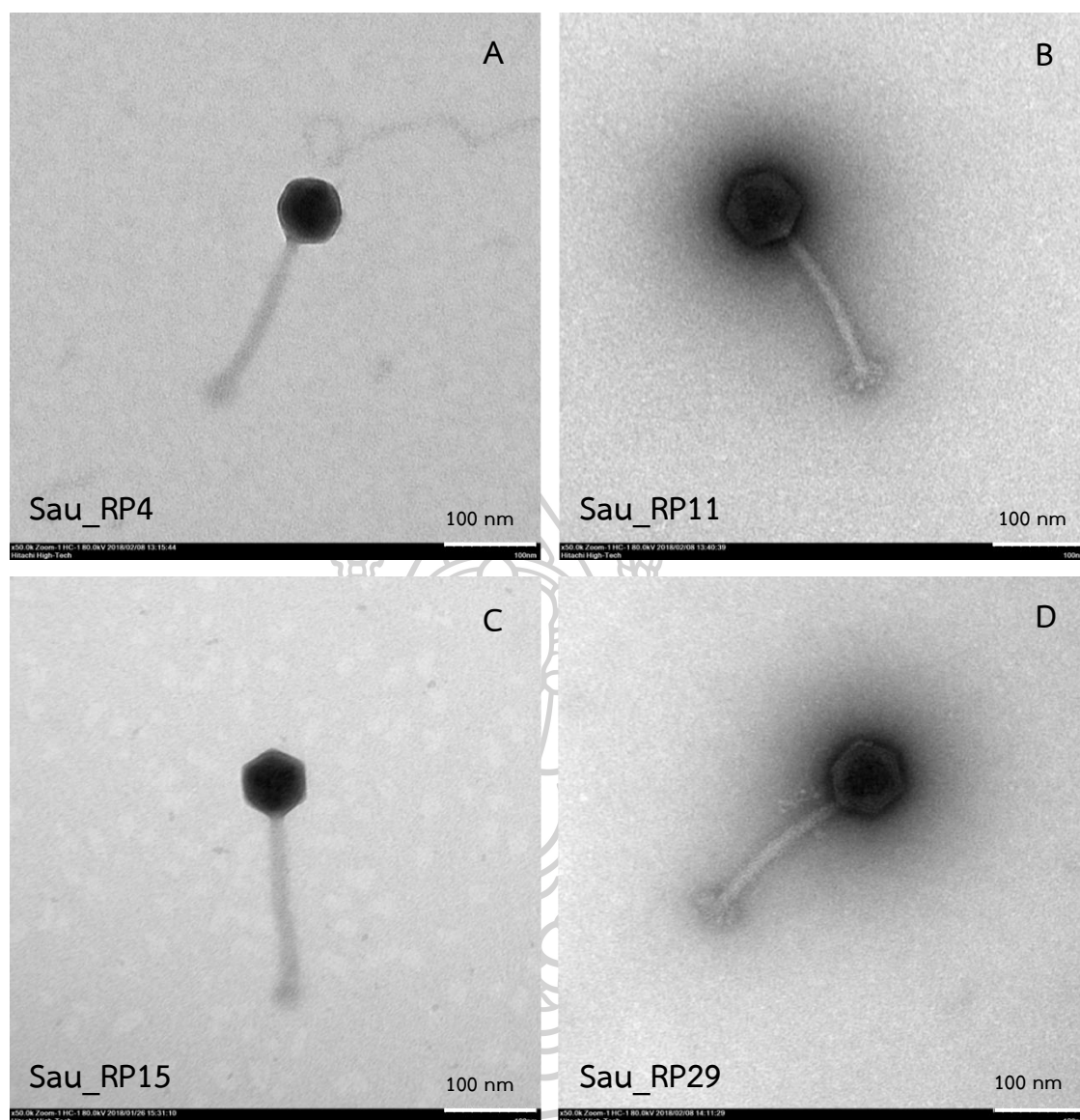
4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy) พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง เป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีหาง (Tailed phage) โดยส่วนหางมีลักษณะยาว ไม่มีเยื่อหุ้มบริเวณหาง (tail sheath) และไม่สามารถยืดหดได้ (long noncontractile tail) นอกจากนี้ส่วนหัวมีรูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral symmetry) (รูปที่ 10) ค่าเฉลี่ยขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอฟาจ แสดงไว้ในตารางที่ 10 จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่ม B ตามการจัดจำแนกของ Bradley (1967) และอยู่ใน Family *Siphoviridae* ตามเกณฑ์การจัดจำแนกของ คณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29

ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจ	ขนาดหัวของแบคทีเรียโอฟาจ		ความยาวหางของแบคทีเรียโอฟาจ (นาโนเมตร)
	ความกว้าง (นาโนเมตร)	ความยาว (นาโนเมตร)	
Sau_RP4	71.18±2.48	72.84±2.67	170.07±4.78
Sau_RP11	74.05±2.08	82.14±2.02	179.52±8.34
Sau_RP15	68.74±2.18	71.26±3.69	176.76±6.76
Sau_RP29	71.34±2.08	74.53±3.56	159.00±4.01

หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวัดผลซ้ำ 10 อนุภาค



รูปที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4 (A), Sau_RP11 (B), Sau_RP15 (C) และ Sau_RP29 (D) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 50,000 เท่า (Scale bar = 100 nm)

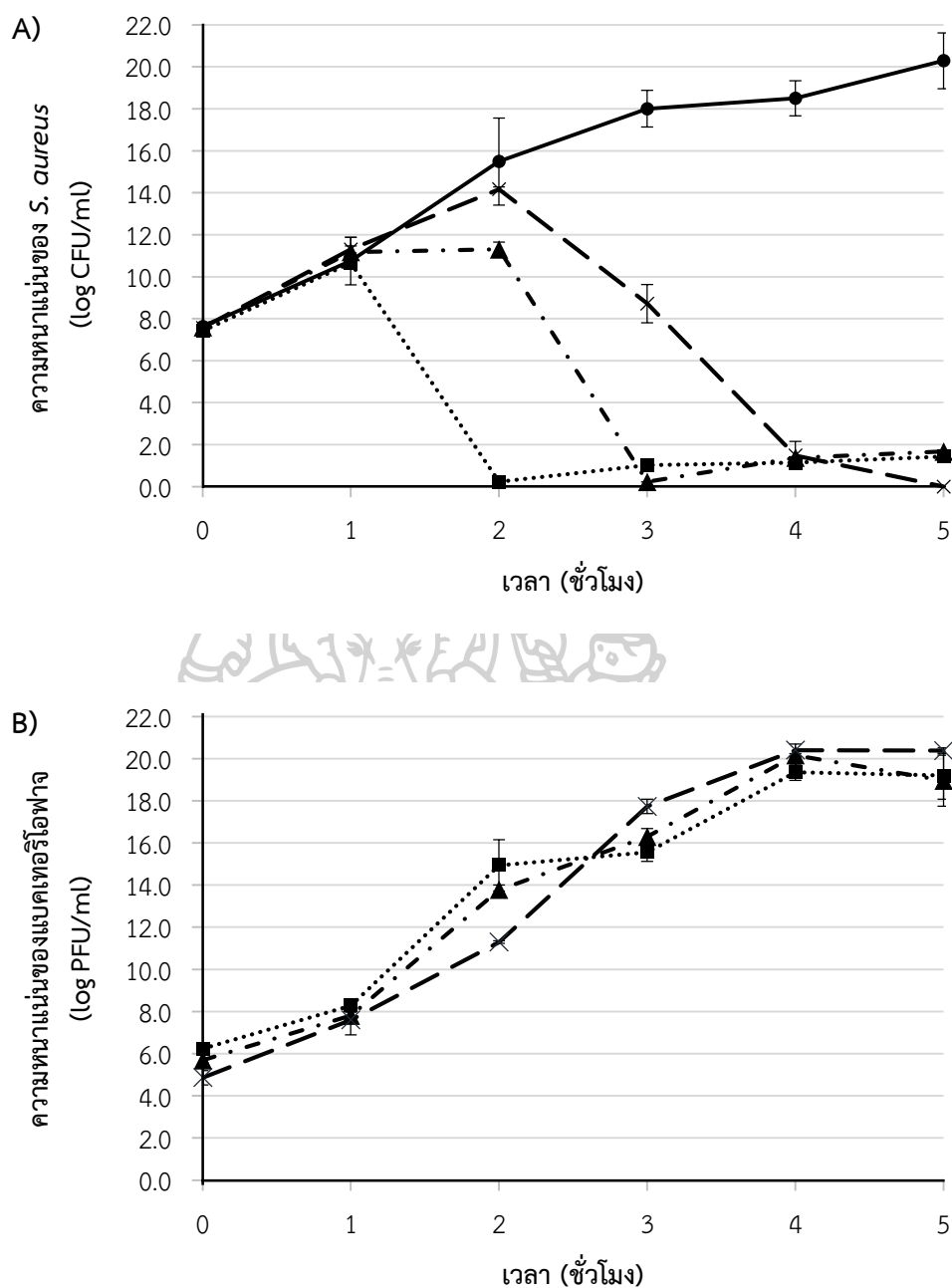
4.6 การหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียโอฟาจ (Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29) ต่อโฮสต์เซลล์ ด้วยการหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ หรือ MOI โดยผสมสารละลายแบคทีเรียโอฟาจและ mid-log phase *S. aureus* 01 ให้ได้ MOI เท่ากับ 0.1, 1 และ 10 และวิเคราะห์หาความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 และแบคทีเรียโอฟาจ จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 มีค่าอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ เท่ากับ 0.1 ดังแสดงในรูปที่ 11, 12, 13 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ใช้แบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อ *S. aureus* 01 ปริมาณน้อยแต่ก็สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ไม่ต่างกับ MOI เท่ากับ 1 และ 10 ($P>0.05$) ซึ่งสามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 โดยเฉลี่ย 19.63 ± 0.78 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าที่ MOI เท่ากับ 10 แบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับ MOI เท่ากับ 1 และ 0.1 (รูปที่ 11A, 12A, 13A และ 14A)

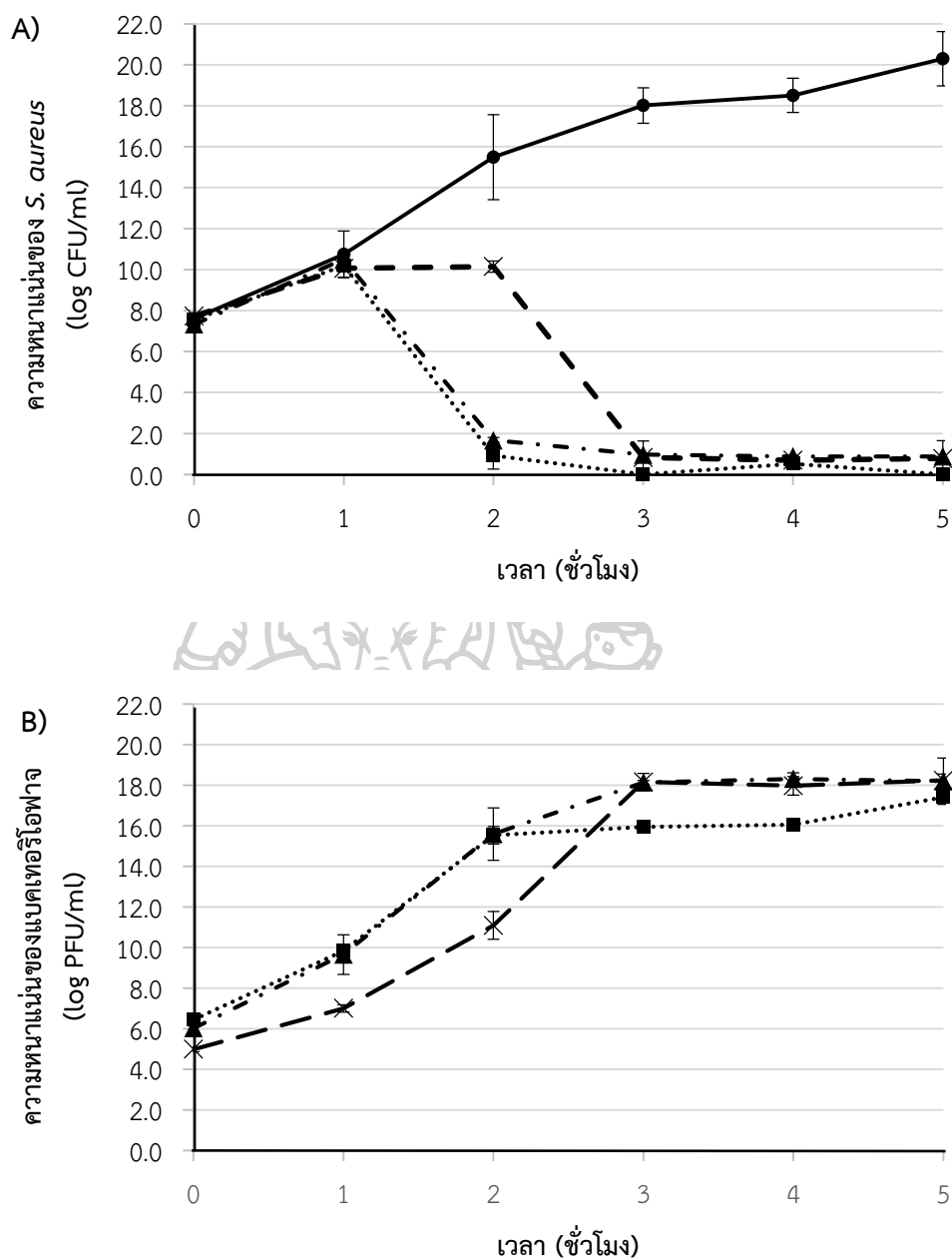
เมื่อเปรียบเทียบที่ MOI เท่ากับ 0.1 พบว่าปริมาณ *S. aureus* 01 ที่ลดลงเนื่องจากแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงแรกของการทดลอง ($P>0.05$) ในขณะที่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ถึง 10.32 ± 0.27 log CFU/ml ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11 และ Sau_RP29 ที่สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ 1.33 ± 0.10 , 5.39 ± 0.27 และ 5.96 ± 0.65 log CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 3 ของการทดลองแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 โดยเฉลี่ย 17.63 ± 0.24 log CFU/ml ในขณะที่แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้เพียง 9.69 ± 0.91 log CFU/ml อย่างไรก็ตามในชั่วโมงที่ 4 และ 5 พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ซึ่งสามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 โดยเฉลี่ย 17.69 ± 0.66 และ 19.87 ± 0.72 log CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง มีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) โดยแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 มี

แนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ซึ่งเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 15.51 ± 0.43 , 13.208 ± 0.38 , 12.03 ± 1.08 และ 10.96 ± 0.27 log PFU/ml ตามลำดับ (รูปที่ 11B, 12B, 13B และ 14B) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

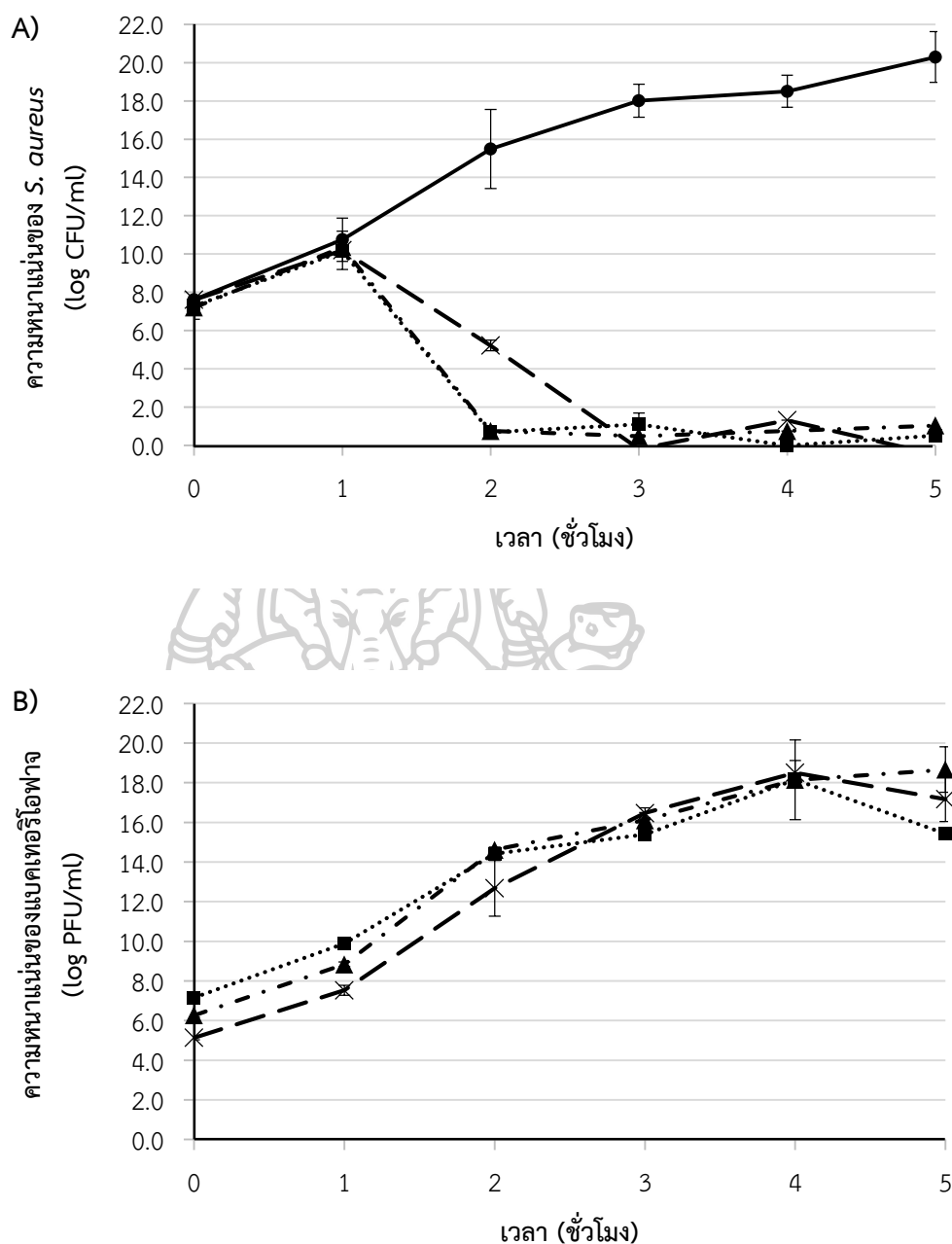




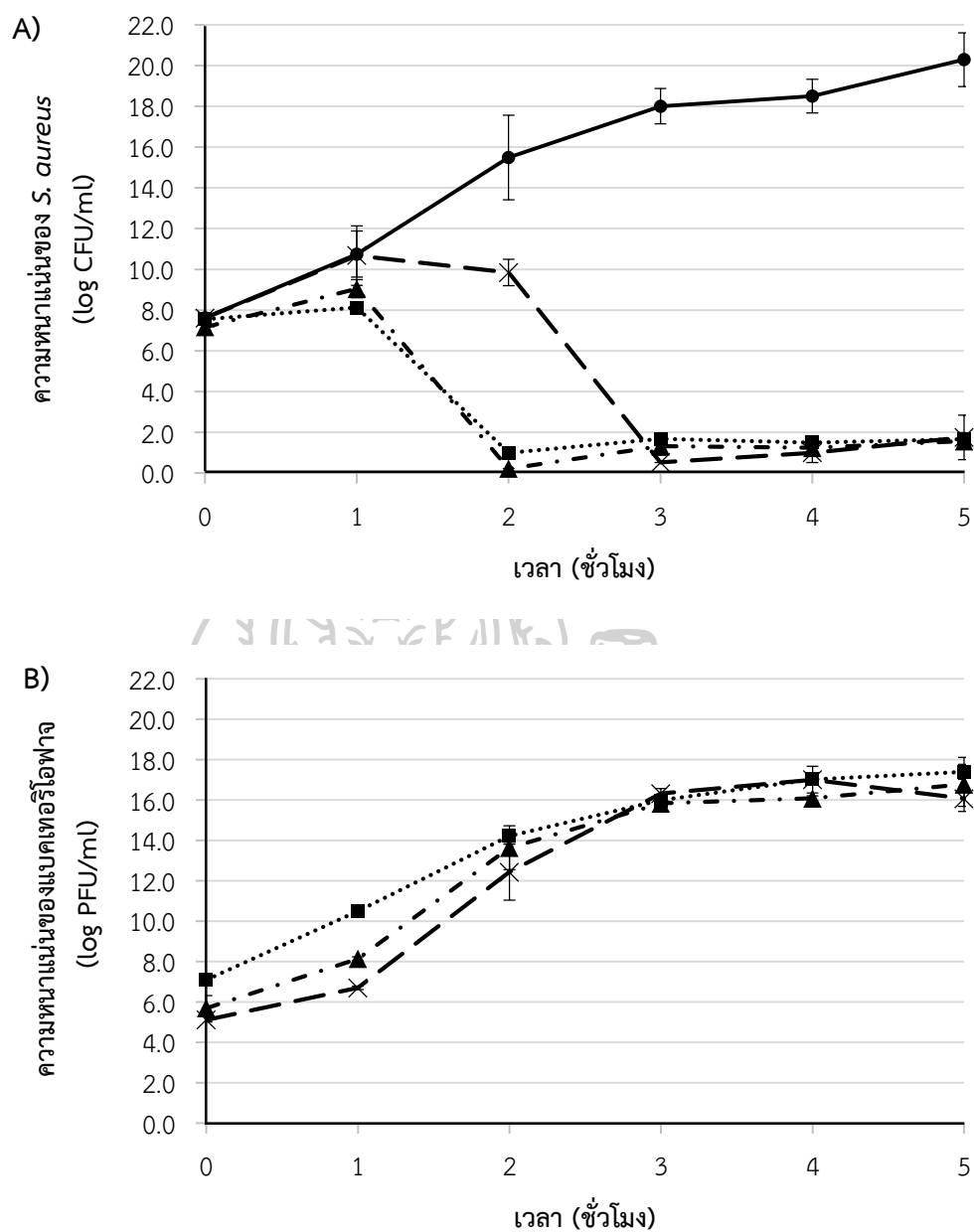
รูปที่ 11 ความหนาแน่นของ *S. aureus* (A) และ ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ Sau_RP4 (B) ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่อัตราส่วนของแบคทีริโอเฟจต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) เท่ากับ 0.1(X), 1(▲) และ 10(■) โดยมีชุดควบคุม *S. aureus*(●) เป็นตัวเปรียบเทียบความหนาแน่นของ *S. aureus* ณ ช่วงเวลาและ MOI ต่าง ๆ (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)



รูปที่ 12 ความหนาแน่นของ *S. aureus* (A) และ ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ Sau_RP11 (B) ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่อัตราส่วนของแบคทีริโอเฟจต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) เท่ากับ 0.1(X), 1(▲) และ 10(■) โดยมีชุดควบคุม *S. aureus*(●) เป็นตัวเปรียบเทียบความหนาแน่นของ *S. aureus* ณ ช่วงเวลาและ MOI ต่าง ๆ (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)



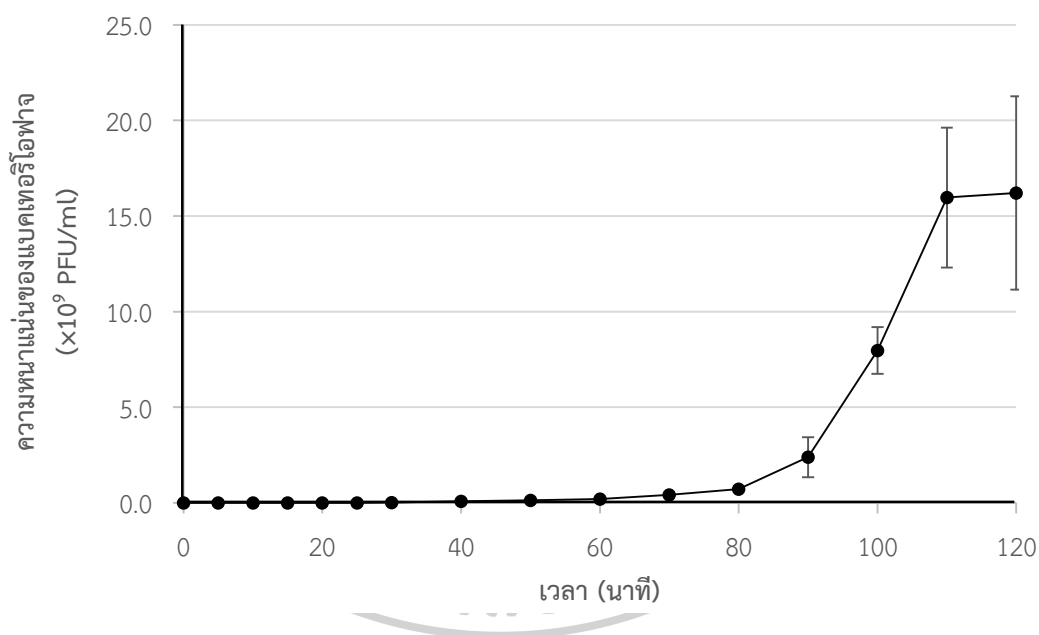
รูปที่ 13 ความหนาแน่นของ *S. aureus* (A) และ ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (B) ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) เท่ากับ 0.1(X), 1(▲) และ 10(■) โดยมีชุดควบคุม *S. aureus*(●) เป็นตัวเปรียบเทียบความหนาแน่นของ *S. aureus* ณ ช่วงเวลาและ MOI ต่าง ๆ (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)



รูปที่ 14 ความหนาแน่นของ *S. aureus* (A) และ ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ Sau_RP29 (B) ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่อัตราส่วนของแบคทีริโอเฟจต่อโฮสต์เซลล์ (MOI) เท่ากับ 0.1(X), 1(▲) และ 10(■) โดยมีชุดควบคุม *S. aureus*(●) เป็นตัวเปรียบเทียบความหนาแน่นของ *S. aureus* ณ ช่วงเวลาและ MOI ต่าง ๆ (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

4.7 การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ

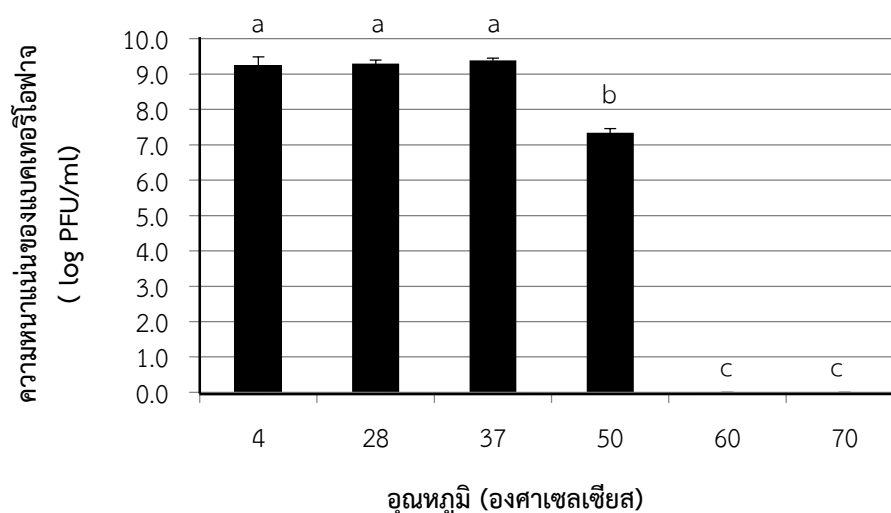
จากการศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ โดยการติดเชื้อ *S. aureus* 01 ด้วยแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (MOI = 0.01) พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีระยะแฝง (latent period) หรือช่วงเวลาตั้งแต่แบคทีเรียโอฟาจยึดเกาะกับโฮสต์เซลล์จนกระทั่งปลดปล่อยแบคทีเรียโอฟาจรุ่นใหม่่ออกสู่นอกโฮสต์เซลล์เป็นครั้งแรก ประมาณ 30 นาที และมีระยะเวลาที่มีการปลดปล่อยแบคทีเรียโอฟาจรุ่นใหม่่ออกมากที่สุดเป็นหนึ่งในรอบของการเจริญซึ่งเป็นเวลาที่โฮสต์เกิดการแตกสลายไปมากที่สุด (burst time) ประมาณ 110 นาที ดังแสดงในรูปที่ 15 และมีค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ (burst size) เท่ากับ 901.27 ± 244.28 PFU/infected cell



รูปที่ 15 การเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

4.8 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ

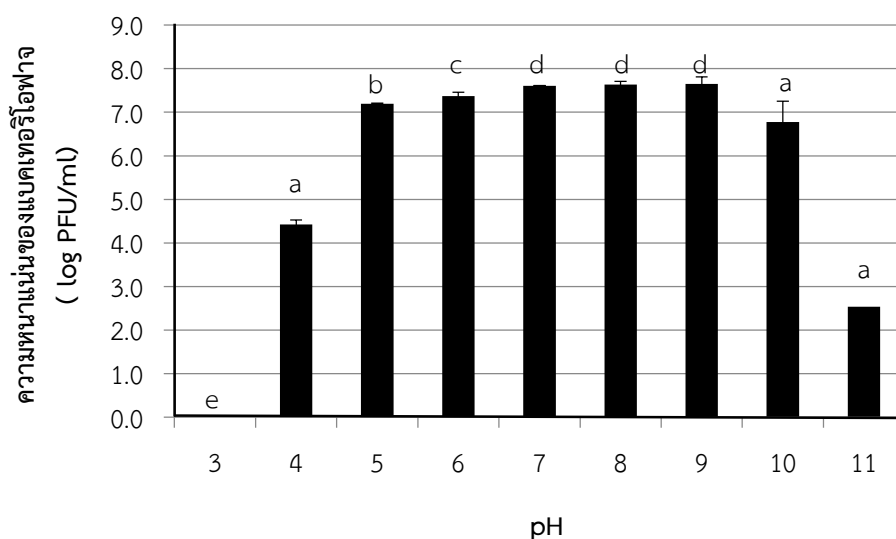
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (ความหนาแน่นประมาณ 10^9 PFU/ml) โดยการบ่มแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4, 28, 37, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจเริ่มต้น ($P>0.05$) ในขณะที่การบ่มแบคทีเรียโอฟาจที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มลดลง โดยลดลงไป 1.93 ± 0.05 log PFU/ml นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายหลังจากการบ่มแบคทีเรียโอฟาจในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ pH 6.9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) a, b และ c แทนกลุ่มของตัวอย่าง (Homogeneous Subsets) ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's multiple range tests (โดยกำหนดนัยสำคัญที่ $P<0.05$)

4.9 การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ

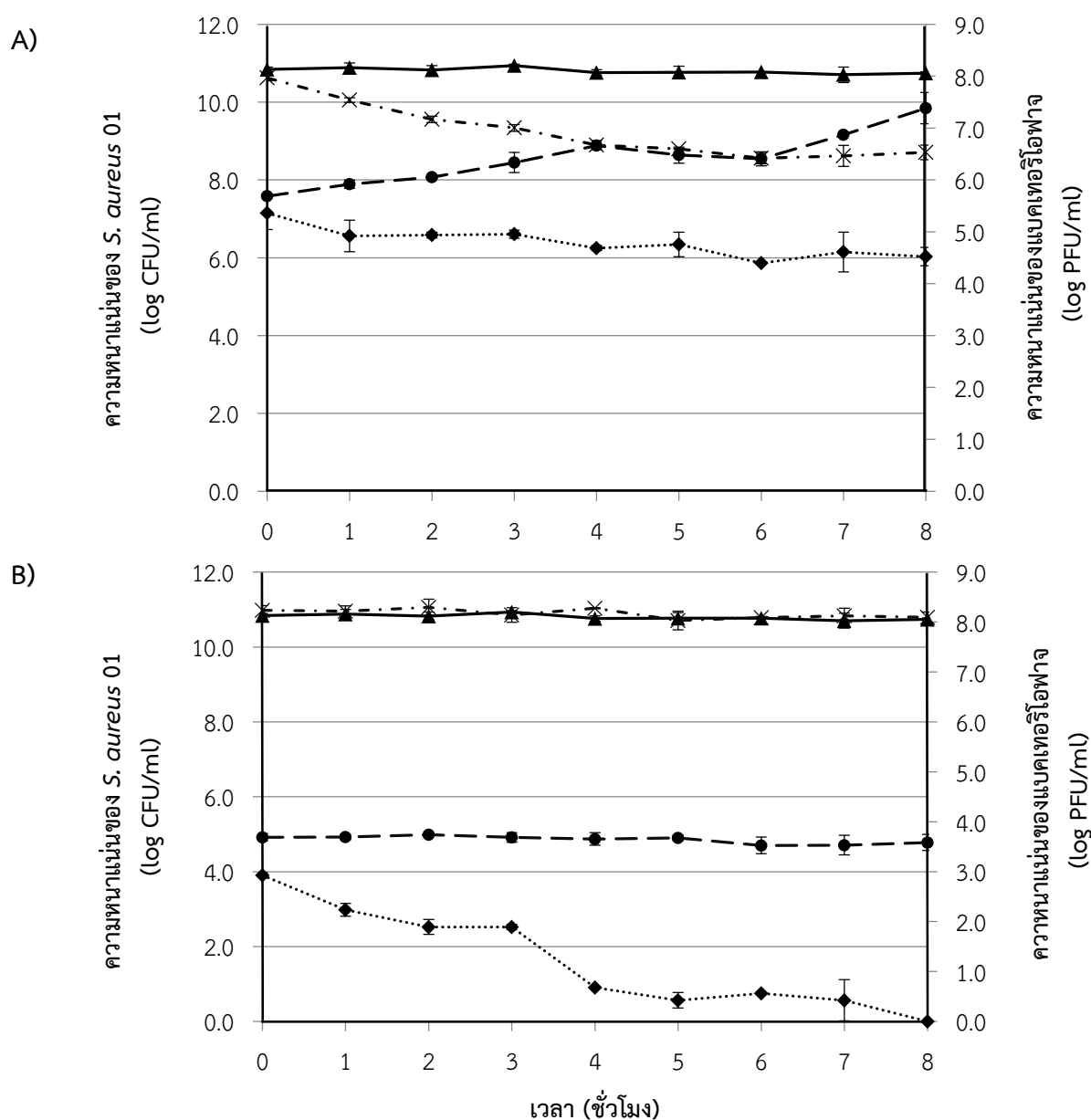
จากการศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (ความหนาแน่นประมาณ 10^7 PFU/ml) โดยการบ่มแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวที่ pH ตั้งแต่ 3-11 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่ pH เท่ากับ 7, 8 และ 9 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจาก ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจเริ่มต้น ($P>0.05$) ในขณะที่การบ่มแบคทีเรียโอฟาจที่ pH เท่ากับ 10 และ 11 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มลดลง โดยลดลงไป 0.84 ± 0.18 และ 5.09 ± 0.38 log PFU/ml ตามลำดับ ทั้งนี้การบ่มแบคทีเรียโอฟาจที่ pH เท่ากับ 6, 5 และ 4 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจก็มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน โดยลดลงไป 0.25 ± 3.32 , 0.429 ± 5.63 และ 3.19 ± 0.16 log PFU/ml นอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH เท่ากับ 3 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายหลังจากการบ่มแบคทีเรียโอฟาจที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) a, b, c, d และ e แทนกลุ่มของตัวอย่าง (Homogeneous Subsets) ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's multiple range tests (โดยกำหนดนัยสำคัญที่ $P<0.05$)

4.10 การควบคุม *S. aureus* 01 ในนมโคพาสเจอร์ไรส์

จากการทดลองการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมโคพาสเจอร์ไรส์ โดยจำลองสถานการณ์ปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งในปริมาณสูงและต่ำ ผลการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (ความหนาแน่น 10^8 PFU/ml) สำหรับการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีระดับการปนเปื้อนสูงถึง 10^7 CFU/ml พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ 0.60 ± 0.55 และ 1.05 ± 0.37 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 เริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 8 ตามลำดับ และลดลงไป 1.44 ± 0.51 และ 3.81 ± 0.51 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองควบคุม ในชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 8 ตามลำดับ ซึ่งหากไม่มีการควบคุมโดยใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 *S. aureus* 01 สามารถเจริญได้ถึงประมาณ 10^{10} CFU/ml ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย โดยลดลงไป 1.45 ± 0.19 log PFU/ml เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 18A และจากผลการทดลองการใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 (ความหนาแน่น 10^8 PFU/ml) สำหรับการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำที่ความหนาแน่น 10^4 CFU/ml พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ 0.93 ± 0.18 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 เริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 1 และลดได้ 1.95 ± 0.13 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองควบคุม ตั้งแต่ชั่วโมงแรก ในขณะที่แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งหากไม่มีการควบคุมโดยใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 *S. aureus* 01 สามารถเจริญได้ถึงประมาณ 10^5 CFU/ml ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มคงที่ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 18B



รูปที่ 18 การควบคุม *S. aureus* 01 ด้วยแบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจำลองสภาวะการปนเปื้อนแบคทีเรียในปริมาณสูง (10^7 CFU/ml) (A) และสภาวะการปนเปื้อนแบคทีเรียในปริมาณต่ำ (10^4 CFU/ml) (B) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ชุดควบคุม *S. aureus* 01 (●) กลุ่มที่ 2 ชุดการทดลองหาความหนาแน่น *S. aureus* 01 หลังจากมีการใช้แบคทีริโอเฟจ (◆) กลุ่มที่ 3 ชุดควบคุมแบคทีริโอเฟจ (▲) กลุ่มที่ 4 ชุดการทดลองหาความหนาแน่นแบคทีริโอเฟจหลังจากมีการใช้แบคทีริโอเฟจ (X) (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

นมและผลิตภัณฑ์นม จัดเป็นเครื่องดื่ม และ/หรือ อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเจริญของจุลินทรีย์ การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นมนั้นมักมีสาเหตุจากปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในนมดิบ หากไม่ได้รับการจัดการหรือควบคุมที่ดี จุลินทรีย์ดังกล่าวก็อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นได้ ซึ่งการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในนมและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. aureus* อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง เนื่องจาก *S. aureus* สามารถสร้างสารพิษ อีกทั้งตัวเชื้อเองยังก่อให้เกิดอันตราย เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะก่อให้เกิดโรคขึ้น (Que and Moreillon, 2010) โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะถูกส่งผ่านไปยังมนุษย์โดยการบริโภคนมและผลิตภัณฑ์นม ซึ่งการควบคุมการแพร่กระจายของแบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็นสิ่งที่ท้าทายอย่างมากสำหรับวิธีการในการควบคุมส่วนใหญ่ทั้งวิธีทางกายภาพและเคมียังส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์และผู้บริโภค การค้นหาวิธีการใหม่ ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์และผู้บริโภค ตลอดจนสิ่งแวดล้อม ยังคงดำเนินต่อไป โดยเมื่อเร็ว ๆ นี้การใช้แบคทีเรียโอฟาจเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีการทางเลือกในการควบคุมการติดเชื้อและการปนเปื้อนเชื้อโรคที่ติดต่อยาปฏิชีวนะ (Hanlon, 2007) ซึ่งมีหลาย ๆ งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจสำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจสำหรับการควบคุมการแพร่กระจายของ *S. aureus* ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต (Garcia et al., 2007) การควบคุมและป้องกันไม่ให้ *S. Enteritidis* เจริญในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษา cheddar cheese (Modi et al., 2001) หรือใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* ใน red smear cheese (Carlton et al., 2005) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* 01 พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดเลือกได้ สำหรับเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ควบคุม *S. aureus* ในนมและผลิตภัณฑ์นม ซึ่งเป็นแนวทางใหม่สำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในประเทศไทย การคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถคัดเลือกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากแหล่งที่มีโฮสต์เซลล์ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียโอฟาजनั้น ๆ อยู่ (Higgins et al., 2007) ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* 01 ได้สำเร็จจากตัวอย่างที่คาดว่าจะแหล่งของโฮสต์เซลล์ทั้งในตัวอย่างนมดิบจากถังนมรวม หรือตัวอย่างน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ แบคทีเรียโอฟาจทั้ง 34 ตัวอย่างที่คัดเลือกได้ มีการสร้างพลาไคที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน 2 ลักษณะ ทั้งพลาไคที่มีลักษณะใส (clear plaque) จำนวน 23 ตัวอย่าง และพลาไคที่มีลักษณะขุ่น (turbid plaque) อีก 11 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจที่สามารถสร้างพลาไคใส

จัดเป็นไวรุสเรนต์ฟาจ (virulent phage) ในขณะที่ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจีที่สร้างพลาซมิดเป็น เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage)

จากความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของแบคทีเรียโอฟาจีจึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียโอฟาจีที่มี วงจรชีวิตแบบไลโซเจนิคไม่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงของการบำบัดหรือควบคุม แบคทีเรียก่อโรค มีเพียงไวรุสเรนต์ฟาจเท่านั้นที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการควบคุมทาง ชีวภาพและนี้อาจเป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้ทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่มีความปลอดภัยมากที่สุด (Sillankorva et al., 2012) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงให้ความสนใจแบคทีเรียโอฟาจีที่สร้างพลาซมิด 23 ตัวอย่าง โดยอาศัยขนาดและลักษณะทางสัณฐานของพลาซมิดที่สามารถมองเห็น ด้วยตาเปล่าเป็นเกณฑ์สำหรับการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอฟาจี ภายหลังการทำบริสุทธิ์ได้ แบคทีเรียโอฟาจีทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างมีความหลากหลายของลักษณะและขนาดของ พลาซมิดแตกต่างกันออกไปโดยมีขนาดตั้งแต่ 1-2 มิลลิเมตร นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เพิ่มปริมาณ แบคทีเรียโอฟาจีทั้ง 30 ตัวอย่าง เพื่อเตรียมเป็น phage stocks ความหนาแน่นสูง สำหรับนำไปใช้ใน การทดสอบคุณสมบัติในขั้นต่อ ๆ ไป

หนึ่งในเกณฑ์ที่สำคัญที่สุดที่ต้องพิจารณาในการเลือกแบคทีเรียโอฟาจีที่มีประสิทธิภาพคือ ความสามารถในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของแบคทีเรียโอฟาจี ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา ความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจีทั้ง 30 ตัวอย่าง ในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จากผลการ ทดลองพบว่าแบคทีเรียโอฟาจี 21 ตัวอย่าง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมี *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่แบคทีเรียโอฟาจีอีก 9 ตัวอย่าง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมี *S. aureus* บางสายพันธุ์เท่านั้น อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอฟาจีทุก ๆ ตัวอย่างที่คัดแยกได้ไม่สามารถ ทำให้เกิดการติดเชื้อมี *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* และ *S. Typhimurium* อาจเป็น เพราะความจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาจีในการติดเชื้อมันจะถูกกำหนดจากขั้นตอนการยึดเกาะ (adsorption) ของแบคทีเรียโอฟาจีกับรีเซพเตอร์ (receptor) ที่อยู่บนเซลล์แบคทีเรียตั้งแต่ช่วงแรก ของการติดเชื้อ (Parisien et al., 2008) ซึ่งถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการติดเชื้อแบคทีเรียของ แบคทีเรียโอฟาจี โดยทั่วไปรีเซพเตอร์ของโฮสต์เซลล์จะแตกต่างกันเป็นผลมาจากองค์ประกอบของ ผนังเซลล์และโครงสร้างพื้นผิวของโฮสต์เซลล์ (Rakhuba et al., 2010) จากรายงานการวิจัยที่อธิบาย ถึงความสำคัญของโปรตีนที่ผนังเซลล์ในการทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ เช่น พอริน (Porins) ซึ่งเป็นหนึ่งใน โปรตีนชนิดแรกในเยื่อหุ้มชั้นนอกของจุลินทรีย์แกรมลบที่มีการศึกษาอย่างละเอียด (Nakae, 1976) โปรตีนเชิงซ้อนเหล่านี้ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ที่ทำให้เกิดช่องในเยื่อหุ้มของแบคทีเรีย โดยโปรตีน ที่สำคัญในเซลล์ *E. coli* คือ OmpC และ OmpF โดย OmpC ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์สำหรับ แบคทีเรียโอฟาจี Hy2, ss4, Tulb และ T4 (Skurray et al., 1974) โดยแบคทีเรียโอฟาจี T4 ใช้ OmpC เป็นรีเซพเตอร์ร่วมกับลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) การไม่มีรีเซพเตอร์เหล่านี้

อย่างน้อยหนึ่งตัว จะส่งผลให้ประสิทธิภาพต่อการติดเชื้อของแบคทีเรียโอฟาจ T4 ลดลง ในขณะที่การสูญเสียรีเซพเตอร์ทั้งสองจะทำให้แบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อแบคทีเรียโอฟาจ T4 ซึ่งนั่นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของรีเซพเตอร์บนโฮสต์เซลล์ต่อการติดเชื้อของแบคทีเรียโอฟาจ นอกจากนี้งานวิจัยของ Rakieten และ Rakieten (1937) พบว่าแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* อาจสามารถเกิดการยิดเกาะบนพื้นผิวของ *Bacillus subtilis* ได้เช่นเดียวกันเนื่องจากความคล้ายคลึงกันในแง่ของโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี (Jazwinski et al., 1975) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในการติดเชื้อของแบคทีเรียโอฟาจ แต่ถึงกระนั้นโดยส่วนใหญ่แบคทีเรียโอฟาจจะทำให้เกิดการติดเชื้อมีโฮสต์เซลล์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น (Braun and Hantke, 1977)

จากการศึกษาลักษณะจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง โดยการสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction และตรวจสอบจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจที่สกัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง มีขนาดมากกว่า 19 kbp เมื่อเปรียบเทียบกับ Lambda DNA/Styl marker ซึ่งการระบุขนาดจีโนมด้วยวิธีนี้เป็นการระบุโดยประมาณไม่แม่นยำเท่ากับการหาขนาดจีโนมด้วยเทคนิค pulse field gel electrophoresis สำหรับการวิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรียโอฟาจที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด คือ *EcoRI*, *Styl*, *HindIII* และ *SacI* จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอ (DNA phage) เนื่องจากจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ยกเว้น *Sau_RP03*, *Sau_RP20* และ *Sau_RP29* เป็นที่น่าสนใจที่แบคทีเรียโอฟาจทั้งสามตัวอย่างไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง *EcoRI* และ *Styl* อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ ไม่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction sites) ทั้ง 2 ชนิด หรืออาจเกิดจากกลไกการต่อต้านการตัดจำเพาะ (anti-restriction mechanism) ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Barrangou และคณะ (2002) ได้อธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากกลไกการต่อต้านการตัดจำเพาะ ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียโอฟาจโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอฟาจที่อยู่ใน Family *Siphoviridae* กลไกการต่อต้านการตัดจำเพาะมีด้วยกันหลายวิธีแต่ละวิธีส่งผลทำให้แบคทีเรียโอฟาจสามารถหลบเลี่ยงการทำลายโดยระบบการตัดจำเพาะของโฮสต์แบคทีเรียได้ (bacterial host restriction systems) กลไกเหล่านี้ได้แก่ การเปลี่ยนลำดับเบสในดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอฟาจ การขัดขวางตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยโปรตีนที่แบคทีเรียโอฟาจสร้างขึ้น หรือการยับยั้งเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยตรงโดยโปรตีนต่อต้านการตัดจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาจ (Pristas et al., 2014; Tock and Dryden, 2005; Vasu and Nagaraja, 2013) ทั้งนี้จากรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่โดยรวมทั้งผลจากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นทำให้สามารถ

จัดกลุ่มและคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจได้ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง คือ แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 สำหรับนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

แบคทีเรียโอฟาจสามารถแบ่งออกได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา แม้ว่าจะมีแบคทีเรียโอฟาจที่มีสัณฐานแตกต่างกันอยู่หลายชนิด แต่โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ใน Family *Myoviridae*, *Siphoviridae*, หรือ *Podoviridae* (Son et al., 2010) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่างนี้ จัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* ตามเกณฑ์การจัดจำแนกของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mohammed Ali และ Jamalludeen (2015) ได้คัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ ϕ SA1, ϕ SA2 และ ϕ SA3 ที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) โดยแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ จัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* รวมทั้งงานวิจัยของ Chang และคณะ (2015) ได้คัดแยกแบคทีเรียโอฟาจ ϕ SA97 ที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* และจากการศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ ϕ SA97 จัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวัดขนาดของแบคทีเรียโอฟาจที่ได้พบว่าล้วนแล้วแต่มีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียโอฟาจในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปแบคทีเรียโอฟาจที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีหาง (Tailed phage) โดยส่วนหางมีลักษณะยาว ไม่มีเยื่อหุ้มบริเวณหาง (tail sheath) และไม่สามารถหดได้ (long noncontractile tail) อีกทั้งส่วนหัวมีรูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral symmetry) และมีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) ซึ่งมักมีขนาดอยู่ในช่วง 40-50 kbp (Pasharawipas et al., 2005) จนถึงปัจจุบันจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ที่ใหญ่ที่สุดที่เคยมีรายงานไว้คือ *Bacillus* phage SPBc2 ซึ่งมีขนาดจีโนมประมาณ 134 kbp (Hatfull, 2008) ในขณะที่แบคทีเรียโอฟาจที่มีจีโนมขนาดใหญ่ 200-300 kbp โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียโอฟาจที่จัดอยู่ใน Family *Myoviridae* (Hansen et al., 2007; Seaman and Day, 2007)

ปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียโอฟาจและโฮสต์เซลล์เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการกำหนดประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียโอฟาจในเชิงบำบัด (Wong et al., 2014) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของอัตราส่วนแบคทีเรียโอฟาจ (Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29) ต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (Optimal multiplicity of infection) จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้ออยู่ที่ MOI เท่ากับ 0.1 และเมื่อเปรียบเทียบกับ MOI เท่ากับ 0.1 พบว่าปริมาณ *S. aureus* 01 ที่ลดลงเนื่องจากแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงแรก

ของการทดลอง ($P>0.05$) ในขณะที่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่างสามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ถึง 10.32 ± 0.27 log CFU/ml ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11 และ Sau_RP29 นอกจากนี้ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมงมีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) โดยความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ซึ่งเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 15.51 ± 0.43 , 13.208 ± 0.38 , 12.03 ± 1.08 และ 10.96 ± 0.27 log PFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากที่ MOI เท่ากับ 0.1 แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ถึง 10.32 ± 0.27 log CFU/ml ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และสามารถเพิ่มจำนวนได้ถึง 12.03 ± 1.08 log PFU/ml ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง จากงานวิจัยของ Han และคณะ 2013 ได้ศึกษาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจ ต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ โดยผสมสารละลายแบคทีเรียโอฟาจ SAH-1 และ mid-log phase *S. aureus* N315 ให้ได้ MOI เท่ากับ 0.01, 1 และ 100 หลังจากนั้น บ่มของผสมที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญของโฮสต์แบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม (OD_{600}) ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าที่ MOI เท่ากับ 0.01 การเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการบ่ม ในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียที่ MOI เท่ากับ 1 มีแนวโน้มลดลงภายหลังการบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และการเจริญของแบคทีเรียที่ MOI เท่ากับ 100 มีแนวโน้มลดลงทันทีหลังจากเกิดการติดเชื้อด้วยแบคทีเรียโอฟาจ โดยทั่วไปการใช้ MOI ที่ต่ำมีข้อดีในแง่ของการผลิตขนาดใหญ่ (large scale production) ในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอฟาจเชิงการค้า เนื่องจากสามารถลดต้นทุนหรือค่าใช้จ่ายในการผลิต ตลอดจนการทำให้บริสุทธิ์ (Raya et al., 2006; Toro et al., 2005) แต่ถึงกระนั้นการลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกระบวนการอุตสาหกรรม โดยใช้เวลาไม่มากก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงการบำบัดหรือควบคุม

จากกราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีระยะแฝง (latent period) เท่ากับ 30 นาที และค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ (burst size) เท่ากับ 901.27 ± 244.28 PFU/infected cell เช่นเดียวกับแบคทีเรียโอฟาจ SA ซึ่งมี latent period 30 นาที และมี burst size เท่ากับ 1000 PFU/infected cell (Hamza et al., 2016) burst size ของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ถือว่ามีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* อื่น ๆ ได้แก่ แบคทีเรียโอฟาจ SAH-1 (latent period 20 นาที, burst size 100 PFU/infected cell) (Han et al., 2013)

แบคทีเรียโอฟาจ SPW (latent period 10-15 นาที, burst size 44 PFU/infected cell) (Li and Zhang, 2014) แบคทีเรียโอฟาจ SA97 (latent period 20 นาที, burst size 32 PFU/infected cell) (Chang et al., 2015) แบคทีเรียโอฟาจ SAP-26 (latent period 15 นาที, burst size 107 PFU/infected cell) (Rahman et al., 2011) และแบคทีเรียโอฟาจ IME-SA1 (latent period 20 นาที, burst size 80 PFU/infected cell) (Fan et al., 2016) ความแปรผันของระยะแฝง และค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของโฮสต์เซลล์หรือแม้กระทั่งสภาวะการเลี้ยงเชื้อ เช่น เชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ (Müller-Merbach et al., 2007; You et al., 2002) ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลโดยตรงต่อปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียโอฟาจและโฮสต์เซลล์ทั้งสิ้น จากงานวิจัยของ Hadas และคณะ (1997) ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ T4 ที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* B/r (H266) โดยการเพาะเลี้ยง *E. coli* B/r (H266) ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอน (carbon sources) แตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบของอาหารเหลวที่แตกต่างกันส่งผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรีย (bacterial growth rate หรือ μ) ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์จะแปรผันตรงกับอัตราการเจริญของแบคทีเรีย อีกทั้งในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์สูงจึงอาจทำให้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจเชิงการบำบัดหรือควบคุม (phage therapy)

ความเสถียรของแบคทีเรียโอฟาจต่ออุณหภูมิเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของแบคทีเรียโอฟาจสำหรับการประยุกต์ใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งแบคทีเรียโอฟาจต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการทนความร้อนได้แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียโอฟาจ ϕ JL-1 สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส (Lu et al., 2003) ในขณะที่แบคทีเรียโอฟาจ PL-1 สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Watanabe et al., 1970) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยลดลงไป $1.93 \pm 0.05 \log \text{ PFU/ml}$ และถูกทำลายอย่างสมบูรณ์เมื่อเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับการทนความร้อนของแบคทีเรียโอฟาจที่ได้นี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำแบคทีเรียโอฟาจไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากหากทราบอุณหภูมิที่สามารถทำลายหรือส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจนั้น ก็สามารถหามาตรการป้องกันหรือหลีกเลี่ยงอุณหภูมินั้น ๆ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวต้องอยู่ในสภาวะที่อาจถูกทำลาย อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจในอุตสาหกรรม (Phumkhachorn and

Rattanachaiakunsopon, 2010)

อย่างไรก็ตามคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับการประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจในควบคุมเชื้อก่อโรคในอุตสาหกรรมอาหารอีกประการหนึ่งคือ ความเสถียรต่อความเป็นกรดและด่างของแบคทีริโอเฟจ จากการศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการบ่มแบคทีริโอเฟจที่ pH เท่ากับ 7-9 ไม่ส่งผลกระทบต่อความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ ($P>0.05$) ในขณะที่การบ่มแบคทีริโอเฟจที่ pH เท่ากับ 10 และ 11 ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจมีแนวโน้มลดลง โดยลดลงไป 0.84 ± 0.18 และ 5.09 ± 0.38 log PFU/ml ตามลำดับ ทั้งนี้การบ่มแบคทีริโอเฟจที่ pH เท่ากับ 6, 5 และ 4 ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจก็มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน โดยลดลงไป 0.25 ± 3.32 , 0.429 ± 5.63 และ 3.19 ± 0.16 log PFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH เท่ากับ 3 ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดและด่างในช่วงกว้าง ตั้งแต่ pH 5-10 เช่นเดียวกับแบคทีริโอเฟจอื่น ๆ ใน Family *Siphoviridae* เช่น แบคทีริโอเฟจแลมบ์ดา (λ -phage) (Jepson and March, 2004) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohammed Ali และ Jamalludeen (2015) ซึ่งพบว่าแบคทีริโอเฟจ ϕ SA1, ϕ SA2 และ ϕ SA3 ที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin มีความเสถียรในช่วง pH ที่แตกต่างกัน โดย ϕ SA1, ϕ SA 2 มีความเสถียรอยู่ในช่วง pH เท่ากับ 4-10 และ ϕ SA3 มีความเสถียรอยู่ในช่วง pH เท่ากับ 3-11 การที่แบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 มีชีวิตรอดอยู่ในช่วง pH ที่กว้าง ทำให้มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในนมและผลิตภัณฑ์นม

การควบคุม *S. aureus* 01 ด้วยแบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 ในตัวอย่างนมโคพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจำลองสภาวะการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งในปริมาณสูงและต่ำ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้แบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 (ความหนาแน่น 10^8 PFU/ml) สำหรับการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีระดับการปนเปื้อนสูงถึง 10^7 CFU/ml (MOI เท่ากับ 10) สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ 1.05 ± 0.37 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 เริ่มต้น ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 4.6 พบว่าที่ MOI เท่ากับ 10 แบคทีริโอเฟจ Sau_RP15 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ถึง 6.96 ± 0.55 log CFU/ml ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดขององค์ประกอบในนมทั้งน้ำตาล ไขมัน โปรตีนหรือแร่ธาตุ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เองส่งผลต่อประสิทธิภาพการยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจกับโฮสต์แบคทีเรียโดยตรง นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีระดับการปนเปื้อนสูง (MOI เท่ากับ 10) สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้น้อย

กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีระดับการปนเปื้อนต่ำกว่า 10^4 CFU/ml (MOI เท่ากับ 10^4) ซึ่งสามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และไม่สามารถตรวจวัดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 ได้ ในชั่วโมงที่ 8 ของการทดลอง อันเนื่องมาจากการใช้อัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อแบคทีเรียที่สูงจะเป็นการเพิ่มโอกาสการยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟาจกับแบคทีเรียเป้าหมายทำให้การควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในอาหารมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเป็นต้องใช้เพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรคอาจเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะของอาหาร เนื่องจากความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการเคลื่อนในเมทริกซ์ของอาหารอาจแตกต่างกัน อีกทั้งแบคทีเรียโอฟาจอาจหยุดการทำงานและเกิดการยึดเกาะแบบผันกลับไม่ได้ในอาหารหรือวัสดุบรรจุภัณฑ์ (Bigot et al., 2011) จากงานวิจัยของ Bigwood และคณะ (2008) ชี้ให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียโอฟาจในเชิงบำบัดและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในอาหารนั้น ระบบการบำบัดหรือควบคุมแบคทีเรียก่อโรคด้วยแบคทีเรียโอฟาจที่มีประสิทธิภาพจะต้องสามารถกำจัดหรือลดโฮสต์เซลล์ได้อย่างรวดเร็วในเวลาอันสั้น โดยใช้ MOI สูง แต่ถึงกระนั้นการใช้ MOI สูง ๆ อาจทำให้เกิดการแตก (lyzed) ของโฮสต์เซลล์ก่อนการสร้างแบคทีเรียโอฟาจรุ่นใหม่ (phage progeny) (Goode et al., 2003; Huff et al., 2006) ส่งผลทำให้ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ ดังนั้นความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจจึงมีแนวโน้มคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า lysis from without (Hudson et al., 2006) เช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ซึ่งไม่พบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ตลอดการทดลอง



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียฟาจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* 01 ได้สำเร็จ ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียฟาจจากตัวอย่างนมดิบจากถังนมรวม น้ำดื่มโค ตัวอย่างน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ รวมถึงน้ำทิ้งจากร้านค้าในตลาดทั้งในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี โดยแบคทีเรียฟาจทั้ง 34 ตัวอย่างที่คัดแยกได้นั้นประกอบด้วยแบคทีเรียฟาจที่สร้างพลาไคใส จำนวน 23 ตัวอย่าง และสร้างพลาไคขุ่น จำนวน 11 ตัวอย่าง ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ความสนใจแบคทีเรียฟาจที่สร้างพลาไคใส จำนวน 23 ตัวอย่าง โดยอาศัยขนาดและลักษณะทางสัณฐานของพลาไคที่ปรากฏที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นเกณฑ์สำหรับการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียฟาจ ภายหลังการทำบริสุทธิ์ได้แบคทีเรียฟาจทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 1-2 มิลลิเมตร นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เพิ่มปริมาณแบคทีเรียฟาจทั้ง 30 ตัวอย่าง (Sau_RP01- Sau_RP30) เพื่อเตรียมเป็น phage stocks สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในขั้นต่อไป

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียฟาจทั้ง 30 ตัวอย่าง ในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นพบว่าแบคทีเรียฟาจ 21 ตัวอย่างสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบโดยพบว่า Sau_RP04, Sau_RP11, Sau_RP15, Sau_RP16 และ Sau_RP29 ให้ระดับการเกิดโซนใสสูงที่สุด นอกจากนี้แบคทีเรียฟาจทั้ง 30 ตัวอย่าง ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียข้ามสกุลได้

การศึกษาลักษณะจีโนมของแบคทีเรียฟาจ พบว่าจีโนมของแบคทีเรียฟาจทั้ง 21 ตัวอย่าง มีขนาดมากกว่า 19 kbp เมื่อเปรียบเทียบกับ Lambda DNA/Styl marker นอกจากนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรียฟาจที่สกัดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด คือ *EcoRI*, *Styl*, *HindIII* และ *SacI* ทำให้สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียฟาจได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังใช้ผลจากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียฟาจในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นประกอบการตัดสินใจเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียฟาจ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 มีระดับการเกิดโซนใสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียฟาจทั้ง 4 ตัวอย่างดังกล่าวเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียฟาจ Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง จัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* ตามเกณฑ์การจัดจำแนกของคณะกรรมการสากลว่า

ด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV)

การศึกษามูลของอัตราส่วนแบคทีเรียโอฟาจ (Sau_RP4, Sau_RP11, Sau_RP15 และ Sau_RP29) ต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (Optimal multiplicity of infection) พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าอัตราส่วนของแบคทีเรียโอฟาจต่อโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้ออยู่ที่ MOI เท่ากับ 0.1 อีกทั้งที่ MOI เท่ากับ 0.1 แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สามารถลดปริมาณ *S. aureus* 01 ได้ถึง 10.32 ± 0.27 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียโอฟาจตัวอย่างอื่น ๆ และยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ถึง 12.03 ± 1.08 log PFU/ml ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง

จากกราฟการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีระยะแฝง (latent period) เท่ากับ 30 นาที และค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียโอฟาจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ (burst size) เท่ากับ 901.27 ± 244.28 PFU/infected cell

การศึกษามูลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยลดลงไป 1.93 ± 0.05 log PFU/ml และถูกทำลายอย่างสมบูรณ์เมื่อเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป

จากการศึกษามูลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่ pH เท่ากับ 7-9 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่ pH เท่ากับ 10 และ 11 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจมีแนวโน้มลดลง โดยลดลงไป 0.84 ± 0.18 และ 5.09 ± 0.38 log PFU/ml ตามลำดับ ทั้งนี้ pH เท่ากับ 6, 5 และ 4 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจก็มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน โดยลดลงไป 0.25 ± 3.32 , 0.429 ± 5.63 และ 3.19 ± 0.16 log PFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 มีความอ่อนไหวต่อ pH ต่ำ ($\text{pH} \leq 3$)

จากการทดลองการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมโคพาสเจอร์ไรส์ โดยจำลองสถานการณ์ปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งในปริมาณสูงและต่ำ ผลการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สำหรับการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีระดับการปนเปื้อนสูง (10^7 CFU/ml) สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 เมื่อเปรียบเทียบการทดลองควบคุมได้ 1.44 ± 0.51 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 1 และลดได้ถึง 3.81 ± 0.16 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 8 และจากผลการทดลองการใช้แบคทีเรียโอฟาจ Sau_RP15 สำหรับการควบคุม *S. aureus* 01 ในตัวอย่าง

นมพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำ (10^4 CFU/ml) สามารถลดความหนาแน่น *S. aureus* 01 เมื่อเปรียบเทียบการทดลองควบคุมได้ 1.95 ± 0.13 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 1 และลดความหนาแน่นของ *S. aureus* 01 จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 8 ในขณะที่ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจทั้งสองแบบจำลองมีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง

ถึงแม้ผลงานวิจัยนี้จะชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้สำหรับการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้ สำหรับเป็นตัวกลางในการควบคุม *S. aureus* ในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์นม แต่เนื่องจาก Staphylococcal phages บางชนิดอาจก่อให้เกิดปัจจัยที่ก่อความรุนแรงของโรค เช่น การผลิต Staphylococcal toxin ซึ่งแปลรหัสจากยีน Staphylokinase (*sak*), Enterotoxin A (*sea*), Enterotoxin E (*see*), Enterotoxin P (*sep*) หรือ Exfoliative toxin A (*eta*) (Boyd, 2012; Brüssow and Desiere, 2001; Christie et al., 2010) สารพิษเหล่านี้ อาจก่อให้เกิดโรค อีกทั้งยังเป็นอันตรายต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและตรวจสอบอย่างละเอียดเพื่อให้แน่ใจได้ว่าแบคทีเรียโอฟาจที่จะนำไปประยุกต์ใช้นั้นไม่ผลิตสารพิษเหล่านี้ รวมถึงการหาลำดับจีโนมที่สมบูรณ์ของแบคทีเรียโอฟาจและการทดลองทางคลินิกเพิ่มเติม (clinical trials) เพื่อเป็นผลยืนยันอีกประการหนึ่งว่าแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้มีปลอดภัยและสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้จริง





วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายต่างๆ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Tryptic Soy Broth (TSB)

Pancreatic digest of casein	17.00 กรัม
Enzymatic digest of soybean	3.00 กรัม
Sodium chloride	5.00 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.50 กรัม
Dextrose (glucose)	2.50 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Tryptic Soy Agar (TSA)

Pancreatic digest of casein	17.00 กรัม
Enzymatic digest of soybean	3.00 กรัม
Sodium chloride	5.00 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.50 กรัม
Dextrose (glucose)	2.50 กรัม
Agar	15.00 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 SM Buffer

Sodium chloride	5.80 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.00 กรัม
Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 7.5	50 มิลลิลิตร
Gelatin (2% w/v)	5 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2 1 M Tris-HCl, pH 7.5

ชั่ง Tris base 121.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 1 M แมกนีเซียมคลอไรด์

ชั่งแมกนีเซียมคลอไรด์ 20.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.4 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)

ชั่งสาร SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน (อาจให้ความร้อนเพื่อละลายได้ดีขึ้น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.5 0.5 M EDTA, pH 8.0

ชั่ง Ethylenediaminetetraacetate • 2H₂O 93.05 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.6 Phenol : Choloform : Isoamyl alcohol

ปิเปต phenol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับ Choloform ปริมาตร 24 มิลลิลิตร และ Isoamyl alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

2.7 Choloform : Isoamyl alcohol

ปิเปต Choloform ปริมาตร 24 มิลลิลิตร และ Isoamyl alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

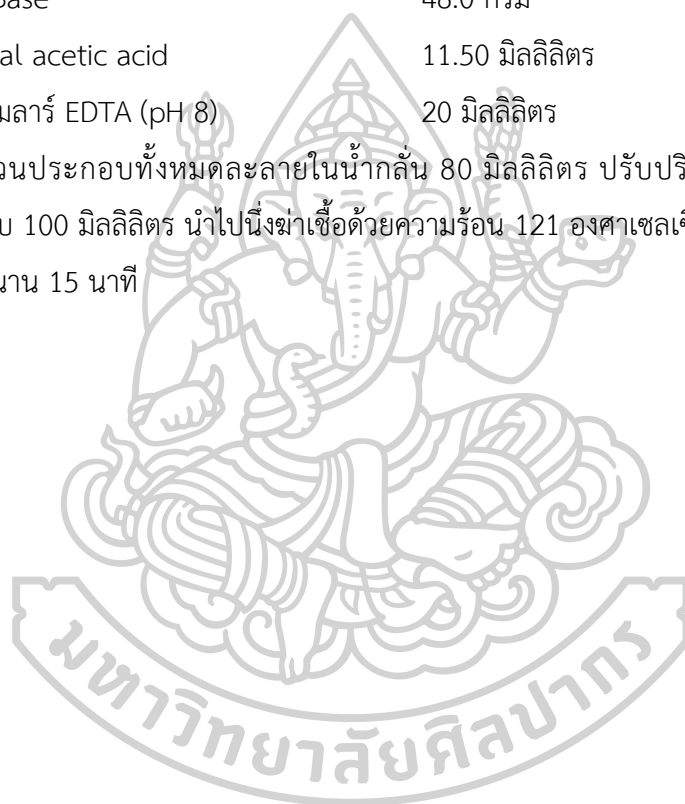
2.8 3 M โฟสเฟตเชื่อมอะซิเตด, pH 5.2

ชั่งโฟสเฟตเชื่อมอะซิเตด 102.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 ด้วยกรดอะซิติก (glacial acetic acid) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.9 100X TAE

Tris-Base	48.0 กรัม
Glacial acetic acid	11.50 มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA (pH 8)	20 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที



รายการอ้างอิง

- Abedon, S. T. (2008). *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. UK: Cambridge University.
- Ackermann, H. W. (1998). Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Advances in virus research*, 51, 135-201.
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New york: Interscience.
- Alzamora, S. M., Tapia, M. S., and Chanes, J. W. (1998). New strategies for minimally processed foods. The role of multitarget preservation. *Food science and technology international*, 4(5), 353-361.
- Argaw, S., and Addis, M. (2015). A Review on Staphylococcal Food Poisoning. *Food Science and Quality Management*, 40, 59-71.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., and Nunez, M. (2005). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 254-260.
- Baird-Parker, A. C. (1974). The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 236(1), 7-14.
- Balaban, N., and Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*, 61(1), 1-10.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, 35(3), 235.
- Baños, A., García-López, J. D., Núñez, C., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2016). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 672-677.
- Barrangou, R., Yoon, S. S., Breidt Jr, F., Fleming, H. P., and Klaenhammer, T. R. (2002). Characterization of six *Leuconostoc fallax* bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5452-5458.

- Bhatia, A., and Zahoor, S. (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3(1), 188-197.
- Bigot, B., Lee, W. J., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, J. A., Billington, C., and Heinemann, J. A. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiol*, 28(8), 1448-1452.
- Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V., and Heinemann, J. A. (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food microbiology*, 25(2), 400-406.
- Boyd, E. F. (2012). Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage pathogenicity island interactions. In *Advances in virus research* 82, 91-118.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4), 230.
- Braun, V., and Hantke, K. (1977). Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems. In *Microbial interactions* (pp. 99-137): Springer.
- Bremer, P. J., Monk, I., Osborne, C. M., Hills, S., and Butler, R. (2002). Development of a steam treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of food science*, 67(6), 2282-2287.
- Bren, L. (2007). Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA consumer*, 41(1), 20-22.
- Brewer, J. D., Hundley, M. D., Meves, A., Hargreaves, J., McEvoy, M. T., and Pittelkow, M. R. (2008). Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome after tooth extraction. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(2), 342-346.
- Brüssow, H., and Desiere, F. (2001). Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Molecular microbiology*, 39(2), 213-223.
- Buchanan, R., and Gibbons, N. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.). Wilams & Wins Company: Baltimore
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., and Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome

- sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301-312.
- Cerveny, K. E., Depaola, A., Duckworth, D. H., and Gulig, P. A. (2002). Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect Immun*, 70(11), 6251-6262.
- Chang, H. C., Chen, C. R., Lin, J. W., Shen, G. H., Chang, K. M., Tseng, Y. H., and Weng, S. F. (2005). Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage phiSMA5. *Appl Environ Microbiol*, 71(3), 1387-1393.
- Chang, Y., Shin, H., Lee, J. H., Park, C. J., Paik, S. Y., and Ryu, S. (2015). Isolation and Genome Characterization of the Virulent *Staphylococcus aureus* Bacteriophage SA97. *Viruses*, 7(10), 5225-5242.
- Chang, Y., Yoon, H., Kang, D. H., Chang, P. S., and Ryu, S. (2017). Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in foods. *International journal of food microbiology*, 244, 19-26.
- Chopin, M. C., Chopin, A., and Roux, C. (1976). Definition of bacteriophage groups according to their lytic action on mesophilic lactic streptococci. *Applied and environmental microbiology*, 32(6), 741-746.
- Christie, G. E., Matthews, A. M., King, D. G., Lane, K. D., Olivarez, N. P., Tallent, S. M., Gill, S. R., and Novick, R. P. (2010). The complete genomes of *Staphylococcus aureus* bacteriophages 80 and 80 α -implications for the specificity of SaPI mobilization. *Virology*, 407(2), 381-390.
- Conly, J. M., and Johnston, B. L. (2008). *Listeria*: a persistent food-borne pathogen. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 19(5), 327-328.
- d'Herelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus Mathematique Academie des Sciences, Paris*, 165, 373-375.
- Elbreki, M., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., McAuliffe, O., and Coffey, A. (2014). Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *Journal of Viruses*, 2014, 1-20.
- Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L. M., and Oliveira, C. A. F. (2010).

- Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 376-380.
- Fan, J., et al. (2016). Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. *Veterinary microbiology*, 191, 65-71.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A. (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Academic Press.
- FDA. (2012). *Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook* (2nd ed.). US Food and Drug Administration, Silver Spring.
- Fueyo, J. M., Rodicio, M. R., Mendoza, M. C., and Martín, M. (2008). Human and Bovine Constitute Reservoirs of Different Sub-Populations of *Staphylococcus aureus* in Possession of the Highly Prevalent Enterotoxin Gene Cluster *EgC_{like}*. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*, 2008, 697-701.
- Gao, Y. L., Ju, X. R., and Jiang, H. H. (2006). Statistical analysis of inactivation of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure and heat in milk buffer. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(6), 670-678.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., and Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*, 17(10), 1232-1239.
- Goode, D., Allen, V. M., and Barrow, P. A. (2003). Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 5032-5036.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., and Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and environmental microbiology*, 75(1), 93-100.
- Guenther, S., and Loessner, M. J. (2011). Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage*, 1(2), 94-100.

- Guetouache, M., Guessas, B., and Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2, 115-122.
- Hadas, H., Einav, M., Fishov, I., and Zaritsky, A. (1997). Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology*, 143(1), 179-185.
- Hagens, S., and Offerhaus, M. L. (2008). Bacteriophages-New weapons for food safety. *Food technology (USA)*, 62(4), 46.
- Hamza, A., Perveen, S., Abbas, Z., and Ur Rehman, S. (2016). The Lytic SA Phage Demonstrate Bactericidal Activity against Mastitis Causing *Staphylococcus aureus*. *Open Life Sciences*, 11(1), 39-45.
- Han, J. E., Kim, J. H., Hwang, S. Y., Choresca Jr, C. H., Shin, S. P., Jun, J. W., Chai, J. Y., Park, Y. H., and Park, S. C. (2013). Isolation and characterization of a Myoviridae bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. *Research in veterinary science*, 95(2), 758-763.
- Hankin, E. H. (1896). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. Inst. Pasteur*, 10(5).
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents*, 30(2), 118-128.
- Hansen, V. M., Rosenquist, H., Baggesen, D. L., Brown, S., and Christensen, B. B. (2007). Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter Penner* serotypes. *BMC Microbiol*, 7(1), 90.
- Hatfull, G. F. (2008). Bacteriophage genomics. *Current opinion in microbiology*, 11(5), 447-453.
- Hierro, E., Ganan, M., Barroso, E., and Fernández, M. (2012). Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna carpaccio. *International journal of food microbiology*, 158(1), 42-48.
- Higgins, S. E., Higgins, J. P., Bielke, L. R., and Hargis, B. M. (2007). Selection and application of bacteriophages for treating *Salmonella enteritidis* infections in poultry. *International Journal of Poultry Science*, 6, 163-168.
- Holmes, F. O. (1948). The filterable viruses. *The filterable Viruses*.

- Holt, J. G., Krieg, N. R., and Sneath, P. H. A. (1994). Characteristics differentiating the species and subspecies of the genus *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 544-551.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F., and Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food technology (USA)*, 43, 99-107.
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., and Donoghue, A. M. (2006). Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poultry science*, 85(8), 1373-1377.
- Ibrahim, G. A., Sharaf, O. M., and Abd El-Khalek, A. B. (2015). Microbiological quality of commercial raw milk, domiati cheese and kareish cheese. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 5(1), 171-176.
- ICMSF. (1996). *Staphylococcus aureus*. Blackie Academic and Professional, London.
- Islam, M. A., Kabir, S. M. L., and Rahman, M. T. (2017). Molecular detection and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk sold in different markets of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 14(2), 277-282.
- Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S., and Oono, T. (2006). *Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression*. *Journal of dermatological science*, 42(3), 203-214.
- Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., and Dadrasnia, A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*, 54, 383-388.
- Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., and Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 124(1-2), 47-57.
- Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology* (6th ed.). Gaithersburg, Maryland: Aspen
- Jazwinski, S. M., Lindberg, A. A., and Kornberg, A. (1975). The lipopolysaccharide receptor for bacteriophages X174 and S13. *Virology*, 66(1), 268-282.
- Jepson, C. D., and March, J. B. (2004). Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 22(19), 2413-2419.

- Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., and Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International Microbiology*, 13(3), 105-112.
- Kajaysri, J., Jasanchuen, A., Mitchaothai, J., and Thammakarn, C. (2014). The Efficiency of Mastivac Vaccine for Preventive Mastitis in Dairy Cow. *Journall off Mahanakorn Veterinary Medicine*, 9(1), 27-38.
- Kloos, W. E., and Schleifer, K. H. (1975). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of clinical Microbiology*, 1(1), 82-88.
- Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 63-76.
- Li, L., and Zhang, Z. (2014). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*, 41(9), 5829-5838.
- Lu, Z., Breidt Jr, F., Fleming, H. P., Altermann, E., and Klaenhammer, T. R. (2003). Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕ JL-1, from a cucumber fermentation. *International journal of food microbiology*, 84(2), 225-235.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P., and Van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 157-163.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., and Griffiths, M. W. (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 64(7), 927-933.
- Mohammed-Ali, M. N., and Jamalludeen, N. M. (2015). Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 5(1), 213-220.
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., and Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Applied microbiology*, 51(4), 363-369.
- Montville, T. J., and Matthews, K. R. (2008). *Food Microbiology: An Introduction* (2nd

- ed.). United States of America: ASM Press, Washington, DC.
- Morgan, S. M., Ross, R. P., Beresford, T., and Hill, C. (2000). Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 414-420.
- Müller-Merbach, M., Kohler, K., and Hinrichs, J. (2007). Environmental factors for phage-induced fermentation problems: replication and adsorption of the *Lactococcus lactis* phage P008 as influenced by temperature and pH. *Food microbiology*, 24(7-8), 695-702.
- Nakae, T. (1976). Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(3), 877-884.
- Nimmo, G. R., and Coombs, G. W. (2008). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *International journal of antimicrobial agents*, 31(5), 401-410.
- Norhana, M. N. W., Poole, S. E., Deeth, H. C., and Dykes, G. A. (2010). The effects of temperature, chlorine and acids on the survival of *Listeria* and *Salmonella* strains associated with uncooked shrimp carapace and cooked shrimp flesh. *Food microbiology*, 27(2), 250-256.
- Oliveira, L. P., Silva, V. C., and Cirqueira, M. G. (2011). Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. *Journal of Food Processing and Technology*, 2(6), 1-5.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., and Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne pathogens and disease*, 2(2), 115-129.
- Orwin, P. M., Leung, D. Y., Donahue, H. L., Novick, R. P., and Schlievert, P. M. (2001). Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and immunity*, 69(1), 360-366.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., and Lan, C. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 1-13.
- Pasharawipas, T., Thaikua, S., Sriurairatana, S., Ruangpan, L., Direkbusarakum, S.,

- Manopvisetcharean, J., and Flegel, T. W. (2005). Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand. *Virus research*, 114(1-2), 63-69.
- Peles, F., Wagner, M., Varga, László, Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Béri, B., Szabó A., Turcsányi, I., and Kardos, G. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International journal of food microbiology*, 118(2), 186-193.
- Phagehunting. (2013). PCI/SDS DNA Extraction. Retrieved from http://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI_SDS_DNA_Extraction_2.2013.pdf
- Phumkhachorn, P., and Rattanachaiakunsopon, P. (2010). Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1794-1800.
- Pourhassan, M., and Najafabadi, T. (2011). The spatial distribution of bacteria pathogens in raw milk consumption on malayer City, Iran. *Shiraz E-Medical Journal*, 12(1), 2-10.
- Pristas, P., Vandzurova, A., and Javorsky, P. (2014). Interplay Between Bacteriophages and Restriction-Modification Systems in Enterococci. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 13(1), 13-20.
- Que, Y., and Moreillon, P. (2010). *Staphylococcus aureus* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier Inc.
- Rahman, M., Kim, S., Kim, S. M., Seol, S. Y., and Kim, J. (2011). Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*, 27(10), 1087-1093.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., and Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish journal of microbiology*, 59(3), 145-155.
- Rakieten, M. L., and Rakieten, T. L. (1937). Relationships between staphylococci and bacilli belonging to the *subtilis* group as shown by bacteriophage absorption. *Journal of bacteriology*, 34(3), 285-300.
- Raya, R. R., Varey, P., Oot, R. A., Dyen, M. R., Callaway, T. R., Edrington, T. S., Kutter, E. M., and Brabban, A. D. (2006). Isolation and characterization of a new T-even

- bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in sheep. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6405-6410.
- Safefood. (2008). A review of the milk supply chain. Retrieved from http://www.safefood.eu/SafeFood/media/SafeFoodLibrary/Documents/Publications/Research%20Reports/8202_safefood_dairy_summary_SCREEN_1.pdf
- Seaman, P. F., and Day, M. J. (2007). Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA. *FEMS microbiology ecology*, 60(1), 1-13.
- Shah, M. (2003). Molecular pathogenesis of *S. aureus* and other staphylococci. *Journal of Applied Microbiology*, 59, 207-221.
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H., and Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology*, 2012.
- Silva, E. N. G., Figueiredo, A. C. L., Miranda, F. A., and Almeida, R. C. d. C. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 11-16.
- Singh, V., Kaushal, S., Tyagi, A., and Sharma, P. (2011). Screening of bacteria responsible for the spoilage of milk. *J. Chem. Pharm. Res*, 3(4), 348-350.
- Skurray, R. A., Hancock, R. E., and Reeves, P. (1974). Conmutants: class of mutants in *Escherichia coli* K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage. *Journal of bacteriology*, 119(3), 726-735.
- Son, J. S., Kim, E. B., Lee, S. J., Jun, S. Y., Yoon, S. J., Kang, S. H., and Choi, Y. J. (2010). Characterization of *Staphylococcus aureus* derived from bovine mastitis and isolation of two lytic bacteriophages. *The Journal of general and applied microbiology*, 56(4), 347-353.
- Soni, K. A., Nannapaneni, R., and Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 427-434.
- Stephan, R., Buehler, K., and Lutz, C. (2002). Prevalence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus*

- aureus* strains isolated from bulk-tank milk samples in Switzerland. *Milchwissenschaft*, 57(9-10), 502-504.
- Stewart, C. M. (2003). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins (6th ed.). Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney: Hocking A.D.
- Strauch, E., Hammerl, J. A., and Hertwig, S. (2007). Bacteriophages: new tools for safer food? *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2(2), 138-143.
- Tabla, R., Martínez, B., Rebollo, J.E., González, J., Ramírez, M.R., Roa, I., Rodríguez, A., and García, P. (2012). Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *International journal of food microbiology*, 156(3), 209-213.
- Tarekgne, E., Skeie, S., Rudi, K., Skjerdal, T., and Narvhus, J. A. (2015). *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. *African Journal of Food Science*, 9(12), 567-576.
- TheNation. (2017). Asia's leading milk exporters. Retrieved from <http://www.nationmultimedia.com/news/breakingnews/30318886>
- Tock, M. R., and Dryden, D. T. F. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 466-472.
- Todar, K. (2008). *Todar's online Textbook of Bacteriology*. Retrieved from <http://textbookofbacteriology.net/>
- Toro, H., Price, S. B., McKee, S., Hoerr, F. J., Krehling, J., Perdue, M., and Bauermeister, L. (2005). Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian diseases*, 49(1), 118-124.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241-1243.
- Vanderhaeghen, W., Cerpentier, T., Adriaensen, C., Vicca, J., Hermans, K., and Butaye, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary microbiology*, 144(1-2), 166-171.
- Vasu, K., and Nagaraja, V. (2013). Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, 77(1),

53-72.

- Watanabe, K., Takesue, S., Jin-Nai, K., and Yoshikawa, T. (1970). Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Applied microbiology*, 20(3), 409-415.
- Wong, C. L., Sieo, C. C., Tan, W. S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., and Ho, Y. W. (2014). Evaluation of a lytic bacteriophage, ϕ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *International journal of food microbiology*, 172, 92-101.
- Yang, H., Liang, L., Lin, S., and Jia, S. (2010). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*, 10(1), 131.
- You, L., Suthers, P. F., and Yin, J. (2002). Effects of *Escherichia coli* physiology on growth of phage T7 in vivo and in silico. *Journal of bacteriology*, 184(7), 1888-1894.
- Young, R. (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of microbiology*, 52(3), 243-258.
- กรมควบคุมโรค. (2557). สถานการณ์โรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2557. Retrieved from <http://ryssurvey.com/vichakarn>.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). รายงานประจำปี. Retrieved from <http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/61/annualreport60.pdf>
- จตุพร กระจ่ายศรี, อนุสรณ์ จำแสนชื่น, จำลอง มิตรชาวไทย และ ชนาธิป ธรรมการ (2557). ประสิทธิภาพของวัคซีน Mastivac สำหรับป้องกันโรคเต้านมอักเสบในแม่โคนม. *สัตวแพทย์ มหานครสาร*. 9(1): 37-48.
- ชนินทร์ รัตนสิน, สุภาพ เหมือนกล้า และ ส่งศักดิ์ ศรีสง่า (2552). ความปลอดภัยของน้ำนมดิบจากฟาร์ม คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. *มทร. อีสาน*. 2(1): 48-57.
- ประกาศระเบียบคณะมนตรียุโรป. (1997). COUNCIL REGULATION (EC) No. 2597/97. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31997R2597&from=GA>
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2556). พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 Retrieved from <https://sp.mahidol.ac.th/pdf/law/food-56.pdf>



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พีระพัฒน์ แจ่มพะเนียด
วัน เดือน ปี เกิด	9 เมษายน 2536
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2560 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	6/3 หมู่ 5 ตำบลศรีษะทอง อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 73120
ผลงานตีพิมพ์	Phiraphat Chaengphaniad and Rujikan Nasanit. Isolation and characterization of lytic bacteriophage for biocontrol of <i>Staphylococcus aureus</i> in milk and dairy products. (p.1222-1232) The 7th National and International Graduate Study Conference (NGSC&IGSC 2017). July 20-21, 2017. At Princess Maha Chakri Sirindhorn Anthropology Centre, Bangkok, Thailand (Oral presentation)