สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

T133411

ณัฐวรา อมาตยกุล

นันทิยา วรวุฒิพงษ์

วิชนันท์ วรรณศรีจันทร์

วพ.
ณ352ก
2556
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน...133411
วัน,เดือน,ปี...8 ต.ค. 2557

b.12643828
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

NATWARA AMATYAKUL

NUNTIYA WORAWUTTIPONG

WITCHANAN WANNASRICHAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

Study on isolation of a bacteriophage of *Staphylococcus aureus*

ชื่อนักศึกษา ณัฐวรา อมาตยกุล รหัสนักศึกษา 53051359

นันทิยา วรวุฒิพงษ์ รหัสนักศึกษา 53051386

วิชนันท์ วรรณศรีจันทร์ รหัสนักศึกษา 53051448

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ดวงกมล แต้มช่วย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2556

คณะกรรมการสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ. ดร. จิตติ ท่าไว	
กรรมการ	ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา	
กรรมการ	ดร. วิมลมาศ บุญมี	
กรรมการ	ดร.ดวงกมล แต้มช่วย	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ชื่อนักศึกษา ณัฐวรา อมาตยกุล รหัสนักศึกษา 53051359

นันทิยา วรวุฒิพงษ์ รหัสนักศึกษา 53051386

วิชนันท์ วรรณศรีจันทร์ รหัสนักศึกษา 53051448

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ดวงกมล แต้มช่วย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

ขั้นแรกทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างอาหาร น้ำนมดิบ และโพรงจมูกของมนุษย์ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

ต่อมาศึกษาวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจทั้งหมด 3 วิธี

วิธีที่ 1 ใช้เซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เจริญในระยะลอการิทึมมาบ่มร่วมกับอาหารเหลว M9 และตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยบ่มข้ามคืน เพื่อเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ตัวอย่างที่ใช้ในวิธีนี้มีจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ น้ำเสียและน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ส่วนวิธีที่ 2 ใช้แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาผสมกับอาหารเหลว M9 และตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ บ่มไว้ข้ามคืน ตัวอย่างที่ใช้ คือ น้ำเสีย น้ำทิ้งจากฟาร์มโคนม และน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ทำการตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยดูการเกิดพลาคด้วยวิธี plaque assay อย่างไรก็ตาม ทั้งวิธีที่ 1 และ 2 ไม่ประสบผลสำเร็จ และไม่มีตัวอย่างที่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมาศึกษาวิธีที่ 3 โดยวิธีนี้มีการใช้เอนไซม์เรนเนท (rennet) สำหรับการเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบก่อนนำไปใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยเมื่อเติมเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว จะวางทิ้งไว้เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรอง 2 ครั้ง จะได้น้ำเวย์ (whey) นำน้ำเวย์ที่ได้ไปบ่มกับอาหารเหลว M9 และแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน ภายใต้สภาวะต่างๆ คือ ปริมาณตัวอย่างน้ำเวย์ที่ใช้และเวลาบ่มที่แตกต่างกัน จากนั้นตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยดูการเกิดพลาคด้วยวิธี plaque assay พบว่า วิธีการนี้ประสบผลสำเร็จในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งตัวอย่างน้ำนมดิบดังกล่าวนี้มีการเตรียมโดยใช้เอนไซม์เรนเนท สำหรับไลติกเบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้รหัส $M_{7,2}$

คำสำคัญ: การแยกแบคเทอริโอเฟจ, แบคเทอริโอเฟจ, *Staphylococcus aureus*, Plaque assay, Rennet, น้ำนมดิบจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	**Study on isolation of a bacteriophage of *Staphylococcus aureus*.**		
Students	Natwara	Amatyakul	Student ID 53051359
	Nuntiya	Worawuttipong	Student ID 53051386
	Wichanan	Wannasrichan	Student ID 53051448
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Industrial Microbiology		
Academic Year	2013		
Advisor	Dr. Wimonmat	Boonmee	
Co – Advisor	Dr. Duangkamol	Tamchay	

ABSTRACT

This study presents the results of a study on isolation of a bacteriophage of *Staphylococcus aureus*. The aim is to investigate a way to isolate bacteriophages.

First, *Staphylococcus aureus* bacteria from different food samples, raw cow milk samples, and human nasal samples were isolated. The growth of *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 was studied to establish the optimum condition of bacterial growth.

After that, three methods were used to find a way to isolate bacteriophages.

In the first method, the log phage culture of *Staphylococcus aureus* was overnight incubated with M9 medium and a sample material to amplify bacteriophage. This was done with 2 different sample materials (sewage and mastitis milk). Then a second method was used. The overnight culture of *Staphylococcus aureus* was incubated with M9 medium and a sample material (sewage, drain water in dairy farm and mastitis milk). Then the plaque assay was used to determine bacteriophage particle. Unfortunately, these processes were not successful, and none of the sample used enabled the isolation of bacteriophage.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hence, a third method was initiated. In this method, rennet was added to bovine mastitis milk sample and kept at room temperature for 4 days to precipitated proteins. After this period, the created whey was filtered twice. The resulting whey was then used to incubate with M9 medium and the overnight culture of *Staphylococcus aureus*. This was done under various conditions of whey sample volumes and incubation times. Then the plaque assay was used to determine bacteriophage particles. This process was successful and the sample used enabled the isolation of bacteriophage. The isolated lytic bacteriophage is specific to isolated bacteria $M_{7,2}$

Keywords : Bacteriophage isolation, Bacteriophage, *Staphylococcus aureus*, Plaque assay, Rennet, Mastitis milk and sewage

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และ ดร.ดวงกมล แต้มช่วย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษ ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดทั้งช่วยปรับปรุงและแก้ไขเล่มโครงงานพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไว ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบโครงงานพิเศษ และขอกราบขอบพระคุณ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ รวมทั้งคำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนปรับปรุงเล่มโครงงานพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้ความรู้ต่างๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ในการทำโครงงานพิเศษ และให้ความเอ็นดู จนทำให้การทำโครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา ,ศูนย์ผลิตภัณฑ์นมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ,องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณพี่ๆน้องๆเพื่อนๆในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้รอยยิ้มและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนในการเรียนปริญญาตรี และให้กำลังใจจนทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VIIII
สารบัญภาพ	X
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โรคเต้านมอักเสบในโคนม (Bovine's mastitis)	4
2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*	5
2.2.1 กลไกการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Staphylococcus aureus*	7
2.2.1.1 โครงสร้างเซลล์	7
2.2.1.2 เอนไซม์	7
2.2.1.3 สารพิษ	8
2.2.2 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม	10
2.3 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage)	11
2.3.1 ประวัติของแบคเทอริโอเฟจ	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ประโยชน์ของแบคเทอริโอเฟจ 12
2.3.2.1 การนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย 12
2.3.2.2. ความเป็นไปได้สำหรับการใช้เฟจเทอราพีในการควบคุมโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* อย่างโรคเต้านมอักเสบในโคนม 13
2.3.3 อนุกรมวิธานของแบคเทอริโอเฟจ 14
2.3.4 สัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ 15
2.3.5 สรีระวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ 17
2.3.5.1 The One-Step Growth Experiment 17
2.3.5.2 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ 18
2.3.5.3 การเป็นตัวกลางในการส่งต่อสารพันธุกรรม 21
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* 24
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ 25

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย
3.1 อุปกรณ์ 31
3.2 เครื่องมือ 32
3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 32
3.4 วัตถุดิบและแหล่งที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ 34
3.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 35
3.6 วิธีการทดลอง 35
3.6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* 35
3.6.1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากน้ำนมดิบที่ได้จากโคนม เนื้อสัตว์ อาหาร และขนมหวาน 35
3.6.1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากโพรงจมูก 37
3.6.1.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่แยกได้ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 37
3.6.2.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466 37
3.6.2.2 การวัดการเจริญของ *S. aureus* TISTR 1466 38
3.6.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเจ้าบ้าน 38
3.6.3.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน 38
3.6.3.2 ขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 1 39
3.6.3.3 ขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 2 39
3.6.3.4 ขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 3 40
3.6.3.5 วิธีการทำ plaque assay 41
3.6.3.6 การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ 41
3.6.3.7 การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ 41

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างต่างๆ 43
4.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 48
4.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเจ้าบ้าน 50

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย 59
5.2 ข้อเสนอแนะ 60

เอกสารอ้างอิง **61**
ภาคผนวก ก **65**
ภาคผนวก ข **68**
ภาคผนวก ค **73**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีต่างๆ 38

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างต่างๆ 45

ตารางที่ 4.2 ผลการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีที่ 1, 2 และ 3 51

ตารางที่ 4.3 ผลการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีที่ 3 ในสภาวะต่างๆ 53

ตารางที่ 1 (ภาคผนวก ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ 68
ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ
Staphylococcus aureus ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1

ตารางที่ 2 (ภาคผนวก ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ 69
ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ
Staphylococcus aureus ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.3

ตารางที่ 3 (ภาคผนวก ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ 71
ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ
Staphylococcus aureus ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5

ตาราง (ภาคผนวก ค) แสดงจำนวนของ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 73
ที่นับได้ในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความขุ่นของเซลล์ช่วง 0.1 ถึง 0.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) 6

ภาพที่ 2.2 Felix d'Herelle 13

ภาพที่ 2.3 Frederick W. Twort 13

ภาพที่ 2.4 ภาพรวมของอนุกรมวิธานแบคเทอริโอเฟจ 15

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ T4 16

ภาพที่ 2.6 ลักษณะของแบคเทอริโอเฟจ T4 ที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM 17

ภาพที่ 2.7 One-step growth curve ของแบคเทอริโอเฟจ 18

ภาพที่ 2.8 วงจรชีวิตแบบไลติก ไซเคิล (lytic cycle) ของแบคเทอริโอเฟจ T4 20

ภาพที่ 2.9 ทรานซ์ดักชันแบบทั่วไป (generalized transduction) 22

ภาพที่ 2.10 ทรานซ์ดักชันแบบพิเศษ (specialized transduction) 23

ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* 46
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 47
Mannitol Salt Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ด้วยเทคนิค 48
ย้อมแกรมซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 49
ที่ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น 0.1, 0.3 และ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้นจากแบคเทอริโอเฟจ 54
ที่จำเพาะได้กับเชื้อรหัส $M_{7,2}$

ภาพ (ภาคผนวก ค) กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CFU มิลลิลิตร 74
กับค่าความขุ่น74 ของเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466
ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคเต้านมอักเสบในโคนม (bovine's mastitis) เป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบบริเวณเต้านม มักพบได้บ่อยในโคนมและส่วนมากเป็นสาเหตุของการตายในโคนมที่โตเต็มวัย (O'Flaherty, 2005) โดยจะมีอาการบวมแดงที่เต้านมและแม่โคจะรู้สึกเจ็บ หรืออาจจะไม่แสดงอาการภายนอกให้เห็น ซึ่งทำให้ยากแก่การตรวจพบและนำไปสู่การรักษาต่อไป โรคนี้มักมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียหลายชนิด เชื้อแบคทีเรียสำคัญที่ทำให้เกิดโรคดังกล่าว คือ *Staphylococcus aureus* (Tanji, 2008) น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคจะตกตะกอนหรือมีลักษณะเปลี่ยนไป มีคุณภาพต่ำลง และทำให้นมที่ผลิตได้มีปริมาณที่น้อยลง อีกทั้ง หากไม่มีการรักษาอย่างทันท่วงที แม่โคอาจจะไม่สามารถผลิตน้ำนมได้อีก ทำให้ต้องคัดแม่โคออกจากฝูงได้และแม่โคอาจเสียชีวิตได้ เป็นผลให้เกิดการสูญเสียรายได้ของเกษตรกรและมีผลในทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมโรคและรักษาแม่โค

การรักษาโรคเต้านมอักเสบในอดีตจนถึงปัจจุบันจะทำการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามมักพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะแบบธรรมดานั้นไม่เป็นผลและมีค่าใช้จ่ายสูง (Basdew และ Laing, 2011) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้เกิดความสนใจในการแสวงหาแนวทางอื่นๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษา ซึ่งวิธีหนึ่งที่เป็นทางเลือกในการรักษา คือ เฟจเทอราพี (Phage Therapy)

เฟจเทอราพีเป็นการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้แบคเทอริโอเฟจซึ่งเป็นไวรัสของแบคทีเรีย ด้วยคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้อย่างจำเพาะ (Tanji, 2008) นั่นคือ แบคเทอริโอเฟจจะเข้าทำลายแบคทีเรียเจ้าบ้านเท่านั้น ทำให้ไม่มีผลไปทำลายเชื้อประจำถิ่น ซึ่งต่างจากยาปฏิชีวนะที่มีเป้าหมายในการทำลายทั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อประจำถิ่น (Sulakvelidze, 2001) และไม่ส่งผลลบต่อเนื้อเยื่อเต้านมของโค (Basdew และ Laing, 2011) แบคเทอริโอเฟจยังสามารถใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากสามารถเกิดวิวัฒนาการได้เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่ดื้อยาต่อปฏิชีวนะ (Sulakvelidze, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมถึงการผลิตแบคเทอริโอเฟจเพื่อมาใช้งานนั้นยังมีต้นทุนที่น้อยกว่าการผลิตยาปฏิชีวนะ อย่างเป็นนัยสำคัญอีกด้วย (Basdew และ Laing, 2011) และในปี ค.ศ. 2006 องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้อนุญาตให้มีการใช้ ListShield™ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แบคเทอริโอเฟจที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (bio-control) สำหรับควบคุมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร (O'Mahony, 2013) จึงทำให้กลุ่มผู้ทำโครงงานพิเศษเกิดความสนใจที่จะศึกษาถึงการแยกแบคเทอริโอแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างที่คาดว่ามีเชื้อ *S. aureus* เช่น น้ำนมดิบของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และน้ำ โสโครกจากชุมชน เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคเต้านมโคอักเสบที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้ว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำการคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างนม, เนื้อสัตว์, อาหาร, ขนมหวาน และอาสาสมัคร

2. เพื่อศึกษาวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจของ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างต่างๆในสิ่งแวดล้อม

3. เพื่อศึกษาสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อม เช่น อาหารจำพวกที่ใช้มือทำ, น้ำนมดิบ ขนมหวาน เนื้อสัตว์ โพรงจมูก เป็นต้น แล้วนำเชื้อที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นแยกแบคเทอริโอแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบและน้ำโสโครกจากชุมชน นำแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทำการเก็บรักษาเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคเต้านมโคอักเสบ ซึ่งอาจตกค้างอยู่ในน้ำนมดิบและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค

2. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคเต้านมโคอักเสบโดยใช้แบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ลดผลของเคียงของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อสุขภาพของโค เนื่องจาก แบคเทอริโอเฟจนั้นมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านเท่านั้น และจะไม่ทำลายเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ของโคเหมือนกับยาปฏิชีวนะ

4. แก้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมโคอักเสบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเต้านมอักเสบโคนม (Bovine's mastitis)

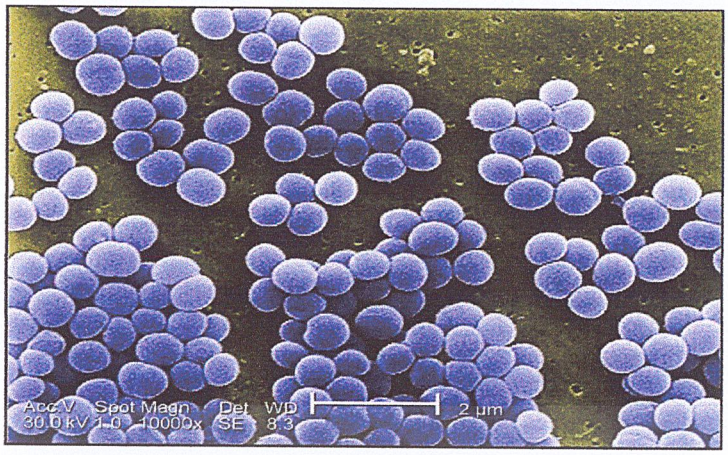
โรคเต้านมอักเสบโคนม (bovine mastitis) เป็นโรคที่เกิดการอักเสบตรงบริเวณที่มีการสร้างน้ำนมของเต้านม ซึ่งทำให้โคนมเกิดความเจ็บปวดและระคายเคือง น้ำนมที่ได้จะลดลงและมีส่วนประกอบที่เปลี่ยนไป (สมพงศ์, 2528) โรคนี้เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ทั้งจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะปล่อยสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อของเต้านม (Schroeder, 2012) หรือจากสภาพแวดล้อมในโรงนมและเครื่องรีดนมที่มีสุขลักษณะไม่ดีพอ จึงทำให้โคนมมีสุขภาพอ่อนแอลงและเกิดโรคได้ (วิพิชญ์, 2541) โรคเต้านมอักเสบในโคนมถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญแก่เกษตรกรที่เลี้ยงโคนมมาก เนื่องจากโรคนี้สามารถติดต่อได้จากแม่โคที่เป็นโรคสู่แม่โคตัวอื่นๆในฝูงได้ในง่ายในสภาพการเลี้ยงแบบรวมฝูงหรือ หากมีสุขาภิบาลของโรงนมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (สมพงศ์, 2528) ในต่างประเทศได้ประมาณการไว้ว่าแต่ละปี โคที่เกิดโรคเต้านมอักเสบอาจก่อให้เกิดมูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจได้มากกว่า 200 ดอลลาร์ต่อตัว เพราะน้ำนมที่ได้จากโคที่เกิดโรคมีความผิดปกติและด้อยคุณภาพต้องเททิ้งไป (Schroeder, 2012) จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมคือ เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เนื่องจากเชื้อนี้เป็นแบคทีเรียที่มักพบบนผิวหนังที่มีแผลหรือมีการอักเสบ โดยเฉพาะตรงรูหัวนม ทำให้เกิดการติดต่อจากโคตัวหนึ่งไปยังโคอีกตัวหนึ่งได้ง่าย โดยผ่านกระบวนการรีดนม ผ้าที่ใช้เช็ดเต้านม และมือคนรีดนมมีการแพร่กระจายจากโคที่เป็นโรคสู่โคตัวอื่นๆในฝูงได้ง่ายในช่วงของการรีดนมผ่านทางหัวรีดหรือมือคนรีดที่ไม่ถูกสุขลักษณะ โคที่ติดเชื้อ *S. aureus* จะเกิดการอักเสบตั้งแต่แบบไม่รุนแรงจนถึงอักเสบอย่างเฉียบพลัน บางครั้งอาจทำให้เนื้อเต้านมตายได้อย่างเฉียบพลัน เชื้อนี้จะแพร่เข้าไปในเต้านมและสร้างพังผืดล้อมรอบไว้ อีกทั้งบางสายพันธุ์เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะยาพวกเพนิซิลิน จึงทำให้การรักษาด้วยยาให้หายขาดนั้นเป็นไปได้ยากมากขึ้น (พีระศักดิ์ และคณะ, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในตระกูล *Staphylococcaceae* มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5 ถึง 1.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่สอง หรือคู่สี่ หรือเป็นสายสั้นๆ 3 ถึง 4 เซลล์ บางทีอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นดังภาพที่ 2.1 โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ เป็นมันวาว ทึบแสง มีขอบชัดเจน มีสีตั้งแต่สีเทาไปจนถึงสีเหลืองและสีส้ม โดยปกติแล้วจะไม่สร้างแคปซูล หรือสร้างแคปซูลได้อย่างจำกัด ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกที่เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) แต่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในภาวะที่มีอากาศ ยกเว้น *S. aureus* subsp. *anaerobius* ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ (anaerobe) มีเมตาบอลิซึมของการหมักและการหายใจ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เอนไซม์โคแอกลูเลส (coagulase) เอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสที่ทนต่อความร้อน (heat-stable endonuclease หรือ thermonuclease, Tnase) และ ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ได้ (Whitman และคณะ, 2009) สามารถรีดิวส์เทลลูไรท์และหมักแมนนิทอล (manitol) ได้ในสภาพไร้อากาศ (สุรีย์, 2553) เชื้อ *S. aureus* ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการวิตามินบีและยูราซิล (uracil) เมื่อเจริญในสภาพไร้อากาศ โดยเชื้อ *S. aureus* สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิช่วง 10 ถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญจะอยู่ในช่วง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส (Whitman และคณะ, 2009) ในขณะที่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 6 ถึง 7 องศาเซลเซียส ระดับพีเอช (pH) ที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.5 ถึง 9.3 ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.0 ถึง 7.5 เจริญได้ในสภาพที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (water activity, a_w) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.83 และทนเกลือ (NaCl) ได้ถึงร้อยละ 15 (สุรีย์, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

ที่มา: http://www.bacteriainphotos.com (28 สิงหาคม 2556)

เชื้อ *S. aureus* พบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน ทราย น้ำทะเล น้ำสะอาด พืช ผิวพืช อาหารสัตว์ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากฟาร์ม พื้นผิวของอุปกรณ์การทำอาหาร ภาชนะ เฟอร์นิเจอร์ เสื้อผ้า ผ้าห่ม พรม ธนบัตร ฝุ่น และอากาศ เป็นต้น เชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุของความผิดปกติและการเสียชีวิตของผู้ป่วยในโรงพยาบาล และก่อโรคในคนหลายโรค เช่น โรคฝีและฝีฝักบัว (furuncles และ carbuncles) โรคผิวหนังเป็นตุ่มพุพอง (impetigo) โรคผิวหนังหลุดลอก (scalded skin syndrome) โรคติดเชื้อของระบบไหลเวียนเลือด (bacteremia) โรคลิ้นหัวใจอักเสบเฉียบพลัน (acute endocarditis) โรคปอดบวม (pneumonia) โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โรคลำไส้อักเสบ (enterocolitis) โรคติดเชื้อของกระดูกและข้อ (osteomyelitis) กลุ่มอาการช็อคจากสารพิษ (toxic shock syndrome) และ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (menigitis) เป็นต้น และยังก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกได้ เช่น โรคเต้านมอักเสบ (mastitis) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคเยื่อบุมดลูกอักเสบ (endometritis) และ โรคติเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เป็นต้น โดยโรคเต้านมอักเสบในโคนม (bovine mastitis) ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากในอุตสาหกรรมฟาร์มนม (Whitman และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 กลไกการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ภัทรชัย, 2552)

S. aureus จะทำการบุกรุกและทำลายชั้นเนื้อเยื่อโดยตรงและ/หรือจากการสร้างสารคัดหลั่งหลายชนิด เช่น เอนไซม์ และ สารพิษ โดยสามารถแบ่งปัจจัยออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

2.2.1.1 โครงสร้างเซลล์

ส่วนประกอบของเซลล์โดยเฉพาะผนังเซลล์มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคและต่อต้านการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แคปซูลมีคุณสมบัติยับยั้งการเคลื่อนตัวเข้าหาและการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังช่วยในการเกาะติดกับวัสดุสังเคราะห์ เช่น สายให้สารน้ำทางเส้นเลือดและอวัยวะเทียม เป็นผลให้เชื้อสามารถรวมกลุ่มกันและเพิ่มจำนวน ทำให้สามารถก่อโรคได้ที่ตำแหน่งดังกล่าวและต้านฤทธิ์ของยาต้านเชื้อแบคทีเรีย คุณสมบัติในการเกาะติดนี้ พบว่ามีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของในเชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มักไม่สร้างสารคัดหลั่งอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

สารเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในชั้นผนังเซลล์มีฤทธิ์คล้ายกับเอนโดท็อกซิน (endotoxin) ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยสามารถกระตุ้นการผลิตอินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1) ที่ก่อให้เกิดอาการไข้ กรดเทโคอิก (teichoic acid) มีส่วนช่วยให้เชื้อเข้าเกาะติดกับผิวของเนื้อเยื่อโดยการเข้าจับตัวกับเส้นใยไฟโบรเนคติน (fibronectin) ในเชื้อ *S. aureus* การจับตัวของโปรตีน เอ (Protein A) กับส่วน Fc ของ IgG ซึ่งเป็นส่วนที่ปกติแอนติบอดีใช้ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการออพโซไนส์เซชัน (opsonization) กระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ (complement system) นอกจากนี้ สารโปรตีนหลายชนิดในบริเวณผิวเซลล์มีส่วนในการช่วยให้เชื้อสามารถเกาะติดกับส่วนประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อ เช่น เส้นใยคลอลาเจน (collagen) ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และ อีลาสติน (elastin)

2.2.1.2 เอนไซม์

เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการก่อโรค ได้แก่

1. โคแอกกลูเลส (Coagulase) เฉพาะเชื้อ *S. aureus* เท่านั้นที่พบการสร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส ไม่พบใน staphylococci สปีชีส์อื่น เอนไซม์โคแอกกลูเลส กระตุ้นให้เปลี่ยนเส้นใยไฟบริโนเจน (fibrinogen) เป็นไฟบริน (fibrin) ซึ่งสามารถเกาะผิวเซลล์แบคทีเรียและทำให้เกิดการรวมตัวเป็นกลุ่ม มีผลช่วยปกป้องเชื้อจากกระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และการถูกทำลายโดยแอนติบอดี การสะสมของเส้นใยไฟบริน ยังมีส่วนทำให้เกิดผนังล้อมรอบบริเวณที่ติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเกิดเป็นฝีหนอง (abscess) โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ส่วนที่อยู่บนผนังเซลล์หรือ bound coagulase (clumping factor) สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างไฟบรินได้โดยตรง และส่วนที่ถูกปล่อยออกสู่ภายนอก หรือ free coagulase จะออกฤทธิ์โดยทำปฏิกิริยากับ globulin plasma factor (coagulase reacting factor) เกิดเป็นสาร สแตปไฟโลธรอมบิน (staphylothrombin) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการเปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินต่อไป

2. คะตะเลส (Catalase) หลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจับกินเชื้อแบคทีเรียโดยกระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) จะเกิดการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และอนุมูลอิสระที่เป็นพิษเพื่อทำลายเชื้อแปลกปลอม เอนไซม์คะตะเลส (catalase) มีฤทธิ์ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจนเพื่อปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากการถูกทำลายโดยเม็ดเลือดขาว

3. ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase หรือ spreading factor) ออกฤทธิ์สลายกรดไฮยาลูโร-นิค (hyaluronic acid) ที่พบเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายก่อให้เกิดการติดเชื้อลุกลามในชั้นเนื้อเยื่อได้

4. สแตปไฟโลไคเนส (Staphylokinase หรือ fibrinolysin) ออกฤทธิ์โดยเปลี่ยนพลาสมิโนเจน (plasminogen) เป็น พลาสมิน (plasmin) ทำให้เกิดการสลายก้อนลิ่มของเส้นไฟบริน (fibrin) ในบริเวณที่ติดเชื้อ จึงมีส่วนช่วยในการกระจายลุกลามของเชื้อในชั้นเนื้อเยื่อ

5. ไลเปส (Lipase) มีฤทธิ์ในการสลายไขมัน จึงมีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อในชั้นผิวหนังและใต้ผิวหนัง ซึ่งประกอบด้วยต่อมไขมันและเนื้อเยื่อไขมัน

6. เบต้าแลคเทมเมส (β-lactamase) เชื้อ staphylococci มีการพัฒนาการดื้อยาเพนิซิลลิน (penicillin) เนื่องจากการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคเทมเมส ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเบต้า-แลคเทม (β-lactams) อื่นอีกหลายชนิด

2.2.1.3 สารพิษ

เนื่องจาก *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจึงไม่สร้างเอนโดท็อกซิน (endotoxin) แต่จะอาศัยการสร้างสารพิษที่เป็นเอคโซท็อกซิน (exotoxin) เป็นกลไกสำคัญในการก่อโรคแทน ซึ่งแบ่งออกหลายกลุ่ม ได้แก่

ไซโตท็อกซิน (Cytotoxin หรือ hemolysin) เป็นกลุ่มสารพิษที่ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์และสลายเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. แอลฟาท็อกซิน (α-toxin) สามารถสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ทำให้เกิดการเน่าตายของเซลล์ผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง เป็นพิษต่อเซลล์ระบบประสาท และยังเป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ตับ และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด โดยแอลฟาท็อกซินจะออกฤทธิ์ทำให้เกิดรูรั่วในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเสียสมดุลของปริมาณสารและแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ เซลล์จึงบวมและแตกในที่สุด

2. เบต้าท็อกซิน (β-toxin หรือ sphingomyelinase) ออกฤทธิ์จำเพาะต่อการทำลายไลโซฟอสฟาติดิลโคลีน (lysophosphatidylcholine) และ สฟริงโกไมอีลิน (sphingomyelin) ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสฟอลิปิด (phospholipid) ที่พบเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงมีผลในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์สัตว์หลายชนิด เช่น เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และ ไฟโบรบลาส (fibroblast) รวมถึงมีผลในการทำลายเนื้อเยื่อและการเกิดฝีหนอง

3. เดลต้าท็อกซิน (δ-toxin) ออกฤทธิ์ทำลายทั้งเม็ดเลือดแดง และ เซลล์เนื้อเยื่ออื่นๆ

4. แกมม่าท็อกซิน (γ-toxin) และ ลิวโคซิดิน (leukocidin) ออกฤทธิ์ร่วมกันในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดความผิดปกติในการควบคุมการผ่านเข้าออกเซลล์ของสารและเสียสมดุลแรงดันออสโมติก เซลล์จึงบวมและแตกในที่สุด ลิวโคซิดินมีฤทธิ์จำเพาะกับเม็ดเลือดขาว

5. เอ็กโฟเลียทีฟ ท็อกซิน (Exfoliative toxin, ET หรือ epidermolytic toxin) พบในเชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์ (ไม่เกินร้อยละ 50) ออกฤทธิ์ทำให้เกิดโรคที่มีการหลุดลอกของผิวหนังที่เรียกว่า staphylococcal scalded skin syndrome สารพิษจะทำลายเซลล์เยื่อบุผิวหนังในชั้นอิพิเดอมิส (epidermis) และทำให้เกิดการแยกตัวของส่วนเดสโมโซม (desmosome) ที่เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ผิวหนังในชั้นสตราตัม แกรนูโลซัม (stratum granulosum) เป็นผลให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนังออกเป็นบริเวณกว้างกระจายไปทั่วร่างกาย

6. ท็อกซิคช็อก ซินโดรม์ ท็อกซิน-1 (Toxic shock syndrome toxin-1) พบสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษนี้ได้ประมาณร้อยละ 20 ของเชื้อ *S. aureus* ที่ก่อโรคช็อก (Toxic shock syndrome) สารพิษที่มีความเข้มข้นต่ำสามารถแทรกผ่านเนื้อเยื่อผนังหลอดเลือด หรือสามารถทำลายเซลล์เยื่อบุต่างๆ ส่วนในระดับความเข้มข้นสูง สารพิษจะกระจายเข้าสู่กระแสเลือดและก่อให้เกิดอาการตามระบบต่างๆได้ และสารพิษยังมีคุณสมบัติเป็นซูเปอร์แอนติเจน (superantigen) ที่สามารถก่อให้เกิดการตอบสนองอย่างไม่จำเพาะของระบบภูมิคุ้มกัน และมีการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) หลายชนิดในจำนวนมากกว่าปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เอนเทอโรท็อกซิน (Enterotoxin) เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างสารพิษกลุ่มนี้ได้ถึงร้อยละ 30 ถึง 50 โดยเอนเทอโรท็อกซิน จะประกอบไปด้วยสารพิษอย่างน้อย 8 ชนิด คือ A, B, C, D, E, G, H และ I โดยจะพบการสร้างเอนเทอโรท็อกซิน เอ ได้บ่อยที่สุด สารพิษทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที ดังนั้นสารพิษจึงสามารถปนเปื้อนลงในอาหารที่ผ่านการปรุงแล้ว และสารพิษยังทนต่อกรดและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคอาหารเป็นพิษ กลไกการก่อโรคของสารพิษเอนเทอโรท็อกซินยังไม่ชัดเจน แต่มีคุณสมบัติเป็นซูเปอร์แอนติเจน (super antigen)

2.2.2 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม (Basdew และ Laing, 2011)

การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวิธีดั้งเดิมที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคเต้านมอักเสบในโคนม เนื่องจาก สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว ลดปัญหาการติดเชื้อเรื้อรัง ลดความเสียหายของผลผลิต สามารถทำให้ผลการตรวจนับเชื้อ (cell count) กลับไปสู่เกณฑ์ที่ยอมรับได้ และขายน้ำนมได้รวดเร็วขึ้น

แม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะจะได้ผลดี แต่ก็ยังมีข้อโต้แย้งว่าการรักษาโดยวิธีนี้คุ้มค่าแล้วจริงหรือ เนื่องจากว่า เชื้อ *S. aureus* ได้พัฒนาศักยภาพในการต้านยาปฏิชีวนะ และยังเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรค อีกทั้งอัตราการควบควบคุมเชื้อของยาปฏิชีวนะนั้นยังต่ำ และยังไม่สามารถกำจัดหรือควบคุมการติดเชื้อภายในฟาร์มโคได้อย่างเด็ดขาด การดื้อยาปฏิชีวนะเกิดได้จากหลายสาเหตุดังนี้

1. เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างหนองซึ่งจะถูกล้อมรอบด้วยไฟบรัสแคปซูล (fibrous) หนาภายในเต้านม ซึ่งจะป้องกันไม่ให้ยาปฏิชีวนะเข้าถึงได้

2. เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถอาศัยอยู่ในเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถแพร่เข้าไปในตัวเซลล์ได้

3. เชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์เบต้าแลคเทมเมส (β-lactamase) จึงทำให้สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะแพนิซิลลิน (penicillin) และยาปฏิชีวนะอื่นที่มีประสิทธิภาพมากกว่า เช่น ยาปฏิชีวนะอะมิโนไกลโคซัยส์ (aminoglycosides) เซปฟาโลสปอริน (cephalosporin) และ เตตร้าซัยคลิน (tetracyclines)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถอยู่รอดได้ในระยะพักซึ่งมีเมือกแคปซูล และไม่มีการแบ่งตัว โดยในระยะนี้ ยาปฏิชีวนะจะไม่สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้ และเชื้อสามารถเจริญได้อีกครั้งในสภาวะที่เหมาะสม

การแพร่กระจายของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลิน (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) ประกอบกับการต้านทานยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดใหม่ คือ แดปโธมัยซิน (daptomycin) และไลเนโซลิด (linezolid) ซึ่งเพิ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่ควบคุมได้ยาก การพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ยังคงดำเนินต่อไป เช่น ไทกีไซไคลน์ (tigecycline) เป็นยารุ่นที่ 3 กึ่งสังเคราะห์ของเตตร้าซัยคลิน (tetracycline) ต่อต้านการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยต้องใช้ร่วมกับริแพมฟิน (ripamfin) ยาอีกตัวหนึ่งคือ เซฟโธบิโพรล (ceftobiprole) เป็นยารุ่นที่ 5 ของเซปฟาโลสปอริน (cepphalosporin) ซึ่งสามารถควบคุมเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ปัญหาหลัก คือ การพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ยังไม่ทันกับการก้าวหน้าทางวิวัฒนาการของเชื้อจุลินทรีย์ และ เชื้อจุลินทรีย์พัฒนาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสามัญได้ง่าย

การใช้แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) จึงเป็นแนวทางเลือกใหม่ในควบคุมเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจาก แบคเทอริโอเฟจหรือเฟจ (phage) มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเป้าหมาย ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเนื้อเยื่อบริเวณเต้านมโค และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้คูณ 1,000 เท่า ภายในเซลล์เจ้าบ้าน (Basdew และ Laing, 2011) แบคเทอริโอเฟจไม่บุรุกมนุษย์หรือเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic cell) ไม่ทำลายแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ไม่เป็นพิษ และไม่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นเหมือนยาปฏิชีวนะ (Kwiatek และคณะ, 2011)

2.3 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage)

2.3.1 ประวัติของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็นชื่อของไวรัสที่ถูกตั้งขึ้นโดย Felix. d'Herelle ซึ่งมีความหมายว่า "eater of bacteria" เพราะมีความสามารถในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย และยังเป็นไวรัสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียอีกด้วย (Adams, 1959) แบคเทอริโอเฟจมีอยู่ทุกหนทุกแห่งในสิ่งแวดล้อม ทั้งในมหาสมุทร, ดิน, น้ำพุร้อน, น้ำที่เราใช้ และอาหารที่เรากิน (Basdew และ Laing, 2011) แบคเทอริโอเฟจถูกค้นพบโดยนักแบคทีเรียวิทยาชาวอังกฤษชื่อ F. W. Twort ในปี ค.ศ 1915 โดย Twort ได้อธิบายบางสิ่งที่ทำโคโลนีของเชื้อกลุ่ม staphylococci มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเปลี่ยนแปลงไป ว่า " พวกมันสามารถผ่านตัวกรองได้และเป็นสิ่งที่เหมือนกับไวรัสที่ก่อโรคในพืชและสัตว์ " แต่ Twort ก็ไม่ได้ไล่ตามข้อสงสัยที่เกิดขึ้น เพราะต้องเข้าร่วมสงครามกับกองทัพอังกฤษ จากนั้นในปี ค.ศ 1917 Felix d'Herelle นักแบคทีเรียวิทยาชาวแคนาดาซึ่งทำงานอยู่ที่สถาบันวิจัย Pasteur ในปารีส ได้ตีพิมพ์วารสารที่กล่าวถึงความสามารถของแบคเทอริโอเฟจหลายฉบับ และในปี ค.ศ 1921 d'Herelle ได้ตีพิมพ์หนังสือที่ชื่อว่า *Le bacteriophage: son role dans rimmiinite* เขาได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลายแบคเทอริโอเฟจที่กรองได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคบิด (dysentery) ไปผสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบิด (Shiga's bacillus) และใช้เชื้อโรคบิดที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอเฟจเป็นเชื้อควบคุม (control) ซึ่ง d'Herelle พบว่าเซลล์แขวนลอยของเชื้อโรคบิดที่เป็นตัวควบคุมเกิดความขุ่นแต่เซลล์แขวนลอยเชื้อโรคบิดที่เติมแบคเทอริโอเฟจ ลงไปนั้นใส และหลังจากที่เขาได้ศึกษาถึงการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของแบคเทอริโอเฟจในธรรมชาติ อีกทั้งได้พบว่าแบคเทอริโอเฟจจะเข้าทำลายเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นเจ้าบ้านเท่านั้น ทำให้ d'Herelle เกิดความสงสัยว่าแบคเทอริโอเฟจอาจจะมีบทบาทในการรักษาโรค (Adams, 1959)

ภาพที่ 2.2 Felix d'Herelle

ภาพที่ 2.3 Frederick W. Twort

ที่มา: http://en.wikipedia.org (16 สิงหาคม 2556)

2.3.2 ประโยชน์ของแบคเทอริโอเฟจ

2.3.2.1 การนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

เฟจเทอราพี เป็นแนวคิดของ Felix d'Herelle ที่ใช้ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านอย่างจำเพาะ ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งใน ปี ค.ศ 1919 d'Herelle ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในการใช้แบคเทอริโอเฟจรักษาเด็กที่ป่วยเป็นโรคบิด ที่โรงพยาบาล des Enfants Malades ในกรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส ในปี ค.ศ 1921 ประเทศเบลเยียม Bruynoghe และ Maisin ได้ทำการรักษาผู้ป่วยโรคฝีที่เกิดจากเชื้อ staphylococcus โดยใช้แบคเทอริโอเฟจ พบว่าทำให้ผู้ป่วยอาการดีขึ้นในเวลา 48 ชั่วโมง ในทศวรรษที่ 1930 George Eliava และ d'Herelle ได้ร่วมมือกันก่อตั้งสถาบัน Eliava ซึ่งเป็นสถาบันวิจัยที่ทำงานทดลองทางด้านแบคเทอริโอเฟจเทอราพี ที่เมือง Tbilisi ประเทศจอร์เจีย นอกจากนี้ ในปี ค.ศ 1936 วารสารวิจัยของฝรั่งเศส ชื่อ *La Médicine* ได้ตีพิมพ์เกี่ยวกับเฟจเทอราพี ว่าสามารถใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคได้หลากหลายชนิด เช่น ไข้รากสาดน้อย (typhoid fever) ลำไส้ใหญ่อักเสบเฉียบพลัน (acute colitis) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) การติดเชื้อที่ต่อมลูกหมากและท่อปัสสาวะ (prostate and urinary tract infections) โรคฝี (furunculosis) โรคติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) และโรคติดเชื้อในหู จมูกและคอ (otolaryngology) แต่หลังจากช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 การวิจัยเกี่ยวข้องกับเฟจเทอราพีของประเทศในแถบยุโรปตะวันตกนั้นลดลงอย่างมาก เนื่องจากการแทนที่ของยาปฏิชีวนะ และเปลี่ยนไปใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอเฟจในด้านการศึกษาทางพันธุศาสตร์แทน ยกเว้นประเทศแถบยุโรปตะวันออกและสหภาพโซเวียตที่ยังคงมีงานวิจัยเกี่ยวกับเฟจเทอราพีเพิ่มขึ้น จนเมื่อทศวรรษที่ 1980 ได้เริ่มมีการกลับมาทำวิจัยเกี่ยวเฟจเทอราพีอีกครั้ง (Kutter, 2011) สำหรับการศึกษาเฟจเทอราพีในสัตว์นั้น ในช่วงทศวรรษที่ 1980 William Smith และเพื่อนร่วมงานจากสถาบันวิจัยโรคติดเชื้อในสัตว์ (The Institute for Animal Disease Research) ในประเทศอังกฤษ ได้รายงานว่าประสบความสำเร็จในการใช้แบคเทอริโอเฟจรักษาหนูที่ติดเชื้อ *E.coli* และพบว่าสัตว์ที่ใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจาก *E.coli* นั้นรอดชีวิตทุกชนิด อีกตัวอย่างหนึ่ง Soothill และคณะ รายงานว่าได้ใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาหนูที่ติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter* อีกทั้งพวกเขาได้เสนอว่าแบคเทอริโอเฟจอาจจะมีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันการติดเชื้อของผู้ป่วยบริเวณผิวหนังที่ได้รับการปลูกถ่ายจากการโดนไฟลวก (Sulakvelidze, 2001)

2.3.2.2. ความเป็นไปได้สำหรับการใช้เฟจเทอราพีในการควบคุมโรคเกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* อย่างโรคเต้านมอักเสบในโคนม

เนื่องจากไม่กี่ปีมานี้ เชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ ในโคนั้นหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น ในช่วงแรก *S. aureus* เริ่มดื้อต่อยาเพนิซิลลิน (penicillin) ต่อมาก็เริ่มดื้อยาเมทิซิลลิน (methicillin) และไม่นานก็

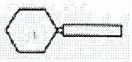
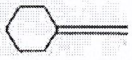
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดื้อยาแวนโคมัยซิน (vancomycin) ตามลำดับ เป็นผลทำให้เกิดความสนใจที่จะเปลี่ยนการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษามาเป็นการใช้วิธีควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) แทน ซึ่งก็คือการใช้แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. aureus* และเพราะว่าแบคเทอริโอเฟจนั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านเท่านั้น ทำให้แบคเทอริโอเฟจไม่สร้างผลกระทบในทางลบกับทั้งเนื้อเยื่อเต้านมและเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ของโค (Basdew และ Laing, 2011) แต่เราควรหลีกเลี่ยงการใช้แบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซจินี (lysogeny) เนื่องจากจีโนมของแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้จะแทรกตัวอยู่บนโครโมโซมของเจ้าบ้านในรูปของโปรเฟจ (prophage) เมื่อแบคเทอริโอเฟจถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนวงจรชีวิตจากไลโซจีนี (lysogeny) ไปเป็นไลติก ไซเคิล (lytic cycle) จีโนมแบคเทอริโอเฟจจะถูกตัดออกจากโครโมโซมของเจ้าบ้าน เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่างๆ ซึ่งบางครั้งยีนก่อโรคจากเจ้าบ้านอาจถูกตัดออกไปพร้อมกับจีโนมของแบคเทอริโอเฟจแล้วถูกบรรจุลงในส่วนหัวพร้อมกับดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจด้วย หลังจากที่แตกเซลล์เจ้าบ้านตัวแรกแล้ว แบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปสอดแทรกสารพันธุกรรมสู่เซลล์เจ้าบ้านตัวถัดไป ซึ่งยีนก่อโรคที่มาจากเจ้าบ้านตัวก่อนหน้าอาจจะเกิดรีคอมบิเนชัน (recombination) กับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านตัวใหม่ (ไม่ก่อโรค) แล้วทำให้แบคทีเรียเจ้าบ้านตัวใหม่นี้กลายเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้ (Prescott, 2002 และ Kutter, 2011)

2.3.3 อนุกรมวิธานของแบคเทอริโอเฟจ

การจัดหมวดหมู่ของไวรัสจัดทำโดยหน่วยงานที่ชื่อว่าคือ the International Committee on Taxonomy of Viruses หรือ ICTV โดยหน่วยงานดังกล่าวได้ทำการจัดหมวดหมู่ไวรัสทั้งที่ก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง, สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง, พืช, โปรโตซัว, ฟังไจและแบคทีเรีย ซึ่งในการรายงานการจัดหมวดหมู่ไวรัสของ ICTV ครั้งที่ 9 ประกอบไปด้วยไวรัสทั้งหมด 6 ลำดับ (order), 87 ตระกูล (families) และ 380 สกุล (genus) แบคเทอริโอเฟจได้ถูกจัดไว้ดังนี้ 1.) แบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในลำดับ *Caudovirales* เป็นแบคเทอริโอเฟจชนิดที่มีหางและไม่มีเอนวิโลป (envelope) หุ้มที่แคพซิด แบ่งเป็น 3 ตระกูล คือ *Myoviridae* (หางยาวมีชีทหุ้ม), *Siphoviridae* (หางยาวไม่มีชีทหุ้ม) และ *Podoviridae* (หางสั้นไม่มีชีทหุ้ม) และ 2.) ตระกูลของแบคเทอริโอเฟจที่มีลักษณะเป็นเส้นสายรูปร่างไม่แน่นอน และมีไขมันหุ้มแคพซิด ดังภาพที่ 2.3 (Ackermann, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shape	Order or family	Nucleic acid, particulars, size	Member	Number[a]
	Caudovirales	dsDNA (L), no envelope		
	*Myoviridae*	Tail contractile	T4	1312
	*Siphoviridae*	Tail long, noncontractile	λ	3262
	Podoviridae	Tail short	T7	771
	Microviridae	ssDNA (C), 27 nm, 12 knoblike capsomers	ϕX174	38
	Corticoviridae	dsDNA (C), complex capsid, lipids, 63 nm	PM2	3?
	Tectiviridae	dsDNA (L), inner lipid vesicle, pseudo-tail, 60 nm	PRD1	19
	Leviviridae	ssRNA (L), 23 nm, like poliovirus	MS2	38
	Cystoviridae	dsRNA (L), segmented, lipidic envelope, 70–80 nm	ϕ6	3
	Inoviridae	ssDNA (C), filaments or rods, 85–1950 x 7 nm	fd	66
	Plasmaviridae	dsDNA (C), lipidic envelope, no capsid, 80 nm	MVL2	5

[a] From reference 1. C, circular; L, linear.

ภาพที่ 2.4 ภาพรวมของอนุกรมวิธานแบคเทอริโอเฟจ

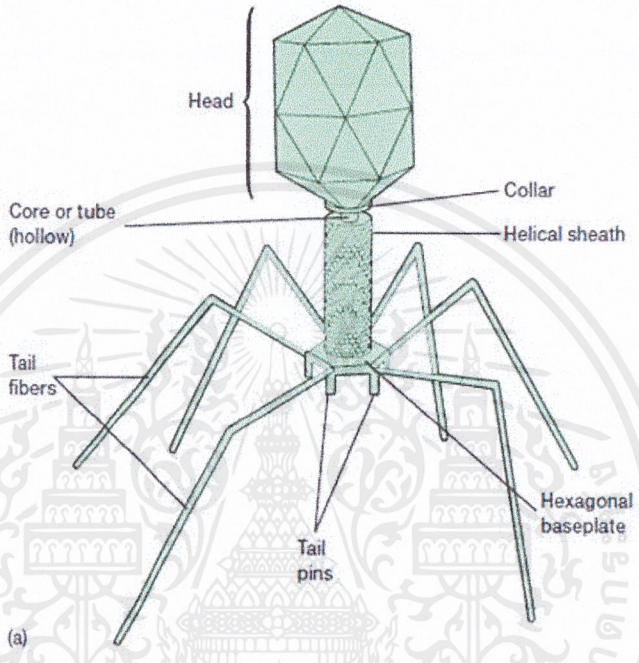
ที่มา: Hans-W. Ackermann, 2011

2.3.4 สัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจมีสารพันธุกรรมที่สามารถเป็นได้ทั้งดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) แต่ส่วนใหญ่นั้นจะพบเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) (Prescott, 2002) แบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายกับลูกอ๊อด ประกอบด้วยส่วนหลักๆ คือ ส่วนหัวประกอบขึ้นจากโปรตีนที่ชื่อว่าแคพซิด (capsid) เป็นส่วนที่ใช้ห่อหุ้มสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเอาไว้ ส่วนหัวนั้นมีทั้งลักษณะที่เป็นทรงกลม (spherical), ทรงกระบอก (cylindrical) หรือทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral) ส่วนหางของ (tail) จะมีชีทหุ้มหรือไม่มีก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Adams, 1959) นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจยังมีส่วนประกอบอื่นๆอีกอย่างเช่น ปลอกคอ (collar), เบส เพลท (base plate), เทล พิน (tail pin) และเทล ไฟเบอร์ (tail fiber) ซึ่งลักษณะเหมือนขา และเป็นส่วนที่ใช้จับเข้ากับรีเซพเตอร์ (receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านอย่างจำเพาะ (Prescott, 2002)

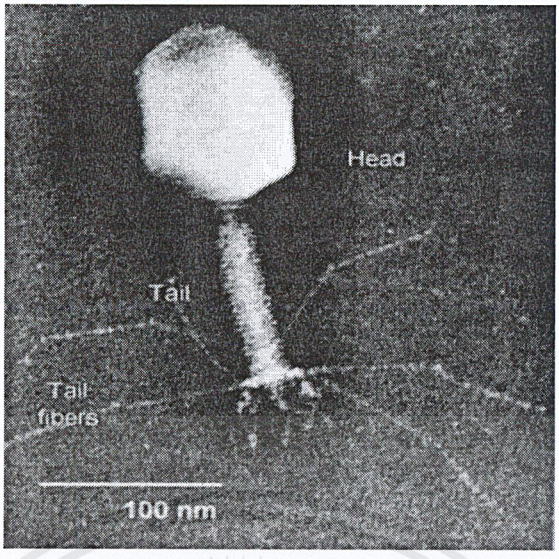


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ T4

ที่มา: Prescott, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 2.6 ลักษณะของแบคเทอริโอเฟจ T4 ที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM ที่มา: https://www.google.co.th (17 สิงหาคม 2556)

2.3.5 สรีระวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ

2.3.5.1 The One-Step Growth Experiment

ในปี ค.ศ 1939 Max Delbrück และ Emory Ellis ได้ออกแบบการทดลองที่เกี่ยวกับการเจริญของแบคเทอริโอเฟจในเซลล์เจ้าบ้าน เรียกการทดลองนี้ว่า The One-Step Growth พวกเขาใช้เชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อแบคเทอริโอเฟจ เช่น *E.coli* ผสมกับอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเจริญของแบคเทอริโอเฟจในเซลล์เจ้าบ้านนั้น แบ่งออกได้เป็นระยะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังนี้ (Prescott, 2002)

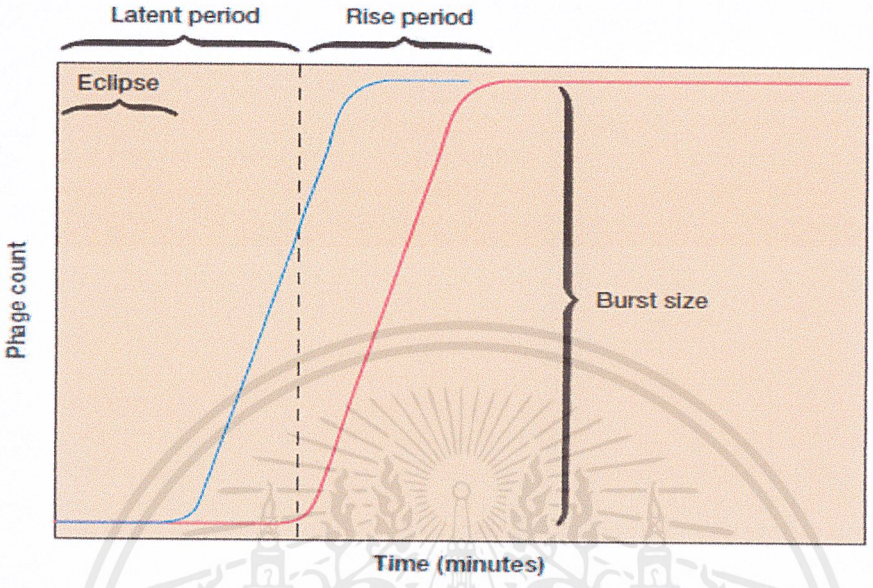
1. Latent period เป็นช่วงเวลาตั้งแต่อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจเข้าเกาะติดกับผิวเซลล์ของเจ้าบ้าน จนถึงช่วงก่อนที่จะมีการปลดปล่อยอนุภาคแบคเทอริโอเฟจออกมาจากเซลล์เจ้าบ้าน

2. Eclipse period เป็นช่วงครึ่งแรกของ latent period คือ ตั้งแต่ช่วงที่อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจเข้าเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน จนถึงช่วงเวลาก่อนที่อนุภาคของลูกหลานแบคเทอริโอเฟจ ที่อยู่ภายในเซลล์เจ้าบ้านนั้นจะสมบรูณ์ (Adams, 1959)

3. Rise period เป็นช่วงเวลาหลังจาก latent period คือ มีการแตกของเซลล์เจ้าบ้านและปลดปล่อยอนุภาคลูกหลานของแบคเทอริโอเฟจออกมา (Prescott, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
133411

ส่วน burst size นั้น คือ จำนวนอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เจ้าบ้าน 1 เซลล์ (Adams, 1959)



ภาพที่ 2.7 กราฟ One-step growth curve ของแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา: Prescott, 2002

2.3.5.2 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจมี 2 รูปแบบ คือ

1. Lytic cycle

เมื่อนำสารละลายแบคทีเรียที่ไวต่อแบคเทอริโอเฟจมาผสมกับแบคเทอริโอเฟจ 1 อนุภาค แบคเทอริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อเวลาเหมาะสมแบคเทอริโอเฟจจะทำให้เซลล์ของเจ้าบ้านแตกออกแล้วปล่อยลูกหลานแบคเทอริโอเฟจออกมา วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจในลักษณะนี้เราเรียกว่า ไลติก ไซเคิล (lytic cycle) กรณีบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ลูกหลานแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้จะเข้าไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านตัวใหม่ที่อยู่ข้างเคียงไปเรื่อยๆ จนเกิดบริเวณที่มีการแตกของเซลล์แบคทีเรียเป็นวงกว้างจนสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกบริเวณนี้ว่า พลาค (plaque) ซึ่งตามอุดมคติแล้ว พลาคหนึ่งพลาคจะเกิดขึ้นจากแบคเทอริโอเฟจเริ่มต้นเพียงอนุภาคเดียว ทำให้เราสามารถใช้การนับจำนวนพลาคในการอนุมานถึงจำนวนของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่มีในตัวอย่างของเราได้ (Adams, 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจมีดังนี้

1. การดูดซับ (Adsorption) เป็นขั้นตอนการเกาะของแบคเทอริโอเฟจกับผิวเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านอย่างจำเพาะ แบคเทอริโอเฟจจะใช้รีเซพเตอร์ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเจ้าบ้านในการเกาะติด เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดเทโคอิก (teichoic acid) และแฟลเจลลา (flagella) (Prescott, 2002) เพียงผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์แค่ส่วนเดียวก็มีโอกาสทำให้ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการเกาะติดแบคทีเรียเจ้าบ้านนั้นหมดไปได้ อีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจคือไอออนของแคลเซียม แมกนีเซียมและโซเดียม โดยหากผสมแบคเทอริโอเฟจเข้ากับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่เจริญในอาหารที่ปราศจากเกลือหรือไอออนเหล่านี้ จะไม่พบการแตก (lysis) ของเซลล์แบคทีเรีย (Adams, 1959)

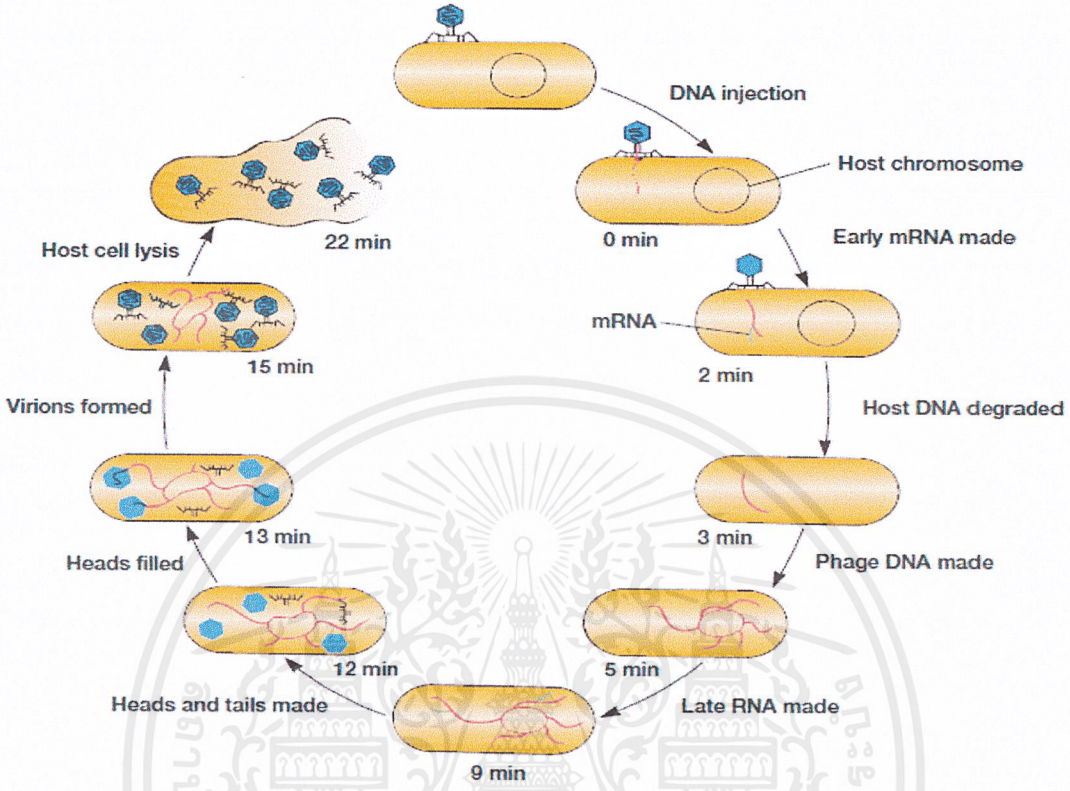
2. การเจาะแทรกซึม (Penetration) เป็นขั้นตอนการถ่ายสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่ ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียเจ้าบ้านโดยผ่านส่วนหาง (tail) ของแบคเทอริโอเฟจที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นท่อขนส่งสารพันธุกรรม

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน (DNA and protein synthesis) ไม่นานหลังจากที่สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในเซลล์ของเจ้าบ้าน การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอและโปรตีนของเจ้าบ้านจะถูกหยุดลงและเปลี่ยนไปเป็นการสร้างส่วนประกอบต่างๆของแบคเทอริโอเฟจแทน

4. การประกอบกันของอนุภาคไวรัส (Assembly) หลังจากสังเคราะห์สารพันธุกรรมและโปรตีนที่จำเป็นต่างๆแล้ว จะมีการประกอบกันของส่วนต่างๆเหล่านี้จนได้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่สมบูรณ์ ส่วนของสารพันธุกรรมนั้นจะถูกบรรจุลงในส่วนหัวของแบคเทอริโอเฟจ

5. การปลดปล่อยอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ (Release) แบคเทอริโอเฟจจะใช้เอนไซม์ที่ชื่อว่า โฮลิน (holin) ในการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านเกิดการฉีกขาด และใช้เอนไซม์เอนโดไลซิน (endolysin) ในการทำลายเปปติโดไกลแคนของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เซลล์ของเจ้าบ้านเกิดรูและเซลล์แตกในที่สุด กรณีของแบคเทอริโอเฟจ T4 จะมีจำนวนลูกหลาน (progeny) ที่ถูกปล่อยออกมาราวๆ 300 อนุภาค (Prescott, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 วงจรชีวิตแบบไลติก ไซเคิล (lytic cycle) ของแบคเทอริโอเฟจ T4

ที่มา: Prescott, 2002

2. Lysogenic phage หรือ temperate phage

จากข้อความข้างต้น เราได้กล่าวถึงแบคเทอริโอเฟจที่มีความสามารถในการแตกเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านมาแล้ว แต่มีดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ อีกหลายชนิดที่ต่างออกไปคือ หลังจากขั้นตอนการดูดซับและการเจาะแทรกซึมสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านแล้ว จีโนมของแบคเทอริโอเฟจจะไม่มีการไปควบคุมและทำลายเซลล์เจ้าบ้าน (Prescott, 2002) แต่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปแทรกอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียเจ้าบ้านแทน โดยวิธีเจเนติก รีคอมบิเนชัน (genetic recombination) เรียกระยะนี้ว่า ไลโซจีนี (lysogeny) และเราจะเรียกจีโนมของแบคเทอริโอเฟจระยะนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) เมื่อมีการจำลองตัวของโครโมโซมแบคทีเรียเจ้าบ้าน โปรเฟจก็จะจำลองตัวไปพร้อมกับโครโมโซมของแบคทีเรียเจ้าบ้านด้วย เหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมเจ้าบ้าน ซึ่งแบคทีเรียเจ้าบ้านเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรเฟจ แฝงอยู่ด้วยเช่นกัน กระบวนการนี้เรียกว่า ไลโซจีไนเซชัน (lysogenization) แบคทีเรียที่มีโปรเฟจแฝงอยู่เรียกว่า ไลโซเจน (lysogen) หรือไลโซจีนิก แบคทีเรีย (lysogenic bacteria) (อัญชุลี, 2555) ซึ่งในบางโอกาสหากโปรเฟจที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้านได้รับการกระตุ้น จะทำให้เกิดการจำลองตัวของแบคเทอริโอเฟจ เกิดเป็นวงจรชีวิตแบบไลติก ไซเคิล และเกิดการแตกเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในที่สุด (Talaro และคณะ, 2012)

2.3.5.3 การเป็นตัวกลางในการส่งต่อสารพันธุกรรม

ในขั้นตอนของการบรรจุสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจลงในส่วนหัวก่อนที่จะมีการแตกเซลล์แบคทีเรียนั้น บางครั้งอาจมีสารพันธุกรรมของแบคทีเรียปะปนเข้าไปในส่วนหัวของแบคเทอริโอเฟจด้วย หรือเข้าไปแทนที่สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจทั้งหมด ซึ่งสารพันธุกรรม (รวมถึงยีนด้วย) ของแบคทีเรียดังกล่าวจะถูกส่งต่อไปยังแบคทีเรียเซลล์อื่นๆได้ (Tamarin, 2001) โดยมีแบคเทอริโอเฟจเป็นตัวกลาง เราเรียกแบคเทอริโอเฟจที่เป็นตัวกลางนี้ว่า ทรานซ์ดิวซิง พาติเคิล (transducing particle) และเรียกกระบวนการนี้ว่า ทรานซ์ดักชัน (transduction) ซึ่งแบ่งออกได้ 2 ประเภทดังนี้ (Maloy, 1994)

1. ทรานซ์ดักชันแบบพิเศษ (Specialized transduction)

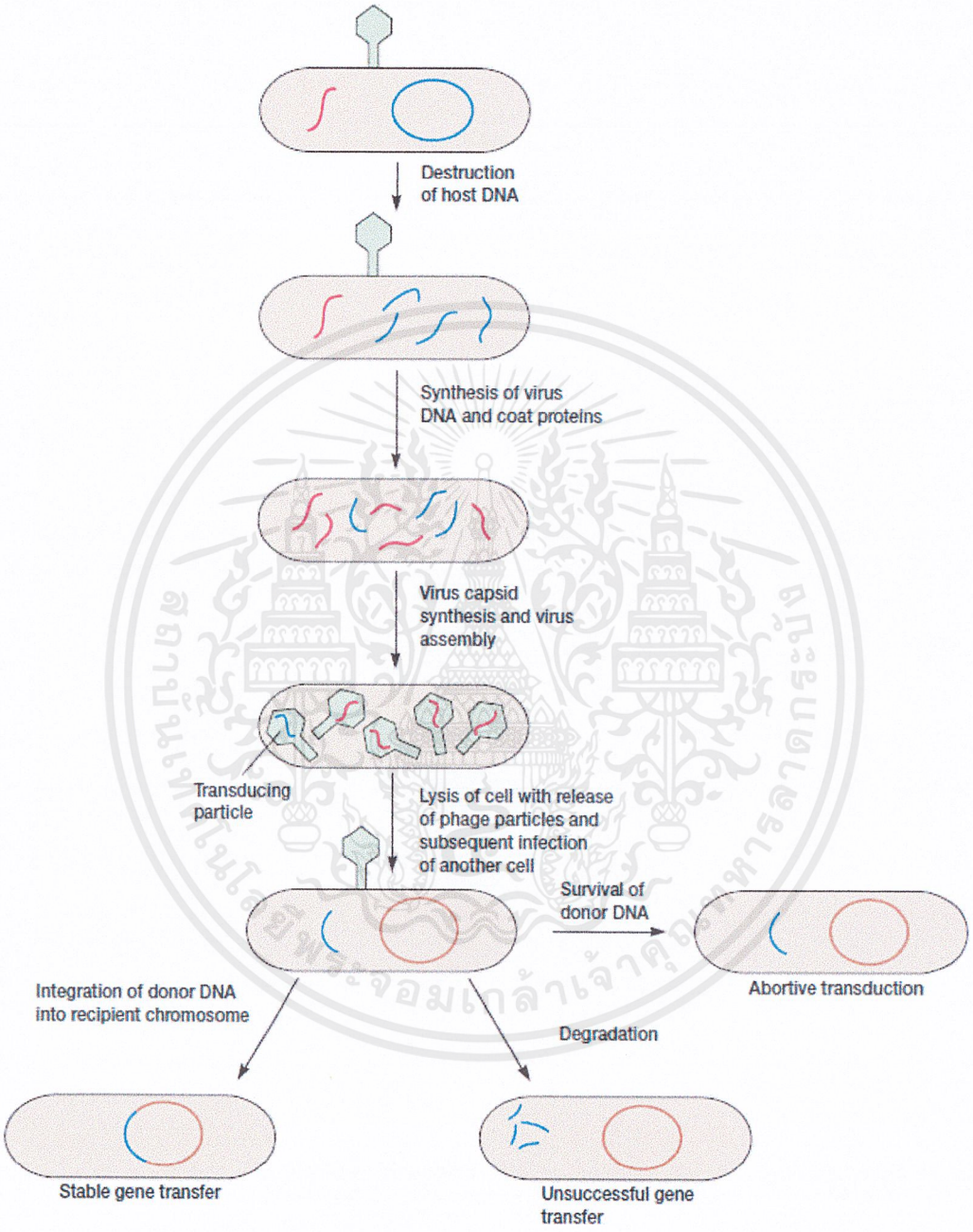
เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นกับแบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซจีนี โดยเกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนการตัดบ่วงดีเอ็นเอ (looping out process) ของโปรเฟจ (prophage) ออกจากโครโมโซมของแบคทีเรีย โดยจะมีเพียงดีเอ็นเอหรือยีนของแบคทีเรียที่อยู่บริเวณข้างเคียงกับจีโนมของแบคเทอริโอเฟจเท่านั้นที่จะถูกตัดออกไปพร้อมกับจีโนมของแบคเทอริโอเฟจ (Prescott, 2002 และ Tamarin, 2001)

2. ทรานซ์ดักชันแบบทั่วไป (Generalized transduction)

ค้นพบโดย Zinder และ Lederberg เกิดขึ้นในขั้นตอนการรวมกันของอนุภาคไวรัส (assembly) และสามารถเกิดได้ทั้งกับแบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติก และวงจรชีวิตแบบไลโซจีนี เป็นกระบวนการที่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผิดพลาดเหมือนกับแบบแรก แต่จะเกิดจากการสุ่มชิ้นส่วนโครโมโซมของแบคทีเรียเจ้าบ้านเข้าไปในส่วนหัวของแบคเทอริโอเฟจมากกว่า โดยแบคเทอริโอเฟจบางอนุภาคที่เกิดขึ้นอาจมีเพียงสารพันธุกรรมแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งจะทำให้อนุภาคแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นตัวกลาง (carrier) ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

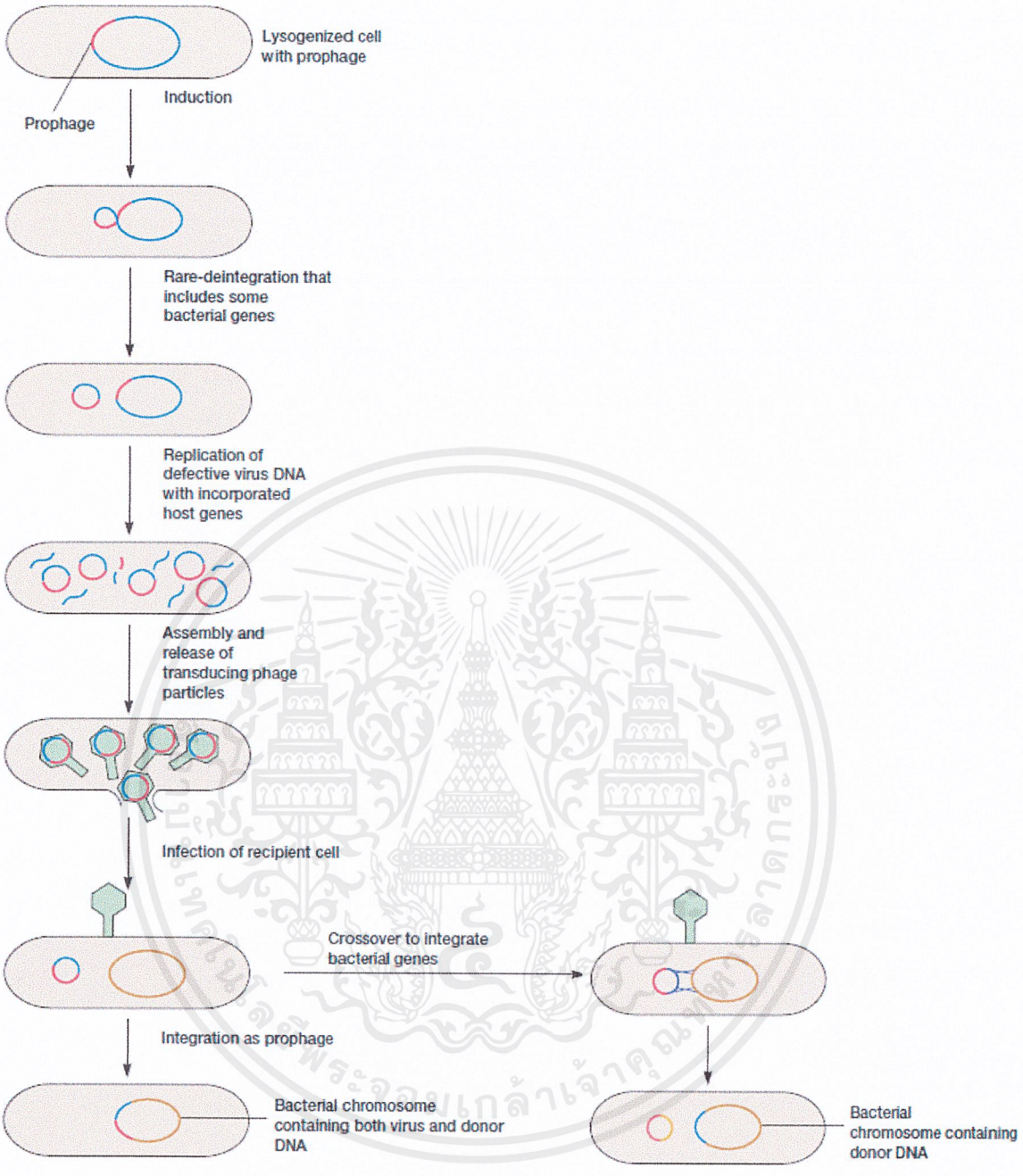
การส่งต่อสารพันธุกรรมให้แบคทีเรียแทนที่จะเป็นการส่งต่อพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ (Prescott, 2002 และ Tamarin, 2001)



ภาพที่ 2.9 ทรานซ์ดักชันแบบทั่วไป (generalized transduction)

ที่มา: Prescott, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 ทรานซ์ดักชันแบบพิเศษ (specialized transduction)

ที่มา: Prescott, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*

1. De Oliveira และคณะ (2011) ได้ทำงานวิจัยเพื่อตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในนมที่บริโภคในประเทศบราซิล ใช้น้ำนมดิบ 50 ตัวอย่าง และน้ำนมพาสเจอไรซ์ 20 ตัวอย่าง โดยนำน้ำนมแต่ละตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร และทำการเจือจางในสารละลายเปปโตน ซาลีน (peptone saline) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 10^0, 10^{-2} และ 10^{-4} มาเกลี่ย (spread plate) ลงบนจานอาหารที่มี Baird Parker Agar (BPA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ถึง 48 ชั่วโมง จากนั้น เลือกโคโลนีที่มีสีดำเป็นเงา มีวงแหวนขุ่น และล้อมรอบด้วยรัศมีใส นำไปลงในหลอดที่มี BHI แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบด้วยโคแอกกูเลส (coagulase test) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร BHI ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปราศจากเชื้อที่มีพลาสมาของกระต่าย (rabbit plasma) อยู่ 0.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และดูการแข็งตัวของเลือดถ้าให้ผลเป็น 3+ และ 4+ สามารถยืนยันได้ว่าเป็น *S. aureus* โดยสามารถดูผลได้ ดังนี้

1+ คือ มีการแข็งตัวที่ไม่สมบูรณ์เกิดขึ้นเล็กน้อย

2+ คือ มีการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นเล็กน้อย

3+ คือ มีการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นมาก

4+ คือ มีการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นสมบูรณ์และไม่เปลี่ยนกลับ

จากการวิจัยพบว่า 34 ตัวอย่าง หรือ ร้อยละ 68 ของน้ำนมดิบ 50 ตัวอย่าง และ 6 ตัวอย่าง หรือ ร้อยละ 30 ของน้ำนมพาสเจอไรซ์ 20 ตัวอย่าง ที่พบการปนเปื้อน *S. aureus*

2. Normanno และคณะ (2005) ได้ทำงานวิจัยเพื่อตรวจหาเชื้อ staphylococci ที่ให้ผลโคแอกกูเลส (coagulase) เป็นบวก และ *S. aureus* จากอาหารหลายชนิดจากตลาดในประเทศอิตาลี และจากผิวหน้าอาหารจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยใช้ทั้งหมด 11,384 ตัวอย่าง นำตัวอย่างอาหารแต่ละตัวอย่างมา 25 กรัม และทำการเจือจางในสารละลายเปปโตนวอเตอร์ (peptone water) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร และตีป่นในเครื่องตีป่น แล้วนำตัวอย่างมา spread plate ลงบนจานอาหารที่มี Baird Parker RPF Agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีสีเทาดำ ล้อมรอบด้วยรัศมีที่มีสีขุ่นๆ ไปทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส ย้อมสีแกรม และทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ถ้าให้ผลเป็นบวกจะทำการจัดจำแนกต่อโดยใช้ระบบ API Staph จากงานวิจัยพบว่า 1,971 ตัวอย่าง หรือ ร้อยละ 17.3 ของตัวอย่างอาหารทั้งหมดเป็น staphylococci ที่ให้ผลโคแอกกูเลสเป็นบวก และได้นำ staphylococci ที่ให้ผลโคแอกกูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(coagulase) เป็นบวก 541 สายพันธุ์ มาจำแนกได้เป็นเชื้อ *S. aureus* จำนวน 537 สายพันธุ์ ซึ่งนำไปทดสอบชนิดของแอนเทอโรท็อกซิน (staphylococcal enterotoxins) ต่อไป

3. Peles และคณะ (2007) ได้ทำงานวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยได้ทำการแยก *S. aureus* จาก 20 ฟาร์ม ในประเทศฮังการี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมจากแต่ละฟาร์มที่แต่ละเวลา ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเก็บน้ำนมหนึ่งในสี่ของนมจากเต้านมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ แล้วบ่มบน Columbia Blood Agar ในสภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการแยก *S. aureus* จากน้ำนมที่อยู่ในถัง โดยใช้อาหาร BPA ที่เติม Egg Yolk Tellurite Emulsion แล้วบ่มในสภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมงและแยก *S. aureus* โดยการเกลี่ยด้วยไม้พันสำลี (swab) จากสิ่งแวดล้อม เช่น ถ้วยน้ำนม ถังน้ำนม ท่อทิ้งน้ำนมในฟาร์ม และทำการจัดจำแนกขั้นพื้นฐาน ดังนี้ คือ ลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรม การสร้างเอนไซม์คะตะเลส การรีดิวซ์เทลลูไรท์ (tellurite reduction) การย่อยเลซิติน (lecithinase activity) คุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic properties) ความสามารถในการทำให้เลือดแข็งตัว (coagulation) และการสร้างคลัมปิงแฟคเตอร์ (clumping factor)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องแบคเทอริโอเฟจ

1. Bueno และคณะ (2012) ได้ศึกษาการยับยั้ง *S. aureus* ด้วยแบคเทอริโอเฟจ ในเนยแข็งประเภท fresh cheese และ hard cheese โดยใช้แบคเทอริโอเฟจ vB_SauS-phi-IPLA35 และ vB_SauS-phi-IPLA88 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมของฟาร์มนมมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดยมีปัจจัยในทดสอบคือจะใช้น้ำนมพาสเจอไรซ์ที่มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* สายพันธุ์ Sa9 (ประมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร) และเติมค็อกเทลของแบคเทอริโอเฟจ (phage cocktail) ทั้งสองลงไป (ประมาณ 10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร) ส่วนปัจจัยควบคุมเป็นเนยแข็งที่ไม่มีการเติมแบคเทอริโอเฟจลงไป การมีอยู่ของแบคเทอริโอเฟจในเนยแข็งทั้งสองประเภททำให้ *S. aureus* ที่มีชีวิตอยู่ในช่วงการสร้างเคิร์ด (curding) ของเนยแข็ง มีจำนวนลดลงอย่างมาก ในกรณีของเนยแข็งประเภท fresh cheese ที่ใช้ทดสอบ จำนวนของ *S. aureus* ลดลงเหลือ 3.38 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 3 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับเนยแข็งที่ใช้เป็นตัวควบคุม และจะไม่สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม staphylococcal เมื่อจบกระบวนการเกิดเคิร์ด (เวลา 24 ชั่วโมง) ทั้งในเนยแข็งที่เป็นตัวควบคุมและตัวที่ใช้ทดสอบ และไม่มีการเจริญของเชื้ออีกเมื่อนำไปเก็บแช่เย็น ในกรณีของเนยแข็งประเภท hard cheese การมีอยู่ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอเฟจทำให้จำนวนของเชื้อกลุ่ม staphylococcal ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในกระบวนการทำเคิร์ดจำนวน *S. aureus* ลดลงเหลือ 4.64 log CFU ต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับเนยแข็งที่ใช้ควบคุม แต่หลังจากจบกระบวนการบ่มแข็งของ hard cheese แล้ว ยังคงมี *S. aureus* เหลืออยู่ในเนยแข็งที่ใช้ทดสอบ 1.24 CFU ต่อกรัม และยังพบในเนยแข็งที่เป็นตัวควบคุมประมาณ 6.73 log CFU ต่อกรัม ส่วนสายพันธุ์ต่างๆของหัวเชื้อที่ใช้ในการทำเนยแข็งนั้นไม่ได้รับผลกระทบจากการใช้แบคเทอริโอเฟจทั้งในกระบวนการผลิตเนยแข็งและการเก็บรักษาเนยแข็ง ซึ่งดูได้จากผลของลักษณะทางกายภาพและเคมีของเนยแข็งที่คล้ายกับเนยแข็งในปัจจัยควบคุม

2. Gill และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจ K กับ *S. aureus* สายพันธุ์ Newbould 305 ในหางน้ำนมดิบของโคและซีรัม (serum) ในการบ่ม *S. aureus* กับแบคเทอริโอเฟจในหางน้ำนมพบว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อการไลซีสโดยแบคเทอริโอเฟจได้ดีเมื่อนำไปเลี้ยงในหางน้ำนมรวมทั้งในซีรัมระดับการยับยั้งการจับระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับเซลล์เจ้าบ้านมีความแตกต่างกันในหางน้ำนมแต่ละตัวอย่างที่ได้จากสัตว์ 23 ชนิด ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลมาจากส่วนประกอบโปรตีนที่อยู่ในเวย์ เมื่อส่วนประกอบเหล่านี้ได้มีการควบคุมด้วยความร้อน โปรติเอส (protease) และอัลตร้าฟิลเตอร์ (ultrafilter) ทำให้การยับยั้งการจับกันระหว่างแบคทีเรียเจ้าบ้านกับแบคเทอริโอเฟจนั้นหมดไป เมื่อผิวเซลล์ของ *S. aureus* มีการสัมผัสกับหางน้ำนม พบว่าการจับของแบคเทอริโอเฟจลดลงด้วย จากกล้องจุลทรรศน์จะพบว่ามีการยึดติดกันของวัตถุที่อยู่นอกเซลล์บนผิวของเซลล์ *S. aureus* ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในเวย์ การแยกส่วนจากโครมาโทรกราฟฟีของเวย์พบว่าโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งนี้มีสัดส่วนของน้ำหนักโมเลกุลที่สูง และไปกีดกันบริเวณที่แบคเทอริโอเฟจจะจับกับผิวเซลล์ได้

3. Gill และคณะ (2006) ได้ศึกษาการนำแบคเทอริโอเฟจ K มาใช้ในการยับยั้ง *S. aureus* ในโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยนำโคที่เป็นโรคในระยะที่ไม่แสดงอาการ (subclinical) ทั้งหมด 24 ตัว จากเมือง Holstein มาทำการรักษาด้วยสารละลายแบคเทอริโอเฟจที่มีจำนวน 1.25×10^{12} PFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มาเปรียบเทียบกับการรักษาโดยใช้น้ำเกลือโดยทำการตรวจผลทุกๆ วันเป็นเวลา 5 วัน พบว่ากลุ่มโคที่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยสารละลายแบคเทอริโอเฟจมีประมาณ 16.7% แต่พบว่าน้ำเกลือไม่สามารถรักษาโคที่ติดเชื้อได้เลย การศึกษาผลกระทบของการฉีดแบคเทอริโอเฟจเข้าทางต่อมน้ำนมของโค พบว่าการฉีดสารละลายแบคเทอริโอเฟจเข้มข้นที่เตรียมได้จากการกรองหรือการใช้วิธี CsCl gradient ในโคที่มีสุขภาพดีซึ่งอยู่ในช่วงระยะการให้นม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของโซมาติกเซลล์ และหลังจากฉีดสารละลายแบคเทอริโอเฟจผ่านไปแล้ว 36 ชั่วโมง แบคเทอริโอเฟจจะถูกปลดปล่อยออกมาสู่น้ำนม

4. Garcia และคณะ (2006) ศึกษาถึงความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจในการควบคุมการเจริญของ *S. aureus* ในกระบวนการผลิตเคิร์ด (curd) จากนม ซึ่งแบคเทอริโอเฟจที่ใช้นั้นมาจากเทมเพอเรทเฟจ (temperate phage) คือแบคเทอริโอเฟจ H5 และแบคเทอริโอเฟจ A72 ซึ่งแยกจากน้ำนมดิบและถูกทำให้การกลายพันธุ์ได้เป็นไลติกแบคเทอริโอเฟจ (lytic phage) คือ แบคเทอริโอเฟจ 88 และแบคเทอริโอเฟจ 35 ซึ่งพวกเขานำแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้มาทำค็อกเทล (cocktail) โดยใช้ค่า MOI เท่ากับ 100 พบว่าที่ค่า MOI นี้แบคเทอริโอเฟจสามารถกำจัด *S. aureus* เข้มข้น 3×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่อยู่ในนมจืด UHT ได้จนหมดสิ้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และหากใช้กรดในการสร้างเคิร์ดจะไม่พบเชื้อ *S. aureus* อยู่เลยหลังจากบ่มกับแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลเป็นเวลา 4 ชั่วโมง 25 องศาเซลเซียส ส่วนในกรณีการสร้างเคิร์ดโดยใช้เอนไซม์เลนนิน พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ถูกกำจัดไปจนหมดภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากบ่มกับแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลเหล่านี้เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่าอาจจะสามารถนำไลติกแบคเทอริโอเฟจ ที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์เหล่านี้ ไปใช้เป็นตัวป้องกันอาหารเน่าเสียทางชีวภาพ (biopreservatives) ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์นมได้

5. Hsieh และคณะ (2010) ได้ทำงานวิจัยเพื่อค้นหาทางเลือกใหม่ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (MRSA) โดยทำการแยกและศึกษาลักษณะของไลติก สแตป-ไฟโลแบคเทอริโอเฟจ (lytic staphylophage) หรือ Stau2 ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) ประมาณ 134.5 กิโลเบส และมีลักษณะคล้ายกับแบคเทอริโอเฟจในตระกูล *Myoviridae* มีระยะ latent เท่ากับ 25 นาที มี burst size เท่ากับ 100 PFU ต่อเซลล์ ซึ่งทำให้แบคเทอริโอเฟจมีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวได้ เท่ากับ 6×10^{10} PFU ต่อ มิลลิลิตร แบคเทอริโอเฟจสามารถอยู่ได้ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 5 ถึง 13 ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิห้อง ได้ 4 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ -85 °C ได้มากกว่า 2 ปี ในขณะที่จำนวนของแบคเทอริโอเฟจจะลดลงเหลือ 1×10^9 จาก 2×10^{12} PFU ต่อมิลลิลิตร แม้ว่าจะเก็บไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 36 เดือน แบคเทอริโอเฟจ Stau2 สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* จากโรงพยาบาลในไต้หวันได้ถึงร้อยละ 80 โดยมีการทำลายอย่างสมบูรณ์ในการทดสอบภายใน 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่าเป็นเพียง *S. aureus* ที่จำเพาะต่อแบคเทอริโอเฟจ เพราะไม่พบว่าเป็นไลติกแบคเทอริโอเฟจในการทดสอบกับเชื้อ staphylococci ที่ให้ผลโคแอกกูแลส (coagulase) เป็นลบ แบคเทอริโอเฟจ Stau2 มีช่วงของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *S. aureus* กว้างกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอเฟจ เค (phage K) ร้อยละ 47 ซึ่งสามารถทำลายเชื้อกลุ่ม staphylococcal อื่นๆได้หลายสปีชีส์ ในการทดลองกับหนูพบว่าแบคเทอริโอเฟจ Stau2 สามารถป้องกันหนูจากการเข้าทำลายจนตายได้ร้อยละ 100 เมื่อ MOI เป็น 10 เมื่อทดสอบกับ *S. aureus* S23 ทำให้พิจารณาได้ว่าแบคเทอริโอเฟจ Stau2 เป็นตัวเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาโดยใช้แบคเทอริโอเฟจ หรือการเติมลงในอาหารในอุตสาหกรรมอาหาร

6. Kwiatek และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาแบคเทอริโอเฟจ MSA6 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจตัวใหม่ที่แยกได้จากน้ำนมของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยทำการทดลองต่างๆดังนี้ ทดสอบถึงความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจกับเจ้าบ้านแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิลซิลลินหรือ สายพันธุ์ MRSA 27 กับเชื้อ *Staphylococcus* sp. ชนิดอื่นๆเช่น *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* พบว่า แบคเทอริโอเฟจ MSA6 ความสามารถเข้าทำลายเชื้อ MRSA ได้เกือบทุกสายพันธุ์ และไม่เข้าทำลายเชื้อ staphylococcus ชนิดอื่นเลย ซึ่งจากการทดสอบถึงของความร้อนและค่าพีเอชที่มีผลต่อแบคเทอริโอเฟจในการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าแบคเทอริโอเฟจยังสามารถเข้าทำลายเซลล์เจ้าได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 37 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบแบคเทอริโอเฟจเหลืออยู่เลยหลังจากที่ให้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรือ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และแบคเทอริโอเฟจ MSA6 ยังทนต่อพีเอช ตั้งแต่ 4 ถึง 10 แต่จำนวนแบคเทอริโอเฟจจะลดลงอย่างมากหากค่าพีเอชต่ำหรือสูงกว่านี้

7. Matsuzaki และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาการทำลาย *S. aureus* ของแบคเทอริโอเฟจในหนูที่เกิดการติดเชื้อที่ช่องท้อง พบว่าเมื่อนำแบคเทอริโอเฟจ MR11 ที่ผสมกับ *S. aureus* ด้วยสัดส่วนของแบคเทอริโอเฟจกับเชื้อเจ้าบ้าน (MOI) $\geq$ 0.1 จะสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ เมื่อมีจำนวนแบคเทอริโอเฟจมากขึ้นเรื่อยๆ จำนวนของ *S. aureus* ก็จะลดลงไปเรื่อยๆจนหมด จึงเป็นผลที่ช่วยสนับสนุนประสิทธิภาพของการนำ phage therapy มาใช้ยับยั้ง *S. aureus* ที่เป็นอันตรายต่อหนูได้

8. Slanetz และ Jawetz (1940) ศึกษาเกี่ยวกับการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้เอนไซม์เรทเนทในการทำให้เกิดเคิร์ด แล้วบ่มต่ออีก 4 วัน แยกเวย์ออกโดยการกรอง จากนั้นนำเวย์ (หรือฟิลเตรท) ที่ได้ไปทดสอบถึงการมีอยู่ของแบคเทอริโอเฟจโดยใช้เชื้อ *Staphylococcus* sp. สายพันธุ์ที่คาดว่าไวต่อแบคเทอริโอเฟจ (โดยหากใช้ฟิลเตรทจากน้ำนมดิบที่เพิ่งได้จากการเก็บตัวอย่างใหม่ๆจะไม่มีทางพบแบคเทอริโอเฟจได้เลย) ซึ่งผลการทดลองพบว่ามีแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ 7 ตัว จากทั้งหมด 20 ตัว และพบว่าแบคเทอริโอเฟจบางชนิดที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิในการบ่ม 37 องศาเซลเซียส จนเกือบไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลือกิจกรรมใดๆ แต่หากบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอเฟจเหล่านี้จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น โดยแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นั้นมีลักษณะพลาค เป็นวงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 430 ถึง 470 ไมโครเมตร

9. S. O'Flaherty และคณะ (2005) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* DPC5645 (เป็นสายพันธุ์ก่อโรคเต้านมอักเสบในโค) ในอาหารชนิดต่างๆ เช่น BHI broth, นมที่ผ่านการให้ความร้อนมาแล้ว (heat-treated milk), น้ำนมดิบ (raw milk), เวย์ (whey) และ เวย์ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว (heat-treated whey) จากนั้นเติมแบคเทอริโอเฟจลงในอาหารแต่ละชนิด พบว่าน้ำนมดิบและเวย์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนนั้นมีการเข้าเกาะของแบคเทอริโอเฟจกับเซลล์เจ้าบ้านได้น้อยมาก เนื่องจากในอาหารเหล่านี้พบแอนติบอดี (antibody) หรือ อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ที่จำเพาะกับเชื้อ *S. aureus* DPC5645 แอนติบอดีเหล่านี้จะจับกับผิวเซลล์ของ *S. aureus* DPC5645 เอาไว้ ทำให้เป็นการขัดขวางเข้าเกาะและการทำลายเซลล์เจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจ

10. Tanji และคณะ (2009) ได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจ 52 ชนิด จากน้ำเสียของโรงงานบำบัดน้ำเสียของเทศบาลในกรุงโตเกียวและทำการศึกษาถึง บรอดโฮสต์เรนจ์ (broad host range) ของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดที่มีต่อเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำนมดิบของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้วิธีการ spot test และมีแบคเทอริโอเฟจ 2 ชนิด ที่นำไปวิเคราะห์ต่อ คือ แบคเทอริโอเฟจ SA039 มีโฮสต์เรนจ์กว้างที่สุด และสร้างพลาคใสบน *S. aureus* ได้ 13 จาก 15 ไอโซเลท ขณะที่แบคเทอริโอเฟจ SA012 สร้างพลาคใสบน *S. aureus* ได้ 8 จาก 15 ไอโซเลท และพวกเขาได้ศึกษาแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้มีขนาดที่ใกล้เคียงกันและเป็นสมาชิกของตระกูล *Myoviridae* จากคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ SA039 และ SA012 ทำให้อาจจะสามารถนำแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้ไปใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคได้

11. Tseng และคณะ (2010) ทำการวิจัยเกี่ยวกับการทำลายเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน โดยใช้แบคเทอริโอเฟจ Stau2 เป็นหนึ่งในทางเลือกที่จะใช้ทำลายเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ แบคเทอริโอเฟจ Stau2 มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ยาวประมาณ 134.5 คู่เบส และมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกับไวรัสในตระกูล *Myoviridae* แบคเทอริโอเฟจชนิดนี้มีช่วง latent period ประมาณ 25 นาที และมี burst size อยู่ที่ 100 PFU ต่อ 1 เซลล์ที่ถูกทำลาย และมีความเสถียรที่ค่าพีเอชระหว่าง 5 ถึง 13 ในนอร์มอล ซาลีน (normal saline) ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างถึง 4 สัปดาห์ และ อยู่ได้ถึง 2 ปี ที่อุณหภูมิ -85 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอเฟจ Stau2 สามารถทำลายเซลล์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. aureus ได้ถึง 164 จาก 205 ไอโซเลท (ร้อยละ 80) ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในไต้หวัน โดยส่วนใหญ่แล้วแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้จะแตกเซลล์ *S. aureus* ได้อย่างสมบรูณ์ภายใน 3 ชั่วโมงและมีโฮสต์เรนจ์ที่กว้าง อีกทั้งในการทดลองนี้แบคเทอริโอเฟจ Stau2 ยังสามารถช่วยป้องกันไม่ให้หนูตายจากการติดเชื้อ *S. aureus* S23 ได้เมื่อใช้ MOI เท่ากับ 10 จากผลการทดลองเหล่านี้ อาจจะสามารถนำแบคเทอริโอเฟจ Stau2 มาใช้ประโยชน์ในด้านเฟจเทอราพีหรือเติมลงในอาหารได้

12. Wilkinson และ Holmes (1978) พบว่าความสามารถในการเข้ายึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจกับเจ้าบ้าน *S. aureus* ที่มีแคปซูล (capsule) นั้นมีความประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าการเข้ายึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจกับเจ้าบ้านที่ไม่มีแคปซูลและพวกเขาได้เสนอว่าแคปซูลนั้นมีหน้าที่เป็นตัวขัดขวางการจับของแบคเทอริโอเฟจกับรีเซพเตอร์ (receptor) ซึ่งก็คือ กรดเทโคอิก (teichoic acid) บนผนังเซลล์ของเจ้าบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish, Union Science Co.,Ltd., Thailand)
2. หลอดทดลอง (Test Tube, PYREX®, USA)
3. ปิเปตต์แก้ว (Pipette, HBG, Germany) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette, GILSON, France) ขนาด 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
5. ทิป (Tip, ExtraGene Inc., Taiwan) ขนาด 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
6. ปากคีบ (Forceps) (MIRA Germany stainless, Germany)
7. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
8. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
9. ไม้พันสำลี
10. ตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร (CORNING®, Germany)
11. หลอดหยด (Pasteur Pipette)
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
13. แท่งแก้วงอ (Spreader)
14. บีกเกอร์ (Beaker, PYREX®, USA) ขนาด 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
15. หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge Tube, Becton Dickinson, USA)
16. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube, ExtraGene Inc., Taiwan)
17. ถุงตีป่น (Stomacher Bag)
18. ขวดแก้ว (Duran Bottle, SCHOTT DURAN®, Germany) ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
19. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask, ISOLAB, Germany) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
20. ขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21. ช้อนตักสาร (Spatula)
22. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
23. คิวเวทท์พลาสติก (Plastic cuvette, PYREX®, USA)
24. กระจกปิดสไลด์ (Slide glass)
25. กระบอกฉีดยา (Syringe, NIPRO, Thailand)

3.2 เครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Airflow Cabinet, BossTech, Scientific Instrument, Thailand)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, CONTROL E2, BINDER, Germany)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave, SX-500, TOMY, USA)
4. เครื่องตีป่น (Stomacher, BAGMIXER ® 400, Interscience, France)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, PH200&PH500, First Clean Corporation, USA)
6. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound Microscope)
7. เครื่องผสม (Vortex, VORTEX-2 GENIE, Scientific Industries, USA)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Z383K, HERMLE, Germany)
9. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker, Gallenkamp, Japan)
10. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, ULM 600, memmert, Germany)
11. เครื่องวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (Spectrophotometer, GENESYS 10S UV-VIS, Thermo scientific, USA)
12. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (PG5002, Mettler-Toledo Ltd., Thailand)
13. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (TE 313S, sartorius, Germany)
14. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance, BP 221S, sartorius, Germany)
15. อ่างน้ำ (Water Bath, memmert, Germany)
16. ตู้แช่แข็ง (Freezer, SANYO, Japan) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
17. ตู้เย็น (Refrigerator, SANYO, Japan)
18. เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum Pump, GE motors, USA)

3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยง

1.) เปปโตน (Peptone Powder, Sisco Reseach Laboratories (SRL), India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder Type I, TM MEDIA, India)

3.) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, MERCK, Gemany)

4.) ทริปโตน (Tryptone Powder, MERCK, Germany)

5.) สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract Powder, BIOMARK™ LABORATORIES, India)

6.) น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol, SRL, India)

7.) Tris (Molecular Biology Grade) (Vivantis, USA)

8.) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

9.) แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรท ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, CARLO ERBA reagents, France)

10.) ไดโซเดียมไฮโดรเจรฟอสเฟต (Na_2HPO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

11.) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

12.) ฟีนอลเรด (Phenol Red, MERCK, Germany)

13.) สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet) (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

14.) น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram's Iodine) (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

15.) สีซาฟรานิน (Safranin) (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

16.) น้ำมัน (Immersion Oil)

17.) สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70

18.) สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

19.) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3

20.) กลีเซอรอล (Glycerol, CARLO ERBA reagents, France)

21.) สารละลาย Saline-Magnesium (SM solution)

22.) เจลาติน (Gelatin)

23.) เอนไซม์เรนเนท (Rennet, SIGMA CHEMICAL CO., USA)

24.) อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar (BPA, SRL, India) ที่เติม Egg York Tellurite Enrichment (SRL, India)

25.) อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar (MSA) (ภาคผนวก ก)

26.) อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก)

27.) อาหารเลี้ยงเชื้อ Modifiled-M9 (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วัตถุดิบและแหล่งที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 วัตถุดิบและแหล่งที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ *S.aureus* สำหรับการทดลองครั้งนี้ มีจำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยระบุรายละเอียดได้ดังนี้

1. น้ำนมดิบได้มาจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา (สหกรณ์โคนมมวกเหล็ก, สหกรณ์โคนมไทย-เดนมาร์ค ห้วยสัตว์ใหญ่ และบริษัทโชคชัยแดรี่ฟาร์ม) และศูนย์ผลิตภัณฑ์นม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง

2. เนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมูบด หนังหมู เนื้อโคบด เนื้อโคชิ้น เนื้อไก่บด และเนื้อไก่ชิ้น ได้มาจากตลาดหัวตะเข้ อย่างละ 1 ตัวอย่าง และเนื้อหมูชิ้นจำนวน 2 ตัวอย่าง รวมเป็น 8 ตัวอย่าง

3. อาหาร ได้แก่ ก๋วยเตี๋ยวหลอด เส้นขนมจีน แซนด์วิช ส้มตำ ได้มาจากตลาดหัวตะเข้ และโรงอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อย่างละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง

4. ขนมหวาน ได้แก่ ขนมต้ม ขนมถั่วแปบ ขนมต้มไส้กล้วย และขนมเอแคลร์ ได้มาจากตลาดหัวตะเข้ และโรงอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อย่างละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง

5. อาสาสมัคร โดยทำการสุ่มนักศึกษาจำนวน 13 คน จากสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากโพรงจมูก (nasal swab) คิดเป็น 13 ตัวอย่าง

3.4.2 วัตถุดิบและแหล่งที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ สำหรับการทดลองครั้งนี้ มีจำนวนทั้งหมด 8 ตัวอย่างโดยระบุรายละเอียดได้ดังนี้

1. น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอ หมวกเหล็ก จำนวน 3 ตัวอย่าง

2. น้ำโสโครกภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง บริเวณหอพักนักศึกษา ท่อระบายน้ำภายในสถาบัน และโรงอาหาร บริเวณละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง

3. น้ำโสโครกจากคลองแสนแสบ บริเวณท่าเรือวัดเทพลีลา จำนวน 1 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. น้ำโสโครกจากท่อระบายน้ำของโรงรีดนมโค ภายในองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอหมวกเหล็ก จำนวน 1 ตัวอย่าง

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ซึ่งได้มาจากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

3.6.1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากน้ำนมดิบที่ได้จากโคนม เนื้อสัตว์ อาหาร และขนมหวาน

สำหรับตัวอย่างน้ำนมดิบ นำมาทำการเจือจางทีละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ในสารละลายเปปโตนซาลีน (peptone saline) ที่เข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้นปิเปตต์ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-4} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารแข็ง Baird Parker Agar (BPA) แล้วใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อเกลี่ย (spread) ตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับตัวอย่างเนื้อสัตว์ อาหาร และขนม นำมาตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในสารละลายเปปโตนซาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีป่น (stomacher) จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างมาทำการเจือจางทีละ 10 เท่า ปิเปตต์ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ถึง 10^{-6} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารแข็ง BPA แล้วใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากนั้นคัดเลือกโคโลนีซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง BPA โดยเลือกโคโลนีที่มีสีเทาเข้มถึงสีดำเป็นเงา นูน มีขอบชัดเจน ผิวเรียบ ขนาดโคโลนีปานกลาง มีโซนใส (clear zone) เป็นวงแหวนรอบโคโลนี โดยจะมีหรือไม่มีบริเวณขาวขุ่น (opaque zone) รอบโคโลนีก็ได้ (เชื้อ *S. epidermidis* จะเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้ไม่ดีนัก แต่สีของโคโลนีอาจพบตั้งแต่ไม่มีสีไปจนถึงสีน้ำตาลเทา และไม่มีโซนใสรอบโคโลนี และมีแบคทีเรียแกรมลบเพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดเดียวที่สามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้ คือ *Proteus miribilis* แต่จะมีโคโลนีสีน้ำตาลดำและมีลักษณะแผ่ออก (swarming)) การคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกได้ ทำโดยเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* จากอาหารแข็ง BPA ตามลักษณะที่กล่าวไว้ข้างต้นมาตัวอย่างละ 3 โคโลนี แล้วเขี่ยเชื้อ (cross streak) แต่ละโคโลนีลงบนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar (MSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA จะมีสีเหลืองและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีแดงส้มเป็นสีเหลือง (เชื้อ *S. epidermidis* จะมีโคโลนีเป็นสีชมพูและไม่เปลี่ยนสีของอาหารแข็ง MSA ส่วนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดสามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้แต่ความสามารถในการเจริญต่ำ และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเกือบทั้งหมดจะไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง MSA ได้) ทำการเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* จากอาหารแข็ง MSA มาเขี่ยลงบนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง LB (LB slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ 1 หยด จากนั้นเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง LB มาแตะลงบนหยดของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จะเกิดฟองอากาศบริเวณที่แตะเชื้อลงไป

จากนั้นทำการย้อมสีแบบแกรมกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยหยดน้ำปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาด ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง LB มาเกลี่ย (smear) ลงบนหยดน้ำ รอจนแห้งแล้วนำแผ่นกระจกสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ (fix) 2 ถึง 3 ครั้ง หรือ จนไอน้ำที่เกาะบนแผ่นกระจกสไลด์หมดไป จากนั้นจึงหยดสีคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างสีคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนซ้ำอีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วหยดเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 ลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 10 ถึง 15 วินาทีแล้วล้างเอทานอลออกด้วยน้ำ จากนั้นจึงหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีซาฟรานินออกด้วยน้ำ รอจนแห้งแล้วนำไปส่องดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากโพรงจมูก

การคัดแยกเชื้อ *S.aureus* จากโพรงจมูก ทำโดยเกลี่ยโพรงจมูก (nasal swab) ทั้งข้างซ้ายและขวาลึกประมาณ 1.5 เซนติเมตร ด้วยไม้พันสำลีที่จุ่มในสารละลายน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (normal saline) จากนั้นนำไม้สำลีดังกล่าวไปเขี่ย (simple streak) ลงบนจานอาหารแข็ง MSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงทำการคัดเลือกโคโลนีบนอาหารแข็ง MSA ที่มีสีเหลืองและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีแดงส้มเป็นสีเหลืองมาเพียงโคโลนีเดียว (ในหัวข้อนี้จะถือว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร 1 คน คือเชื้อ 1 ไอโซเลท) แล้วนำไปเขี่ยลงบนหลอดอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง LB ไปตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และย้อมสีแบบแกรม

3.6.1.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่แยกได้

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ที่แยกได้ ทำโดยเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง LB มาเขี่ย (streak) ลงบนจานอาหารแข็ง LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อจากจานอาหารแข็ง LB มา 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเหลว LB ที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยปริมาตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.6.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

3.6.2.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466

นำหัวเชื้อของแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสมาทำการเขี่ยเชื้อ โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) จุ่มลงในหลอดเก็บรักษาเชื้อ แล้วนำไปเขี่ย (streak) ลงบนจานอาหารแข็ง LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 จากจานอาหารแข็ง LB จำนวน 3 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว M9 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.2 ขั้นตอนการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466

นำหัวเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 ที่ได้จากหัวข้อที่ 3.6.2.1 ไปเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อในอาหารเหลว M9 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1, 0.3 และ 0.5 ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าความขุ่นของเซลล์ทุกๆ 20 นาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง นำค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญระหว่างค่า CFU ต่อมิลลิลิตรกับเวลาโดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของการเจริญ (ภาคผนวก ค) ในการแปลงค่าความขุ่นของเซลล์ไปเป็นค่า CFU ต่อมิลลิลิตร

3.6.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเจ้าบ้าน

3.6.3.1 การเลือกและการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน

ทำการเตรียมหัวเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 และเลือกเชื้อแบคทีเรียดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 มาทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียดังขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.6.2.1

ตารางที่ 3.1 รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีต่างๆ

วิธีที่ใช้ในการแยกเฟจ	ตัวอย่างที่ใช้	รหัสเชื้อ *S. aureus* ที่ใช้
วิธีที่ 1	น้ำเสียจากหอพักนักศึกษา	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{3,2}$
	น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{1,2}$, $S_{2,2}$, $S_{3,2}$, $M_{5,1}$
วิธีที่ 2	น้ำโสโครกจากท่อระบายน้ำภายในสถาบัน	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{3,2}$, $M_{5,1}$, N_8, $S_{1,3}$
	น้ำโสโครกจากโรงอาหารในสถาบัน	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{1,3}$, $S_{3,2}$, $M_{5,1}$, N_8
	น้ำโสโครกจากคลองแสนแสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $B_{1,3}$, $M_{5,1}$, $M_{5,3}$, $M_{6,1}$, $M_{1,3}$, $S_{7,1}$, $S_{1,2}$, $S_{1,3}$, $S_{3,2}$
	น้ำโสโครกจากโรงรีดนมโค	$B_{1,3}$, $M_{5,3}$, $M_{7,1}$, $S_{1,2}$, $M_{6,3}$
	น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{1,2}$, $S_{3,2}$, $M_{5,3}$, $M_{6,3}$, $M_{7,1}$, N_8,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		$B_{1,3}$, $F_{3,2}$
วิธีที่ 3	น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{3,3}$, $M_{5,1}$, $M_{6,1}$, $M_{7,2}$

3.6.3.2 ขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 1

เตรียมหัวเชื้อตามหัวข้อที่ 3.6.2.1 โดยเลือกแบคทีเรียเจ้าบ้านตามตารางที่ 3.1 หลังจากบ่มครบ 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อในอาหารเหลว M9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แขวนลอยเจริญอยู่ในระยะลอการิทึม (log phase) จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อให้มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ต่อมาทำการล้างเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 4,000 เท่าของแรงโน้ม-ถ่วง (g) เป็นเวลา 10 นาที ดูดตะกอนเชื้อ (pellet) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีตัวอย่างน้ำนมดิบหรือน้ำโสโครก ปริมาตร 89.9 มิลลิลิตร และอาหารเหลว M9 ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้จากการบ่มไปถ่ายลงหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ด้วยแรง 4,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำโสโครก หรือด้วยแรง 8,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำนมดิบ จากนั้นนำส่วนของของเหลวด้านบน (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ไปกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บของเหลวใสที่ได้จากการกรอง (filtrates) ไว้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ แล้วจึงทำ plaque assay ดังหัวข้อที่ 3.6.3.5 เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.3.3 ขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 2

เตรียมหัวเชื้อตามหัวข้อที่ 3.6.2.1 โดยเลือกแบคทีเรียเจ้าบ้านตามตารางที่ 3.1 หลังจากบ่มครบ 18 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำโสโครกหรือตัวอย่างน้ำนมดิบ มาเติมลงขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว M9 ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนมีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร ต่อมานำหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ แล้วเติมลงในส่วนผสมระหว่างอาหารเหลว M9 กับตัวอย่าง ให้มีค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำไปบ่มข้ามคืนที่สภาวะเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้จากการบ่มไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ด้วยแรง 4,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำโสโครก หรือด้วยแรง 8,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำนมดิบ แล้วนำส่วนใสด้านบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร เก็บของเหลวใสที่กรองได้ไว้ในภาชนะปราศจากเชื้อ จากนั้นทำ plaque assay ดังหัวข้อที่ 3.6.3.5 เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.3.4 ขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 3

เตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยเติมเอนไซม์เรนเนท (rennet) ให้เพียงพอที่จะเกิดการตกตะกอนของโปรตีนเคซีนในน้ำนม โดยปกติในการกระบวนการผลิตเนยแข็งจะเติมเรนเนท 5 ถึง 50 มิลลิลิตร ต่อน้ำนม 100 ลิตร (Eck และ Gillis, 2000) หรือประมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำนม 1 ลิตร แต่การทดลองครั้งนี้จะใช้สัดส่วนปริมาตรเอนไซม์เรนเนท 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำนมดิบ 850 มิลลิลิตร เพื่อให้แน่ใจว่าจะเกิดการตะกอนอย่างสมบูรณ์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เมื่อบ่มจนครบเวลาที่กำหนดจึงทำการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน (Whatman) เบอร์ 5 โดยใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) แล้วกรองซ้ำอีกครั้งผ่านตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บส่วนใสที่กรองได้ไว้ในภาชนะปราศจากเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อตามหัวข้อที่ 3.6.2.1 โดยเลือกแบคทีเรียเจ้าบ้านตามตารางที่ 3.1 หลังจากบ่มครบ 18 ชั่วโมง แล้วเติมหัวเชื้อลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว M9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยทำทั้งหมด 9 ขวด จากนั้นเติมส่วนใสที่กรองได้ซึ่งคาดว่าน่าจะมีแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 2, 4 และ 20 มิลลิลิตร ลงไปปริมาตรละ 3 ขวด แล้วจึงแบ่งขวดที่ได้ออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ขวด (ปริมาตร 2, 4 และ 20 มิลลิลิตร) นำขวดชุดที่ 1, 2 และ 3 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 3, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อบ่มครบตามเวลาที่กำหนด จึงนำส่วนผสมที่ได้จากการบ่มไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 5,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสด้านบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ไปกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวใสที่กรองได้ไว้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปทำ plaque assay ดังหัวข้อที่ 3.6.3.5 เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.3.5 วิธีการทำ plaque assay

นำของเหลวใสที่ได้จากการกรอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้าน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมส่วนผสมที่ได้ ลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex) แล้วเทลงบนจานอาหารแข็ง LB (bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) ซึ่งไม่มีการเติมของเหลวใสที่ได้จากการกรองลงไป จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar) ในกรณีการหาปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ จะรายงานผลในหน่วย PFU ต่อมิลลิลิตร (Plaque Forming Unit ต่อมิลลิลิตร)

3.6.3.6 การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์

ใช้ทิป (tip) ปราศจากเชื้อ เขี่ยพลาคเดี่ยวจากจานอาหารวุ้นสองชั้น ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย SM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 วินาที แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางทีละ 10 เท่า ตั้งแต่ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้วจึงนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจที่ทุกระดับความเจือจางไปทำ plaque assay ดังหัวข้อที่ 3.6.3.5 แล้วตรวจผลการเกิดพลาค (plaque) จากนั้นทำขั้นตอนทั้งหมดนี้ซ้ำอีก 4 ครั้ง เพื่อให้ได้พลาคที่บริสุทธิ์

3.6.3.7 การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ

ใช้ทิป (tip) ปราศจากเชื้อ เขี่ยพลาคเดี่ยวที่บริสุทธิ์จากจานอาหารวุ้นสองชั้นที่ได้จากหัวข้อที่ 3.6.3.6 มาทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแบคเทอริโอเฟจโดยใส่ลงในสารละลาย SM ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 วินาที แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำของเหลวที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้านปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม แล้วเทลงบนจานอาหารแข็ง LB (bottom agar) ทำในลักษณะที่กล่าวมาข้างต้นให้ได้จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

เมื่อบ่มครบเวลาแล้ว ทำการตรวจหาจานอาหารที่มีลักษณะที่เรียกว่า เพลทไลเสท (plate lysate) คือ มีพลาคเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากจนผิวหน้าอาหารเกือบใส ซึ่งเกิดจากการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (bacterial host lysis)

จากนั้นเติมสารละลาย SM ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและทำการวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่อยๆ เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลาย SM จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 5,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวด้านบน ไปกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บของเหลวใสที่กรองได้ไว้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของเหลวใสที่กรองได้นี้คือ สารละลายแบคเทอริโอเฟจเข้มข้น (bacteriophage stock) จากนั้นนำไปหาปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ในหัวข้อที่ 3.6.3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

จากการคัดแยกแบคทีเรีย *S. aureus* เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (bacterial host) สำหรับใช้ในการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยคัดแยกจากตัวอย่างต่างๆ ดังต่อไปนี้ ได้แก่น้ำนมดิบ เนื้อสัตว์ อาหาร ขนมหวาน และโพรงจมูกของอาสาสมัคร รวมจำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างน้ำนมดิบ เนื้อสัตว์ อาหารและขนมหวาน จำนวน 23 ตัวอย่าง เชื้อที่แยกได้เบื้องต้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA มีจำนวนทั้งหมด 69 โคโลนี (เลือกมาตัวอย่างละ 3 โคโลนี ในหัวข้อที่ 3.6.1.1) โดยหลังจากเลี้ยงเชื้อบนอาหาร MSA ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และย้อมสีแบบแกรมแล้ว สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* ได้ 29 ไอโซเลท (ในการทดลองนี้ถือว่า 1 โคโลนีคือ 1 ไอโซเลท) ในขณะที่ตัวอย่างจากการเกลี่ยโพรงจมูกของอาสาสมัคร จะทำการแยกเชื้อด้วยอาหาร MSA จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และย้อมสีแบบแกรม โดยพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อ *S. aureus* ได้จำนวน 12 ไอโซเลท จากอาสาสมัครทั้งหมด 13 คน รวมเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้มีทั้งหมด 41 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1

การคัดแยกคัดแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากน้ำนมดิบที่ได้จากโคนม ซึ่งได้มาจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา (S_1-M_6) (สหกรณ์โคนมมวกเหล็ก, สหกรณ์โคนมไทย-เดนมาร์ค ห้วยสัตว์ใหญ่ และบริษัทโชคชัยแดรี่ฟาร์ม) และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (M_7) จำนวน 7 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 6 ตัวอย่าง เป็นจำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลท คือ $S_{1,1}$, $S_{1,2}$, $S_{1,3}$, $S_{2,2}$, $S_{3,1}$, $S_{3,2}$, $S_{3,3}$, $M_{5,1}$, $M_{5,2}$, $M_{5,3}$, $M_{6,1}$, $M_{6,2}$, $M_{6,3}$, $M_{7,1}$, $M_{7,2}$ และ $M_{7,3}$

การคัดแยกคัดแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมูบด (P_{1-2}) จำนวน 2 ตัวอย่าง หนังหมู (P_3) เนื้อหมูชิ้น (P_4) เนื้อโคบด (B_1) เนื้อโคชิ้น (B_2) เนื้อไก่ชิ้น (C_1) และ เนื้อไก่บด (C_2) อย่างละ 1 ตัวอย่าง รวม 8 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 5ตัวอย่าง เป็นจำนวนทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ $P_{2,1}$, $P_{3,3}$, $B_{1,3}$, $C_{1,2}$ และ $C_{2,3}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดแยกคัดแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากอาหารคือ ก๋วยเตี๋ยวหลอด (F_1) เส้นขนมจีน (F_2) แซนด์วิช (F_3) ส้มตำ (F_4) จำนวน 4 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 2 ตัวอย่าง เป็นจำนวนทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ $F_{1,2}$, $F_{1,3}$, $F_{3,1}$, $F_{3,2}$ และ $F_{3,3}$

การคัดแยกคัดแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากขนมหวานคือ ขนมต้ม (D_1) ขนมถั่วแปบ (D_2) ขนมต้มไส้กล้วย (D_3) ขนมเอแคลร์ (D_4) จำนวน 4 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 2 ตัวอย่าง เป็นจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซคือ $D_{2,2}$, $D_{3,1}$ และ $D_{3,2}$

การคัดแยกคัดแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากโพรงจมูกคน จำนวน 13 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 12 ตัวอย่าง เป็นจำนวนทั้งหมด 12 ไอโซ คือ N_1, N_2, N_3, N_4, N_5, N_6, N_7, N_8, N_9, N_{10}, N_{11} และ N_{12}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*	จำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบ	จำนวนโคโลนีที่แยกได้เบื้องต้นจากอาหาร BPA	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้	รหัสของเชื้อที่สามารถแยกได้	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ *S. aureus*
น้ำนมดิบ	7	21	16	$S_{1,1}$, $S_{1,2}$, $S_{1,3}$, $S_{2,2}$, $S_{3,1}$, $S_{3,2}$, $S_{3,3}$, $M_{5,1}$, $M_{5,2}$, $M_{5,3}$, $M_{6,1}$, $M_{6,2}$, $M_{6,3}$, $M_{7,1}$, $M_{7,2}$ และ $M_{7,3}$	6
เนื้อสัตว์	8	24	5	$P_{2,1}$, $P_{3,3}$, $B_{1,3}$, $C_{1,2}$ และ $C_{2,3}$	5
อาหาร	4	12	5	$F_{1,2}$, $F_{1,3}$, $F_{3,1}$, $F_{3,2}$ และ $F_{3,3}$	2
ขนมหวาน	4	12	3	$D_{2,2}$, $D_{3,1}$ และ $D_{3,2}$	2
คน	13	-	12	N_1, N_2, N_3, N_4, N_5, N_6, N_7, N_8, N_9, N_{10}, N_{11} และ N_{12}	12

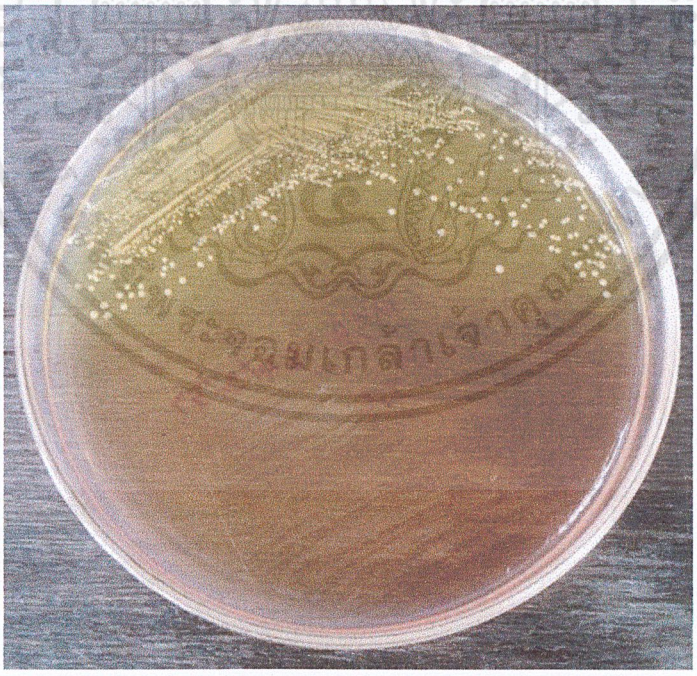
S_1-M_6 เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา, M_7 เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, P_2 เชื้อที่แยกได้จากเนื้อหมูบด, P_3 เชื้อที่แยกได้จากหนังหมู, B_1 เชื้อที่แยกได้จากเนื้อโคบด, C_1 เชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่ชิ้น, C_2 เชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่บด, F_1 เชื้อที่แยกได้จากก๋วยเตี๋ยวหลอด, F_3 เชื้อที่แยกได้จากแซนด์วิช, D_2 เชื้อที่แยกได้จากขนมถั่วแปบ, D_3 เชื้อที่แยกได้จากขนมต้มไส้กล้วย และ $N_{1\text{-}12}$ เชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัคร

หลังจากนำตัวอย่างต่างๆมาคัดแยกเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิคการทำให้เชื้อกระจาย (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar (BPA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญบนอาหาร BPA จะมีสีเทาจนถึงดำ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการรีดิวซ์เทลลูไรท์ (tellurite) ที่อยู่ในอาหาร BPA อีกทั้งโคโลนียังเป็นเงานูน ขอบเรียบ เกิดโซนใส (clean zone) รอบโคโลนีซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ไข่แดง (egg yolk) ที่ได้เติมลงไปในอาหาร BPA เอนไซม์เลซิทิเนสที่เชื้อสร้างขึ้น และอาจเกิดโซนขุ่น (opaque zone) ภายในโซนใสได้หากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส อาหารเลี้ยงเชื้อ BPA จัดเป็นอาหารชนิด selective media โดยมีไกลซีน, ลิเทียม และเทลลูไรท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆที่ปนเปื้อนได้ยกเว้น *S. aureus* (MacFADDIN, 1985) ดังภาพที่ 4.1

ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

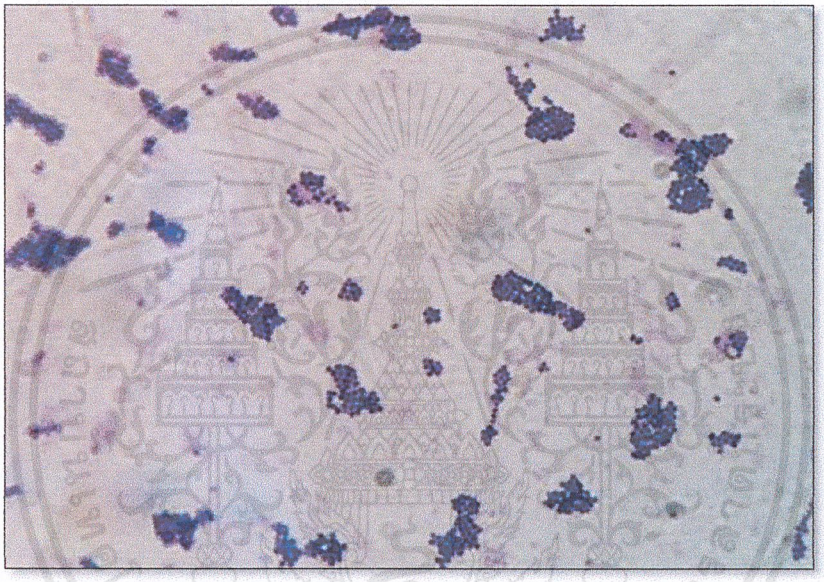
หลังจากคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA แล้ว จะทำการตรวจยืนยันอีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar (MSA) เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว เชื้อ *S. aureus* จะมีโคโลนีสีเหลืองและเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยมีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังภาพที่ 4.2 การเกิดลักษณะดังกล่าวเป็นผลเนื่องมาจากเชื้อ *S. aureus* สามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอลที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ได้และเกิดการสร้างกรดขึ้น ทำให้สีของฟีนอลเรดเปลี่ยนเป็นจากสีแดงเป็นสีเหลือง อาหารเลี้ยงเชื้อ MSA จึงจัดเป็นอาหารชนิด differential media นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ยังมีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) สูงถึงร้อยละ 7.5 จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆได้ ยกเว้นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือ (MacFADDIN, 1985) รวมทั้ง *S. aureus* ที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือเข้มข้นถึงร้อยละ 10 (สุรีย์, 2553) อีกทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ยังจัดเป็นอาหารชนิด selective media ที่ใช้คัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่ม staphylococcal โดยถ้าเป็นเชื้อ staphylococcal สายพันธุ์อื่น เช่น *Staphylococcus epidermidis* จะเจริญเป็นโคโลนีสีชมพู และไม่เปลี่ยนสีของอาหาร เนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอลได้ (MacFADDIN, 1985)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส หากเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อ *S. aureus* ผลที่เกิดจะเป็นบวก คือมีฟองอากาศเกิดขึ้นหลัง หลังเขี่ยเชื้อลงบนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ร้อยละ 3 โดยฟองอากาศที่เกิดขึ้นนั้นคือก๊าซออกซิเจน (O_2) ที่เป็นผลผลิต จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง เอนไซม์คะตะเลสที่เชื้อสร้างขึ้น และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และจากการตรวจสอบการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า หากเชื้อที่แยกได้ เป็นเชื้อ *S. aureus* จะพบว่าเชื้อติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อแกรมบวก มีรูปร่างกลมและเรียงติดกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ซึ่งจะมีลักษณะดังภาพที่ 4.3



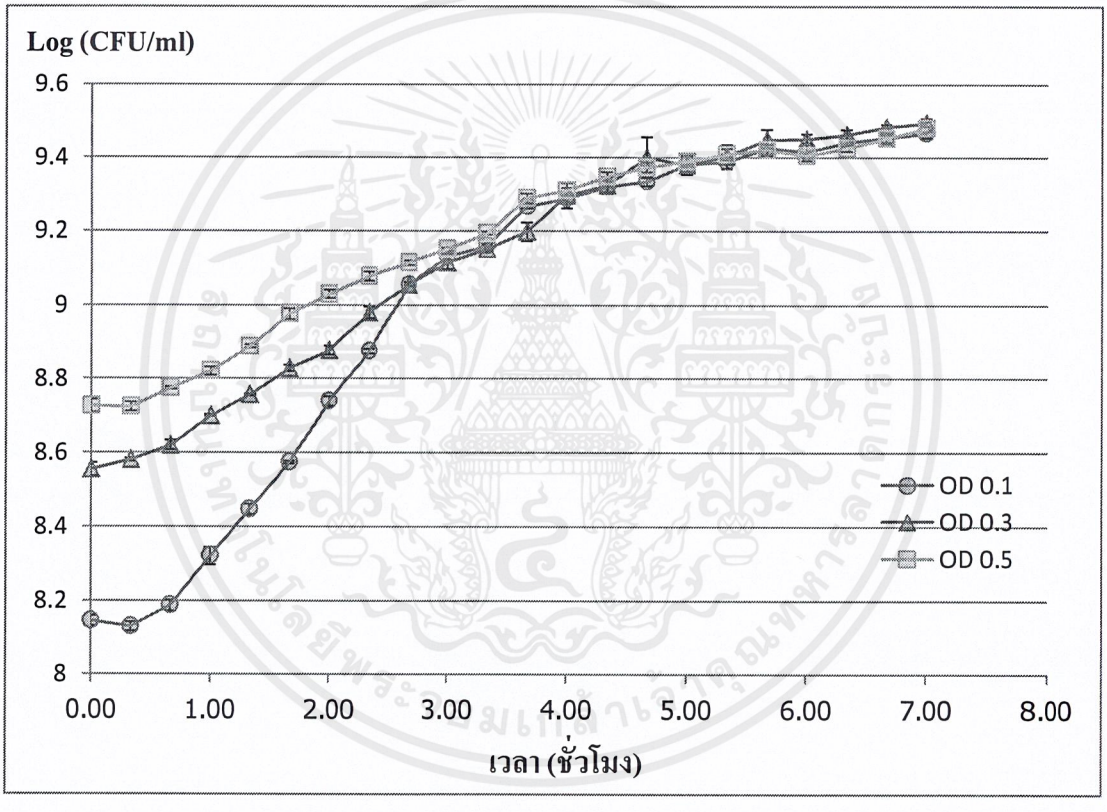
ภาพที่ 4.3 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 (เป็นเชื้อมาตรฐาน) เพื่อใช้ข้อมูลการเจริญของเชื้อดังกล่าว เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิง ในการเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างต่างๆ ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งการศึกษาการเจริญของเชื้อมาตรฐานนี้จะทำในอาหารเหลว M9 ที่บ่มในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร แตกต่างกัน เท่ากับ 0.1, 0.3 และ 0.5 ตามลำดับ แล้วบันทึกค่าความขุ่นของเซลล์เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยนำค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญระหว่างที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CFU ต่อมิลลิลิตรกับเวลาโดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานการเจริญ (ภาคผนวก ค) ในการการแปลงค่าความขุ่นของเซลล์ให้เป็นค่า CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น 0.1 ทำให้เชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 เจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น 0.3 และ 0.5 ดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยที่ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น 0.1, 0.3 และ 0.5 นั้นเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 มีการเจริญอยู่ในระยะลอการิทึม (log phase) มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.861, 0.446 และ 0.366 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ (t_d) เท่ากับ 48.3, 93.2 และ 113.6 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3 (ภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4.4 การเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ที่ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น 0.1, 0.3 และ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเจ้าบ้าน

จากการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจโดยใช้แบคทีเรีย *S. aureus* ที่คัดแยกได้ในขั้นต้นเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (ดังแสดงในตารางที่ 3.1) ทั้ง 3 วิธี ดังแสดงผลในตารางที่ 4.2 โดยวิธีที่ 1 จะเป็นการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียและน้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยจะเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเจ้าบ้านให้อยู่ในระยะลอการิทึมก่อน แล้วจึงนำไปใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ส่วนในวิธีที่ 2 จะเป็นการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ น้ำโสโครกโรงรีดนมในฟาร์มโคนม และน้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนเป็นเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ส่วนวิธีที่ 3 จะเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบโดยเติมเอนไซม์เรนเนท เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม แล้วแยกเฉพาะส่วนใสมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งพบว่าวิธีที่ 3 สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกเฟจ (lytic phage) ได้เพียงวิธีเดียว ซึ่งมีวิธีการคือ เติมเอนไซม์เรนเนท (rennet) ลงในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการกรอง 2 ครั้งด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 5 แล้วจึงกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำส่วนที่กรองได้ไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 และเชื้อ *S. aureus* จำนวน 1 สายพันธุ์ (*S. aureus* TISTR 1466) กับอีก 4 ไอโซเลท ($S_{3,3}$, $M_{5,1}$, $M_{6,1}$ และ $M_{7,2}$) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 5,000 เท่าของแรงโน้มถ่วง แล้วจึงกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร อีกครั้ง และสุดท้ายนำไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธีการทำ plaque assay เมื่อบ่มไว้เป็นเวลาข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีพลาดเกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารสองชั้น (double layer agar) นั่นแสดงให้เห็นว่า ประสบผลสำเร็จในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำนมดิบดังกล่าว ซึ่งผลของการแยกแบคเทอริโอเฟจจะแสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีที่ 1,2 และ 3

วิธีการที่ใช้ในการทดลอง	ตัวอย่างที่ใช้	รหัสเชื้อ *S. aureus* ที่ใช้	ผลการทดลอง
วิธีที่ 1	น้ำเสียจากหอพักนักศึกษา	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{3,2}$	ไม่พบการเกิดพลาค
	น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{1,2}$, $S_{2,2}$, $S_{3,2}$, $M_{5,1}$	ไม่พบการเกิดพลาค
วิธีที่ 2	น้ำโสโครกจากท่อระบายน้ำภายในสถาบัน	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{3,2}$, $M_{5,1}$, N_8, $S_{1,3}$	ไม่พบการเกิดพลาค
	น้ำโสโครกจากโรงอาหารในสถาบัน	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{1,3}$, $S_{3,2}$, $M_{5,1}$, N_8	ไม่พบการเกิดพลาค
	น้ำโสโครกจากคลองแสนแสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $B_{1,3}$, $M_{5,1}$, $M_{5,3}$, $M_{6,1}$, $M_{1,3}$, $S_{7,1}$, $S_{1,2}$, $S_{1,3}$, $S_{3,2}$	ไม่พบการเกิดพลาค
	น้ำโสโครกจากโรงรีดนมโค	$B_{1,3}$, $M_{5,3}$, $M_{7,1}$, $S_{1,2}$, $M_{6,3}$	ไม่พบการเกิดพลาค
	น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{1,2}$, $S_{3,2}$, $M_{5,3}$, $M_{6,3}$, $M_{7,1}$, N_8, $B_{1,3}$, $F_{3,2}$	ไม่พบการเกิดพลาค
วิธีที่ 3	น้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	- *S. aureus* TISTR 1466, $S_{3,3}$, $M_{5,1}$, $M_{6,1}$,	ไม่พบการเกิดพลาค
		$M_{7,2}$	เกิดพลาค

จากผลการทดลองของแยกแบคเทอริโอเฟจจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบด้วยวิธีที่ 3 ในสภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าสภาวะที่ใช้ของเหลวใสที่ได้จากการกรอง 2 และ 4 มิลลิลิตร เวลาในการบ่ม 3 และ 6 ชั่วโมง จะสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* รหัสไอโซเลท $M_{7,2}$ ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำนมดิบ ในขณะที่ เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง ไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่เวลาในการบ่ม 3 และ 6 ชั่วโมง ยังมีเชื้อแบคทีเรียที่มีสภาพเหมาะสมต่อการเข้าทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ จากนั้นเมื่อนำไปทำ plaque

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

assay จึงทำให้สามารถตรวจพบพลาดบนอาหารวุ้นสองชั้น ส่วนในกรณีที่บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่นานเกินไปทำให้แบคทีเรียมีเมตาบอลิซึมที่ต่ำไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ ส่วนกรณีที่ใช้ ของเหลวที่ได้จากการกรอง 20 มิลลิลิตร พบว่ามีผลการทดลองที่ขัดแย้งกับผลการทดลองก่อนหน้า ทำให้ไม่สามารถอธิบายได้ว่าผลที่เกิดขึ้นมาจากสาเหตุใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีที่ 3 ในสภาวะต่างๆ

รหัสเชื้อ *S. aureus* ที่ใช้ / เวลาที่ใช่บ่ม (ชม.)	ปริมาตรของของเหลวที่ได้จากการกรอง (filtrate) ที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ (มล.)								
	2			4			20		
	3	6	24	3	6	24	3	6	24
S. aureus TISTR 1466	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$S_{3,3}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M_{5,1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M_{6,1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M_{7,2}$	+	+	-	+	+	-	-	-	+

(+ คือเกิดพลาด , - คือไม่เกิดพลาด)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของพลาคที่เกิดขึ้นกับเชื้อ $M_{7,2}$ นั้นพบว่า พลาคมีลักษณะใส ปรากฏเห็นได้ชัดเจน เป็นวงกลม ขอบหยาบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Slanetz และ Jawetz (1940) ที่ได้กล่าวว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาโดยส่วนใหญ่ของแบคเทอริโอเฟจของเชื้อกลุ่ม staphylococcal จะเกิดพลาคที่เป็นวงกลมขอบหยาบ ปรากฏบนผิวหน้าอาหารอย่างชัดเจน ซึ่งพลาคที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้ มีขนาดประมาณ 0.9 ถึง 1.1 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4.5

แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้และมีความจำเพาะกับเชื้อรหัส $M_{7,2}$ นี้ หลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์ แล้วจะทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจและ ทำการนับจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในหน่วยของ PFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าแบคเทอริโอเฟจที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.93×10^8 PFU ต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพลาค (plaque) ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่เก็บมาจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย รหัส $M_{7,2}$ ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการแยกแบคเทอริโอเฟจ ในขั้นตอนการเลือกตัวอย่างที่จะนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจนั้น ถือเป็นเรื่องที่สำคัญมาก ซึ่งจะต้องคำนึงถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียเจ้าบ้านในตัวอย่างที่เราต้องการแยกแบคเทอริโอเฟจ หากในตัวอย่างที่ทำการเก็บมานั้น ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน โอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจได้จากตัวอย่างนั้นจะน้อยลง เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัส ซึ่งไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง จำเป็นต้องอาศัยแบคทีเรียเจ้าบ้านในการเพิ่มจำนวนและส่งต่อสารพันธุกรรม (Prescott, 2002) อีกทั้งแบคเทอริโอเฟจยังมีความจำเพาะโดยจะเข้าทำลายแบคทีเรียที่เป็นเจ้าบ้านเท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่แบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดจะมีแบคทีเรียเจ้าบ้านเพียงหนึ่งสกุล (genus) (Adam, 1959) ซึ่งหากไม่มีแบคทีเรียเจ้าบ้านอยู่ในตัวอย่าง ก็อาจไม่มีแบคเทอริโอเฟจเช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลือกตัวอย่างในการแยกแบคเทอริโอเฟจ คือ 1. น้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (สาเหตุส่วนใหญ่ของโรคเต้านมอักเสบในโคเกิดจากเชื้อ *S. aureus*) และ 2. น้ำโสโครกจากชุมชนต่างๆ (เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* สามารถพบได้ตามผิวหนังและในโพรงจมูกของมนุษย์ ซึ่งน้ำโสโครกดังกล่าวจะมาจากการชะล้างผิวหนังส่วนต่างๆของมนุษย์) เช่น คลองแสนแสบ, หอพักนักศึกษาภายในสถาบัน และท่อระบายน้ำคณะวิทยาศาสตร์ เป็นต้น

กรณีน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ น้ำนมดิบนั้นมีส่วนประกอบหลายชนิดทั้งโปรตีนเคซีน โปรตีนเวย์ต่างๆ ได้แก่ บีต้า-แลคโตกลอบูลิน (β-lactoglobulin) แอลฟา-แลคโต-อัลบูมิน (α-lactoalbumin) ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin) และ อิมมูโนกลอบูลิน (immunoglobulin) เป็นต้น อีกทั้งยังมีสารพวกคาร์โบไฮเดรต คือน้ำตาลแลคโตส, เม็ดไขมัน และแร่ธาตุต่างๆเช่น แคลเซียม แมกนีเซียมและฟอสฟอรัส เป็นต้น (สุรีย์, 2539) องค์ประกอบเหล่านี้ อาจจะมีผลต่อการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบก็เป็นได้ ซึ่งจากคำแนะนำของ Slanetz และ Jawetz (1940) คือ อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในน้ำนมดิบจะไม่ได้อยู่อย่างอิสระ โดยจะเกาะอยู่กับอนุภาคบางอย่างที่อยู่ในน้ำนม ดังนั้นการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบจึงจำเป็นต้องทำให้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ และอนุภาคที่เป็นส่วนประกอบในน้ำนมดิบแยกออกจากกันเสียก่อน ซึ่งในภายหลัง O'Flaherty (2005) และ Gill (2006) ได้ค้นพบว่าอนุภาคที่แบคเทอริโอเฟจเกาะอยู่นั้นส่วนหนึ่งมาจากของเวย์ที่อยู่ในน้ำนม อีกทั้งยังพบอีกว่าโปรตีนเวย์เหล่านี้ก็ไปเกาะกับผิวเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเช่นกัน จึงเป็นการไปขัดขวางไม่ให้เฟจเข้าไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน และกอปรกับอนุภาคเฟจมีคุณสมบัติเป็นขั้วลบ (มีปัจจัยมาจากสารประกอบฟอตเฟสที่อยู่ในสารพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแบคเทอริโอเฟจ) จึงทำให้แบคเทอริโอเฟจสามารถเกาะอยู่กับโปรตีนต่างๆ ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำนมดิบได้ เนื่องจากโปรตีนมีคุณสมบัติเป็นทั้งขั้วบวก ซึ่งเกิดจากปลายด้าน $-NH_3^+$ หรือ N-terminal และขั้วลบที่เกิดจากปลายด้าน $-COO^-$ หรือ C-terminal รวมทั้งยังมีส่วนของหมู่ R (side chain group) ในกรดอะมิโนหลายชนิดที่ทำให้โปรตีนมีทั้งขั้วบวกและลบ (Voet, 2013) ซึ่งหลังจากได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจแล้ว พบว่าวิธีที่ 3 นั้น สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งมีความเป็นไปได้ประการแรกคือ อาจเกิดจากการใช้เอนไซม์เรนเนทในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบ เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมจนเกิดเคิร์ด ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีผลไปทำให้อนุภาคของโปรตีน เคซีนหรืออาจรวมถึงโปรตีนเวย์บางชนิดตกตะกอนไปเนื่องจากเอนไซม์เรนเนทประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ไคโมซิน (chymosin) และเปปซิน (pepsin) (Robinson, 1995) โดยเอนไซม์ไคโมซินจะตกตะกอนเคซีนในน้ำนม ส่วนเปปซินจะตกตะกอนโปรตีนอื่นๆ ซึ่งจากการตกตะกอนหรือการเสียสภาพของโปรตีนดังกล่าวนั้น ส่งผลให้อนุภาคของเฟจในน้ำนมถูกสกัดแยกออกมาจากอนุภาคที่เฟจเกาะติดอยู่เดิมและมีสถานะเป็นอิสระและสามารถเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ในที่สุด ประการที่สองอาจเป็นผลมาจากการเลือกเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านเพื่อนำไปใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำนมดิบมาจำนวน 4 ไอโซเลท และอีก 1 สายพันธุ์ของเชื้อมาตรฐาน ซึ่งการเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำนมดิบมาใช้ด้วยนั้น อาจทำให้แบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในน้ำนมดิบมีโอกาสที่จะเจอกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่จำเพาะเจาะจงกันได้สูงขึ้น เนื่องจากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำนมดิบเช่นเดียวกัน ประการสุดท้ายที่อาจมีผลให้สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้สำเร็จคือในขั้นตอนการบ่มเชื้อแบคทีเรียกับฟิลเตรท (filtrate) เป็นการบ่มในสภาวะนิ่ง ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้แบคเทอริโอเฟจสามารถเข้าไปเกาะกับเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ง่าย และเข้าทำเซลล์เจ้าบ้านในที่สุด โดยที่ไม่มีแรงเหวี่ยงจากเครื่องบ่มพร้อมเขย่า (incubated shaker) เหมือนกับการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีที่ 1 และ 2 ถึงแม้ว่าทั้ง 2 วิธีนี้จะบ่มที่ความเร็วรอบไปไม่เกิน 100 รอบต่อนาทีก็ตาม แต่ก็มีโอกาสที่จะทำให้แบคเทอริโอเฟจไม่สามารถเข้าเกาะกับแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ อีกทั้งยังได้ทำการเลือกเชื้อแบคทีเรียสำหรับนำมาใช้เป็นเจ้าบ้านให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่จะนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในน้ำนมแล้วเช่นกัน แต่จากการทดลองที่ผ่านมาของวิธีที่ 1 และ 2 กลับไม่พบการเกิดขึ้นของพลาคแต่อย่างใด ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจนั้นไม่ได้มีการสกัดแยก (extract) อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจออกมาจากอนุภาคต่างๆที่แบคเทอริโอเฟจไปเกาะติดอยู่ ดังนั้นในขั้นตอนของการปั่นเหวี่ยงเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกอนุภาคของสารอื่นๆออกไปนั้น จึงทำให้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจตกตะกอนไปพร้อมกับอนุภาคของสารอื่นๆด้วย จึงทำให้ไม่แบคเทอริโอเฟจหลงเหลือในสารละลาย เมื่อนำของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองแล้ว ทำ plaque assay จึงไม่พบการเกิดขึ้นของพลาค ถึงแม้ว่าการแยกแบคเทอริโอเฟจวิธีที่ 1 จะมีขั้นตอนในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านให้อยู่ในช่วงการเจริญอยู่ในระยะลอกาลิทึม (log phase) ซึ่งเป็นระยะการเจริญของแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการเข้าทำลายของแบคเทอริโอเฟจมากที่สุด (Clokie, 2009) แล้วก็ตาม หรือสุดท้ายอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีที่ 1 และ 2 นั้นไม่มีแบคเทอริโอเฟจอยู่เลย จึงไม่มีพลาคเกิดขึ้น แต่ตัวอย่างน้ำนมดิบที่แยกแบคเทอริโอเฟจได้ด้วยวิธีที่ 3 อาจจะมีแบคเทอริโอเฟจอยู่ก็เป็นได้ จึงทำให้มีพลาคเกิดขึ้น

สำหรับการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำโสโครกนั้น ได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำโสโครกด้วยวิธีที่ 1 และ 2 ซึ่งพบว่าไม่มีพลาคเกิดขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมดที่เป็นน้ำโสโครก ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุที่น่าจะคล้ายกับกรณีของการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนมดิบ คืออนุภาคแบคเทอริโอเฟจมักจะเกาะอยู่กับอนุภาคต่างๆที่อยู่ในน้ำโสโครก และไม่ได้อยู่อย่างอิสระ การจะแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำโสโครกได้นั้น จำเป็นที่จะต้องทำให้แบคเทอริโอเฟจและ อนุภาคต่างๆในน้ำโสโครกแยกออกจากกันเสียก่อน เนื่องจากน้ำโสโครกโดยเฉพาะที่มาจากแหล่งชุมชนจะมีตะกอนของสารอินทรีย์อยู่จำนวนมากซึ่งจะมีทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอื่นๆอีกมากมาย โดยมาจากสิ่งเจือปนต่างๆ เช่น ปัสสาวะ, อุจจาระ, ผงซักฟอก, สบู่และเศษอาหาร ที่มนุษย์ทิ้งลงน้ำ เป็นต้น อีกทั้งยังประกอบไปด้วยสารอนินทรีย์อีกด้วย (นวลพรรณ, 2544) ซึ่งสารที่อยู่ในน้ำโสโครกเหล่านี้จะมีทั้งขั้วบวก, ขั้วลบ หรืออาจจะไม่มีขั้วก็ได้ (เช่น น้ำมันหรือไขมัน) อีกเหตุผลหนึ่งที่คล้ายกับการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำนม คือ ความจำเพาะหรือโฮสเรนจ์ของแบคเทอริโอเฟจในน้ำโสโครกอาจไม่ตรงกับเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเลือกมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ถึงแม้จะเลือกแบคทีเรียที่แยกได้จากคนและอาหาร เพื่อเพิ่มความเป็นไปได้ในเรื่องของสภาพแวดล้อมแล้วก็ตาม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารละลาย SM ซึ่งมีส่วนผสมของบัฟเฟอร์ และเจลาตินซึ่งมีส่วนช่วยให้แบคเทอริโอเฟจมีความคงตัวอยู่ได้ (Sambrook, 2001) โดยใช้ในขั้นตอนการทำเฟจให้บริสุทธิ์ ขั้นตอนการทำให้เฟจเข้มข้น และขั้นตอนการเจือจางสารละลายแบคเทอริโอเฟจ โดยปกติจะไม่นิยมใช้สารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (normal saline) เป็นสารละลายทำเจือจาง ทั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายเกลือ ยกเว้นในกรณีของแคลเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออนที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจะช่วยให้เฟจมีความเสถียรมากขึ้น (Adam, 1959)

ในขั้นตอนการเก็บรักษาแบคเอริโอเฟจ หลังจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเฟจให้อยู่ในรูปของสารละลายแบคเทอริโอเฟจเข้มข้นแล้ว นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อผ่านไปเป็นระยะเวลา 14 วัน ปรากฏว่ามีตะกอนเกิดขึ้น จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียของเฟจด้วยวิธี plaque assay พบว่าเฟจมีความสามารถในการเข้าทำลายแบคทีเรียเจ้าบ้านลดลง ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากคุณภาพของส่วนประกอบที่นำมาใช้ในการเตรียมสารละลาย SM และการเก็บรักษาสารละลาย SM ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลากว่า 20 วัน ก่อนที่จะนำมาใช้เก็บรักษาเฟจ จึงทำให้สารละลาย SM สูญเสียคุณสมบัติที่จะช่วยให้เฟจคงสภาพไว้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การแยกแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมนั้นมีความสำคัญต่อการแยกแบคเทอริโอเฟจเนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ดังผลการทดลองที่พบว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียรหัส $M_{7,2}$ (แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ) แต่ไม่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466 ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466 ทำให้ทราบระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของแบคเทอริโอเฟจ และค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ระดับความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญที่ดีที่สุด คือ 0.1 ดังนั้นจึงใช่ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ 0.1 เพื่อศึกษาการแยกแบคเทอเทอริโอเฟจ

การเลือกตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในขั้นตอนการแยกแบคเทอริโอเฟจจะต้องคำนึงถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียเจ้าบ้านในตัวอย่าง หากตัวอย่างมีแบคทีเรียเจ้าบ้าน โอกาสในการแยกเฟจได้จากตัวอย่างนั้นจะสูงขึ้น เพราะแบคเทอริโอเฟจจะอาศัยแบคทีเรียเจ้าบ้านในการเพิ่มเจริญและเพิ่มจำนวน ดังผลการทดลองที่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียรหัส $M_{7,2}$ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ

การสกัดแยกอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจจากอนุภาคต่างๆที่แบคเทอริโอเฟจยึดเกาะในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างก่อนนำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ มีความสำคัญคือทำให้แบคเทอริโอเฟจมีสถานะเป็นอิสระและสามารถเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ ดังผลการทดลองที่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ เมื่อเติมเอนไซม์เรนเนทลงในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ทำให้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจถูกสกัดแยกออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. หากต้องการบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อกลุ่ม staphylococcal ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ควรศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา ทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

2. คุณภาพของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของ *S. aureus* ในอาหารเหลว M9 สันนิษฐานว่า เกิดการเสื่อมคุณภาพของผงยีสต์สกัด (yeast extract) อันเนื่องมาจากการเก็บรักษา ซึ่งวิธีการเก็บรักษาผงยีสต์สกัดที่เหมาะสม คือ เมื่อเปิดใช้แล้วควรปิดฝาให้สนิทและเก็บในที่ที่มีความชื้นต่ำที่อุณหภูมิเท่าเดิมตลอดการเก็บรักษา และเพื่อป้องกันความชื้น (Acumedia, 2011) หากเป็นไปได้ควรเก็บรักษาให้ดีและใช้ขวดเดิมตลอดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นวลพรรณ ณ ระนอง และมงคล เพ็ญสายใจ (2544). น้ำและการบำบัดน้ำเสีย. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ: หน้า 74-78

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และคณะ. (2539). ประมวลความรู้เกี่ยวกับโคนม. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 135-144.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2552). ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ปรับปรุงแก้ไข). กรุงเทพฯ: หจก. วี.เจ. พริ้นติ้ง, 233-246.

วิพิชญ์ ไชยศรีสงคราม. (2541). การตรวจคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม (ม.ป.ท.). (ม.ป.พ.), 172-173.

สมพงศ์ เทศประสิทธิ์. (2528). โคนม. สงขลา: คณะทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุรีย์ นานาสมบัติ. (2553). จุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. กรุงเทพฯ: โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรีย์ นานาสมบัติ. (2553). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี-พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรีย์ นานาสมบัติ (2539). เทคโนโลยีของนมและผลิตภัณฑ์นม. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ: หน้า 1-29

อัญชุลี เลิศสงคราม และคณะ (2555). แบคเทอริโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม. 19 (3), 1-23.

Ackermann, H.W. (2011). Bacteriophage taxonomy. Department of Microbiology Immunology and Infectiology Faculty of Medicine, Laval University.

Adams, M.H. et al. (1959). Bacteriophage. Interscience Publishers, Inc., New York.

Basdew, I.H., Laing, M.D. (2011). Mini-Review: Biological control of bovine mastitis using bacteriophage therapy. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 386-393.

Bueno, E., García, P., Martínez, B., and Rodríguez, A. (2012). Phage inactivation of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus in fresh and hard-type cheeses. International Journal of Food Microbiology, 158, 23–27.

Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. (2009). Bacteriophage: Method and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions, vol. 501, Humana Press

De Oliveira L.P. et al. (2011). Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. J Food Process Technol 2011, 2:6.

Eck André & Gillis Jean-Claude (2000). Cheesemaking from science to quality assurance 2nd Edition. Lavoisier Publishing, France.

Garcia, P., Madera C., Martinez B. and Rodriguez A. (2006). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. International Dairy Journal, 17, 1232–1239.

Gill, J. J., Sabour, P. M, Leslie, K. E., Griffiths, M. W. (2005). Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. J Applied Microbiology, 101, 377-386

Gill, J. J., Pacan, J.C. , Carson, M.E., Leslie, K. E. , Griffiths, M. W. , Sabour , P. M. (2006). Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle†. Antimicobial Agent Chemotherapy, 50, 2912-2918.

Kathleen, P.T., Barry, C. (2012) Foundation in Microbiology, 8th ed. © The McGraw—Hill Companies, New York. 174-176.

Kutter, E.M., Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G. (2011). Phage treatment of human infections. Bacteriophage, Landes Bioscience. 66 – 85.

Kwiatek, M., Parasion S., Mizak L., Gryko R., Bartoszcze M. and Kocik J. (2011). Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. Springer. 225-234.

MacFaddin, J.F. (1985). Media for Isolation – Curtivation – Identification – Maintenance of Medical Bacteria, Volume I. Williams and Wilkins,London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maloy, Stanley R. (1994). Microbial genetics, 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, USA.

Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H. Kuroda, M., et al. (2003). Experimental Protection of Mice against Lethal *Staphylococcus aureus* Infecttion by Novel Bacteriophage ØMR11. JID 187, 613-624.

Normanno G., et al. (2003). Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, 98 (2005), 73-79.

O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. (2005). Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. Letters in Applied Microbiology, 41(2005), 274–279.

O'Flaherty, S., Ross, R.P., Flynn, J., Meaney, W. J., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A. (2005). Isolation and characterization of two anti-Staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. Lett Applied Microbiology, 41, 482-486.

Peles F., Wanger M., Varga L. Rieck P., Gutser K., Keresztúri P., Kardos G., Turcsányi T., Béri B. and Szabó A. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. International Journal of Food Microbiology, 118 (2007), 186-193.

Prescott, L.M. et al. (2002). Microbiology, 5th edition © The McGraw—Hill Companies, 2002, 382-396, 362.

Robinson, Richard K. (1995). A colour guide to cheese and fermented milks. Chapman & Hall, Hong Kong.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2.25-2.27.

Schroeder J.W. (2012). Mastitis Control Program: Bovine Mastitis and Milking Management. North Dakota State University.

Slanetz, W. L., Ernest, J. (1940). Isolation and characteristics of bacteriophage for Staphylococci of bovine mastitis. University of New Hampshire Agricultural Experiment Station. 447 – 455.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J. Glenn, J.R. (2001). Minireview Bacteriophage Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Mar, 2001, 649-659.

Tamarin, R.H. (2001). Principles of Genetics, seventh Edition. The McGraw—Hill Companies, 167-168.

Tanji, Y., Synnott, A.J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K. and Iwano, H. (2009). Isolation from Sewage Influent and Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Bacteriophages with Wide Host Ranges and Potent Lytic Capabilities. Applied and Environmental Microbiology, July 2009, 4483–4490.

Tseng, Y.H., et al. (2010). Wide Host Range and Strong Lytic Activity of *Staphylococcus aureus* Lytic Phage Stau2. Applied and Environmental Microbiology, Feb 2011, 756–761.

Voet, Donald et al. (2013) Biochemistry. John Wiley and Sons Singapore Pte. Ltd., Asia: page 80

Whitman W.B., Schleifer K.H., De Vos P., Garrity G., Jones D, Krieg N.R., Ludwig W. and Rainey F.A. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. USA: Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 392-406.

Wilkinson, B.J., Holmes, K.M. (1978) *Staphylococcus aureus* Cell Surface: Capsule as a Barrier to Bacteriophage Adsorption. Infection and Immunity, Feb. 1979, 549-552.

"YEAST EXTRACT (7184)". [Online]. Available: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/Prodinfo/7184_PI.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. Baird Parker Agar (BPA)

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาณที่ใช้คือ 63 กรัมต่อน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Enzymatic Digest of Casein	10.0000	กรัม
Beef Extract	5.0000	กรัม
Yeast Extract	1.0000	กรัม
Lithium Chloride	5.0000	กรัม
Glycine	12.0000	กรัม
Sodium Pyruvate	10.0000	กรัม
Agar	17.0000	กรัม
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

pH 6.8 ± 0.2

ชั่งอาหารปริมาณ 63 กรัม ละลายในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 950 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเติม Egg Yolk Tellurite Supplement ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

2. Luria Bertani Agar (LB Agar)

Tryptone	10.0000	กรัม
Yeast Extract	5.0000	กรัม
NaCl	5.0000	กรัม
Agar	15.0000	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Mannitol Salt Agar (MSA)

Casein	10.0000	กรัม
Beef Extract	1.0000	กรัม
NaCl	75.0000	กรัม
D – mannitol	10.0000	กรัม
Agar	15.0000	กรัม
Phenol red	0.0250	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.4 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Modified minimal media (modified M9)

Yeast extract	5.0000	กรัม
Stock solution (M9 salt)	10	มิลลิลิตร
ซึ่งประกอบด้วย		
Na_2HPO_4	68.0000	กรัม
KH_2PO_4	30.0000	กรัม
NaCl	5.0000	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
$MgSO_4$ความเข้มข้น 1 โมลาร์	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.0 – 7.5

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ที่ปลอดเชื้อแล้ว ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. **Peptone saline**

NaCl	8.5000	กรัม
Peptone	1.0000	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. **Sailine – magnesium diluent plus gelatin (SMG)**

NaCl	5.8000	กรัม
$MgSO_4 . 7H_20$	2.0000	กรัม
1M Tris-HCl (pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) gelatin	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ผลการวัดการเจริญของ *Stapphylococcus aureus* TISTR 1466

ตารางที่1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. aureus* ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1

เวลา (min)	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นของเซลล์	SD	ln OD	CFU ต่อมิลลิลิตร	ln (CFU ต่อมิลลิลิตร)
0	0.0000	0.1700	0.0046	-1.7739	139,666,667	18.7547
20	0.3333	0.1650	0.0038	-1.8038	134,666,667	18.7183
40	0.6777	0.1840	0.0055	-1.6946	153,666,667	18.8502
60	1.0000	0.2400	0.0112	-1.4285	209,666,667	19.1610
80	1.3333	0.3100	0.0087	-1.1712	280,000,000	19.4503
100	1.6777	0.4050	0.0026	-0.9038	375,000,000	19.7424
120	2.0000	0.5780	0.0164	-0.5476	548,333,333	20.1224
140	2.3333	0.7800	0.0103	-0.2488	749,666,667	20.4351
160	2.6777	1.1650	0.0031	0.1524	1.135E+09	20.8496
180	3.0000	1.3790	0.0273	0.3211	1.349E+09	21.0224
200	3.3333	1.4730	0.0172	0.3875	1.443E+09	21.0902
220	3.7777	1.8760	0.0223	0.6291	1.846E+09	21.3362
240	4.0000	1.9670	0.0455	0.6763	1.937E+09	21.3842
260	4.3333	2.1230	0.0751	0.7526	2.093E+09	21.4617
280	4.6777	2.1930	0.0690	0.7854	2.163E+09	21.4949
300	5.0000	2.4410	0.1348	0.8925	2.411E+09	21.6034
320	5.3333	2.4810	0.1120	0.9087	2.451E+09	21.6198
340	5.6777	2.7000	0.1076	0.9932	2.67E+09	21.7053
360	6.0000	2.6400	0.1442	0.9707	2.61E+09	21.6826

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. aureus* ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (ต่อ)

เวลา (min)	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นของเซลล์	SD	ln OD	CFU ต่อมิลลิลิตร	ln (CFU ต่อมิลลิลิตร)
380	6.3333	2.7950	0.0575	1.0277	2.765E+09	21.7402
400	6.6777	2.8770	0.0777	1.0568	2.847E+09	21.7696
420	7.0000	2.9600	0.0668	1.0851	2.93E+09	21.7982

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. aureus* ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.3

เวลา (min)	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นของเซลล์	SD	ln OD	CFU ต่อมิลลิลิตร	ln (CFU ต่อมิลลิลิตร)
0	0.0000	0.3885	0.0148	-0.9454	358,500,000	19.69743922
20	0.3333	0.4105	0.0035	-0.8903	380,500,000	19.75699674
40	0.6667	0.4470	0.0127	-0.8051	417,000,000	19.84859678
60	1.0000	0.5310	0.0028	-0.6329	501,000,000	20.03211666
80	1.3333	0.6015	0.0035	-0.5083	571,500,000	20.16377504
100	1.6667	0.7040	0.0127	-0.3509	674,000,000	20.32874067
120	2.0000	0.7830	0.0212	-0.2446	753,000,000	20.43957579
140	2.3333	0.9870	0.0354	-0.0131	957,000,000	20.67931395
160	2.6777	1.1670	0.0156	0.1544	1,137,000,000	20.85165905
180	3.0000	1.3340	0.0566	0.2882	1,304,000,000	20.9887023
200	3.3333	1.4490	0.0269	0.3708	1,419,000,000	21.07321824
220	3.7777	1.6070	0.0919	0.4743	1,577,000,000	21.17879014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. aureus* ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.3 (ต่อ)

เวลา (min)	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นของเซลล์	SD	ln OD	CFU ต่อมิลลิลิตร	ln (CFU ต่อมิลลิลิตร)
240	3.6667	2.0120	0.1584	0.6991	1,982,000,000	21.40737227
260	4.0000	2.140	0.1131	0.7608	2,110,000,000	21.46995378
280	4.3333	2.5540	0.3253	0.9376	2,524,000,000	21.64911078
300	4.6667	2.4260	0.1386	0.8862	2,396,000,000	21.59706652
320	5.0000	2.5660	0.1895	0.9423	2,536,000,000	21.65385387
340	5.3333	2.8520	0.1810	1.0480	2,822,000,000	21.76071169
360	5.6667	2.8560	0.0905	1.0494	2,826,000,000	21.76212812
380	6.0000	2.9400	0.0849	1.0784	2,910,000,000	21.79141892
400	6.3333	3.0820	0.0424	1.1255	3,052,000,000	21.83906295
420	6.6667	3.1520	0.0566	1.1480	3,122,000,000	21.86173966
440	7.0000	3.5440	0.1584	1.2652	3,514,000,000	21.98002083
460	7.3333	3.7840	0.0113	1.3307	3,754,000,000	22.04608778
480	7.6667	3.8200	0.2546	1.3402	3,790,000,000	22.05563186
500	8.0000	3.8480	0.0905	1.3475	3,818,000,000	22.06299256
520	8.3333	3.8360	0.0170	1.3444	3,806,000,000	22.05984461
540	8.6667	4.4400	0.3281	1.4906	4,410,000,000	22.20714053
560	9.0000	4.2720	1.0182	1.4520	4,242,000,000	22.16830069
580	9.3333	4.1360	0.1471	1.4197	4,106,000,000	22.13571516
600	9.6667	4.0760	0.1980	1.4051	4,046,000,000	22.12099458
620	10.0000	3.8240	0.1018	1.3412	3,794,000,000	22.05668671

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. aureus* ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5

เวลา (min)	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นของเซลล์	SD	ln OD	CFU ต่อมิลลิลิตร	ln (CFU ต่อมิลลิลิตร)
0	0.0000	0.5625	0.0219	-0.5753	532,500,000	20.09309346
20	0.3333	0.5595	0.0148	-0.5807	529,500,000	20.08744372
40	0.6777	0.6245	0.0049	-0.4708	594,500,000	20.20323127
60	1.0000	0.6920	0.0170	-0.3681	662,000,000	20.31077611
80	1.3333	0.8040	0.0085	-0.2181	774,000,000	20.46708243
100	1.6777	0.9770	0.0325	-0.0232	947,000,000	20.66880965
120	2.0000	1.1000	0.0283	0.0953	1,070,000,000	20.79092449
140	2.3333	1.2280	0.0339	0.2053	1,198,000,000	20.90391934
160	2.6777	1.3310	0.0184	0.2860	1,301,000,000	20.98639904
180	3.0000	1.4460	0.0141	0.3688	1,416,000,000	21.07110183
200	3.3333	1.5920	0.0141	0.4650	1,562,000,000	21.16923289
220	3.7777	1.9720	0.0566	0.6790	1,942,000,000	21.38698421
240	4.0000	2.0720	0.0283	0.7285	2,042,000,000	21.43719556
260	4.3333	2.2620	0.0594	0.8162	2,232,000,000	21.52616388
280	4.6777	2.3920	0.0735	0.8721	2,362,000,000	21.58277455
300	5.0000	2.4880	0.0735	0.9114	2,458,000,000	21.62261385
320	5.3333	2.5960	0.0962	0.9540	2,566,000,000	21.6656141
340	5.6777	2.6660	0.0990	0.9805	2,636,000,000	21.69252845
360	6.0000	2.5740	0.0255	0.9454	2,544,000,000	21.65700348
380	6.0000	2.7000	0.0509	0.9932	2,670,000,000	21.70534431
400	6.3333	2.8660	0.0990	1.0530	2,836,000,000	21.76566045
420	6.6667	3.0600	0.1810	1.1184	3,030,000,000	21.83182846
440	7.0000	3.4960	0.3394	1.2516	3,466,000,000	21.96626703

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา, ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และจำนวน CFU ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. aureus* ที่กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 (ต่อ)

เวลา (min)	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นของเซลล์	SD	ln OD	CFU ต่อมิลลิลิตร	ln (CFU ต่อมิลลิลิตร)
460	7.3333	3.6600	0.2772	1.3630	3,878,000,000	22.07858539
480	7.6667	3.7440	0.0962	1.2974	3,630,000,000	22.01249849
500	8.0000	3.7600	0.0792	1.3201	3,714,000,000	22.0353753
520	8.3333	4.1560	0.1131	1.3244	3,730,000,000	22.03967407
540	8.6667	4.2880	0.2206	1.4245	4,126,000,000	22.14057425
560	9.0000	4.1600	0.4525	1.4558	4,258,000,000	22.1720654
580	9.3333	3.6600	0.0679	1.4255	4,130,000,000	22.14154324
600	9.6667	3.5480	0.1640	1.2974	3,630,000,000	22.01249849
620	10.0000	3.9080	0.7184	1.2663	3,518,000,000	21.98115848

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

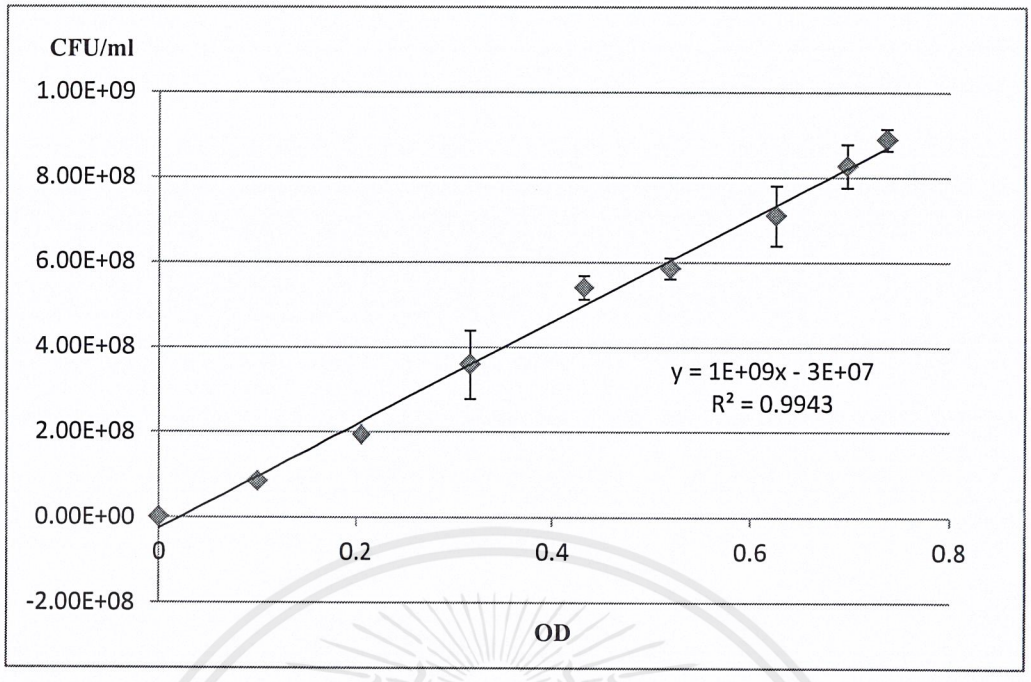
ภาคผนวก ค

ตาราง แสดงจำนวนโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ที่นับได้ต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความขุ่นของเซลล์ช่วง 0.1 ถึง 0.8 และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CFU ต่อมิลลิลิตร กับความขุ่นของเซลล์ของ *S. aureus* TISTR 1466 ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ตารางแสดงจำนวนโคโลนีของ *S.aureus* TISTR 1466 ที่นับได้ต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความขุ่นของเซลล์ช่วง 0.1 ถึง 0.8

ค่าความขุ่นของเซลล์	จำนวนโคโลนีที่นับได้				Dilution factor	CFU ต่อมิลลิลิตร
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ค่าเฉลี่ย		
0	0	0	0	0	0	0
0.1	90	90.5	75	85.2	10^{-6}	8.52×10^{7}
0.206	191	195.5	109	165.2	10^{-6}	1.65×10^{8}
0.317	27.5	36.5	43.5	35.8	10^{-7}	3.58×10^{8}
0.432	52	-	56	54.0	10^{-7}	5.40×10^{8}
0.519	60.5	56	56.5	57.7	10^{-7}	5.76×10^{8}
0.626	66	76	-	71.0	10^{-7}	7.10×10^{8}
0.698	84	77	87	82.7	10^{-7}	8.26×10^{8}
0.738	86.5	88.5	91.5	88.8	10^{-7}	8.88×10^{8}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพของ กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CFU มิลลิลิตร กับค่าความขุ่นของเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้