



การคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *Staphylococcus aureus*



โดย
นายวงศธร ศิริสุรพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การตัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ
Staphylococcus aureus



โดย
นายวงศธร ศิริสุรพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGE SPECIFIC
FOR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*



By

MR. Wongsatorn SIRISURAPONG

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	การตัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>Staphylococcus aureus</i>
โดย	วงศธร ศิริสุรพงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา หลิวเสรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(สัตวแพทย์หญิง ดร. ยลยง วัณวงษ์)

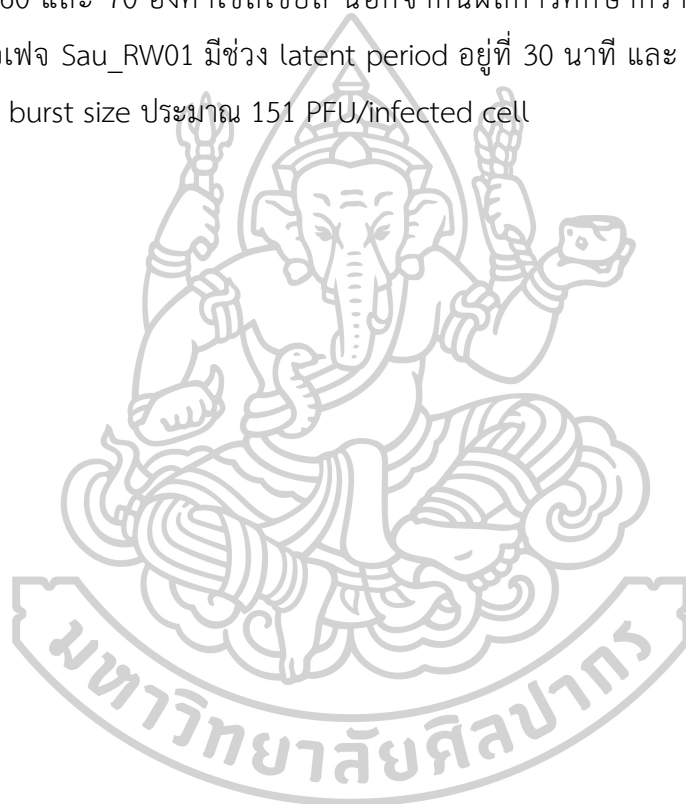
58401209 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : คุณลักษณะ, แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร, แบคทีเรียโอเฟจ, แสตปไฟโลค็อกคัส

นาย วงศธร ศิริสุรพงศ์: การคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Staphylococcus aureus* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคสำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โดยทั่วไปการควบคุมเชื้อก่อโรคในอาหารมักใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะเป็นหลัก อย่างไรก็ตามวิธีที่กล่าวไปข้างต้นนั้นส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาเป็นเวลานาน อาจก่อให้เกิดแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ เมื่อไม่นานมานี้แบคทีเรียโอเฟจได้รับความสนใจมากขึ้นสำหรับการประยุกต์ใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคทางชีวภาพในอาหาร เนื่องจากมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านสูง และไม่ผลิตสารพิษตกค้าง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* และศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับควบคุม *S. aureus* ในงานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* ได้ 14 ตัวอย่าง จากตัวอย่าง นมดิบ น้ำเสียที่ระบายน้ำ รวมถึงน้ำล้างเนื้อหมูจากร้านค้า ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ทั้งหมด 247 ตัวอย่าง ภายหลังจากทำบริสุทธิ์ได้ผลิตแบคทีเรียโอเฟจ (lytic bacteriophage) ทั้งหมด 37 ไอโซเลท (Sau_RW01- Sau_RW37) จากผลการศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของแบคทีเรียโอเฟจเหล่านี้ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ 8 ไอโซเลท สามารถติดเชื้อ *S. aureus* 11 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ให้ระดับโซนใสสูงสุด ดังนั้น จึงเลือกแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ในการทดลองต่อไป นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW11 และ Sau_RW12 สามารถเกิดการติดเชื้อ *S. Enteritidis* อีกทั้งยังทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถติดเชื้อข้ามสกุลด้วยวิธี Efficiency of plating (EOP) กับ *S. Enteritidis* พบว่า Sau_RW11 มีค่า EOP เท่ากับ 0.00381 และ Sau_RW12 มีค่า EOP เท่ากับ 0.00057 ซึ่งชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพต่ำในการติดเชื้อข้ามสกุลนี้ จากผลการศึกษาจีโนมและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *EcoRI*, *Hinfi* และ *StyI* ของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท (Sau_RW01, Sau_RW02, Sau_RW09, Sau_RW05, Sau_RW11, Sau_RW12, Sau_RW20, Sau_RW21, Sau_RW32 และ Sau_RW33) เมื่อพิจารณาควบคู่กับความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียโอเฟจออกเป็น 8 กลุ่ม และผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12 พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในวงศ์ *Siphoviridae* ผลการศึกษาอัตราส่วนแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (multiplicity of infection, MOI) พบว่า

ที่ MOI 10, 1 และ 0.1 สามารถลดความหนาแน่น *S. aureus* ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง โดยลดลงไป 20.67, 19.73 และ 20.14 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าที่ MOI 0.1 แบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 สามารถลดความหนาแน่น *S. aureus* ได้ไม่แตกต่างกับ MOI 10 และ 1 ดังนั้น อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมต่อการติดเชื้ออยู่ที่ MOI 0.1 จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นแบคทีเรียโอเฟจลดลง 1.27 log PFU/ml ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใน 1 ชั่วโมง และไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ผลการศึกษากาแฟการเจริญชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 มีช่วง latent period อยู่ที่ 30 นาที และ burst period อยู่ที่ 100 นาที อีกทั้งมี burst size ประมาณ 151 PFU/infected cell



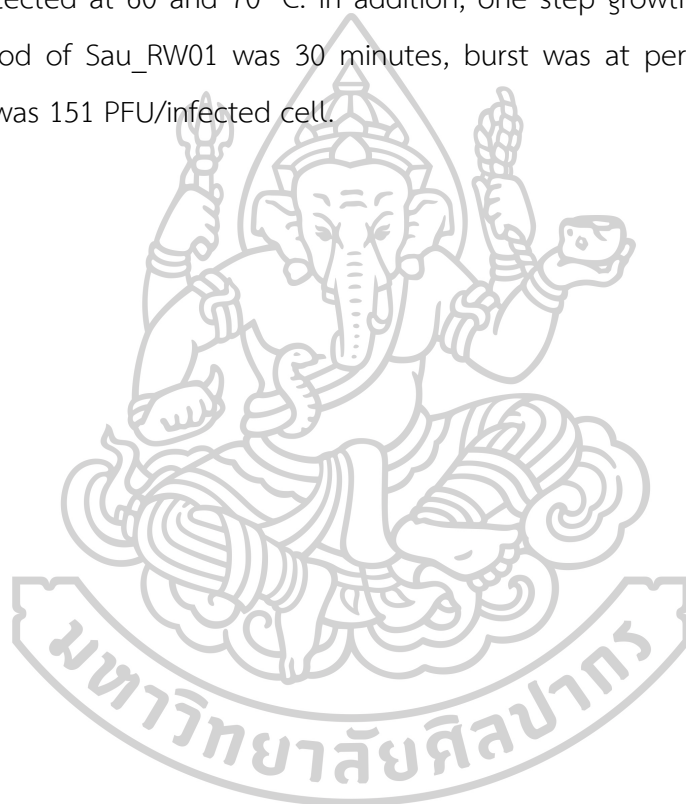
58401209 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : BACTERIOPHAGE, CHARACTERIZATION, FOODBORNE PATHOGEN,
STAPHYLOCOCCUS

MR. WONGSATORN SIRISURAPONG : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
BACTERIOPHAGE SPECIFIC FOR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* THESIS ADVISOR :
ASSISTANT PROFESSOR RUJIKARN NASANIT, Ph.D.

Staphylococcus aureus is an important pathogen that causes foodborne illness. Generally, chemicals or antibiotics have been used to control pathogenic bacteria. However, the methods mentioned above have negative effects on consumer health. Moreover, antibiotic-resistant bacteria can occur by treating with antibiotics in long term treatment. Recently, bacteriophages have been increasing interested in biocontrol application of pathogens in food due to their high host specificity and not produce toxic residues. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize bacteriophages that are specific to *S. aureus* as a guideline for controlling *S. aureus*. In this study, *S. aureus*-specific bacteriophages were isolated from raw milk and sewage samples as well as pork washing water samples from pork butcher shops in Nakhon Pathom and Ratchaburi provinces from 14 out of 247 samples. After purification 37 isolates of lytic bacteriophages (Sau_RW01- Sau_RW37) were obtained. The host range tests of these bacteriophages showed that 8 isolates could infect 11 *S. aureus* strains. Sau_RW01 produced highest level clear zone, therefore it was selected for the further experiments. In addition, Sau_RW11 and Sau_RW12 could cross-species infect *S. Enteritidis*. The cross-species infectivity test of bacteriophages by using efficiency of plating (EOP) method showed that EOP values of *S. Enteritidis* infection of Sau_RW11 and Sau_12 were 0.00381 and 0.00057, respectively, which indicated the low efficiencies. Genome analysis of ten phages (Sau_RW01, Sau_RW02, Sau_RW09, Sau_RW05, Sau_RW11, Sau_RW12, Sau_RW20, Sau_RW21, Sau_RW32 and Sau_RW33) were performed by restriction analysis using 3 restriction enzymes which included *EcoRI*, *HinfI* and *StyI*. Bacteriophages were classified into 8 groups when considered the results of host range test and the restriction analysis. The morphological results of bacteriophages Sau_RW01, Sau_RW11 and Sau_RW12 indicated that these phages were classified into

family *Siphoviridae*. The determination of multiplicity of infection of Sau_RW01 showed that the titer of *S. aureus* reduced at MOI 10, 1 and 0.1 within 5 h by 20.67, 19.73 and 20.14 log PFU/mL, respectively. It can be seen that at the decrease of *S. aureus* titer by Sau_RW01 at MOI 0.1 was not different from MOI 10 and 1. Therefore, the optimal multiplicity of infection was at MOI 0.1. The study of thermal sensitivity test of bacteriophages showed that Sau_RW01 was stable at 4, 28 and 37 °C. However, phage titer reduced by 1.27 log PFU/mL at 50 °C within 1 hr and could not be detected at 60 and 70 °C. In addition, one step growth curve revealed that latent period of Sau_RW01 was 30 minutes, burst was at period 100 minutes and burst size was 151 PFU/infected cell.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุจิภาณุจันท์ นาสนิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา หลิวเสรี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา วัฒนการุณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแรงผลักดัน พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข ที่ให้ความกรุณาเป็นประธาน และ สัตวแพทย์หญิง ดร. ยลยง วัณวงศ์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบ ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้ความรู้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณทิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเขย และคุณนุชนาฏ เลี้ยงอำนาจ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมีต่าง ๆ เพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณวัลพิไล ยอดยิ่งทวีลาภ และคุณศิลา ศรียา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกติดต่อประสานงานในการดำเนินการยื่นคำร้องต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า และคุณน้า ที่ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ รวมถึงแรงผลักดันต่าง ๆ ที่ทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจศึกษาเสมอมา

ขอขอบคุณ นางสาวโสภิต ใจบางยาง และนางสาวนภาพัชฌ์ อิมกิลิน ที่คอยช่วยเหลืองานต่าง ๆ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและให้กำลังใจจนสามารถทำงานสำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ นายพีระพัฒน์ แจ็งพะเนียด เพื่อนที่ดีที่สุดที่คอยอยู่ข้างกายเสมอไม่ว่าทุกข์หรือสุขใด ๆ พร้อมทั้งช่วยกันฝ่าฟันทุกอุปสรรคต่าง ๆ และคอยให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา

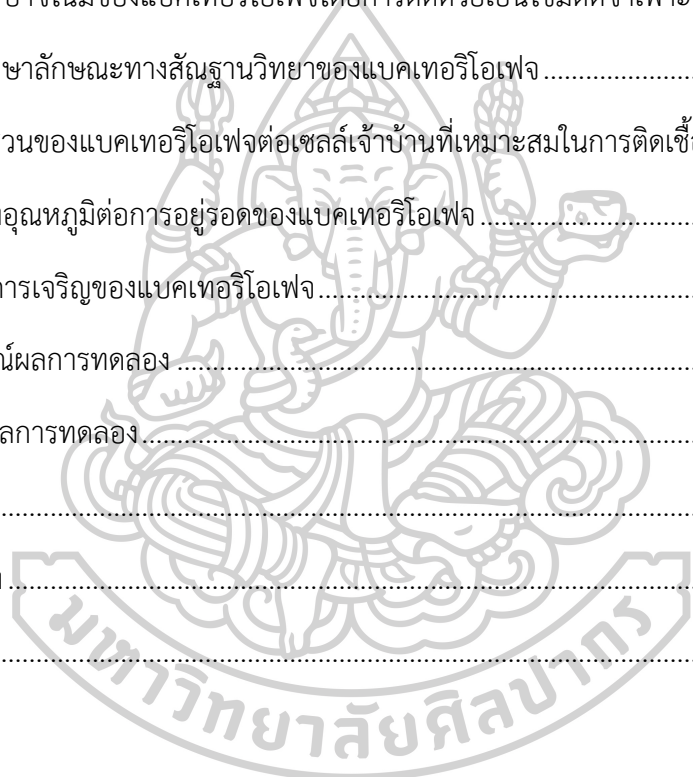
ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่เคยทำงานร่วมกันมาและคอยร่วมทุกข์ร่วมสุขทำให้ผ่านอุปสรรคต่าง ๆ มาได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในอาหาร	4
2.2 ลักษณะทั่วไปของ <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.3 รายงานการตรวจพบเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> ในประเทศไทย.....	6
2.4 โรคอาหารเป็นพิษจาก <i>S. aureus</i>	7
2.5 แบคทีเรียโอเฟจ	8
2.6 วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ.....	8
2.7 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ.....	11
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์แบคทีเรียโอเฟจเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในอาหาร	12
2.9 ข้อดีและข้อจำกัดของการบำบัดด้วยแบคทีเรียโอเฟจ	18

2.10	ผลิตภัณฑ์แบคทีริโอเฟจทางการค้า	18
บทที่ 3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	20
3.1	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	20
3.1.1	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	20
3.1.2	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	21
3.2	วิธีการทดลอง.....	22
3.2.1	การตัดแยก <i>S. aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบและสภาวะการเจริญเติบโต	22
3.2.2	การระบุชนิดของแบคทีเรียที่ตัดแยกได้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA.....	23
3.2.3	การเตรียมสารละลายแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage suspension).....	26
3.2.4	การตรวจหาแบคทีริโอเฟจ (phage detection) ในสารละลายแบคทีริโอเฟจ	27
3.2.5	การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage purification)	27
3.2.6	การเพิ่มจำนวนแบคทีริโอเฟจ (large-scale amplification of bacterio phage)28	
3.2.7	การหาความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage titer).....	28
3.2.8	การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range test).....	28
3.2.9	การศึกษาจีโนมของแบคทีริโอเฟจและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (bacteriophage genome analysis and restriction enzyme analysis).....	30
3.2.10	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีริโอเฟจ (phage morphology) ..	31
3.2.11	การหาอัตราส่วนของแบคทีริโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (multiplicity of infection, MOI)	31
3.2.12	การศึกษาผลอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีริโอเฟจ (thermal sensitivity test)	33
3.2.13	การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีริโอเฟจ (one step growth)	33
3.2.14	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (static analysis).....	34

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	35
4.1 การคัดแยก <i>S. aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบ	35
4.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA.....	36
4.3 การคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ	40
4.4 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	44
4.5 การศึกษาจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	50
4.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ.....	56
4.7 อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ	57
4.8 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ.....	59
4.9 กราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ.....	60
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	61
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	67
ภาคผนวก.....	69
รายการอ้างอิง.....	87
ประวัติผู้เขียน.....	95



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอเฟจในวงศ์ต่าง ๆ.....11
2	ข้อดีและข้อจำกัดของการบำบัดด้วยแบคทีเรียโอเฟจ.....18
3	ปริมาตรและความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ และ <i>S. aureus</i> BPA3 สำหรับ การทดลองหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ.....32
4	สายพันธุ์ของโคลีนีแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท จากตัวอย่างเนื้อหมู.....36
5	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 27F ของ แบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท.....38
6	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 1492R ของ แบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท.....39
7	ผลการคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความจำเพาะกับ <i>S. aureus</i> BPA3 และลักษณะ ของพลาจมาจากตัวอย่างทั้งหมด 14 ตัวอย่าง41
8	ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น.....45
9	ผลการจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> และความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น.....52
10	ขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12.....56
ตารางผนวกที่	หน้า
ค 1	ผลการคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>S. aureus</i> BPA3 จาก 247 ตัวอย่าง ที่เก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี.....75

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1	วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจแบบไลติกและไลโซจีนิก.....10
2	กลไกของไลติกเฟจในการในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย.....10
3	ลักษณะโคโลนีของ <i>S. aureus</i> ที่คัดแยกได้บนอาหาร braid parker agar.....35
4	ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R.....37
5	ลักษณะพลาทที่ปรากฏบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธี agar overlay assay.....44
6	ลักษณะโซนใสที่ปรากฏบนสนามของ <i>S. aureus</i> BPA1 โดยวิธี spot test.....49
7	ลักษณะพลาทของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW11 และ Sau_RW12 ที่ปรากฏ บนสนามของ <i>S. Enteritidis</i> โดยวิธี agar overlay assay.....49
8	จีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท.....51
9	การตัดจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>53
10	การตัดจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HinfI</i>54
11	การตัดจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>StyI</i>55
12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12.....56
13	ความหนาแน่นของ <i>S. aureus</i> BPA3 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อ เซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ.....58
14	ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์ เซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ.....58

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
15	ผลอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	59
16	กราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01.....	60



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ทนความร้อนได้สูง เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีความเล็กและลักษณะการเรียงตัวคล้ายรวง องุ่น สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ถึง 48 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 35-37 องศาเซลเซียส (Bhumibhamon and Bilhmad, 2011) โดยทั่วไปสามารถพบได้ทั้งจาก ผิวหนังของมนุษย์ น้ำมูก น้ำลาย สิว ฝี และหนองที่กำลังอักเสบ รวมถึงในอาหาร และ/หรือเครื่องดื่มอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* อาทิเช่น น้ำดื่ม และเนื้อสัตว์ โดย *S. aureus* จัดเป็นเชื้อก่อโรคหลัก (primary pathogen) สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งในคนและสัตว์ สามารถผลิตสารพิษชนิดเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ในงานวิจัยของ Angkititrakul และคณะ (2014) รายงานว่าพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในเนื้อสุกรบตร้อยละ 31.87 จากตัวอย่างทั้งหมด 91 ตัวอย่าง จากตลาดสด 4 แห่ง และห้างสรรพสินค้า 4 แห่ง ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น ในเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม พ.ศ. 2555 อีกทั้งมีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในอาหารพร้อมรับประทาน งานวิจัยของ Homthong และคณะ (2011) พบการปนเปื้อน *S. aureus* ในตัวอย่างซูชิ 14 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากร้านค้าที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้า บริเวณอำเภอเมืองศรีราชา และบริเวณใกล้มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 หากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* อาจส่งผลให้เกิดอาการ คลื่นไส้ ท้องเสีย อาเจียนในบางรายที่มีอาการรุนแรงอาจส่งผลถึงชีวิตได้ (Chang et al., 2017) และจากงานวิจัยของ Al-Bahry และคณะ (2014) พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* มากที่สุดในอาหารที่เตรียมด้วยมือได้แก่ ขนมปังอบใส่ไก่ แชนด์วิช และปอเปี๊ยะ

ศูนย์ป้องกันและควบคุมโรค (The Centers for Disease Control and Prevention) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รายงานเกี่ยวกับผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อในอาหารว่ามีถึง 241,188 ราย ที่ป่วยจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อน *S. aureus* เข้าไปและมีการตายถึง 6 ราย ในทุก ๆ ปี (FDA, 2006)

โดยปกติแล้วการควบคุมเชื้อ *S. aureus* นั้น ใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมี เช่น Peracetic acid, Chlorine และ Cetylpyridinium chloride อย่างไรก็ตามการใช้วิธีที่กล่าวไปข้างต้นก็มีข้อเสียที่สำคัญ เช่น หากใช้ยาปฏิชีวนะที่ผิดวิธีหรือใช้เกินกว่ากำหนด ส่งผลให้เชื้อมีการวิวัฒนาการสายพันธุ์ที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะหรือเรียกว่า antibiotic-resistant bacteria ซึ่งแบคทีเรียต้านยาปฏิชีวนะที่สำคัญได้แก่ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) การดื้อยาของเชื่อนี้เป็นปัญหาที่แพร่กระจายไปทั่วโลกทำให้การรักษาเป็นไปได้ลำบาก จำเป็นต้องมีการใช้ยาที่มีฤทธิ์สูงขึ้นซึ่งอาจมีผลข้างเคียงและทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย (Siriwong and Chukeatirote, 2009) ส่วนการใช้สารเคมีนั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญคือเกิดผลเชิงลบ (negative effect) ต่อองค์ประกอบเนื้อสัมผัสของอาหาร ในบางประเทศในยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้สารเคมีมาใช้กำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเพราะอาจเกิดการตกค้างของสารเคมีซึ่งส่งผลเสียต่อผู้บริโภค (Hungaro et al., 2013) ซึ่งเห็นได้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี นั้นส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีใหม่ ๆ เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

ในปัจจุบัน เพลจ หรือ แบคเทอริโอเพลจ เป็นวิธีทางเลือกใหม่ที่ได้รับ越来越多的ความสนใจมากขึ้นเพื่อใช้ควบคุมโรคในอาหาร เนื่องจากแบคเทอริโอเพลจนั้นมีคุณสมบัติที่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ไม่เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อก่อโรค ไม่ผลิตสารพิษตกค้าง และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ (Wong et al., 2014) ทำให้การใช้เพลจบำบัดนั้นมีความปลอดภัย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาถึงคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคเทอริโอเพลจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับควบคุมแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

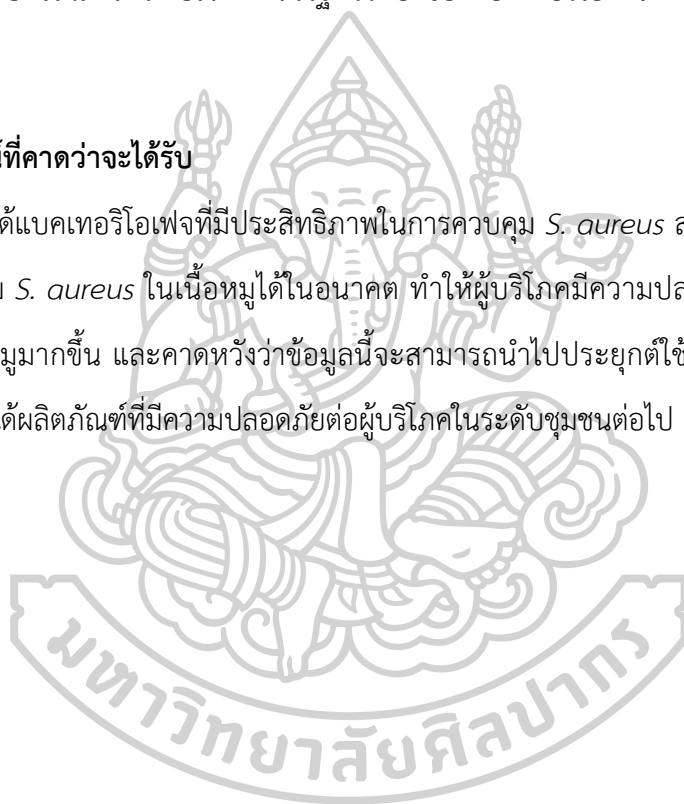
1. คัดแยกแบคเทอริโอเพลจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* จากแหล่งที่คาดว่าแบคเทอริโอเพลจ
2. ศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคเทอริโอเพลจที่ได้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับควบคุม *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. คัดแยกเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างเนื้อหมูในจังหวัดนครปฐม
2. คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus*
3. ศึกษาความสามารถการติดเชื้อข้ามแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ (Host range test)
4. ศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกได้ ได้แก่ กราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ และผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจ
5. ศึกษาจีโนมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากได้แบคทีเรียโอเฟจที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม *S. aureus* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุม *S. aureus* ในเนื้อหมูได้ในอนาคต ทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยและมั่นใจในการเลือกซื้อเนื้อหมูมากขึ้น และคาดหวังว่าข้อมูลนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในระดับชุมชนต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในอาหาร

อาหารเป็นสิ่งจำเป็นพื้นฐานในชีวิตประจำวันของมนุษย์ สำหรับบริโภคเพื่อเสริมโภชนาการให้แก่ร่างกาย อาหารมักมาจากพืชหรือสัตว์และมีสารอาหารสำคัญ อาทิ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน หรือแร่ธาตุ สิ่งมีชีวิตย่อยและดูดซึมสารที่เป็นอาหารเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปสร้างพลังงานและกระตุ้นการเจริญเติบโต หากอาหารถูกปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรค อาจส่งผลให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่

1. *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ส่วนใหญ่พบได้ในอาหารทะเลดิบ เป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อน สามารถทำลายได้ด้วยการพาสเจอร์ไรส์

2. *Salmonella* spp. รูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมลบ ก่อให้เกิดโรคซาลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ลำไส้อักเสบ ส่วนใหญ่พบในเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ไข่ นม และผลิตภัณฑ์จากนม

3. *Staphylococcus* sp. ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นทรงกลม อยู่รวมกันคล้ายรวงงุ่น ผู้ป่วยที่รับเชื้อเข้าไป อาจแสดงอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ผู้ป่วยบางรายอาจแสดงอาการปวดศีรษะและตะคริวที่กล้ามเนื้อร่วมด้วย ส่วนใหญ่มักพบเชื้อกลุ่มนี้ในเนื้อหมู และอาหารทะเล

4. *Clostridium botulinum* เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดร้ายแรง ผลิตสารพิษ botulinum toxin ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาท ส่วนใหญ่มักพบในอาหารประเภทบรรจุภัณฑ์ปิดสนิท เช่น อาหารกระป๋อง สารพิษสามารถถูกทำลายด้วยความร้อนระดับพาสเจอร์ไรส์

5. *Clostridium perfringens* เป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกับ *Clostridium botulinum* อย่างไรก็ตาม สารพิษนั้นมีความรุนแรงน้อยกว่า ผู้ป่วยที่รับสารพิษเข้าไป อาจแสดงอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องร่วง ภายใน 8-22 ชั่วโมง ส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปในเนื้อวัว ไก่ หมู ปลา และอาหารแห้ง โดยเฉพาะพวกสมุนไพร และเครื่องเทศ (ภาวิน, 2547)

ซึ่งจากรายงานการเฝ้าระวังโรค ในปี 2552 สำนักระบาดวิทยาในประเทศไทย ได้รายงานเกี่ยวกับโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 103,420 ราย พบว่ามีอัตราการป่วย 162.98 ต่อประชากรแสนคน โดยจังหวัดที่มีอัตราป่วยต่อประชากรแสนคนสูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ปราจีนบุรี ขอนแก่น ลำปาง อุบลราชธานี และพิษณุโลก นอกจากนี้ยังมีเหตุการณ์ที่พบผู้ป่วยสูงที่สุดในรอบวันคือ อาหารเป็นพิษที่โรงเรียนแห่งหนึ่งในจังหวัดนนทบุรี เมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2522 พบผู้ป่วยรวม 573 ราย ซึ่งสาเหตุการระบาดเกิดจากรับประทานข้าวเหนียวสังขยาที่ปนเปื้อน *S. aureus* (รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา, 2552) นอกเหนือจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งเป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพและความเป็นอยู่ของมนุษย์แล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้ยังส่งผลกระทบต่ออย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารในแง่ของการเน่าเสียของอาหาร (food spoilage) ซึ่งการเน่าเสียของอาหารเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่พึงประสงค์กับลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหาร ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับการบริโภคของมนุษย์ ซึ่งการเน่าเสียโดยแบคทีเรียถือเป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสียในอาหาร แม้ในปัจจุบันจะมีวิธีการเก็บรักษาที่ดีและมีการควบคุมคุณภาพของทั้งผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามยังมีผลิตภัณฑ์อาหารที่สูญเสียไปเนื่องจากความเสียหายที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (Endersen et al., 2014)

2.2 ลักษณะทั่วไปของ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus จัดอยู่ในวงศ์ *Micrococcaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีการเรียงตัวคล้ายพวงองุ่นมีรูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สภาวะที่มีเกลือ 10% ความเป็นกรดต่าง 4.0-9.8 ช่วงอุณหภูมิ 7-48 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase และผลิตสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ทนความร้อนสูงนานถึง 30 นาที และทนต่อกรดในกระเพาะ (Bhumibhamon and Bilhmad, 2011) มักพบ *Staphylococcus* ทั้งในคนและสัตว์เลือดอุ่นชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะในคนที่มีผิวหนังผิดปกติ เช่น เป็นแผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น เชื้อนี้ยังแยกได้จากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค กระบือ สุกร น่าน และในอาหารสัตว์ *S. aureus* ยังก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในสัตว์โดยเฉพาะโค กระบือ แพะ และแกะ อีกด้วย (Le Loir et al., 2003) อาหารที่มักพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทพร้อมรับประทานต่าง ๆ และ

ผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน และเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ *S. aureus* มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายได้ดี รวมทั้งสามารถมีชีวิตอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย และสามารถพบ *S. aureus* แพร่กระจายอยู่รอบสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตอาหาร เช่น ในโรงงานบรรจุหีบห่อสัตว์ปีก (poultry packing plants) โดยเชื้อสามารถเกาะติดอยู่กับเครื่องมือและปนเปื้อนขณะบรรจุหีบห่อได้ (Bigot et al., 2011)

2.3 รายงานการตรวจพบเชื้อก่อโรค *S. aureus* ในประเทศไทย

มีงานวิจัยในประเทศไทยที่ได้ตรวจสอบเกี่ยวกับ *S. aureus* ในเนื้อสัตว์ต่าง ๆ เช่น งานวิจัยการตรวจคุณภาพเนื้อสุกรบดที่จำหน่ายในเทศบาลเมืองขอนแก่น โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรบดจากตลาดสด 4 แห่ง และห้างสรรพสินค้า 4 แห่ง ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น ในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2555 จำนวน 91 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์พบการปนเปื้อน *Salmonella* spp., *E. coli* และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรบดร้อยละ 58.24, 86.81 และ 31.87 ตามลำดับ (Angkititrakul et al., 2014) และงานวิจัยในจังหวัดราชบุรี มีการตรวจสอบการปนเปื้อน *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดและตลาดนัด ผลการตรวจตัวอย่างในปี พ.ศ.2554 พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในระดับเกินมาตรฐาน (มากกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม) จำนวน 81 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.50 เมื่อจำแนกตามชนิดสัตว์ พบว่าในเนื้อสุกร ไก่ และโค พบ *S. aureus* ร้อยละ 44.36, 28.57 และ 37.50 ตามลำดับ ผลการตรวจในปี พ.ศ. 2555 พบ *S. aureus* จำนวน 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.60 เมื่อจำแนกตามชนิดสัตว์พบว่าในเนื้อสุกร ไก่ และโค พบ *S. aureus* ร้อยละ 13.65, 9.09 และ 25 ตามลำดับ (Malicharn and Vanaprasertsak, 2012) นอกจากนี้ยังตรวจพบ *S. aureus* ในอาหารพร้อมรับประทานและในผลไม้อีกด้วย จากงานวิจัยของ Suklampoo และคณะ (2003) ได้รายงานการพบ *S. aureus* ในขนมไทย ซึ่งเป็นอาหารที่ผ่านกรรมวิธีการผลิตมาแล้ว โดยเก็บตัวอย่างขนมไทยจำนวน 120 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ขนมไทยที่มีมะพร้าวคลุกหรือโรยหน้า และขนมไทยที่ไม่มีมะพร้าวคลุกหรือโรยหน้าประเภทละ 30 ตัวอย่าง จากห้างสรรพสินค้าและตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างขนมไทย 120 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในตัวอย่างขนมทุกชนิด ซึ่งพบว่ามีขนมไทยจำนวนร้อยละ 74.2 (89 ตัวอย่าง) ที่ไม่ได้มาตรฐานตามเกณฑ์คุณภาพคือตรวจพบการปนเปื้อนของ

S. aureus มากกว่า 100 โคลนิต่อกรัม และงานวิจัยของ สุดสายชล (2554) รายงานเกี่ยวกับ แพร่กระจายของ *S. aureus* ในตัวอย่างผลไม้พร้อมบริโภคได้แก่ มะม่วง แดงโม ฝรั่ง องุ่น เป็นต้น โดยสุ่มตัวอย่างมาทั้งหมด 84 ตัวอย่าง จากร้านค้าที่วางจำหน่ายในร้านรถเข็นบริเวณใกล้ มหาวิทยาลัยบูรพา (42 ตัวอย่าง) และในห้างสรรพสินค้าบริเวณอำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี (42 ตัวอย่าง) ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนมกราคม 2554 ตรวจพบ *S. aureus* ในตัวอย่างผลไม้จำนวน 42 ตัวอย่างจากทั้งหมด 84 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50 แบ่งเป็นตัวอย่างจากรถเข็นผลไม้จำนวน 29 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้าจำนวน 13 ตัวอย่าง โดยพบว่า 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.95 มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* เกินเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารดิบที่เตรียมหรือปรุงในสภาพที่บริโภคได้ทันทีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กำหนดว่าต้องมีปริมาณ *S. aureus* ไม่เกิน 100 โคลนิต่อกรัม (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

2.4 โรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus*

S. aureus สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ที่มีแนวโน้มการพบผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Bhumibhamon and Bilhmad, 2011) ลักษณะอาการของโรคอาหารเป็นพิษนั้นแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลาย ๆ กรณี ซึ่งอาการทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อที่พบคือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย ในรายที่รุนแรงมีอาการปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง ผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง สามารถดีขึ้นภายใน 1 วัน ขึ้นอยู่กับสภาพและความต้านทานสารพิษของร่างกาย รวมไปถึงปริมาณสารพิษที่รับเข้าไป โดยโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* เรียกโรคนี้ว่า "Staphylococcal food poisoning" (Miwa et al., 2001) ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคกรมปศุสัตว์ จึงได้กำหนดกฎหมายเพื่อควบคุมให้มีเชื้อ *S. aureus* ได้ไม่เกิน 100 โคลนิต่อกรัม ในเนื้อสัตว์ จึงถือว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภคเมื่อมีการสุ่มตรวจ (Bhumibhamon and Bilhmad, 2011)

2.5 แบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟจ (phage) ประกอบด้วยดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในสารเคลือบโปรตีนเรียกว่าแคปซิด (capsid) และยึดจับกับเซลล์เจ้าบ้านโดยไปทำลายและจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวนภายในเซลล์เจ้าบ้าน และปลดปล่อยแบคทีริโอเฟจออกมาทำให้แบคทีเรียตายซึ่งต่างจากสารปฏิชีวนะ แบคทีริโอเฟจสามารถทำลายแบคทีเรียเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง และไม่ทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Han et al., 2013) โดยเฟจถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1915 โดย Twort และ Felix D'Herelle พบว่ามีสารบางอย่างที่เปลี่ยนโคโลนีของเชื้อ *Micrococcus* ให้มีลักษณะใสและเรียกมันว่าแบคทีริโอเฟจ ลักษณะใสที่เกิดขึ้นนั้นมาจากแบคทีริโอเฟจไปทำลายเซลล์แบคทีเรีย แบคทีริโอเฟจมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านสูง จึงได้มีการนำไปใช้เพื่อรักษาเรียกว่าเฟจบำบัด (phage therapy) (Fruciano and Bourne, 2007) และในปี ค.ศ. 1920 Felix D'Herelle ได้ตีพิมพ์ผลงานเกี่ยวกับชีววิทยาของแบคทีริโอเฟจ และได้รับการรับรองจากสถาบันแบคทีริโอเฟจนานาชาติ (International Bacteriophage Institute) ในประเทศจอร์เจีย และในปี ค.ศ. 1923 ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้เริ่มนำแบคทีริโอเฟจมาใช้บำบัดโรคติดเชื้อต่าง ๆ และได้ถูกยอมรับจากหลาย ๆ ประเทศ อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดทางความเข้าใจในองค์ประกอบของเฟจ และการไม่ยอมรับในประสิทธิภาพของแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการบำบัด ทำให้แบคทีริโอเฟจมีบทบาทในการใช้รักษาน้อยลง และเมื่อมีการค้นพบยาปฏิชีวนะในปี ค.ศ. 1940 ทำให้การใช้เฟจบำบัดนั้นหายไป เนื่องจากมีความเชื่อมั่นในยาปฏิชีวนะมากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะมีปัญหาเพิ่มขึ้น เนื่องจากการใช้ที่ผิดวิธีส่งผลให้เกิดแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการรักษาทางการแพทย์ ดังนั้นทำให้ต้องใช้ประโยชน์จาก แบคทีริโอเฟจเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษา ซึ่งสามารถนำมาใช้ควบคุมปัญหาจากเชื้อแบคทีเรียมากมายรวมถึงในอาหารด้วย (Endersen et al., 2014)

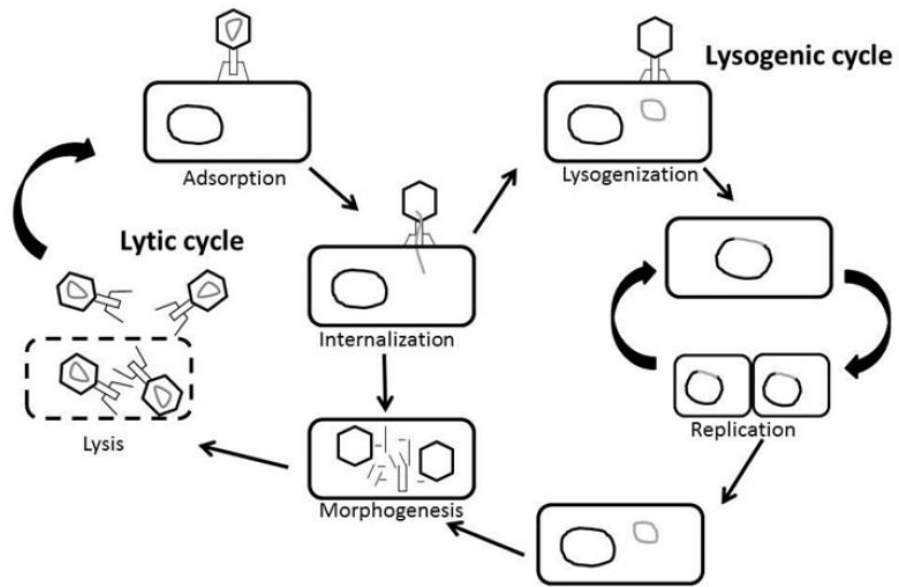
2.6 วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจ

วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (รูปที่ 1) ดังนี้

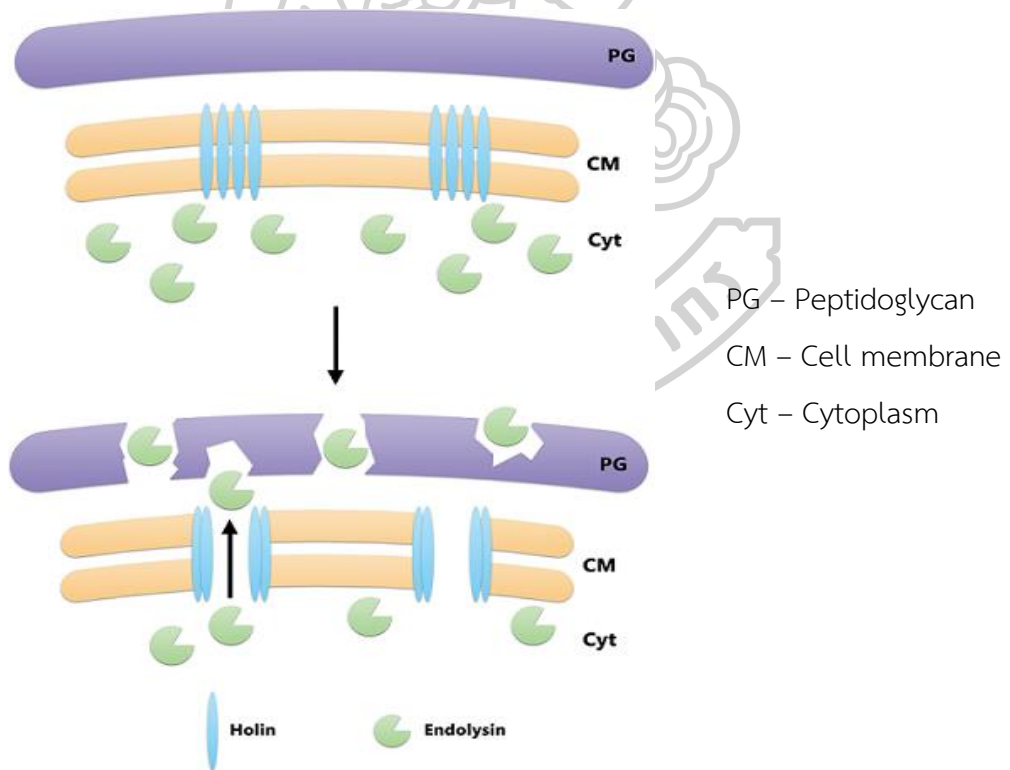
1. วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) แบคทีริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้เรียกว่า ไลติกหรือไวรุเรนต์เฟจ (lytic หรือ virulent phage) โดยแบคทีริโอเฟจสามารถเข้าจับกับเซลล์เจ้าบ้านโดยอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติด (attachment site) ของแบคทีริโอเฟจกับตำแหน่ง

รีเซพเตอร์ (receptor site) บนเซลล์แบคทีเรีย เช่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) แฟล็กเจลลา (flagella) แคปซูล (capsule) พิล (pili) โปรตีน (protein) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นต้น (Elbreki et al., 2013) ภายหลังจากเข้าจับกับเซลล์เจ้าบ้าน แบคทีเรียโอเฟจจะปลดปล่อย (inject) จีโนมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่น ๆ ยังคงอยู่ภายนอกเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์เจ้าบ้านแล้ว เซลล์เจ้าบ้านจะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ และเริ่มการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนโครงสร้างของแบคทีเรียโอเฟจ เช่น แคพซิดหรือหาง เป็นต้น รวมไปถึงโปรตีนที่จำเป็นสำหรับขั้นตอนแตกสลายของเซลล์เจ้าบ้าน (Tan et al., 2014) เมื่อสร้างองค์ประกอบต่าง ๆ เสร็จสิ้นและประกอบตัวเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่สมบูรณ์แล้ว (bacteriophage progeny) จะเข้าสู่ขั้นตอนการปลดปล่อยแบคทีเรียโอเฟจออกมาจากเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งอาศัยการทำงานของโปรตีนของแบคทีเรียโอเฟจ 2 ชนิด ได้แก่ เอนโดไลซิน (endolysin) และโฮลิน (holin) โดยโฮลินสามารถสอดแทรกโฮลินโมโนเมอร์ (holin monomer) เข้าไปในผนังเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์เจ้าบ้านจากทางด้านในของเซลล์และประกอบตัวเป็นโฮลินโอลิโกเมอร์ (holin oligomers) ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์ ส่งผลให้เอนโดไลซินสามารถผ่านเข้าไปย่อยทำลายชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก แบคทีเรียโอเฟจจึงถูกปลดปล่อยออกมา (Young, 2014) (รูปที่ 2)

2. วงจรชีวิตแบบไลโซจีนิก (Lysogenic cycle) แบคทีเรียโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้เรียกว่าไลโซจีนิกหรือเทมเพอเรตเฟจ (lysogenic หรือ temperate phage) โดยวงจรนี้แตกต่างจากวงจรชีวิตแบบไลติก โดยเมื่อแบคทีเรียโอเฟจปลดปล่อยจีโนมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน จีโนมสามารถสอดแทรก (integrate) เข้าไปในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน เรียกแบคทีเรียโอเฟจระยะนี้ว่าโปรเฟจ (prophage) และเรียกเซลล์เจ้าบ้านที่มีโปรเฟจว่าไลโซเจน (lysogen) เมื่อเซลล์เจ้าบ้านแบ่งตัวโปรเฟจก็แบ่งตัวไปพร้อมกัน ส่งผลให้เซลล์เจ้าบ้านใหม่มีโปรเฟจติดไปด้วย โดยวงจรเฟจระยะนี้สามารถถูกชักนำกลับไปเป็นวงจรชีวิตแบบไลติกได้ เช่น หากได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ทำให้โครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านได้รับความเสียหาย ส่งผลให้โปรเฟจสามารถหลุดออกจากโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านและเข้าสู่วงจรชีวิตแบบไลติก (Doss et al., 2017)



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจแบบไลติกและไลโซจีนิค
(ที่มา : Chibeu, 2013)



รูปที่ 2 กลไกของไลติกเฟจในการในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย
(ที่มา : Jie, 2014)

2.7 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียโอเฟจทุกชนิดประกอบด้วยจีโนม (genome) ซึ่งหุ้มล้อมด้วยแคปซิด (capsid) โดยจีโนมนั้นอาจเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) อาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) หรือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) ซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และวงกลม (circular) แคปซิดของแบคทีเรียโอเฟจมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น หกเหลี่ยมขนาดต่างๆ (hexagonal) เป็นเส้นใย (filamentous) หรือรูปร่างซับซ้อนที่ประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง ซึ่งทาง International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียโอเฟจออกเป็น 1 อันดับ (order) 13 วงศ์ (family) (ตารางที่ 1) และ 30 สกุล (genera) ตามชนิดของกรดนิวคลีอิก (nature of nucleic acid) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (particle morphology) โดยแบคทีเรียโอเฟจจำนวนมากกว่าร้อยละ 96 เป็นแบคทีเรียโอเฟจที่มีหาง (tailed phage) และส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (Khakhum et al., 2010) โดยแบคทีเรียโอเฟจสามารถแบ่งออกได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งส่วนใหญ่มักพบอยู่ใน 1 ใน 3 วงศ์ นั่นคือ *Myoviridae*, *Siphoviridae* หรือ *Podoviridae* (Han et al., 2013)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอเฟจในวงศ์ต่าง ๆ

Order	Family	Morphology	Nucleic acid
Caudovirales	<i>Myoviridae</i>		Double-stranded DNA
	<i>Siphoviridae</i>		
	<i>Podoviridae</i>		
	<i>Tectiviridae</i> ^a		
	<i>Corticoviridae</i> ^a		
	<i>Lipothrixviridae</i> ^b		
	<i>Plasmaviridae</i> ^b		
	<i>Rudiviridae</i>		
	<i>Fuselloviridae</i>		
	<i>Inoviridae</i>		
	<i>Microviridae</i>		Single-stranded DNA
	<i>Leviviridae</i>		
	<i>Cytoviridae</i> ^b		
			Segmented, double-stranded RNA

หมายเหตุ a - มีลิพิด (lipid) ภายในแคปซิด

b - มี enveloped หุ้มอยู่

(ที่มา : Matsuzaki et al., 2005)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์แบคทีเรียโอเฟจเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในอาหาร

แบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรียซึ่งมีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน และอากาศ โดยแบคทีเรียโอเฟจมีคุณสมบัติที่เข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านได้อย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้ว สามารถอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนและสร้างเอนไซม์เอนโดไลซินขึ้นมา เพื่อทำลายผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เซลล์ตายแล้วปลดปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์ จึงได้มีการนำแบคทีเรียโอเฟจมาใช้ในการบำบัดและควบคุมเชื้อก่อโรคต่าง ๆ (Kutateladze and Adamia, 2010)

แบคทีเรียโอเฟจเป็นนักล่าตามธรรมชาติของแบคทีเรีย มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม สามารถจำลองตัวเองได้และเพิ่มจำนวนมากขึ้นตราบใดที่ยังมีเซลล์เจ้าบ้านอยู่ และมีเป้าหมายเพียงเซลล์เจ้าบ้านที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น ในกรณีของการบำบัดด้วยเฟจนั้นใช้ไลติกเฟจที่มีความรุนแรง ซึ่งค่อย ๆ สลายเซลล์เจ้าบ้าน เกิดเป็นวงใสที่เรียกว่าพลาคว (plaque) โดยในปัจจุบันความรู้ทางเทคโนโลยีเกี่ยวกับแบคทีเรียโอเฟจนั้นพัฒนาไปมาก ทำให้รู้ว่าแบคทีเรียโอเฟจนั้นมีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ อันที่จริงแล้วผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอเฟจหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อทางชีวภาพกับอาหารพร้อมรับประทาน เช่น Listex™ P100, Listshield™ เป็นต้น และยังได้รับการรับรองแล้วว่าปลอดภัยจากสำนักงานอาหารและยาในสหรัฐอเมริกา (FDA) (Garcia et al., 2010) ข้อดีของการใช้แบคทีเรียโอเฟจมาเป็นเครื่องมือในการบำบัดควบคุมเชื้อก่อโรคในอาหาร ได้แก่

1. มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านสูง
2. ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อกลิ่น สี เนื้อสัมผัส และรสชาติของอาหาร
3. สามารถคัดแยกได้จากธรรมชาติ เนื่องจากมีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ ไม่ทำอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต
4. ไม่มีการตกค้างในอาหาร

จากงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียโอเฟจเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยมีนักวิจัยจำนวนหนึ่งได้ศึกษาการควบคุมเชื้อ *S. aureus* โดยใช้แบคทีเรียโอเฟจ งานวิจัยของ Li และ Zhang (2014) คัดแยกและศึกษาแบคทีเรียโอเฟจ SPW ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเสียในเขตชุมชน และนำไปควบคุม *S. aureus* ซึ่งคัดแยกมาจากนมวัวที่เป็นเต้านมอักเสบและนมวัวที่ไม่เป็นเต้านมอักเสบ โดยผู้วิจัยได้ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจโดยเพาะเชื้อช่วง early-exponential ลงไปในอาหาร LB ที่มีการเติม CaCl_2

จากนั้นเติมแบคทีเรียโอเฟจ SPW ให้ได้ MOI 0.01 และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ทุก ๆ 1 ชั่วโมง พบว่าใน 1-2 ชั่วโมงแรก ค่า OD_{600} ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และหลังจาก 3 ชั่วโมง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเรื่อย ๆ จนเข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจ SPW นั้นมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุม *S. aureus* Han และคณะ (2013) ได้คัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจจากน้ำเสียในเขตชุมชนเมือง Gwacheon ประเทศเกาหลี โดยจัดจำแนกแบคทีเรียโอเฟจอยู่ในวงศ์ *Myoviridae* และตั้งชื่อแบคทีเรียโอเฟจตัวนี้ว่า SAH-1 การศึกษากิจกรรมที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic activity) โดยเฉพาะ *S. aureus* ในระยะ early-exponential ผสมกับแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ให้ได้ MOI 0, 0.01, 1 และ 100 ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าในช่วงแรกการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และในช่วงหลังมีการเจริญลดลง ซึ่งค่า MOI ที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมการเจริญของ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ MOI 100 Gutiérrez และคณะ (2016) คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจและ *S. aureus* ในประเทศสเปนและนิวซีแลนด์ โดยคัดแยก *S. aureus* จากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมได้รวมทั้งสิ้น 87 สายพันธุ์ และคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจจากอาหารทะเลได้ 6 ตัวอย่าง ได้แก่ Φ 11, K, Φ H5, Φ A72, CAPSa1 และ CAPSa3 พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ K สามารถติดเชื้อมีได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียโอเฟจตัวอย่างอื่น ๆ สามารถติดเชื้อได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น ดังนั้นสรุปได้ว่าแบคทีเรียโอเฟจ K มีช่วงการเข้าจับเซลล์เจ้าบ้านที่กว้าง (broad host range) Mohammed-Ali และ Jamalludeen (2015) คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถควบคุม Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดย MRSA ทั้ง 100 สายพันธุ์ ถูกคัดแยกจากผิวหนัง บาดแผล และเลือด รวมถึงทดสอบการต้านยาของ MRSA ด้วยแผ่นยาเซฟิซิดิน (cefazolin disc) ขณะที่แบคทีเรียโอเฟจถูกคัดแยกจากตัวอย่างน้ำเสียบริเวณโรงพยาบาล จากผลการทดสอบความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range test) ด้วยวิธี spot test พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ Φ SA1, Φ SA2 และ Φ SA3 สามารถติดเชื้อมีได้กับ MRSA ทั้ง 100 สายพันธุ์ และพบว่าจะจัดอยู่ในวงศ์ *Siphoviridae* รวมถึงมีความเสถียรที่พีเอช (pH) 4 ถึง 9 Synnott และคณะ (2009) คัดแยก *S. aureus* ทั้งหมด 49 สายพันธุ์ รวมทั้งคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจได้ 52 ตัวอย่าง จากนั้นนำ *S. aureus* มาทดสอบเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) และการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis)

พบว่ามีเพียง 15 สายพันธุ์ ที่ให้เป็นผลบวก (positive) เมื่อทดสอบความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range test) พบว่ามีเพียงแบคทีเรียโอเฟจ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ Φ SA039 และ Φ SA012 สามารถติดเชื้อ *S. aureus* ได้ 13 และ 8 สายพันธุ์ ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้งสองจัดอยู่ในวงศ์ *Myoviridae* García และคณะ (2007) ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอเฟจผสม (bacteriophage cocktail) ได้แก่ Φ H5 และ Φ A72 ซึ่งคัดแยกจากตัวอย่างนมดิบ สำหรับควบคุม *S. aureus* ในลิม่อน้ำนม (curd) และน้ำเวย์ (whey) โดยใช้ MOI 100 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการบ่มเพียง 1 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งในลิม่อน้ำนมและน้ำเวย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจผสมนั้นมีประสิทธิภาพในการควบคุม *S. aureus*

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้แบคทีเรียโอเฟจร่วมกับวิธีต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อก่อโรคได้แก่ งานวิจัยของ García และคณะ (2010) ได้ทดลองใช้เอนไซม์เอนโดไลซินจากแบคทีเรียโอเฟจ *LysH5* ร่วมกับไนซิน (nisin) สำหรับควบคุม *S. aureus* Sa9 ในนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ โดยไนซินเป็นแบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) ที่ผลิตมาจาก *Lactococcus lactis* มักนิยมใช้กับผลิตภัณฑ์จากนมเป็นหลัก เพื่อลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ จากการทดลองได้นานนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์มาเพาะ *S. aureus* Sa9 โดยเติมไนซินและเอนโดไลซิน *LysH5* ทันที แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าการใช้เอนไซม์เอนโดไลซิน *LysH5* ร่วมกับไนซิน มีประสิทธิภาพในการลดความหนาแน่นของ *S. aureus* Sa9 ในนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Tabla และคณะ (2012) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้แบคทีเรียโอเฟจร่วมกับความดันสูง (high hydrostatic pressure) ในนม โดยคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ vB_SauS-phi-IPLA35 (phiIPLA35) และ vB_SauS-phi-IPLA88 (phiIPLA88) สำหรับควบคุม *S. aureus* Sa9 ในนมดิบที่มีการพาสเจอร์ไรส์ โดยใช้ *S. aureus* Sa9 ความหนาแน่นเริ่มต้น 1×10^6 และ 1×10^4 CFU/มิลลิลิตร สภาวะการบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยควบคุมความดันเท่ากับ 400 เมกะปาสคาล เนื่องจากเป็นความดันที่ phiIPLA35 และ phiIPLA88 ยังสามารถทำงานอยู่ได้ พบว่าที่ 4 ชั่วโมง ความหนาแน่นของ *S. aureus* Sa9 ลดลงประมาณ 3.5 log CFU/มิลลิลิตร จากระดับความหนาแน่นเริ่มต้น 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร และไม่สามารถตรวจพบได้หลังจากผ่านไป 48 ชั่วโมง และที่ระดับความหนาแน่นเริ่มต้น 1×10^4 CFU/มิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจพบ *S. aureus* Sa9 ได้ตั้งแต่ 4 ชั่วโมง เป็นต้นไป ซึ่ง

สรุปได้ว่าการใช้แบคทีเรียโอฟาจร่วมกับความดันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพสำหรับควบคุม *S. aureus* ซึ่งช่วยลดการสิ้นเปลืองพลังงานจากการใช้ความดันสูงในการฆ่าเชื้อ Chang และคณะ (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการใช้สารผสมสองชนิดได้แก่ เอนโดไลซิน LysSA97 และน้ำมันหอมระเหย คาร์วาครอล (carvacrol) ในการควบคุม *S. aureus* ในอาหาร ซึ่งมีความสามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคโดยไม่ไปรบกวนแบคทีเรียชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งเอนโดไลซิน LysSA97 เป็นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ (recombinant enzyme) ที่ได้จากการแสดงออกของยีนเอนโดไลซิน (endolysin gene) SA97_036 จากแบคทีเรียโอฟาจ SA97 และนำสารผสมไปควบคุม *S. aureus* ในนมขาดมันเนย (skim milk) นมสดครบส่วน (whole milk) และ เนื้อวัว จากผลการทดลองพบว่าสารผสมสามารถลดความหนาแน่น *S. aureus* ในนมขาดมันเนยได้โดยไม่ตรวจพบความหนาแน่นของ *S. aureus* ในช่วงหลัง 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการใช้เพียงเอนโดไลซิน LysSA97 หรือคาร์วาครอลเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามในนมสดครบส่วนและเนื้อวัวพบว่าสามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างที่ซับซ้อนของเนื้อวัว รวมถึงองค์ประกอบของนมครบส่วนมีปริมาณไขมันสูง ทำให้ประสิทธิภาพของสารผสม (LysSA97 และ คาร์วาครอล) นั้นลดลงไป อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าการใช้เอนโดไลซิน LysSA97 ร่วมกับ คาร์วาครอลมีประสิทธิภาพอย่างมากในการควบคุม *S. aureus*

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้แบคทีเรียโอฟาจในการควบคุมเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ เช่น งานวิจัยของ Bigot และคณะ (2011) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอฟาจ FWLLm1 ซึ่งคัดแยกจากมูลแกะจากฟาร์มในประเทศนิวซีแลนด์ สำหรับควบคุม *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ออกไก่พร้อมรับประทาน โดยเปรียบเทียบการทดลองระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 5 องศาเซลเซียส โดยหยุด *L. monocytogenes* ความหนาแน่น 10^5 CFU/ตารางเซนติเมตร และหยุดแบคทีเรียโอฟาจ FWLLm1 ความหนาแน่น 2.5×10^7 PFU/ตารางเซนติเมตร ลงบนออกไก่ขนาด 2×2 เซนติเมตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในวันแรกความหนาแน่นของ *L. monocytogenes* ลดลงทันที $2.5 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน แบคทีเรียโอฟาจยังสามารถเจริญได้ ซึ่งสรุปได้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่แบคทีเรียโอฟาจเจริญได้ดี แบคทีเรียโอฟาจจึงไม่สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งหมด ส่งผลให้แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดสามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองหยุด *L. monocytogenes* ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น 10^4 CFU/ตารางเซนติเมตร และ 10^2 CFU/ตารางเซนติเมตร จากนั้นหยุด

แบคทีเรียโอเฟจ FWLLm1 ความหนาแน่น 1.5×10^6 PFU/ตารางเซนติเมตร ลงบนอกไก่ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แบคทีเรียโอเฟจสามารถลดความหนาแน่นของ *L. monocytogenes* ได้ $1.5 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร ตั้งแต่วันแรกจากความหนาแน่นเริ่มต้น 10^4 CFU/ตารางเซนติเมตร และไม่มีการเจริญของแบคทีเรียภายในการทดลอง 21 วัน ในขณะที่ความหนาแน่นเริ่มต้นของ *L. monocytogenes* 10^2 CFU/ตารางเซนติเมตร เมื่อเติมแบคทีเรียโอเฟจลงไป สามารถลดความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียได้ $1 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร ตั้งแต่วันแรก และไม่สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในวันที่ 5 อย่างไรก็ตามหลังจากผ่านไป 21 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียเจริญกลับมาเพียงเล็กน้อย ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิทั่วไปที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหาร ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญได้ไม่ดี เมื่อใส่แบคทีเรียโอเฟจลงไปจึงสามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียได้ Baños และคณะ (2016) ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอซิน AS-48 ซึ่งผลิตจาก *Enterococcus faecalis* ร่วมกับผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 สำหรับควบคุม *L. monocytogenes* ในปลาแซลมอนรมควัน โดยเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* โดยสเปรย์ลงบนปลาแซลมอนรมควันความหนาแน่น 10^3 CFU/ตารางเซนติเมตร และแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 สเปรย์แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 ความหนาแน่น 2.3×10^7 PFU/ตารางเซนติเมตร กลุ่ม 2 สเปรย์แบคทีเรียโอซิน AS-48 ความเข้มข้น 0.37 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร และกลุ่ม 3 สเปรย์แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 ร่วมกับแบคทีเรียโอซิน AS-48 ความเข้มข้นเท่าเดิม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลอง พบว่าหลังจากผ่านไป 30 วัน การใช้แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 หรือแบคทีเรียโอซิน AS-48 สามารถลดความหนาแน่นของ *L. monocytogenes* ได้ $1.58 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร และ $4.25 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ในขณะที่การใช้แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 ร่วมกับแบคทีเรียโอซิน AS-48 ไม่สามารถตรวจพบ *L. monocytogenes* ตั้งแต่วันที่ 1-15 อย่างไรก็ตามในวันที่ 30 พบว่า *L. monocytogenes* เจริญกลับมาเพียงเล็กน้อย โดยมีความหนาแน่นเท่ากับ $0.78 \log$ CFU/ตารางเซนติเมตร ซึ่งการกลับมาเจริญของแบคทีเรียอาจมีสาเหตุจากแบคทีเรียโอซิน AS-48 นั้นเสื่อมสภาพลง ส่งผลให้ แบคทีเรียสามารถฟื้นฟูกลับมาได้ ซึ่งผลการทดลองในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 ร่วมกับแบคทีเรียโอซิน AS-48 นั้นสามารถควบคุม *L. monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 หรือ แบคทีเรียโอซิน AS-48 เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง Hungaro และคณะ 2013 ได้

ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอเฟจผสมพร้อมทั้งเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี เนื่องจากสารเคมีส่งผลเสียต่อเนื้อสัมผัส อีกทั้งยังอาจตกค้างได้ในอาหารซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภค โดยได้คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ ได้แก่ $\Phi 7$, $\Phi 16$, $\Phi 18$, $\Phi 36$ และ $\Phi 43$ จากมูลไก่ สำหรับนำมาควบคุม *Salmonella* Enteritidis ในหนังไก่ โดยเฉพาะเชื้อ *S. Enteritidis* ความหนาแน่น 10^5 CFU/ตารางเซนติเมตร ลงบนหนังไก่ และนำไปแช่ในสารละลายต่าง ๆ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อนาน 30 นาที กลุ่มที่ 2 แช่แบคทีเรียโอเฟจผสมที่ความหนาแน่น 10^9 PFU/ตารางเซนติเมตร นาน 30 นาที กลุ่มที่ 3 แช่ sodium dichloroisocyanurate ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 10 นาที กลุ่มที่ 4 แช่ peracetic acid ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 10 นาที และ กลุ่มที่ 5 แช่ lactic acid ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 วินาที นำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า การแช่ในน้ำกลั่นส่งผลให้ความหนาแน่นของ *S. Enteritidis* ลดลงไป 0.2 log CFU/ตารางเซนติเมตร ในขณะที่การแช่ในแบคทีเรียโอเฟจผสมทำให้ความหนาแน่นของ *S. Enteritidis* ลดลงไป 1 log CFU/ตารางเซนติเมตร และการแช่ในสารเคมี ได้แก่ sodium dichloroisocyanurate, peracetic acid และ lactic acid พบว่าความหนาแน่นของ *S. Enteritidis* ลดลงไป 0.81 ± 0.06 log CFU/ตารางเซนติเมตร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า การใช้แบคทีเรียโอเฟจผสมและสารเคมีสามารถลดความหนาแน่นของ *S. Enteritidis* ได้ไม่แตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าการใช้แบคทีเรียโอเฟจผสมนั้นเป็นวิธีทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับนำมาใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคแทนการใช้สารเคมี O'Flynn และคณะ 2004 ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอเฟจผสม ได้แก่ e11/2, e4/1c และ PP01 ซึ่งคัดแยกจากอุจจาระผู้ป่วยที่เป็นโรกระบบทางเดินอาหาร สำหรับนำมาควบคุม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อวัว โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* O157:H7 ความหนาแน่น 2×10^3 CFU/มิลลิลิตร และเติมแบคทีเรียโอเฟจผสมความหนาแน่น 2×10^8 PFU/มิลลิลิตร ลงในเนื้อวัว จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าเนื้อวัวที่เติมแบคทีเรียโอเฟจผสมตรวจพบความหนาแน่นของ *E. coli* O157:H7 น้อยกว่า 10 CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจผสมนั้นมีประสิทธิภาพในการควบคุม *E. coli* O157:H7

2.9 ข้อดีและข้อจำกัดของการบำบัดด้วยแบคทีเรียโอเฟจ

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจนั้นเป็นวิธีทางเลือกที่ดีในการนำมาใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคในอาหารต่าง ๆ อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียโอเฟจนั้นมีทั้งข้อดีและข้อจำกัดที่ยังคงต้องศึกษาและแก้ไขต่อไปในอนาคต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ข้อดีและข้อจำกัดของการบำบัดด้วยแบคทีเรียโอเฟจ (ที่มา : Endersen et al., 2014)

ข้อดี	ข้อจำกัด
มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่สูง ราคาถูก ไม่ทำลายแบคทีเรียเจ้าถิ่น	มีช่วงของเซลล์เจ้าบ้านที่แคบ
มีความสามารถในการจำลองตัวเองได้โดย อาศัยเซลล์เจ้าบ้าน	ผู้บริโภคมักต้องการความรู้เกี่ยวกับเรื่องแบคทีเรีย โอเฟจอีกมาก
ไม่มีผลกระทบต่อกลืน สี รสชาติ และเนื้อ สัมผัสของอาหาร	ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งมีทัศนคติเชิงลบต่อ คำว่า “viruses” หรือ “virulent phage” ในอาหาร
แบคทีเรียโอเฟจมีอยู่อย่างสมบูรณ์ใน ธรรมชาติ และไม่ทำอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช	
ประยุกต์ใช้ได้ เช่น กำจัดไบโอฟิล์มหรือใช้ ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคได้	

2.10 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอเฟจทางการค้า

ในปี 2005 ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียโอเฟจชนิดแรก ได้รับการรับรองจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐ (US Environmental Protection Agency) ให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ Agriphage™ (OmniLytics Inc.) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในสหรัฐอเมริกาเพื่อใช้บำบัดและควบคุม *Xanthomonas campestris* และ *Pseudomonas syringae* ซึ่งก่อให้เกิดโรคจุดแบคทีเรีย (spot disease) บนพืชผลทางการเกษตร ต่อมาในปี 2006 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐ (U.S. Food and Drug Administration, FDA) ได้รับรองให้ LMP-102 หรือ Listshield™ (Intralytix Inc.) เป็นผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอเฟจชนิดแรกที่ใช้ในการควบคุม

L. monocytogenes ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และสัตว์ปีก (Sarhan and Azzazy, 2015) และในปีเดียวกัน ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอเฟจ Listex™ P100 (PhageGuard Inc.) ซึ่งใช้ควบคุม *L. monocytogenes* ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (generally regarded as safe, GRAS) โดย FDA สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเหมาะสำหรับอาหารทุกประเภทที่ไวต่อการปนเปื้อน *L. monocytogenes* อีกทั้งในปี 2007 Listex™ P100 ยังได้รับการรับรองว่าเป็นผลิตภัณฑ์อินทรีย์ตามข้อกำหนดของแผนงานเกษตรอินทรีย์แห่งชาติสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture) รวมไปถึงได้รับการรับรองจากสำนักงานมาตรฐานอาหารออสเตรเลีย-นิวซีแลนด์ (Food Standards Australia New Zealand) อีกด้วย (Endersen et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอเฟจชนิดอื่น ๆ ที่มีเป้าหมายเพื่อควบคุมแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้รับการรับรองจาก FDA ได้แก่ EcoShield™ (Intralytic Inc.) ซึ่งใช้สำหรับควบคุม *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์เนื้อสดก่อนถูกนำไปใช้ผลิตแฮมเบอร์เกอร์ Salmofresh™ ใช้สำหรับควบคุม *Salmonella enterica* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีก ปลา และหอย รวมถึงผักและผลไม้ Finalyse™ (จำหน่ายโดย Elanco และพัฒนาโดย Omnilytics Inc.) และ STECleanz™ (ESR Ltd.) ใช้สำหรับควบคุม Shiga toxinogenic *Escherichia coli* บนหนังสัตว์เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์บนเนื้อสด (Campdenbri, 2016) และ Armament™ (OmniLytics Inc.) ใช้สำหรับควบคุม *Salmonella* spp. โดยสเปรย์บนผิวหนังวัวก่อนนำไปชำแหละ (Sharma, 2013)

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
Baird parker agar	TM Media, India
Egg yolk tellurite	TM Media, India
Chloroform	RCI Labscan, Thailand
Dextrose	Sisco Research, India
di-Potassium hydrogen orthophosphate	Ajax Finechem, USA
DNase I	Panreac, Germany
<i>Eco</i> RI (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
Ethidium bromide	Fluka, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka, Germany
Gelatin	Criterion, USA
GF-1 AmbiClean kit	Vivantis, 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
Primer 27F	Macrogen, Korea
Primer 1492R	Macrogen, Korea
Protinase K	Vivantis, USA
RNase A	Amresco, USA
<i>SacI</i> (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
Sodium acetate trihydrate	Himedia, India
Sodium chloride	RCI Labscan, Thailand
<i>Taq</i> DNA polymerase	Biolab, Thailand
Sodium EDTA	Central Drug House, India
Sodium hydroxide	RCI Labscan, Thailand
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Soytone	Himedia, India
<i>StyI</i> (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
Tris base	Amresco, USA
Tryptone	Sisco Research, India

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย
Autoclave	Tomy, Korea
Auto pipette	Gilson, UK
Centrifuge	Hermle, Germany
Dry bath	Major Science, Korea
Hot air oven	Binder, Germany

Incubator	Memmert, Germany
Laminar airflow carbinet	Haier, China
LED illuminator	Maestrogen, Taiwan
Microcentrifuge	Wisd, Korea
Microwave	LG, Thailand
Mini Horizontal Gel Electrophoresis	Major Science, Korea
pH meter	Ohaus, China
Power supply	Major Science, Korea
Spectrophotometer	Mesulab, China
Stomacher	Interscience, France
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, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius, USA
เครื่องผลิตน้ำกลั่น	ELGA, UK
เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน	ELGA, UK
ตู้เย็น	Samsung, Korea

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การคัดแยก *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบและสภาวะการเจริญเติบโต

เก็บตัวอย่างเนื้อหมูจากร้านค้าในตลาดสดในจังหวัดนครปฐมจำนวน 5 ร้าน จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อหมูดิบ 25 กรัม มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากันกับสารละลายเพปโทน (Peptone water) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในถุงซิปล็อค จากนั้นตีบดให้เข้ากันด้วยเครื่องตีบด (stomacher) ที่ความเร็ว 8 จังหวะ/วินาที นาน 3 นาที ปิเปตสารละลายผสม 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร baird parker ที่ผสม egg yolk tellurite แล้วใช้แท่งแก้ว

รูปสามเหลี่ยมที่ปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* คือมีสีดำวาว นูน โชนด้านในมีสีขาวขุ่น โชนด้านนอกใส มา 9 ไอโซเลท และตั้งรหัสเป็น *S. aureus* BPA1-BPA9 จากนั้นเกลี่ยลงบน baird parker agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยงานวิจัยนี้ ช่วงเริ่มแรกใช้ *S. aureus* BPA1 และ *S. aureus* BPA3 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับคัดแยก แบคทีเรียโอเฟจ ในภายหลังสามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจได้จาก *S. aureus* BPA3 จึงใช้เป็นเซลล์ เจ้าบ้านหลัก เพื่อคัดแยกและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจ รวมทั้งใช้ในการศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกได้

เลี้ยงเชื้อ *S. aureus* BPA1 และ *S. aureus* BPA3 ในอาหาร tryptic soy broth (TSB) บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เจือจางด้วยอาหารเหลว TSB ในอัตราส่วน 1:10 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ *S. aureus* BPA1 และ BPA3 ในระยะ mid-log phase (OD_{600} เท่ากับ 1.5)

เก็บรักษา *S. aureus* ทุกตัวอย่างในอาหารเหลว TSB ที่เติมกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาในระยะยาว

3.2.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ยีน 16S rDNA

3.2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

เลี้ยงเซลล์ *S. aureus* ให้อยู่ในระยะ mid-log phase ในอาหารเหลว TSB จากนั้นปิเปต อาหารที่มีเซลล์แบคทีเรียมา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติม lysozyme ที่ละลาย อยู่ใน TE buffer ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 573 ไมโครลิตร ลงในตะกอนเซลล์ที่ได้ ปิเปตขึ้นลงผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับ หลอดไปมาและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์

ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม CTAB/NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมของ Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ปิดเปิดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ และเติมส่วนผสมของ Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ปิดเปิดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า ของสารละลายที่ปิดเปิดมา และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนพลอตเชื้อ

จากนั้นวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1x TAE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้เจละลาย แล้วเทเจลลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber และเท 1x TAE ให้ท่วมเจล จากนั้นนำสารละลายกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 นำมาไหลลงในช่องภายในอะกาโรสเจล โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาส่องด้วยเครื่อง LED illuminator สำหรับการเปรียบเทียบขนาดของกรดนิวคลีอิกใช้ VC 1kb DNA Ladder เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. aureus* ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') โดยเตรียมองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

DNA template	4	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	1	เท่า
50 mM MgCl ₂	2.5	มิลลิโมลาร์
10 mM dNTPs	0.2	มิลลิโมลาร์
Primer 27F	100	พิโคลโมล
Primer 1492R	100	พิโคลโมล
Taq DNA polymerase (Vivantis, USA)	5	ยูนิต

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนปลอดเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส 10 นาที
ขั้นที่ 2 (35 รอบ)	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	52 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที
ขั้นที่ 3	72 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามที่กล่าวไปในวิธี 3.2.2.1 และแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสตามวิธีในข้อ 3.2.2.3

3.2.2.3 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ชุดสำเร็จรูป GF-1 AmbiClean kit (Vivantis, USA)

ส่องดูแผ่นอะกาโรสด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดเจลจากบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป GF-1 AmbiClean kit (Vivantis, USA) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดดังนี้ นำเจลที่ตัดใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อให้ทราบน้ำหนักของเจล จากนั้นเติม 1 volume DB buffer ต่อ 1 volume ของเจล แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีการเติม DB buffer ไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจลที่อยู่ภายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอมเหลวจนละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกับ DB buffer จากนั้นถ่ายสารละลายลงในคอลัมน์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม wash buffer ปริมาตร 750

ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้แห้ง เติม Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ดึงคอลัมน์ออกแล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence analysis) โดยทั้ง 27F และ 1492R เป็นไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

3.2.2.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. aureus* BPA1 ถึง BPA9 มาวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank บนเว็บไซต์ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม Blastn

3.2.3 การเตรียมสารละลายแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage suspension)

ตัวอย่างทั้งหมด 247 ตัวอย่าง ถูกเก็บจากบริเวณที่คาดว่ามีความเสี่ยงสูงต่อ *S. aureus* ตามพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี เช่น นมดิบ น้ำเสียจากท่อระบายน้ำ น้ำเสียจากตลาด เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม หรือ 5 มิลลิลิตร เติม SM buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 M NaCl, 1 M MgSO₄ และ 0.01% gelatin) ในอัตราส่วน 1 : 5 ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปิเปิดตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับ *S. aureus* BPA1 หรือ BPA3 ช่วง mid-log phase ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม TSB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านตัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ได้สารละลายแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage suspension) จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.4 การตรวจหาแบคทีริโอเฟจ (phage detection) ในสารละลายแบคทีริโอเฟจ

ตรวจหาแบคทีริโอเฟจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* BPA3 ในสารละลายแบคทีริโอเฟจข้อ 3.2.3 ด้วยวิธี agar overlay assay (Adams, 1959) นำ *S. aureus* BPA3 สำหรับใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ที่เจริญอยู่ในช่วง mid log phase ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแบคทีริโอเฟจ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเติม molten soft agar (อาหารเหลว TSB ที่มี agar ความเข้มข้น 0.45 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปิเปตส่วนผสมทั้งหมดลงบน TSA หลังจากเทลงบน TSA soft agar หมุนวนเพลทเพื่อให้สารละลายผสมกันและกระจายทั่วเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกขนาดของพลาคว (plaque) และตรวจดูลักษณะของพลาควที่เกิดขึ้น (ชุ่นหรือใส)

3.2.5 การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage purification)

เก็บพลาควที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อจากการทำ agar overlay assay โดยใช้ pipette tip ที่ตัดตรงปลายในการเจาะขึ้นวุ้นบริเวณที่มีพลาควและกระจายใน SM buffer ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งหลอดทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้แบคทีริโอเฟจแพร่ออกมาจากขึ้นวุ้น สารละลายแบคทีริโอเฟจที่ได้นี้ถูกนำไปทำ agar overlay assay โดยทำบริสุทธิ์เช่นนี้อย่างน้อย 3 รอบ เพื่อให้มั่นใจว่าเฟจที่ได้มีความบริสุทธิ์ โดยสังเกตจากลักษณะและขนาดของพลาควมีความสม่ำเสมอทั้งเพลท จากนั้นชะเพลทที่มีเฟจบริสุทธิ์ โดยเติม SM buffer 5 มิลลิลิตร ลงในเพลทแล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมขูดหน้าวุ้นเบา ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้แบคทีริโอเฟจแพร่ออกมาจากขึ้นวุ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 × g เวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านตัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่กรองได้เป็นสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์

3.2.6 การเพิ่มจำนวนแบคทีริโอเฟจ (large-scale amplification of bacteriophage)

เลี้ยง *S. aureus* BPA3 ให้อยู่ในช่วง mid-log phase จากนั้นปิเปตเชื้อผสมเข้ากับอาหาร TSB และสารละลายแบคทีริโอเฟจ ในอัตราส่วน 1 : 4 : 5 (แบคทีริโอเฟจ:แบคทีเรีย:อาหาร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านตัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร เก็บสารละลายแบคทีริโอเฟจที่กรองได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.7 การหาความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage titer)

การหาความหนาแน่นแบคทีริโอเฟจด้วยเทคนิค agar overlay assay ตามวิธีของ Adams (1959) โดยนำแบคทีริโอเฟจที่ผ่านการเพิ่มปริมาณ มาเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย SM buffer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และปิเปตสารละลายแบคทีริโอเฟจในแต่ละระดับการเจือจางมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ mid-log phase *S. aureus* BPA3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม molten soft agar (อาหารเหลว TSB ที่มี agar ความเข้มข้น 0.45 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เทลงบนอาหารแข็ง TSA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนพลาไคที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับพลาไคในช่วง 30-300 พลาไค) และนำมาคำนวณค่าความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจในหน่วย plaque-forming unit/มิลลิลิตร (PFU/มิลลิลิตร) ดังนี้ ความหนาแน่นของแบคทีริโอเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) = (จำนวนพลาไคที่ปรากฏ/ปริมาตรของสารละลายแบคทีริโอเฟจ (มิลลิลิตร)) × ระดับการเจือจาง

3.2.8 การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range test)

การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นด้วยวิธี spot test ตามวิธีของ Mohammed-Ali และ Jamalludeen (2015) โดยผสม mid-log phase ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *S. aureus* (ที่คัดแยกจากเนื้อหมูจำนวน 9 ไอโซเลท),

S. aureus 01 (โรงพยาบาลสัตว์หนองโพคัดแยกจากตัวอย่างนมดิบ), *S. aureus* DN22 (โรงพยาบาลสัตว์หนองโพคัดแยกจากตัวอย่างนมดิบ), *Listeria monocytogenes* DMST 17303 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) และ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับ molten soft agar (อาหารเหลว TSB ที่มี agar ความเข้มข้น 0.45 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 4 มิลลิตร เททับลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง TSA รोजน molten agar แข็งตัว หยดสารละลายแบคทีเรียโอเฟจความหนาแน่น 10^8 PFU/มิลลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น

3.2.8.1 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจสำหรับทำลาย *S. aureus* BPA3 โดยวิธี efficiency of plating (EOP)

เนื่องจากการผลความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถติดเชื้อข้ามสกุล (cross genus) ได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่ทดสอบ โดยใช้ *S. aureus* BPA3 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถติดเชื้อข้ามสกุลมาทำ agar overlay assay เจาะพลาคนอาหารแข็งมากระจาย (resuspend) ใน SM buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เพื่อให้แบคทีเรียโอเฟจแพร่ออกมาจากชั้นวุ้น นำไปทำ agar overlay assay โดยใช้ทั้ง *S. aureus* BPA3 และ *S. Enteritidis* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งสามารถคำนวณประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจสำหรับทำลาย *S. aureus* BPA3 ดังนี้ Efficiency of plating (EOP) (PFU/มิลลิตร) = ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการทดสอบกับเซลล์เจ้าบ้านอื่น/ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการทดสอบกับเซลล์เจ้าบ้านหลัก

3.2.9 การศึกษาจีโนมของแบคทีริโอเฟจและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (bacteriophage genome analysis and restriction enzyme analysis)

จีโนมของแบคทีริโอเฟจถูกสกัดด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction ซึ่งดัดแปลงจาก Phage hunting (2013) โดยผสมแบคทีริโอเฟจความหนาแน่น 10^9 PFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ DNase I ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร รวมทั้งเติม 10% SDS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก ๆ 20 นาที ปิดเปิดของผสมลงหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $11,300 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที และปิดเปิดส่วนใสด้านบนไปยังหลอดใหม่ (โดยใช้ทิปปลายตัดเพื่อป้องกันการขาดของกรดนิวคลีอิก) จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาณเท่ากับส่วนใสที่ปิดเปิดออกมา ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $11,300 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิดเปิดส่วนใสด้านบนไปยังหลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่า ของส่วนใส และ sodium acetate, pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่า ของส่วนใส ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ $11,300 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งตะกอนให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนปลอดเชื้อ และตรวจสอบจีโนมของแบคทีริโอเฟจที่สกัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1x TAE ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาส่องด้วยเครื่อง LED illuminator สำหรับการเปรียบเทียบขนาดของกรดนิวคลีอิก ใช้ Lamda DNA/Styl marker เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

นำจีโนมที่ได้มาศึกษาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *EcoRI*, *HinfI* และ *Styl* โดยสภาวะที่ใช้ในการตัดกรดนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์เหล่านี้ได้ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ จากนั้นตรวจสอบรูปแบบจีโนมของแบคทีริโอเฟจที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ด้วยวิธีอะกาโรส

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยซั้งอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1x TAE ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาส่องด้วยเครื่อง LED illuminator สำหรับการเปรียบเทียบขนาดของกรดนิวคลีอิกใช้ Lamda DNA/*Hind*III marker และ 1kb DNA marker เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.10 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ (phage morphology)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) ดัดแปลงจากวิธีของ Wong และคณะ (2014) โดยหยดแบคทีเรียโอเฟจความหนาแน่นประมาณ 10^9 PFU/มิลลิลิตร ลงบนตะแกรงทองแดงเคลือบคาร์บอน (copper grid) แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำมาย้อมสีแบบ negative staining ด้วย uranyl acetate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 นาที บนตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Hitachi Hightech รุ่น HT7700 (ประเทศญี่ปุ่น) ที่กำลังไฟฟ้า 80 kV (ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) จำแนกชนิดของแบคทีเรียโอเฟจและหาขนาดของแบคทีเรียโอเฟจจากค่าเฉลี่ยของการวัดผล 10 ครั้ง

3.2.11 การหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (multiplicity of infection, MOI)

การหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านในการติดเชื้อ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Yang และคณะ (2010) โดยผสมสารละลายแบคทีเรียโอเฟจ และ mid-log phase *S. aureus* BPA3 ให้ได้อัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียโอเฟจต่อปริมาณเซลล์เจ้าบ้าน เท่ากับ 10, 1 และ 0.1 โดยปริมาตรและความหนาแน่นที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาตรและความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ และ *S. aureus* BPA3 สำหรับ
การทดลองหาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ

	MOI 10	MOI 1	MOI 0.1
สารละลาย แบคทีเรียโอเฟจ	10^{11} PFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10^{11} PFU/มิลลิลิตร (0.3 มิลลิลิตร)	10^{11} PFU/มิลลิลิตร (0.03 มิลลิลิตร)
mid-log phase <i>S. aureus</i> BPA3	10^{10} CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10^{10} CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)	10^{10} CFU/มิลลิลิตร (3 มิลลิลิตร)
อาหารเหลว TSB	24 มิลลิลิตร	26.7 มิลลิลิตร	26.97 มิลลิลิตร

โดยสารละลายที่ไม่มีแบคทีเรีย (bacteria-free suspension) และสารละลายที่ไม่มีแบคทีเรียโอเฟจ (phage-free suspension) เป็นการทดลองควบคุม (control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นหาความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 รวมทั้งวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ

วิเคราะห์หาความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 โดยปิเปตเซลล์เจ้าบ้านผ่านการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง TSA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (นับโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี) คำนวณความหนาแน่นของ *S. aureus* ในหน่วย colony-forming unit/มิลลิลิตร (CFU/มิลลิลิตร) ดังนี้ ความหนาแน่นของ *S. aureus* (CFU/มิลลิลิตร) = (จำนวนโคโลนีที่ปรากฏ/ปริมาตรของสารละลาย) × ระดับการเจือจาง พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *S. aureus* (CFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (ชั่วโมง)

วิเคราะห์ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ โดยปิเปตสารละลายผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านตัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจในของเหลวที่ผ่านการกรอง

(filtrate) ด้วยเทคนิคใน agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (ชั่วโมง)

3.2.12 การศึกษาผลอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ (thermal sensitivity test)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจดัดแปลงจากวิธีของ Phumkhachorn และ Rattanachaikunsopon (2010) โดยปิเปตน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ และบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4, 28, 37, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำละลายแบคทีเรียโอเฟจปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความหนาแน่นสุดท้ายประมาณ 10^8 PFU/มิลลิลิตร) และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิทดสอบ จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที วิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) กับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

3.2.13 การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ (one step growth)

การศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจดัดแปลงจากวิธีของ Chang และคณะ (2015) โดยเตรียม *S. aureus* BPA3 ในช่วง mid-log phase ผสมกับสารละลายแบคทีเรียโอเฟจให้ได้ MOI 0.1 ในปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตามตารางที่ 3 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้แบคทีเรียโอเฟจยึดเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ TSB ปริมาตรเท่ากับส่วนใสที่ทิ้งไปลงในส่วนตะกอน ซึ่งเป็นส่วนเซลล์เจ้าบ้านที่มีเฟจมายึดเกาะ และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านตัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ผ่านการกรอง (filtrate) และวิเคราะห์หาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค agar overlay assay พร้อมทั้งพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (นาที)

3.2.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (static analysis)

วิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ และผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ โดยใช้ One-Way ANOVA พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's multiple range tests โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 21



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยก *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบ

ตัวอย่างเนื้อหมูที่เก็บจากร้านค้าในตลาดสดในจังหวัดนครปฐมจำนวน 5 ตัวอย่าง จาก 5 ร้าน ถูกนำมาคัดแยก *S. aureus* โดยใช้อาหาร braid parker agar (selective media) ที่มี egg yolk tellurite (5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าสามารถคัดแยกโคโลนีที่คาดว่าจะ เป็น *S. aureus* ได้จากเนื้อหมูจำนวน 2 ตัวอย่าง จาก 2 ร้าน โดยลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารคัดเลือก มีสีน้ำตาลนูน และมีโซนใสล้อมรอบประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ซึ่งเกิดจาก *S. aureus* สามารถรีดิวซ์ tellurite ไปเป็น tellurium ซึ่งเป็นสารกำมะถัน จึงสร้างโคโลนีเป็นสีดำ รวมถึงสามารถผลิตเอนไซม์ lecithinase ซึ่งย่อย lecithin ใน egg yolk จึงเกิดเป็นวงใส (HiMedia, 2018) (รูปที่ 3) สุ่มเก็บโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาทั้งหมด 9 ไอโซเลท และตั้งรหัสสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 4



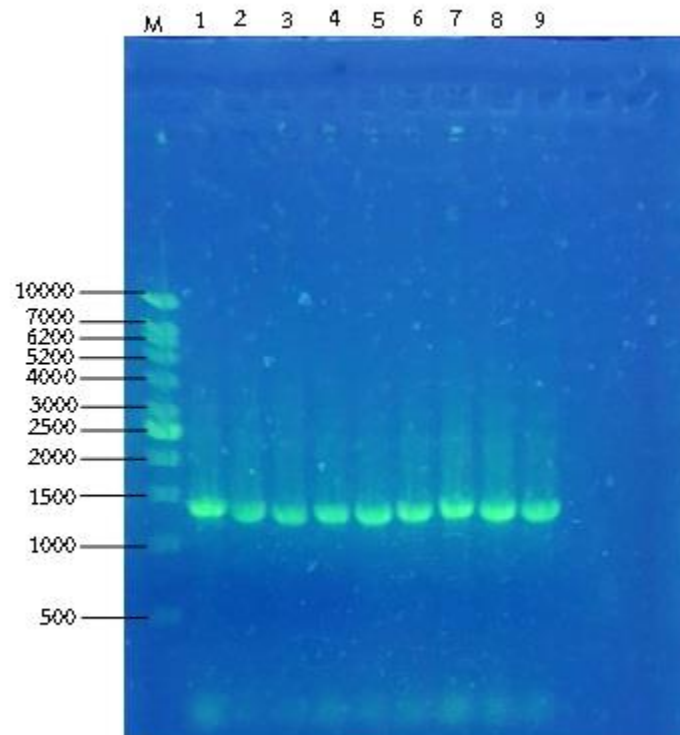
รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* ที่คัดแยกได้บนอาหาร braid parker agar

ตารางที่ 4 สายพันธุ์ของโคโลนีแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท จากตัวอย่างเนื้อหมู

แหล่งตัวอย่างเนื้อหมู	จำนวนไอโซเลท	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย
ร้านที่ 1	-	-
ร้านที่ 2	-	-
ร้านที่ 3	5	BPA1, BPA2, BPA3 BPA4, BPA5
ร้านที่ 4	4	BPA6, BPA7, BPA8, BPA9
ร้านที่ 5	-	-

4.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเนื้อหมูทั้ง 9 ไอโซเลท ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol chloroform extraction และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (รูปที่ 4) เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท มีความเหมือนกับ *S. aureus* ในฐานข้อมูลถึงร้อยละ 100 ดังแสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 6



รูปที่ 4 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโพรเซซิส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R โดยช่อง M คือ VC 1 kb Marker และ ช่อง 1 ถึง 9 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก แบคทีเรีย BPA1, BPA2, BPA3, BPA4, BPA5, BPA6, BPA7, BPA8 และ BPA9 ตามลำดับ



ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 27F ของ
 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วย
 โปรแกรม Blastn

แบคทีเรีย ที่คัดแยกได้	สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด	Accession number	ความเหมือน (%identity)
BPA1	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	601/601 (100.0)
BPA2	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	369/369 (100.0)
BPA3	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	413/413 (100.0)
BPA4	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	406/406 (100.0)
BPA5	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	369/369 (100.0)
BPA6	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	251/251 (100.0)
BPA7	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	434/434 (100.0)
BPA8	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	360/360 (100.0)
BPA9	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	252/252 (100.0)

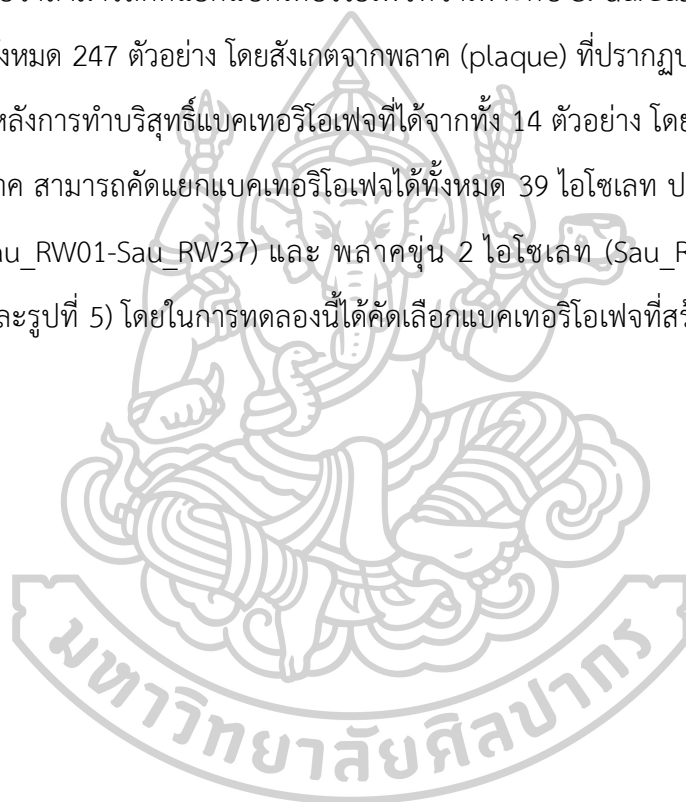
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 1492R ของ
 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วย
 โปรแกรม Blastn

แบคทีเรีย ที่คัดแยกได้	สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด	Accession number	ความเหมือน (%identity)
BPA1	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	582/582 (100.0)
BPA2	<i>Staphylococcus aureus</i> strain F17SA003 chromosome, complete genome	CP031130.1	562/562 (100.0)
BPA3	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	361/361 (100.0)
BPA4	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	516/516 (100.0)
BPA5	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	487/487 (100.0)
BPA6	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	477/477 (100.0)
BPA7	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	475/475 (100.0)
BPA8	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	628/628 (100.0)
BPA9	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ch22 chromosome	CP017807.1	578/578 (100.0)

4.3 การคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* โดยเริ่มจากเตรียมสารละลายแบคทีเรียโอเฟจ (bacteriophage suspension) และตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี agar overlay assay ในช่วงเริ่มต้นใช้ *S. aureus* BPA1 และ BPA3 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ ซึ่งภายหลังสามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจโดยใช้ *S. aureus* BPA3 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงใช้ *S. aureus* BPA3 เป็นเซลล์เจ้าบ้านหลักสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ จากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะกับ *S. aureus* BPA3 ได้ 14 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 247 ตัวอย่าง โดยสังเกตจากพลาคว (plaque) ที่ปรากฏบนจานอาหารแข็ง

ภายหลังการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากทั้ง 14 ตัวอย่าง โดยสังเกตจากลักษณะและขนาดของพลาคว สามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท ประกอบด้วยพลาควใส 37 ไอโซเลท (Sau_RW01-Sau_RW37) และ พลาควขุ่น 2 ไอโซเลท (Sau_RW38 และ Sau_RW39) (ตารางที่ 7 และรูปที่ 5) โดยในการทดลองนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจที่สร้างพลาควใส สำหรับการทดลองต่อไป



ตารางที่ 7 ผลการคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* BPA3 และลักษณะของพลาจิดจากตัวอย่างทั้งหมด 14 ตัวอย่าง

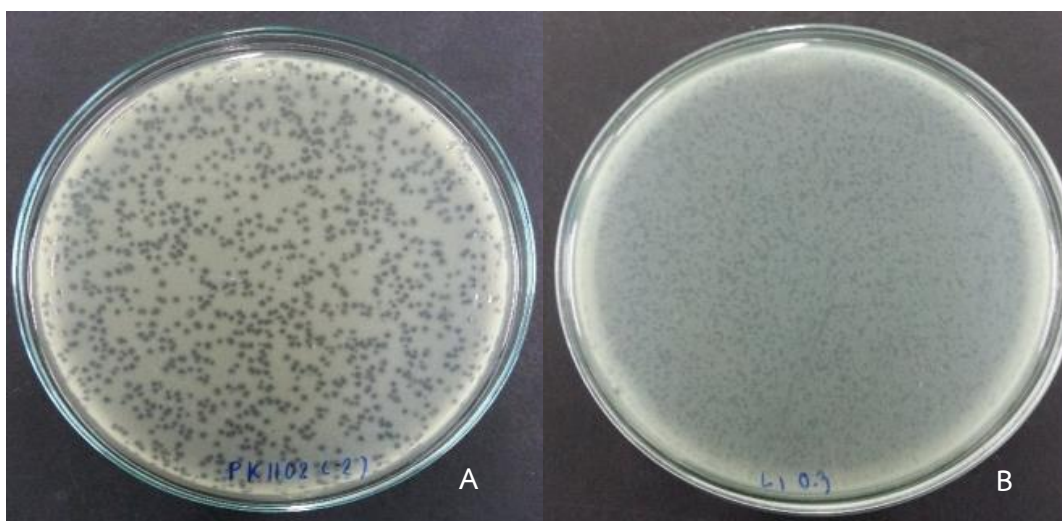
รหัสตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะของพลาจิด	ขนาดของพลาจิด (เซนติเมตร)	แบคทีเรียโอเฟจ
I11	น้ำล้างมือหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาจิดไฮซอบเรียบ	พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW01
			พลาจิดไฮขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW02
K11	นมดิบ (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	พลาจิดไฮซอบเรียบ	พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW08
			พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW09
			พลาจิดไฮขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW10
			พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW06
N2	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาจิดไฮซอบเรียบ	พลาจิดไฮขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW07
			พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW14
			พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW15
			พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW16
O1	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาจิดไฮซอบเรียบ	พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW03
			พลาจิดไฮขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW04
			พลาจิดไฮขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW05

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะของพลาค	ขนาดของพลาค (เซนติเมตร)	แบบเทอร์โมเฟจ
O2	น้ำจากท่อระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาคใสขอบเรียบ	พลาคใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW11
			พลาคใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW12
			พลาคใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW13
O3	น้ำแ่งหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาคใสขอบเรียบ	พลาคใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW17
			พลาคใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW18
			พลาคใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW19
O4	น้ำแ่งหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาคใสขอบเรียบ	พลาคใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW20
			พลาคใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW21
			พลาคใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW22
O5	น้ำแ่งหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาคใสขอบเรียบ	พลาคใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW23
			พลาคใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW24
			พลาคใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW25
O6	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาคใสขอบเรียบ	พลาคใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW26
			พลาคใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW27
			พลาคใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW28

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะของพลาสติก	ขนาดของพลาสติก (เซนติเมตร)	แบบเทอร์โมพลาสติก
O7	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาสติกใสขอบเรียบ	พลาสติกใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW29
			พลาสติกใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW30
			พลาสติกใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW31
O8	เนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาสติกใสขอบเรียบ	พลาสติกใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW32
			พลาสติกใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW33
			พลาสติกใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW34
O9	เนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาสติกใสขอบเรียบ	พลาสติกใสขนาดประมาณ 0.2	Sau_RW35
			พลาสติกใสขนาดประมาณ 0.1	Sau_RW36
			พลาสติกใสขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW37
L1	นมดิบ (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	พลาสติกขุ่น	พลาสติกขุ่นขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW38
M1	เนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	พลาสติกขุ่น	พลาสติกขุ่นขนาดน้อยกว่า 0.1	Sau_RW39



รูปที่ 5 ลักษณะผลึกที่ปรากฏบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย (lawn of bacteria) โดยวิธี agar overlay assay (A) พลาไคใส (B) พลาไคขุ่น

4.4 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 37 ไอโซเลท ด้วยวิธี spot test โดยใช้ *S. aureus* 11 สายพันธุ์, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* เป็นแบคทีเรียทดสอบ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ 8 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW01, Sau_RW02, Sau_RW05, Sau_RW09, Sau_RW20, Sau_RW21, Sau_RW32 และ Sau_RW33 สามารถติดเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 11 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) โดยลักษณะโซนใสที่ปรากฏแสดงในรูปที่ 6 นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟจ 2 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW11 และ Sau_RW12 สามารถติดเชื้อข้ามสกุล (cross genus) กับ *S. Enteritidis* โดยสังเกตจากผลึกที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 7

ทั้งนี้แบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ได้ถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากสามารถติดเชื้อกับ *S. aureus* ได้ทั้ง 11 สายพันธุ์ และให้ระดับโซนใสสูงสุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียโอเฟจไอโซเลทอื่น

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น
(host range test)

แบคทีเรียโอเฟจ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	<i>S. aureus</i> BPA1	<i>S. aureus</i> BPA2	<i>S. aureus</i> BPA3	<i>S. aureus</i> BPA4	<i>S. aureus</i> BPA5	<i>S. aureus</i> BPA6	<i>S. aureus</i> BPA7	<i>S. aureus</i> BPA8	<i>S. aureus</i> BPA9	<i>S. aureus</i> 01	<i>S. aureus</i> DN22	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Sau_R W01		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W02		+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W03		-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W04		-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-
Sau_R W05		++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W06		-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W07		+	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W08		+	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W09		+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W10		-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W11		-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+

ตารางที่ 8 (ต่อ)

แบคทีเรีย ชื่อ สายพันธุ์แยกที่เรีย	<i>S. aureus</i> BPA1	<i>S. aureus</i> BPA2	<i>S. aureus</i> BPA3	<i>S. aureus</i> BPA4	<i>S. aureus</i> BPA5	<i>S. aureus</i> BPA6	<i>S. aureus</i> BPA7	<i>S. aureus</i> BPA8	<i>S. aureus</i> BPA9	<i>S. aureus</i> 01	<i>S. aureus</i> DN22	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Sau_R W12	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+
Sau_R W13	+	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W14	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W15	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W16	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-
Sau_R W17	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W18	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W19	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W20	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W21	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W22	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

แบค เทอ รีโอเฟจ	สายพันธุ์แบคทีเรีย													
	<i>S. aureus</i> BPA1	<i>S. aureus</i> BPA2	<i>S. aureus</i> BPA3	<i>S. aureus</i> BPA4	<i>S. aureus</i> BPA5	<i>S. aureus</i> BPA6	<i>S. aureus</i> BPA7	<i>S. aureus</i> BPA8	<i>S. aureus</i> BPA9	<i>S. aureus</i> 01	<i>S. aureus</i> DN22	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Sau_R W23	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W24	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W25	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W26	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W27	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W28	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W29	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W30	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W31	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W32	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-

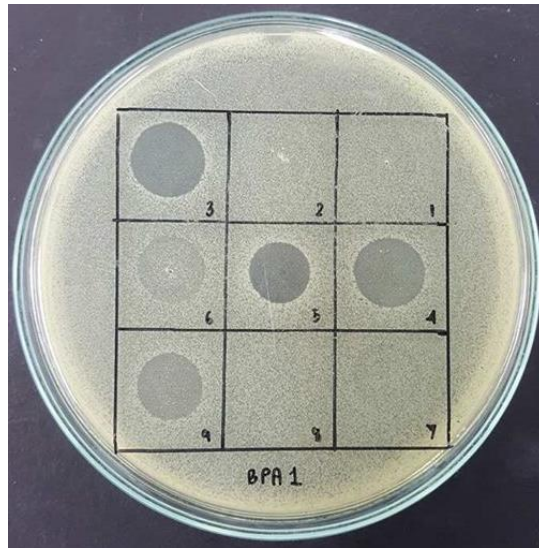
ตารางที่ 8 (ต่อ)

แบค เทอ รีโอเฟจ	สายพันธุ์แบคทีเรีย													
	<i>S. aureus</i> BPA1	<i>S. aureus</i> BPA2	<i>S. aureus</i> BPA3	<i>S. aureus</i> BPA4	<i>S. aureus</i> BPA5	<i>S. aureus</i> BPA6	<i>S. aureus</i> BPA7	<i>S. aureus</i> BPA8	<i>S. aureus</i> BPA9	<i>S. aureus</i> 01	<i>S. aureus</i> DN22	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Sau_R W33	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W34	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-
Sau_R W35	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Sau_R W36	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-
Sau_R W37	-	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-

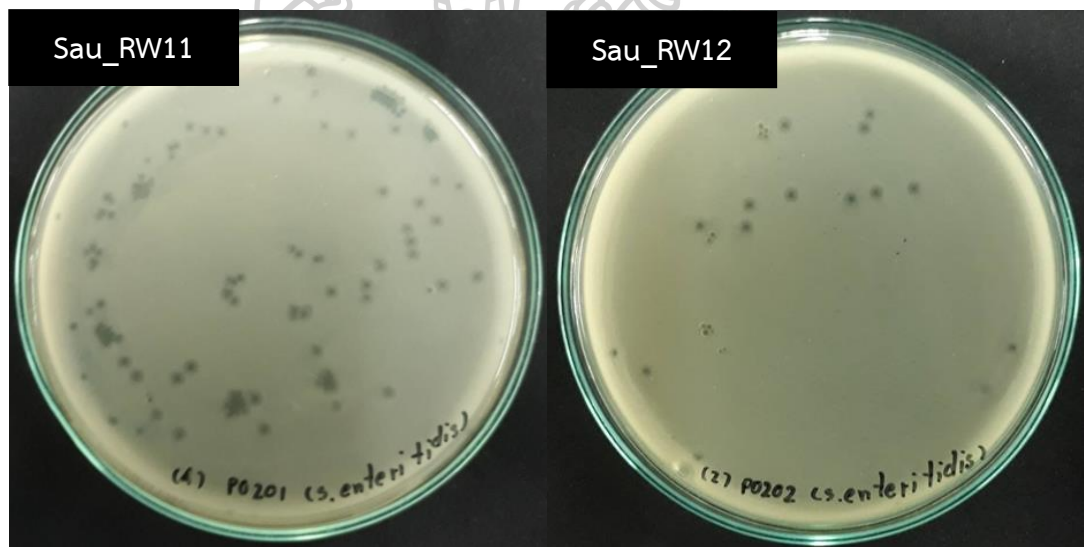
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดโซนใส

+ หมายถึง เกิดโซนใสสังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน

++ หมายถึง เกิดโซนใสสังเกตเห็นได้ชัดเจน



รูปที่ 6 ลักษณะโซนใสที่ปรากฏบนสนามของ *S. aureus* BPA1 โดยวิธี spot test
ระดับการเกิดโซนใส ++ (3, 4, 5), + (6, 9) และ - (1, 2, 7, 8)



รูปที่ 7 ลักษณะพลาคของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW11 และ Sau_RW12 ที่ปรากฏบนสนามของ
S. Enteritidis (lawn of bacteria) โดยวิธี agar overlay assay

จากผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นพบว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW11 และ Sau_RW12 สามารถติดเชื้อข้ามสกุลกับ *S. Enteritidis* ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจสำหรับทำลาย *S. Enteritidis* ด้วยวิธี Efficiency of plating (EOP) ซึ่งกำหนดค่า EOP ตาม Mirzaei และ Nilsson (2015) ดังนี้

- ค่า EOP สูงกว่า 0.5 หมายถึง เฟจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบสูง
- ค่า EOP อยู่ในช่วง 0.5-0.1 หมายถึง เฟจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบปานกลาง
- ค่า EOP อยู่ในช่วง 0.1-0.001 หมายถึง เฟจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ
- ค่า EOP ต่ำกว่า 0.001 หมายถึง เฟจไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ

โดยแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW11 มีค่า EOP เท่ากับ 0.00381 อยู่ในช่วงค่า EOP 0.1-0.001 หมายถึง เฟจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ และแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW12 มีค่า EOP เท่ากับ 0.00057 อยู่ในช่วงค่า EOP ต่ำกว่า 0.001 หมายถึง เฟจไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาจีโนมรวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW11 และ Sau_RW12 ต่อไป

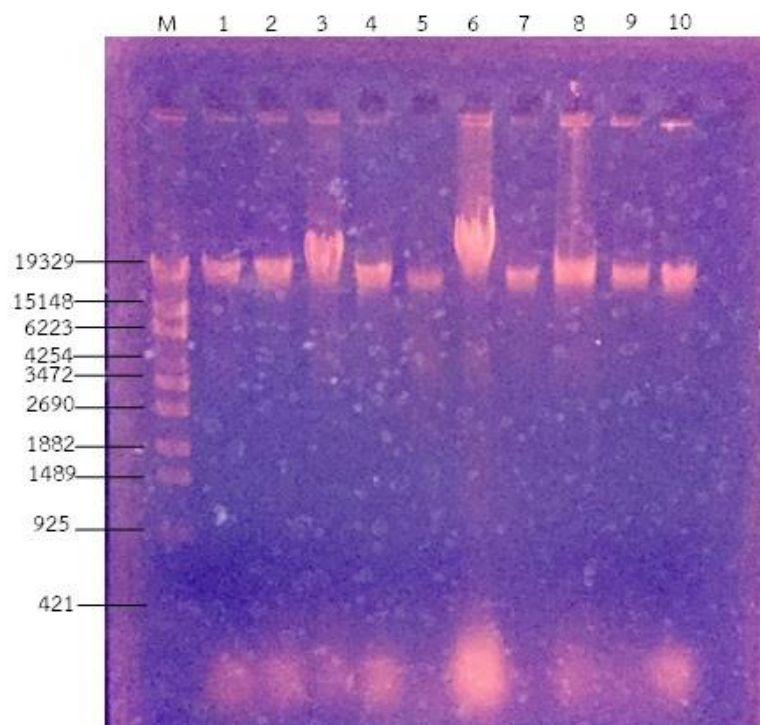
4.5 การศึกษาจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น แบคทีเรียโอเฟจ 8 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW01, Sau_RW02, Sau_RW09, Sau_RW05, Sau_RW20, Sau_RW21, Sau_RW32 และ Sau_RW33 สามารถติดเชื้อมี *S. aureus* ได้ทั้ง 11 สายพันธุ์ นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟจ 2 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW11 และ Sau_RW12 สามารถติดเชื้อข้ามสกุลกับ *S. Enreitidis* ดังนั้นแบคทีเรียโอเฟจเหล่านี้จึงถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาจีโนม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียโอเฟจจากรูปแบบของขนาดดีเอ็นเอที่ตัดได้

จากผลการทดลองพบว่าจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 10 ไอโซเลท มีขนาดดีเอ็นเอใกล้เคียงกันมาก โดยมีขนาดมากกว่า 19 kbp ดังแสดงในรูปที่ 8 และผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *EcoRI* (รูปที่ 9), *Hinfi* (รูปที่ 10) และ *StyI* (รูปที่ 11) พบว่าการตัดจีโนมด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับการตัดด้วยเอนไซม์ *Hinfi* และ *StyI* ดังนั้นจึงใช้เพียงรูปแบบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* มาพิจารณาจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอเฟจโดยสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งสิ้น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 9

แม้ว่าผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียโอเฟจออกเป็น 6 กลุ่ม อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่ากลุ่มที่ 1 Sau_RW05, Sau_RW21 และ Sau_RW33 แสดงระดับการเกิดโชนในเสเหมือนกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ Sau_RW01 ซึ่งแสดงระดับการเกิดโชนในเสแตกต่างกันจึงจัดอยู่คนละกลุ่ม และกลุ่มที่ 2 Sau_RW12 และ Sau_RW20 แสดงระดับการเกิดโชน

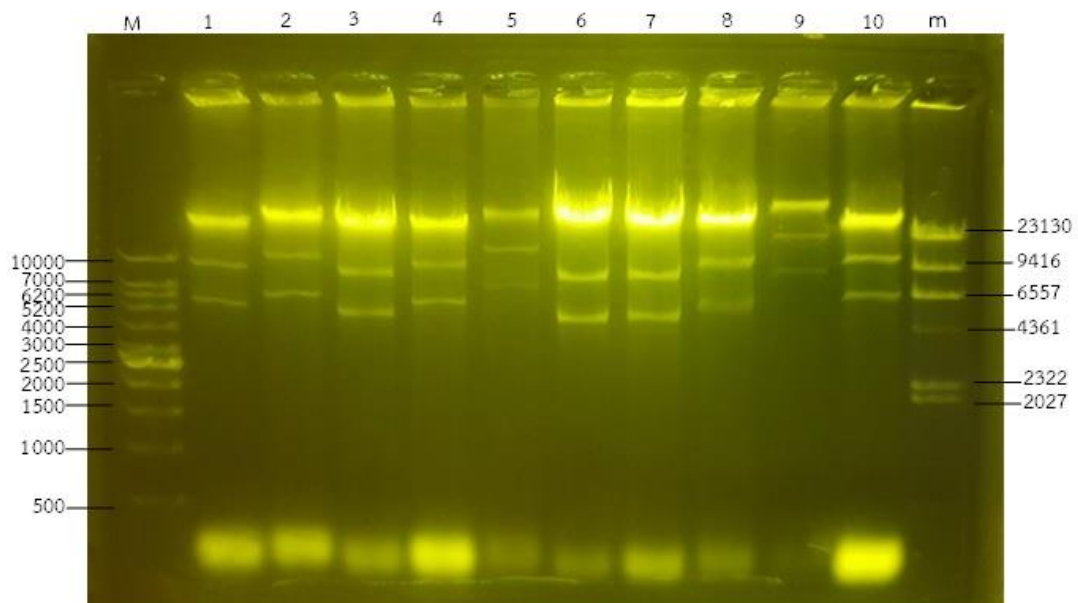
ใส่แตกต่างกันจึงจัดอยู่คนละกลุ่ม ดังนั้นจากการวิเคราะห์ผลข้างต้นสามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอเฟจได้ทั้งสิ้น 8 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 9



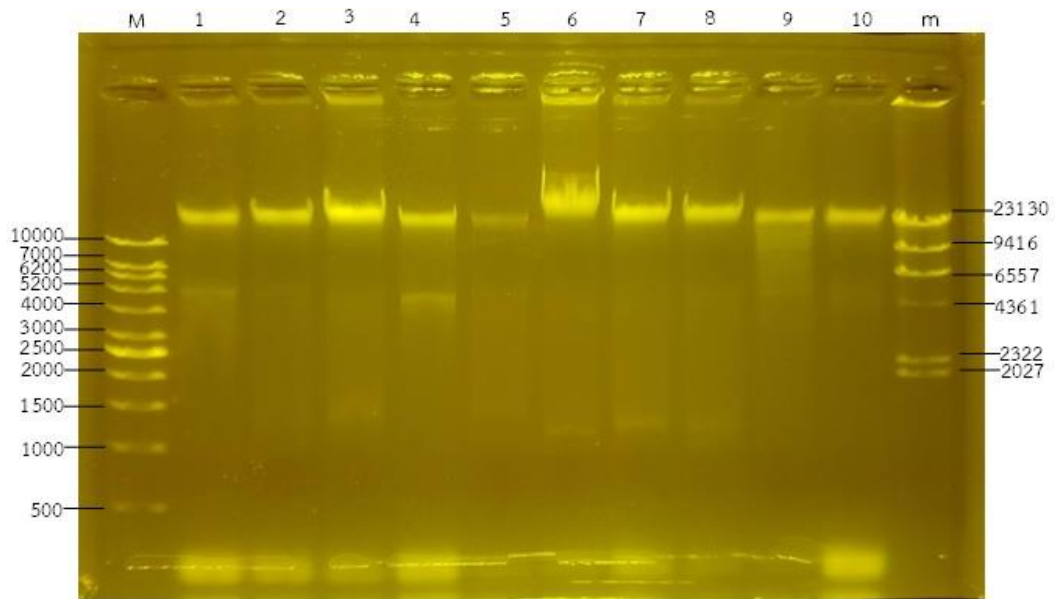
รูปที่ 8 ผลการตรวจสอบจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 10 ไอโซเลท ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยช่อง M คือ λ -Styl Marker, Lane 1 = Sau_RW01, Lane 2 = Sau_RW02, Lane 3 = Sau_RW09, Lane 4 = Sau_RW05, Lane 5 = Sau_RW11, Lane 6 = Sau_RW12, Lane 7 = Sau_RW20, Lane 8 = Sau_RW21, Lane 9 = Sau_RW32 และ Lane 10 = Sau_RW33

ตารางที่ 9 ผลการจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

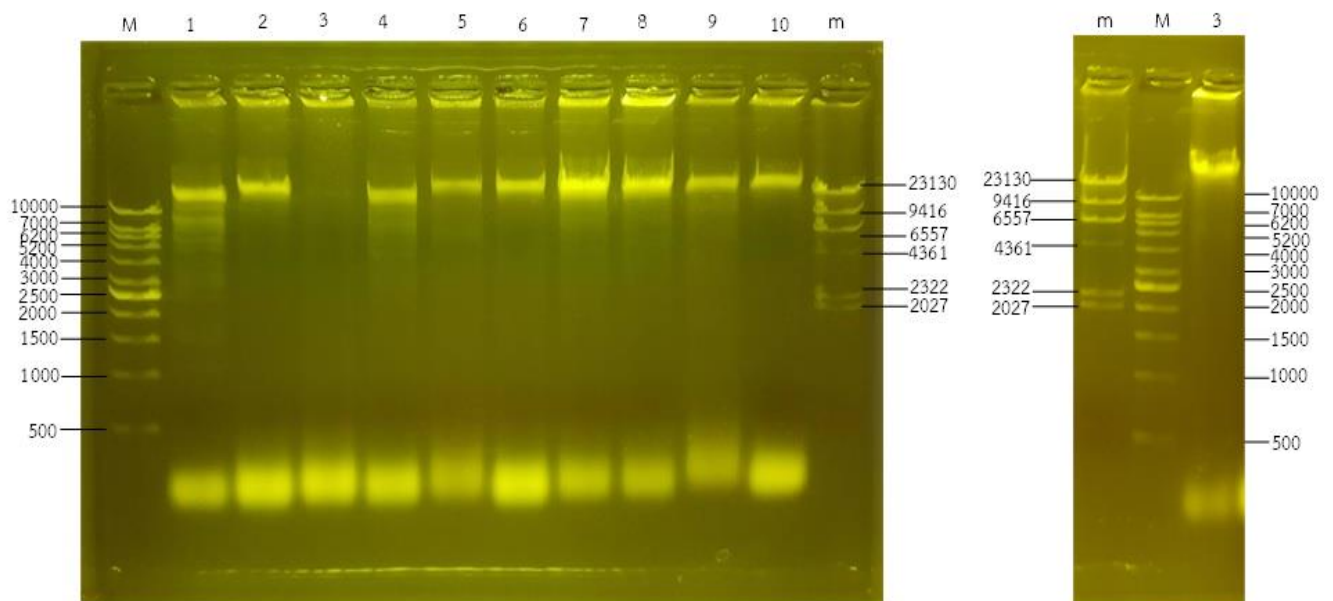
กลุ่ม	แบคทีเรียโอเฟจ	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (คู่เบส)	พิจารณาควบคู่กับความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	
1	Sau_RW01, Sau_RW05, Sau_RW21, Sau_RW33	> 23130, 10000-9416, 6557	Sau_RW01	Sau_RW05, Sau_RW21, Sau_RW33
2	Sau_RW12, Sau_RW20	> 23130, 10000, 7000-6200	Sau_RW12	Sau_RW20
3	Sau_RW02	> 23130, 10000, 7000-6200	-	-
4	Sau_RW09	> 23130, 9416, 6557-4000	-	-
5	Sau_RW11	> 23130, 23130-10000, 7000	-	-
6	Sau_RW32	> 23130, 23130, 6557	-	-



รูปที่ 9 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ 10 ไอโซเลท ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยช่อง M คือ VC 1kb Marker, Lane 1 = Sau_RW01, Lane 2 = Sau_RW02, Lane 3 = Sau_RW09, Lane 4 = Sau_RW05, Lane 5 = Sau_RW11, Lane 6 = Sau_RW12, Lane 7 = Sau_RW20, Lane 8 = Sau_RW21, Lane 9 = Sau_RW32, Lane 10 = Sau_RW33 และ m คือ λ -HindIII Marker



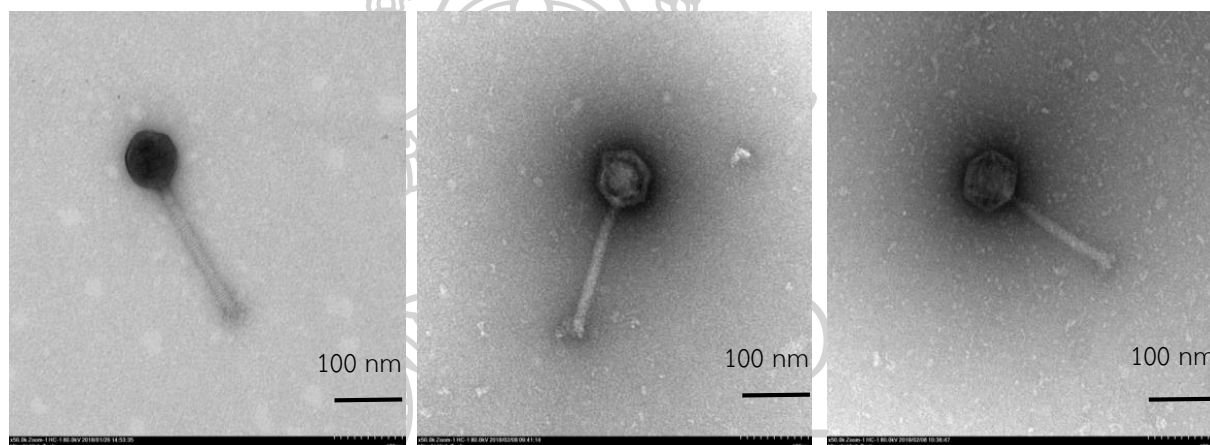
รูปที่ 10 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอเฟล 10 ไอโซเลท ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยช่อง M คือ VC 1kb Marker, Lane 1 = Sau_RW01, Lane 2 = Sau_RW02, Lane 3 = Sau_RW09, Lane 4 = Sau_RW05, Lane 5 = Sau_RW11, Lane 6 = Sau_RW12, Lane 7 = Sau_RW20, Lane 8 = Sau_RW21, Lane 9 = Sau_RW32, Lane 10 = Sau_RW33 และ m คือ λ -*HindIII* Marker



รูปที่ 11 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจ 10 ไอโซเลท ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *StyI* ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยช่อง M คือ VC 1kb Marker, Lane 1 = Sau_RW01, Lane 2 = Sau_RW02, Lane 3 = Sau_RW09, Lane 4 = Sau_RW05, Lane 5 = Sau_RW11, Lane 6 = Sau_RW12, Lane 7 = Sau_RW20, Lane 8 = Sau_RW21, Lane 9 = Sau_RW32, Lane 10 = Sau_RW33 และ m คือ λ -*HindIII* Marker

4.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ 3 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy) พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณะหัวเป็นแบบรูปร่างเหลี่ยมซึ่งจัดเรียงตัวแบบสมมาตรมี 12 มุม (icosahedral symmetry) หางยาว (tailed phage) แคบและไม่ยืดหยุ่น (non-contractile flexible) เนื่องจากไม่มีส่วนของปลอกคอ (collar) ที่เชื่อมต่อกับแคปซิด โดยค่าเฉลี่ยขนาดของหัวและหางแบคทีเรียโอเฟจแสดงในตารางที่ 10 จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12 จัดอยู่ในอันดับ *Caudovirales* วงศ์ *Siphoviridae* (รูปที่ 12) ตามเกณฑ์การจัดจำแนกของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV)



(a) Sau_RW01

(b) Sau_RW11

(c) Sau_RW12

รูปที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ (a) Sau_RW01, (b) Sau_RW11 และ (c) Sau_RW12 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า ภายใต้กล้อง TEM (Bar = 100 nm)

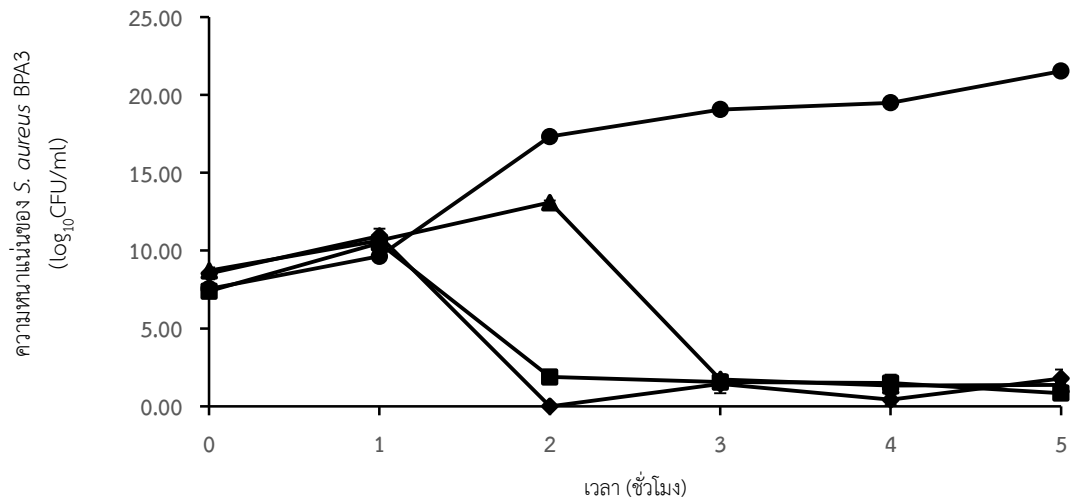
ตารางที่ 10 ขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12

แบคทีเรียโอเฟจ	หัว (นาโนเมตร)		หาง (นาโนเมตร)
	ยาว	กว้าง	ยาว
Sau_RW01	74.4 ± 2.8	75.2 ± 3.5	187.8 ± 12.1
Sau_RW11	63.9 ± 4.1	65.6 ± 3.6	155.5 ± 14.4
Sau_RW12	78.1 ± 4.7	81.4 ± 3.2	177.9 ± 9.2

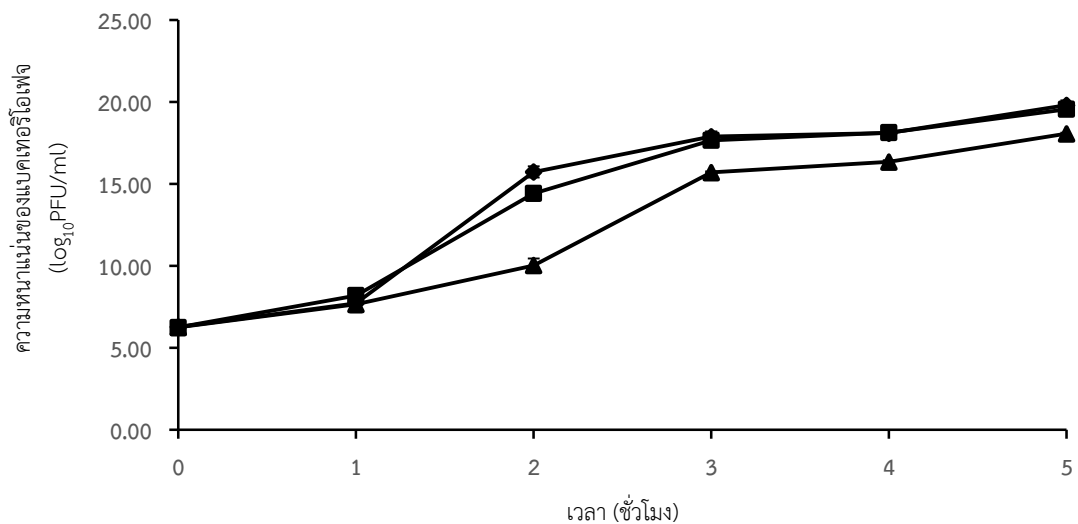
หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวัดผลซ้ำ 10 อนุภาค

4.7 อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ

จากผลการทดสอบอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ พบว่าในช่วงโม่งที่ 1 ความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ที่ MOI 10, 1, 0.1 และการทดลองควบคุม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยมีความหนาแน่นโดยประมาณ 10 log CFU/มิลลิลิตร และช่วงโม่งที่ 2 พบว่าที่ MOI 10 และ 1 ความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ต่ำกว่าการทดลองควบคุม 15.52 และ 17.32 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ MOI 0.1 ความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ต่ำกว่าการทดลองควบคุมเพียง 4.23 log CFU/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามในช่วงโม่งที่ 3 ถึง 5 พบว่าที่ MOI 10, 1 และ 0.1 ความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ที่เหลืออยู่ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยสามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ได้ 20.67, 19.73 และ 20.14 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม ในช่วงโม่งที่ 5 ดังแสดงในรูปที่ 13 นอกจากนี้ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าที่ MOI 10 และ 1 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยมีความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 13.31, 13.52 log PFU/มิลลิลิตร จากความหนาแน่นเริ่มต้นตามลำดับ ในขณะที่ MOI 0.1 ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 11.82 log PFU/มิลลิลิตร จากความหนาแน่นเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 14 จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อเท่ากับ MOI 0.1 เนื่องจากใช้สารละลายแบคทีเรียโอเฟจน้อยกว่า และสามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ได้ไม่แตกต่างกับ MOI 10 และ 1 ซึ่งใช้สารละลายแบคทีเรียโอเฟจมากกว่า



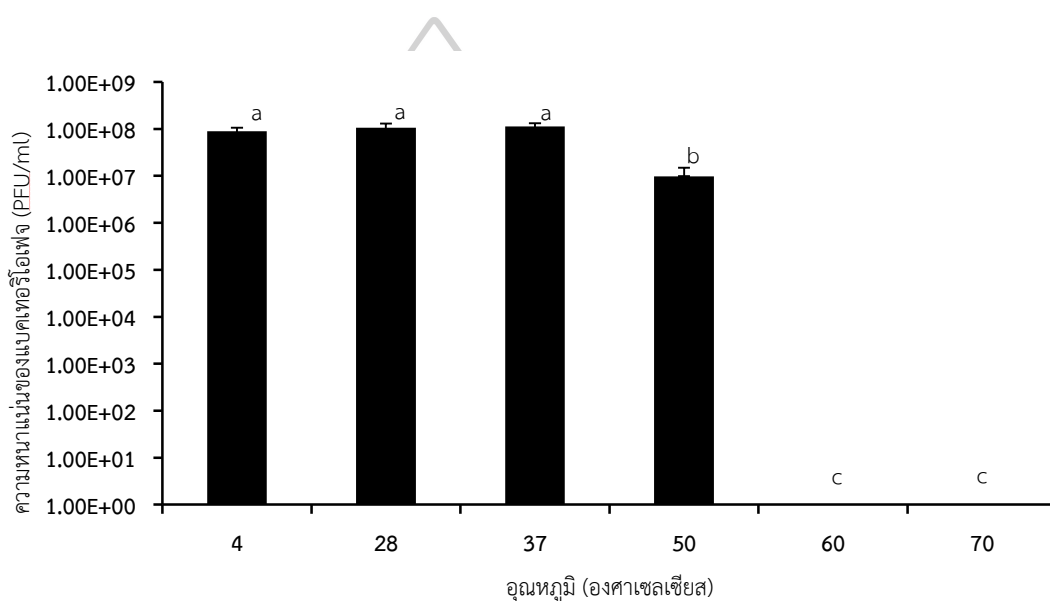
รูปที่ 13 ความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียต่อเซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (Multiplicity of infection) ใน การทดลองควบคุม (●), MOI 10 (■), MOI 1 (◆) และ MOI 0.1 (▲) (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)



รูปที่ 14 ความหนาแน่นของแบคทีเรียของ Sau_RW01 ที่อัตราส่วนของแบคทีเรียต่อเซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (Multiplicity of infection) ที่ MOI 10 (■), MOI 1 (◆) และ MOI 0.1 (▲) (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)

4.8 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ

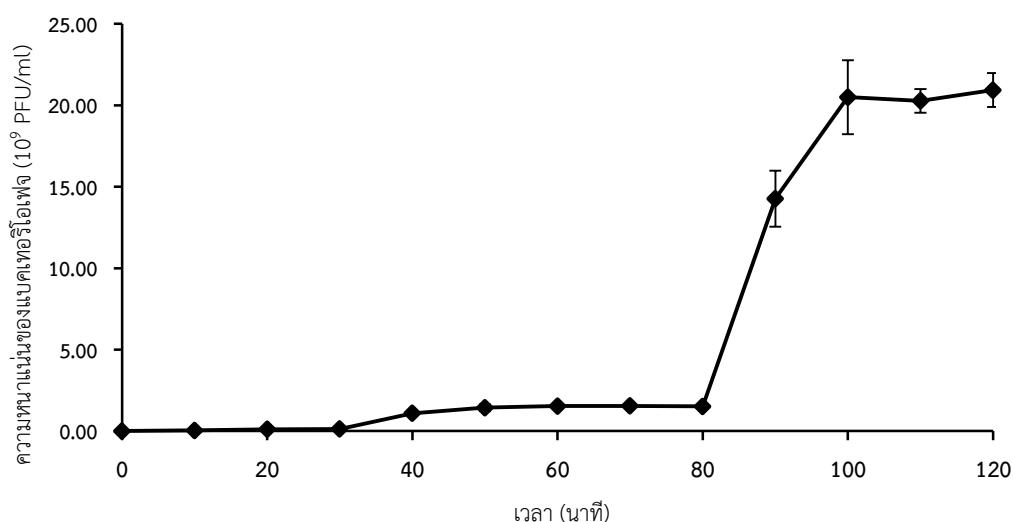
พบว่าแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RW01 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส โดยความหนาแน่นของแบคทีเรียโอฟาจไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นเริ่มต้น ($P>0.05$) ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นแบคทีเรียโอฟาจลดลงไป $1.27 \log$ PFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นเริ่มต้น และไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียโอฟาจที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ Sau_RW01 (ความหนาแน่นเริ่มต้น 10^8 PFU/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4, 28, 37, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง) a, b, c แทนกลุ่มของตัวอย่าง (Homogeneous Subsets) ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's multiple range tests (โดยกำหนดนัยสำคัญที่ $P<0.05$)

4.9 กราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ

จากกราฟการเจริญพบว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 มี latent period ที่เวลา 30 นาที เป็นช่วงเวลาที่แบคทีเรียโอเฟจใช้เพิ่มจำนวนภายในเซลล์เจ้าบ้าน จนกระทั่งเริ่มปลดปล่อยแบคทีเรียโอเฟจรุ่นลูก (progeny phage) ออกมา และเข้าสู่ช่วง burst period ที่เวลา 100 นาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์เจ้าบ้านเกิดการแตกและปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกมาในหนึ่งรอบ โดยสามารถคำนวณ burst size จากอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรกในช่วง burst period ที่ 100 นาที ต่อแบคทีเรียโอเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของ latent period ที่ 30 นาที มีค่าประมาณ 151 PFU/infected cell (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 กราฟการเจริญ (One step growth) ของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 (ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

S. aureus สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ อีกทั้งยังเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โดยทั่วไปการรักษาโรคที่ติดเชื้อ *S. aureus* มักใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเป็นหลัก อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องและเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลให้เกิดแบคทีเรียที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2012) จากงานวิจัยของ Bhumibhamon และ Bilhmad (2011) ได้ศึกษาการดื้อยาของ *S. aureus* ที่คัดแยกได้จากเนื้อหมูจากโรงฆ่าสัตว์ในภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2549-2551 พบว่า *S. aureus* จำนวน 375 ไอโซเลท มีร้อยละการดื้อยา penicillin, amoxicillin, tetracycline และ streptomycin เท่ากับ 82.67, 76.53, 73.60 และ 58.40 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากยาดังกล่าวนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในมนุษย์และสัตว์มาเป็นระยะเวลานาน หากใช้ผิดวิธีหรือใช้เกินปริมาณ ส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ จากปัญหาที่กล่าวไปข้างต้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งหนึ่งในวิธีทางเลือกที่น่าสนใจนั้นคือการใช้แบคเทอริโอเฟจบำบัด (phage therapy) เนื่องจากมีศักยภาพเป็นสารฆ่าแบคทีเรียที่จำเพาะเจาะจง (Basdew and Laing, 2015) โดยแบคเทอริโอเฟจมีคุณสมบัติที่สามารถทำลายแบคทีเรียเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง จึงไม่ทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น ส่งผลให้ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Nukdee, 2007) และสามารถสร้างเอนโดไซม์เอนโดไลซิน (endolysin) ซึ่งมีคุณสมบัติทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียให้แตกออก จึงสามารถฆ่าแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ (Fan et al., 2016) อีกทั้งแบคเทอริโอเฟจนั้นมีอยู่มากมายในสิ่งแวดล้อม การค้นหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะกับแบคทีเรียเป้าหมาย จึงง่ายกว่าการผลิตยาปฏิชีวนะหรือวัคซีนชนิดใหม่ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่สูง (Basdew and Laing, 2015)

เนื้อหมูเป็นอาหารประเภทโปรตีนที่นิยมบริโภคโดยทั่วไป ซึ่งหากโรงฆ่าสัตว์หรือผู้ค้าปลีกไม่มีการควบคุมความสะอาดของสุขอนามัยส่วนบุคคล หรือแม้กระทั่งเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ อย่างถูกสุขลักษณะ จึงมีโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถปนเปื้อนลงสู่เนื้อหมูได้ (Angkititrakul et al., 2014) ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้คัดแยก *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษจากตัวอย่างเนื้อหมูจำนวน 5 ร้าน จากตลาดสดในจังหวัดนครปฐม ซึ่งสามารถคัดแยก *S. aureus* ได้จากตัวอย่างเนื้อหมู

จำนวน 2 ร้าน เช่นเดียวกับ Jaisue และ Angkittrakul (2011) สามารถคัดแยก *S. aureus* จากตัวอย่างเนื้อหมูที่เก็บมาทั้งหมด 165 แผง จากตลาดสด 5 แห่ง ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น โดยพบ *S. aureus* ในเนื้อหมูทั้งหมด 43 แผง คิดเป็นร้อยละ 26.06

แบคทีเรียโอเฟจสามารถคัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น น้ำทะเล น้ำเสีย ขยะ เป็นต้น การคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจอย่างมีประสิทธิภาพควรเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่คาดว่าจะมีเซลล์เจ้าบ้านที่สนใจอาศัยอยู่ เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟจจำเป็นต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มจำนวนเพื่อความอยู่รอด (Li and Zhang, 2013) ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยก แบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* BPA3 จากแหล่งที่คาดว่าจะมีเซลล์เจ้าบ้านอาศัยอยู่ จากตัวอย่าง นมดิบ น้ำเสียจากท่อระบายน้ำ รวมถึงน้ำล้างเนื้อหมูจากร้านค้าในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ซึ่งภายหลังจากการทำบริสุทธิ์สามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจได้ 39 ไอโซเลท

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 37 ไอโซเลท ที่สร้างพลาคลाइในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอเฟจ 8 ไอโซเลท สามารถติดเชื้อมี *S. aureus* ได้ทุกสายพันธุ์ และแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 แสดงระดับพิษในสูงที่สุด นอกจากนี้ไม่พบแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถติดเชื้อมี *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* เนื่องจากการติดเชื้อของแบคทีเรียโอเฟจจำเป็นต้องอาศัยความจำเพาะของตัวรับ (receptor) บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น กรดไทโคอิกหรือลิโปโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น หากแบคทีเรียไม่มีตัวรับที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียโอเฟจ ส่งผลทำให้แบคทีเรียโอเฟจนั้นไม่สามารถการเกิดติดเชื้อมีแบคทีเรียได้ (Elbreki et al., 2013; Jensen et al., 2015) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอเฟจ 2 ไอโซเลท สามารถติดเชื้อข้ามสกุลกับ *S. Enteritidis* อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 2 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อข้ามสกุลต่ำ โดยทั่วไปการติดเชื้อข้ามสกุลเป็นไปได้ยากมากโดยเฉพาะระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเนื่องจากมีผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้ตัวรับบนผนังเซลล์จึงแตกต่างกัน แบคทีเรียโอเฟจจึงไม่สามารถเกิดการติดเชื้อข้ามได้ ซึ่งงานวิจัยอื่น ๆ ส่วนใหญ่มักพบเพียงการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ (cross strain) เช่น งานวิจัยของ Lee และคณะ (2011) ได้คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจ FWLBc1 และ FWLBc2 ที่มีความจำเพาะต่อ *Bacillus cereus* และนำมาทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลาย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ *B. cereus* A2, *B. cereus* D2, *B. cereus* NCTC 11143, *B. cereus* NCTC 11145, *B. thuringiensis* NZRM 2981, *B. thuringiensis* DSM 2046, *B. licheniformis* DSM 603,

B. subtilis NTCT 3610, *B. mycoides* ATCC 6462 และ *B. megaterium* NCTC10343 พบว่า FWLbc1 และ FWLbc2 สามารถเกิดการติดเชื้อกับ *Bacillus* spp. ได้ 5 และ 9 สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์นี้เกิดจากความจำเพาะของตัวรับบนผนังเซลล์แบคทีเรียที่เรียกกันคล้ายคลึงกัน จึงส่งผลให้แบคทีเรียโอเฟจสามารถเกิดการติดเชื้อได้ อีกทั้งงานวิจัยของ Rakhuba และคณะ (2010) ได้อธิบายการเข้าจับของแบคทีเรียโอเฟจ T4 กับตัวรับบนผนังเซลล์ *E. coli* ซึ่งประกอบด้วยการทำงานร่วมกันของตัวรับ OmpC และ Lipopolysaccharide ที่ผนังเซลล์ จากการทดลองพบว่าหากไม่มีตัวรับเหล่านี้ตัวใดตัวหนึ่ง ส่งผลให้แบคทีเรียโอเฟจมีประสิทธิภาพการติดเชื้อ *E. coli* ลดลง และหากสูญเสียตัวรับทั้ง OmpC และ Lipopolysaccharide ส่งผลให้แบคทีเรียโอเฟจไม่สามารถเกิดการติดเชื้อกับ *E. coli*

จากผลการศึกษาจีโนมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียโอเฟจได้ทั้งสิ้น 8 กลุ่ม นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟจทั้ง 10 ไอโซเลทเหล่านี้จัดเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอเนื่องจากสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และจากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ 3 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12 จึงจัดแบคทีเรียโอเฟจเหล่านี้อยู่ในอันดับ *Caudovirales* วงศ์ *Siphovirida* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ García และคณะ (2007) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ Φ H5 และ Φ A72 ที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* จัดอยู่ในวงศ์ *Siphoviridae* และงานวิจัยของ Mohammed-Ali และ Jamalludeen (2015) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ Φ SA1, Φ SA2 และ Φ SA3 ที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* จัดอยู่ในวงศ์ *Siphoviridae* เช่นกัน

ในงานวิจัยนี้อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (multiplicity of infection, MOI) เท่ากับ MOI 0.1 เนื่องจากใช้สารละลายแบคทีเรียโอเฟจน้อยกว่า และสามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ได้ไม่แตกต่างกับ MOI 10 และ 1 ซึ่งจากการทดลองพบว่าในชั่วโมงที่ 5 MOI 10, 1 และ 0.1 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ได้ไม่แตกต่างกัน โดยต่ำกว่าการทดลองควบคุม 20.67, 19.73 และ 20.14 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจทุก ๆ MOI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง จากงานวิจัยของ Takemura-Uchiyama และคณะ 2013 ได้ศึกษาอัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจ S25-3 และ S13' ต่อ *S. aureus* SA27 โดยการติดเชื้อที่ MOI 0.1, 0.01 และ

0.001 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งติดตามการเจริญของ *S. aureus* SA27 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าที่ MOI 0.1 และ 0.01 แบคทีเรียโอเฟจ S25-3 และ S13' สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* SA27 ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ในขณะที่ MOI 0.001 แบคทีเรียโอเฟจ S25-3 และ S13' สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* SA27 ภายในระยะเวลา 2.5 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียโอเฟจ S25-3 และ S13' สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* SA27 จนไม่สามารถตรวจวัดได้เมื่อสิ้นสุดการทดลองในทุก ๆ MOI โดยทั่วไป MOI ที่ต่ำส่งผลต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมและการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอเฟจ อย่างไรก็ตามการใช้ MOI ที่สูง ใช้สารละลายแบคทีเรียโอเฟจมากกว่าและอาจส่งผลให้เกิดการแตกของเซลล์เจ้าบ้านโดยไม่เพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจ หรือเรียกว่าปรากฏการณ์ lysis from without (Wong et al., 2014) แต่ถึงกระนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจในผลิตภัณฑ์อาหารจำเป็นต้องใช้ MOI ที่สูงเพื่อให้สามารถลดความหนาแน่นของเซลล์เจ้าบ้านลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากในอาหารแต่ละชนิดมีโครงสร้างและองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้อาจส่งผลให้แบคทีเรียโอเฟจเกิดการยึดเกาะแบบผันกลับไม่ได้ในอาหาร (irreversible adsorption) ดังนั้นการใช้ MOI ที่สูงจึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะระหว่างแบคทีเรียโอเฟจและเซลล์เจ้าบ้าน (bigot et al., 2014)

จากผลการศึกษาอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจมีแนวโน้มลดลง และไม่สามารถตรวจพบความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2016) ซึ่งได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ SLPW ที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ SLPW มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิ 65 และ 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Li และ Zhang (2013) ซึ่งได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ SPW ที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* พร้อมทั้งเก็บ

ตัวอย่างทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ SPW มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยที่กล่าวไปข้างต้นชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจแต่ละชนิดมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกแบคทีเรียโอเฟจสำหรับประยุกต์ใช้ในสภาวะต่าง ๆ จึงต้องคำนึงถึงความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้แบคทีเรียโอเฟจถูกทำลายในสภาวะนั้น ๆ (Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon, 2010)

ผลการศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 มี latent period และ burst period ที่เวลา 30 และ 100 นาที ตามลำดับ โดย burst size มีค่าเท่ากับ 151 PFU/infected cell ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Han และคณะ (2013) ได้ศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ SAH-1 ที่จำเพาะต่อ *S. aureus* พบว่ามี latent period และ burst period ที่เวลา 20 และ 40 นาที ตามลำดับ โดย burst size มีค่าเท่ากับ 100 PFU/infected cell และงานวิจัยของ Hsieh และคณะ (2014) ได้ศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ Stau2 พบว่ามี latent period และ burst period ที่เวลา 25 และ 40 นาที ตามลำดับ โดย burst size มีค่าเท่ากับ 100 PFU/infected cell อย่างไรก็ตาม burst size ของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 มีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Chang และคณะ (2015) ซึ่งได้ศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ SA97 พบว่ามี latent period และ burst period ที่เวลา 20 และ 40 นาที ตามลำดับ โดย burst size มีค่าเท่ากับ 32 PFU/infected cell และงานวิจัยของ Li และ Zhang (2013) ได้ศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ SPW พบว่ามี latent period และ burst period ที่เวลา 20 และ 60 นาที ตามลำดับ โดย burst size มีค่าเท่ากับ 44 PFU/infected cell ซึ่งความแปรผันของช่วง latent period และ burst size อาจเป็นผลมาจากเซลล์เจ้าบ้านหรือสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน (Wong et al., 2014) จากงานวิจัยของ Hadas และคณะ 1997 ได้ศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ T4 ที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* B/r H266 โดยในงานวิจัยนี้เพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้านในอาหารที่มีการดัดแปลงสารอาหารแตกต่างกัน จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยง *E. coli* B/r H266 ในอาหารเหลว Luria-Bertani ที่เติม glucose (LBG) อาหารเหลว M9 minimal ที่เติม glucose (GC) และอาหารเหลว M9 minimal ที่เติม succinate (Suc) พบว่า *E. coli* B/r H266 มีอัตราการเจริญ (growth rate) เท่ากับ 2.60, 1.20 และ 0.62 h⁻¹ ตามลำดับ ทั้งนี้จากการติดตามการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ T4 ที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* B/r H266 ที่เลี้ยง

ในอาหารเหลว LBG, GC และ Suc พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ T4 มี latent period ที่เวลา 18, 36 และ 37 นาที ตามลำดับ และ burst size มีค่าเท่ากับ 110, 60 และ 14 PFU/infected cell ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญของ *E. coli* B/r H266 แปรผกผันกับ latent period และแปรผันตรงกับ burst size เช่นเดียวกับงานวิจัยของ You และคณะ 2002 ได้ศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ T7 ที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* BL21 โดยการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 ในอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน (1.7, 1.5, 1.2, 1.0 และ 0.7 h^{-1}) โดยพบว่า burst size ของแบคทีเรียโอเฟจ T7 มีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่ออัตราการเจริญของ *E. coli* BL21 สูงขึ้น เช่นเดียวกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 มีช่วงเวลาในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจภายในเซลล์เจ้าบ้านที่สั้น รวมถึงมีการปลดปล่อยแบคทีเรียโอเฟจรุ่นใหม่ออกมาปริมาณมาก



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างเนื้อหมูที่เก็บจากร้านค้าในตลาดสดในจังหวัดนครปฐมจำนวน 5 ตัวอย่าง จาก 5 ร้าน พบว่าเนื้อหมูจำนวน 2 ตัวอย่าง จาก 2 ร้าน สามารถคัดแยกโคโลนีได้ 9 ไอโซเลท โดยสามารถระบุได้เป็น *S. aureus* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความจำเพาะกับ *S. aureus* BPA3 ได้ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง จากนมดิบ น้ำเสียที่ระบายน้ำ รวมถึงน้ำล้างเนื้อหมูจากร้านค้าในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี โดยภายหลังจากทำบริสุทธิ์สามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจได้ 39 ไอโซเลท ประกอบด้วยพลาไคไล 37 ไอโซเลท (Sau_RW01-Sau_RW37) และพลาไคไคน์ 2 ไอโซเลท (Sau_RW38 และ Sau_RW39)

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 37 ไอโซเลท ที่สร้างพลาไคไล พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ 8 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW01, Sau_RW02, Sau_RW05, Sau_RW09, Sau_RW20, Sau_RW21, Sau_RW32 และ Sau_RW33 สามารถติดเชื้อ *S. aureus* ได้ทุกสายพันธุ์ และแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 แสดงระดับโชนใสสูงที่สุด นอกจากนี้ไม่พบแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถติดเชื้อมี *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* และแบคทีเรียโอเฟจ 2 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW11 และ Sau_RW12 สามารถติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกข้ามสกุลกับ *S. Enteritidis* ซึ่งจากการศึกษา Efficiency of plating (EOP) พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ 2 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อข้ามสกุลต่ำ

ผลการศึกษาลำดับของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่ามีขนาดจีโนมมากกว่า 19 kbp และสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 8 กลุ่ม เมื่อพิจารณาผลการตัดจีโนมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะควบคู่กับความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

นอกจากนี้ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจ 3 ไอโซเลท ได้แก่ Sau_RW01, Sau_RW11 และ Sau_RW12 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สามารถระบุได้ว่าเฟจทั้ง 3 ชนิด จัดอยู่ในอันดับ *Caudovirales* วงศ์ *Siphovirida*

อัตราส่วนของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 ต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการติดเชื้อ (multiplicity of infection, MOI) เท่ากับ MOI 0.1 เนื่องจากใช้สารละลายแบคทีเรียโอเฟจ

น้อยกว่า และสามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ได้ไม่แตกต่างกับ MOI 10 และ 1 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าในชั่วโมงที่ 5 ที่ MOI 10, 1 และ 0.1 สามารถลดความหนาแน่นของ *S. aureus* BPA3 ได้ไม่แตกต่างกัน โดยลดลง 20.67, 19.73 และ 20.14 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่ MOI 10, 1 และ 0.1 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง โดยในชั่วโมงที่ 5 เพิ่มขึ้นโดยประมาณ 13.31, 13.52 และ 11.82 log PFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 เมื่อป่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 28 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นแบคทีเรียโอเฟจลดลง 1.27 log PFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับความหนาแน่นเริ่มต้น และไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ Sau_RW01 พบว่ามี latent period และ burst period ที่เวลา 30 และ 100 นาที ตามลำดับ โดยมีค่า burst size เท่ากับ 151 PFU /infected cell

โดยสรุปแล้วในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *S. aureus* พร้อมทั้งศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกได้ ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยนี้อาจชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้สำหรับการนำแบคทีเรียโอเฟจไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุม *S. aureus* ในอาหาร นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การประยุกต์ใช้ร่วมกับแบคทีเรียโอเฟจชนิดอื่น ๆ (bacteriophage cocktails) และศึกษาลำดับจีโนมที่สมบูรณ์ของแบคทีเรียโอเฟจเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกมาได้นั้นปลอดภัยไม่มียีนที่มีคุณสมบัติสร้างสารพิษ เช่น Staphylococcal phage บางชนิด สามารถผลิตสารพิษซึ่งแปลรหัสจากยีน exfoliative toxin A (*eta*) โดยก่อให้เกิดโรค ผิวน้ำ ลอก หลุด (staphylococcal scald skin syndrome) (Deghorain and Van Melder, 2012) รวมไปถึงการทดลองทางคลินิก (clinical trials) เพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียโอเฟจมีความปลอดภัยเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในอาหาร อย่างไรก็ตามงานวิจัยในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจยังมีไม่มากนัก จึงหวังว่าข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจในอนาคต



ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Baird-Parker Agar

Pancreatic Digest of Casein	10.0 กรัม
Beef Extract	5.0 กรัม
Yeast Extract	1.0 กรัม
Glycine	12.0 กรัม
Sodium Pyruvate	10.0 กรัม
Lithium Chloride	5.0 กรัม
Agar	20.0 กรัม

Egg yolk ที่ผสม potassium tellurite 5 เปอร์เซ็นต์
นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นที่ 45 องศาเซลเซียส แล้วเติม Egg yolk ที่ผสม potassium tellurite ลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่าให้กัน



ภาคผนวก ข

สูตรสารเคมี

1. Peptone water

Peptone	1.00 กรัม
---------	-----------

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำปราศจากไอออน 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. TE Buffer

10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl	pH 8.0
-------------------------	--------

1 มิลลิโมลาร์ EDTA	pH 8.0
--------------------	--------

ซึ่ง Tris base ปริมาณ 1.21 กรัม และ EDTA ปริมาณ 0.29 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. 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
------------------	-------------

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

4. 1 M Tris-HCl, pH 7.5

ซึ่ง 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

5. 1 M แมกนีเซียมคลอไรด์

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

6. สารละลาย 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)

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

7. 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

8. Phenol : Choloform : Isoamyl alcohol

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

9. Choloform : Isoamyl alcohol

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

10. 3 M โฟแทสเซียมอะซิเตต, pH 5.2

ชั่งโฟแทสเซียมอะซิเตต 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

11. 100X TAE

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

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที



ภาคผนวก ค

ข้อมูลเพิ่มเติม

ตารางผนวกที่ ค 1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* BPA3 จาก 247 ตัวอย่าง
ที่เก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	A01	มูลวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	A02	มูลวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	A03	ปัสสาวะวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	A04	ปัสสาวะวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	A05	น้ำดื่มวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	A06	ดิน (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	A07	น้ำเสีย (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B01	น้ำล้างคอกวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B02	น้ำดื่มวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B03	น้ำดื่มวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B04	ปัสสาวะวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B05	น้ำล้างคอกวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B06	อาหารวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B07	อาหารวัวใบข้าวโพด (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B08	ฟาง (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B09	ฟาง (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B10	มูลวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B11	มูลวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B12	นมวัวตัวที่ 1 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B13	นมวัวตัวที่ 2 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B14	นมวัวตัวที่ 3 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	B15	นมวัวตัวที่ 4 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	B16	นมวัวตัวที่ 5 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	C01	นมวัวตัวที่ 1 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	C02	นมวัวตัวที่ 2 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	C03	นมวัวตัวที่ 3 (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	C04	น้ำล้างคอกวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	C05	น้ำล้างคอกวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	D01	มูลหมูเปียก (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D02	มูลหมูแข็ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D03	มูลหมูแข็ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D04	ดินจากฟาร์มหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D05	ดินจากเล้าหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D06	น้ำล้างเล้าหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D07	น้ำทิ้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D08	น้ำทิ้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D09	น้ำดื่มหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D10	น้ำดื่มหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D11	อาหารหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D12	รำข้าว (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D13	ปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D14	มูลไก่แห้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D15	มูลไก่ (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D16	อาหารไก่ (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	D17	น้ำดื่มไก่ (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E01	น้ำดื่มไก่อายุ 3 วัน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E02	น้ำดื่มไก่อายุ 1 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E03	น้ำดื่มไก่อายุ 2 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	E04	น้ำดื่มไก่อายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E05	น้ำดื่มไก่อายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E06	ดินจากไก่อายุ 3 (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E07	ดินจากไก่อายุ 1 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E08	ดินจากไก่อายุ 2 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E09	ดินจากไก่อายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E10	ดินจากไก่อายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E11	มูลไก่แห้งอายุ 3 วัน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E12	มูลไก่แห้งอายุ 1 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E13	มูลไก่แห้ง อายุ 2 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E14	มูลไก่แห้งอายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E15	มูลไก่แห้งอายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E16	มูลไก่เปียกอายุ 3 วัน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E17	มูลไก่เปียกอายุ 1 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E18	มูลไก่เปียกอายุ 2 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E19	มูลไก่เปียกอายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E20	มูลไก่เปียกอายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E21	มูลไก่เปียกอายุ 3.5 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E22	ดินเล้าไก่ (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E23	ดินเล้าไก่ที่ว่าง 3 เดือน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E24	ดินเล้าไก่ที่ว่างนานแล้ว (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E25	ดินทางเดินเล้าไก่ (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	E26	ดินทางเดินหน้าบ้าน (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F01	แกลบเปียก (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F02	มูลไก่-แกลบ (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F03	แกลบที่พื้นเล้า (ฟาร์มไก่นครปฐม)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	F04	อาหารไก่ (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F05	น้ำดื่มไก่ (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F06	อาหารเป็ด (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F07	น้ำดื่มเป็ด (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F08	ดิน-มูลเป็ด (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F09	มูลเป็ดแห้ง (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F10	มูลเป็ดเปียก (ฟาร์มไก่อันครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F11	มูลวัวแห้ง (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F12	มูลวัวเปียก (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F13	ฟาง (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F14	น้ำดื่มวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F15	อาหารหมูจากกระสอบ (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F16	อาหารหมูจากคอกหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F17	ดินบริเวณคอกหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F18	มูลหมูแห้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F19	น้ำดื่มหมูอายุ 3 เดือน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F20	น้ำดื่มหมูอายุ 1 เดือน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F21	น้ำจากบ่อน้ำทิ้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F22	น้ำล้างคอกหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F23	มูลหมูเปียกอายุ 1 เดือน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F24	มูลหมูเปียกอายุ 3 เดือน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F25	ปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F26	อาหารหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F27	น้ำล้างผัก (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F28	รากผักเน่า (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F29	เศษดินจากผัก (ตลาดกลางนครปฐม)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	F30	เศษหินพอไลท์ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F31	ใบผักกาด (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F32	รากผักกาด (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F33	ดินบริเวณเล้าไก่ (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F34	ดินในเล้าไก่ (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F35	เศษเนื้อหมูที่เขียง (ตลาดสามควายเผือกนครปฐม)	-
BPA1/BPA3	F36	มูลไก่เปียก (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F37	ขนไก่ (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F38	มูลไก่แห้ง (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F39	น้ำดื่มไก่ (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F40	น้ำดื่มไก่ (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F41	น้ำคลอง (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	F42	น้ำเสีย (ฟาร์มไก่อราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	G01	น้ำจากบ่อน้ำบาดน้ำเสีย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G02	น้ำจากบ่อน้ำบาดน้ำเสีย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G03	ดินจากบ่อน้ำบาดน้ำเสีย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G04	ดินจากบ่อน้ำบาดน้ำเสีย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G05	ดินจากด้านข้างถนนบลูโรด (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G06	น้ำทิ้งด้านข้างถนนบลูโรด (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G07	น้ำจากบ่อน้ำด้านหน้าศูนย์วิจัย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G08	ดินจากบ่อน้ำด้านหน้าศูนย์วิจัย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G09	น้ำทิ้งจากด้านหลังโรงอาหารเพชรซ็อบ (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G10	น้ำทิ้งจากโรงอาหารเพชรซ็อบ (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G11	น้ำซังจากด้านหลังโรงอาหารเพชรซ็อบ (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	G12	น้ำจากการล้างจาน (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G13	น้ำจากด้านหน้าแอปเปิ้ล (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G14	น้ำที่ด้านข้างตึกคณะวิทยาศาสตร์ (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G15	ดินด้านข้างตึกคณะวิทยาศาสตร์ (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G16	ทราย (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G17	น้ำสระแก้วบริเวณเกาะนก (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G18	น้ำสระแก้วบริเวณศาลา (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G19	น้ำสระแก้วบริเวณสะพานสระแก้ว (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	G20	ดินบริเวณสะพานสระแก้ว (มหาวิทยาลัยศิลปากร)	-
BPA1/BPA3	H01	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H02	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H03	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H04	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H05	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H06	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H07	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H08	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H09	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H10	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H11	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H12	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H13	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H14	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H15	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA1/BPA3	H16	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H17	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H18	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H19	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H20	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H21	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H22	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H23	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H24	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H25	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H26	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H27	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H28	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H29	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	H30	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I01	มูลไก่แห่งอายุ 8 วัน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I02	มูลไก่แห่งอายุ 1 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I03	มูลไก่แห่งอายุ 2 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I04	มูลไก่แห่งอายุ 4 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I05	มูลไก่เปือกอายุ 8 วัน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I06	มูลไก่เปือกอายุ 1 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I07	มูลไก่เปือกอายุ 2 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I08	มูลไก่เปือกอายุ 4 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA1/BPA3	I09	อาหารไก่ 1 เดือน (ฟาร์มไก่ราชบุรี)	-
BPA3	I10	น้ำล้างเชียงใหม่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	I11	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	2 ไอโซเลท

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้ตัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียไอเฟจ
BPA3	J01	มูลหมูเปียก (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J02	มูลหมูแห้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J03	น้ำปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J04	น้ำดื่มหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J05	น้ำทิ้งหลังฟาร์ม (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J06	น้ำทิ้งหลังฟาร์ม (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J07	มูลหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J08	มูลหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J09	ดิน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J10	ดิน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J11	ดิน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J11	ดิน (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J12	น้ำทิ้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J13	น้ำทิ้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J14	น้ำทิ้ง (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J15	ปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J16	ปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J17	ปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J18	ปัสสาวะหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	J19	ปัสสาวะและมูลหมู (ฟาร์มหมูนครปฐม)	-
BPA3	K1	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K2	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K3	น้ำล้างเนื้อหมูและเลือด (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K4	น้ำล้างเนื้อหมูและเลือด (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K5	น้ำล้างเขียงหันหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K6	น้ำล้างเขียงหันไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้ตัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียไอเฟจ
BPA3	K7	น้ำล้างไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K8	นมวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA3	K9	นมวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA3	K10	นมวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA3	K11	นมวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	3 ไอโซเลท
BPA3	K12	น้ำกินวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA3	K13	น้ำกินวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA3	K14	น้ำล้างคอกวัว (ฟาร์มโคนมราชบุรี)	-
BPA3	K15	เศษเนื้อไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	K16	เศษเครื่องในไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	L1	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	1 ไอโซเลท
BPA3	L2	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L3	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L4	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L5	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L6	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L7	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L8	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L9	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L10	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L11	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L12	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	L13	นมวัว (โรงพยาบาลสัตว์ราชบุรี)	-
BPA3	M1	เนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	1 ไอโซเลท
BPA3	M2	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดนัดบ้านโป่งราชบุรี)	-
BPA3	M3	น้ำล้างซี่โครงหมู (ตลาดนัดบ้านโป่งราชบุรี)	-

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้คัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียไอเฟจ
BPA3	M4	น้ำล้างเนื้อไก่ (ตลาดนัดบ้านโป่งราชบุรี)	-
BPA3	M5	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดสามกระบือเผือกราชบุรี)	-
BPA3	M6	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	M7	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	M8	น้ำทิ้งจากท่อในตลาด (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	M9	ดินโรงงานแม่ศรี (นครชัยศรี)	-
BPA3	M10	น้ำทิ้งจากท่อโรงงานแม่ศรี (นครชัยศรี)	-
BPA3	M11	น้ำทิ้งจากท่อโรงงานแม่ศรี (นครชัยศรี)	-
BPA3	N1	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N2	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	5 ไอโซเลท
BPA3	N3	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N4	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N5	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N6	น้ำจากร้านชำแหละไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N7	น้ำจากร้านชำแหละไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N8	น้ำจากแผงขายผัก (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N9	น้ำล้างซีโครงไก่ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N10	น้ำล้างชิ้นเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N11	น้ำล้างหมูสับ (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	N12	น้ำล้างหอยแครง (ตลาดกลางนครปฐม)	-
BPA3	O1	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O2	น้ำที่ระบายน้ำ (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O3	น้ำแผงหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O4	น้ำแผงหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O5	น้ำแผงหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O6	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i> ที่ใช้ตัดแยก	รหัส ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียโอเฟจ
BPA3	O7	น้ำล้างเนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O8	เนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท
BPA3	O9	เนื้อหมู (ตลาดกลางนครปฐม)	3 ไอโซเลท

องค์ประกอบชุดสกัดเจล GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis, USA)

GF-1 Ambiclean Kit (PCR และ Gel) เป็นชุดสำเร็จรูปที่ออกแบบมาสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล รวมถึงมีความรวดเร็วสำหรับชะล้างแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 100bp ถึง 20kb ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ชนิดพิเศษ สำหรับปรับความเข้มข้นของเกลือและพีเอช เพื่อให้การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลมีประสิทธิภาพ รวมถึงมีคอลัมน์ซึ่งภายในมีเมมเบรนชนิด glass filter ซึ่งมีประสิทธิภาพสำหรับยึดจับดีเอ็นเอไว้บนเมมเบรน นอกจากนี้ยังช่วยกำจัด dNTPs ส่วนเกิน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (short oligo fragments) น้ำมันมินอรัล (mineral oil) เอนไซม์จากการทำ PCR รวมไปถึงสีย้อมที่เหลือยู่และเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)





รายการอ้างอิง

- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New York: Interscience.
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Al-Musharafi, S. K., and Sivakumar, N. (2014). *Staphylococcus aureus* contamination during food preparation, processing and handling. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 388-392.
- Angkititrakul, S., Srirangam, P., and Polpakdee, A. (2014). Quality of minced pork sold in Khon Kaen municipality. *Khon Kaen Research Journal*, 19(6), 900-904.
- 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.
- Basdew, I. H., and Laing, M. D. (2015). Investigation of the lytic ability of South African bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus*, associated with bovine mastitis. *Biocontrol Science and Technology*, 25, 429-443.
- Bhumibhamon, T., and Bilhmad, U. (2011). Antimicrobial resistance of *S. aureus* in pork from slaughterhouses in the southern part of Thailand during 2006–2008. *Veterinary Research and Development Center Journal*, 6(1), 1905-5048.
- 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 Microbiology*, 28(8), 1448-1452.
- Campdenbri. (2016). Systematic and critical review on the potential use of bacteriophage on foods. Retrieved from <https://www.food.gov.uk/research/research-projects/systematic-and-critical-review-on-the-potential-use-of-bacteriophages-on-foods>
- 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.
- Chibeu, A. (2013). Bacteriophages in food safety. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120914>
- Deghorain, M., and Van Melderren, L. (2012). The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses*, 4(12), 3316-3335.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., and Berekzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3), 50.
- 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.
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., and Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327-349.
- Fan, J., Zeng, Z., Mai, K., Yang, Y., Feng, J., Bai, Y., Sun, B., Xie, Q., Tong, Y., and Ma, J. (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.
- FDA. (2006). *Staphylococcus aureus* : foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Retrieved from http://pdf.usaid.gov/Pdf_docs/PNADO152.pdf
- Fruciano, D. E., and Bourne, S. (2007). Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 18(1), 19-26.
- 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.
- García, P., Martínez, B., Rodríguez, L., and Rodríguez, A. (2010). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 151-155.

- Garcia, P., Rodriguez, L., Rodriguez, A., and Martinez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*, 21(8), 373-382.
- Gutierrez, D., Rodriguez-Rubio, L., Garcia, P., Billington, C., Premarante, A., Rodriguez, A., and Martinez, B. (2016). Phage sensitivity and prophage carriage in *Staphylococcus aureus* isolated from foods in Spain and New Zealand. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 16-20.
- 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.
- Han, J. E., Kim, J. H., Hwang, S. Y., Choresca, C. H., Jr., 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.
- HiMedia. (2018). Baird Parker Agar Base. Retrieved from <http://himedialabs.com/TD/M043.pdf>
- Homthong, S., Tanwutthibandit, J., Dungkong, N., Boodngam, A., and Nilnoree, B. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in sushi. *Burapha Science Journal*, 16(1), 69-76.
- Hsieh, S. E., Lo, H. H., Chen, S. T., Lee, M. C., and Tseng, Y. H. (2011). Wide host range and strong lytic activity of *Staphylococcus aureus* lytic phage Stau2. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 756-761.
- Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Gouvêa, D. M., Vanetti, M. C. D., and Pinto, C. L. d. O. (2013). Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Research International*, 52(1), 75-81.
- Jaisue, T., and Angkititrakul, S. (2011). Contamination of *Staphylococcus aureus* in pork and palms of butchers at fresh-food markets in Khon Kaen municipality. *Khon Kean University Veterinary Journal*, 21(2), 147-153.
- Jensen, K. C., Hair, B. B., Wienclaw, T. M., Murdock, M. H., Hatch, J. B., Trent, A. T., White, T. D., Haskell, K. J. and Berges, B. K. (2015). Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* and potential use as a fomite decontaminant. *PLOS ONE*, 10(7), e0131714.
- Jie, W. (2014) Endolysin from lambda phage. Retrieved from http://parts.igem.org/Part:BBa_K1378032
- Khakhum, N., Yordpratum, U., and Wongratanacheewin, R. (2010). Bacteriophages and their medical applications. *Srinagarind Medical Journal*, 25(1), 47-53.
- Kutateladze, M., and Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28(12), 591-595.
- Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research Journal*, 2(1), 63-76.
- Lee, W. J., Billington, C., Hudson, J. A., and Heinemann, J. A. (2011). Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 52(5), 456-464.
- Li, L., and Zhang, Z. (2013). 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.
- Malicharn, S., and Vanaprasertsak, S. (2012). Study on *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* contamination in meat obtained from retail market and flea market in Ratchaburi province. Retrieved from <http://pvlo-rrri.dld.go.th/pdf/gps/ผลงานวิชาการ-น.สพ.pdf>
- Matsuzaki, S., Rashed, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., and Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), 211-219.
- Mirzaei, M. K., and Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLOS ONE*, 10(5), e0127606.
- Miwa, N., Kawamura, A., Masuda, T., and Akiyama, M. (2001). An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 361-366.
- Mohammed-Ali, M. N., and Jamalludeen, N. M. (2015). Isolation and characterization of

- bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology and Diagnosis*, 5(1), 213-220.
- Nukdee, K. (2007). Isolation of bacteriophages specific to enteric bacteria. *Ubon Ratchathani Research Journal*, 9(3), 29-37.
- O'flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3417-3424.
- Phage Hunting Program. (2013). Phage DNA Extraction. Retrieved from http://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI_SDS_DNA_Extraction_2_2013.pdf
- Phumkhachorn, P., and Rattanachaikunsopon, P. (2010). Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1794-1800.
- 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.
- Sarhan, W. A., and Azzazy, H. M. (2015). Phage approved in food, why not as a therapeutic?. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(1), 91-101.
- Sharma, M. (2013). Lytic bacteriophages potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce. *Bacteriophage*, 3(2), e25518.
- Siriwong, N., and Chukeatirote, E. (2009). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and controlling. *Songklanagarind Medical Journal*, 27(4), 347-358.
- Suklampoo, L., Satta, P., and Senaard, S. (2003). Study on contamination of *Staphylococcus aureus* in Thai dessert. Retrieved from http://agkb.lib.ku.ac.th/ku/search_detail/result/8530
- Synnott, A. J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H., and Tanji, Y. (2009). Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4483-4490.
- Tabla, R., Martinez, B., Rebollo, J. E., Gonzalez, J., Ramirez, M. R., Roa, I., Rodriguez, A., and Garcia, 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.
- Takemura-Uchiyama, I., Uchiyama, J., Kato, S. I., Inoue, T., Ujihara, T., Ohara, N., Daibata, M., and Matsuzaki, S. (2013). Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against *Staphylococcus aureus* infections using a silkworm larval infection model. *FEMS Microbiology Letters*, 347(1), 52-60.
- Tan, T. L. H., Chan, K. G., and Lee, L. H. (2014). Application of bacteriophage in biocontrol of major foodborne bacterial pathogens. *Journal of Molecular Biology and Molecular Imaging*, 1(9), 1-9.
- Wang, X., Wang, Y., Guo, G., Usman, T., Hao, D., Tang, X., Zhang, Y., and Yu, Y. (2014). Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from holstein milk. *Letters in Applied Microbiology*, 58, 527-534.
- Wang, Z., Zheng, P., Ji, W., Fu, Q., Wang, H., Yan, Y., and Sun, J. (2016). SLPW: A virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 934.
- 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.
- Zhang, C. P., Song, L., Chen, H. J., Liu, Y., Qin, Y. L., and Ning, Y. B. (2012). Antimicrobial susceptibility and molecular subtypes of *Staphylococcus aureus* isolated from pig tonsils and cow's milk in China. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76, 268-274.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). รายงานประจำปี Retrieved from http://www.dmsc.moph.go.th/dmscnew/userfiles/files/S__1286203.pdf

ภาวีน ผดุงทศ. (2547). แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร. Retrieved from

http://www.vet.cmu.ac.th/cmvtj/document/journal/8_2547.pdf

รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา. (2552). โรคอาหารเป็นพิษ. Retrieved from

http://www.boe.moph.go.th/Annual/Annual%202552/AESR52_Part1/B_Part1_52/3752_FoodPoisoning.doc

สุดสายชล หอมทอง. (2554). การแพร่กระจายของ *Staphylococcus aureus* ในผลไม้พร้อมบริโภค บริเวณอำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี. Retrieved from

http://www.ubu.ac.th/web/files_up/08f2013012310514138.pdf





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายวงศธร ศิริสุรพงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	4 มกราคม 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	150 ซอยชุมชน ตำบลสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	Wongsatorn Sirisurapong and Rujikan Nasanit. Isolation and Characterization of Bacteriophage Specific for Staphylococcus aureus. (p. I426-I434) The 7th National and International Graduate Study Conference. July 20-21, 2017, Princess Maha Chakri Sirindhorn Anthropology Centre, Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

