การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* จากน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม

STUDY ON ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF BACTERIA EXPECTED *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FROM RAW MILK'S BOVINE MASTITIS AND FARM ENVIRONMENT

คมสันต์ วันแอเลาะห์

จันทร์จิรา เฉกเพลงพิน

ดารินทร์ ตันติยะสกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF BACTERIA EXPECTED *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FROM RAW MILK'S BOVINE MASTITIS AND FARM ENVIRONMENT

KOMSUN WANAELO
JUNJIRA CHEKPLENGPIN
DARIN TANTIYASAKUN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* จากน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria Expected *Staphylococcus aureus* from Raw Milk's Bovine Mastitis and Farm Environment		
ชื่อนักศึกษา	นายคมสันต์	วันแอเลาะห์	รหัสนักศึกษา 56050807
	นางสาวจันทร์จิรา	เฉกเพลงพิน	รหัสนักศึกษา 56050808
	นางสาวดารินทร์	ตันติยะสกุล	รหัสนักศึกษา 56050837
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* จากน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม		
ชื่อนักศึกษา	นายคมสันต์	วันแอเลาะห์	รหัสนักศึกษา 56050807
	นางสาวจันทร์จิรา	เฉกเพลงพิน	รหัสนักศึกษา 56050808
	นางสาวดารินทร์	ตันติยะสกุล	รหัสนักศึกษา 56050837
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี		

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เพื่อนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Baird-Parker Agar จำนวนทั้งหมด 19 โคโลนี จากนั้นนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาด และลักษณะของโคโลนี ขนาดเซลล์ การเคลื่อนที่ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ การเจริญบนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์โคแอคกูเลส ผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลท ต่อมาจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่คัดแยกได้มาเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ เมื่อทำการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ด้วยวิธี spot test และ plaque assay จากการทดลองไม่พบบริเวณใส และไม่พบการเกิดพลาค จากนั้นจึงทำการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ทั้งแบบมีการเปลี่ยนอาหาร และแบบไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียโดยใช้ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากการทดลองไม่พบการเกิดพลาคเช่นเดียวกัน

คำสำคัญ : การแยกแบคเทอริโอเฟจ น้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ แบคเทอริโอเฟจ สิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม plaque assay, *Staphylococcus aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria Expected *Staphylococcus aureus* from Raw Milk's Bovine Mastitis and Farm Environment
Students	Mr.Komsun Wanaelo Student ID 56050807
	MissJunjira Chekplengpin Student ID 56050808
	MissDarin Tantiyasakun Student ID 56050837
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr.Wimonmat Boonmee

Abstract

The aim of this special project was to study on the isolation of bacteriophages of bacteria which was expected to be *Staphylococcus aureus* from raw milk's bovine mastitis and farm environment. The nineteen colonies of the bacteria were isolated on Baird Parker Agar and were evaluated on morphology characterization such as shape, cell size, colony appearance; size, shape and color, Gram staining and motility as well as enzyme production; catalase and coagulase, including growth on mannitol salt agar. The result showed 18 isolates of the bacteria expected *S. aureus* from raw milk's bovine mastitis. Then the isolated bacteria were used as the bacterial hosts to investigate on isolation of the bacteriophages. The study on isolation of bacteriophages of the bacteria from raw milk's bovine mastitis and farm environment was determined by spot test and plaque assay. The isolation without enrichment of the samples, the samples; from raw milk's bovine mastitis and farm environment, were used. Whereas, the enrichment of the bacteriophage samples were done by the samples; from farm environment both with and without replacing the medium of LB broth on the isolation of the bacteriophages. The result showed that none of the samples and methods used was enabled to isolate the bacteriophage of the bacteria in which the ways and the samples were subjected by without enrichment and with enrichment both with and without replacing the LB medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น เว้นแต่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : bacteriophage, environment, isolation of bacteriophage, plaque assay, raw milk's bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่องการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจ ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำชี้แนะต่างๆ ตลอดการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว และดร.สมพิศ สอนโยธา ประธานกรรมการสอบ และกรรมการสอบโครงงานพิเศษนี้ ที่ได้สละเวลาในการเข้ารับฟังการนำเสนอ รวมทั้งให้คำแนะนำคำปรึกษาจนโครงงานพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา และพี่สมศักดิ์ที่เอื้อเฟื้อการเบิกอุปกรณ์สารเคมีต่างๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำการทดลองที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร กนกพร บุญญะอติชาติ และดร.ดวงกมล แต้มช่วย อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร ที่สนับสนุนและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำการทดลอง ตลอดจนการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ใช้ในการทดลองโครงงานพิเศษนี้ และขอขอบพระคุณคุณกมลวัฒน์ ใสสว่าง และคุณมนัส ขยายแย้ม เจ้าของฟาร์มโคนม อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ที่สนับสนุนการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ และการเก็บตัวอย่างอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยอยู่เคียงข้าง และเป็นกำลังใจให้กันตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในศึกษาและต่อยอดต่อไป

คมสันต์ วันแอเลาะห์
จันทร์จิรา เฉกเพลงพิน
ดารินทร์ ตันติยะสกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis)	4
2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*	6
2.3 แบคเทอริโอเฟจ	9
2.3.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ	9
2.3.2 สมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ	9
2.3.3 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ	10
2.3.4 วงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ	12
2.3.5 การทำ plaque assay	15
2.3.6 การตรวจสอบการติดเชื้อในแบคทีเรียเจ้าบ้าน	16
2.3.7 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแบคเทอริโอเฟจ	17
2.3.8 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในด้านต่างๆ	18
2.3.9 ความปลอดภัยของแบคเทอริโอเฟจต่อการนำมาใช้งาน	19
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*	20
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
3.1 อุปกรณ์.	24
3.2 เครื่องมือ	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 สารเคมี..... 25
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 26
3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์..... 26
3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 26
3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้..... 26
3.6 วิธีการทดลอง..... 27
3.6.1 การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 27
3.6.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ..... 27
3.6.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้..... 29
3.6.4 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 29
3.6.5 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 34
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ..... 34
4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Baird-Parker Agar..... 34
4.1.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar..... 36
4.1.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 37
4.1.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 38
4.1.5 การติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 38
4.1.6 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 39
4.1.7 การตรวจดูลักษณะของโคโลนี และวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรื่องการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.8 การวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* 39

4.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* 43

4.2.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ 44

4.2.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยมีการเพิ่มปริมาณ 56

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 63

5.1 สรุปผลการวิจัย 63

5.2 ข้อเสนอแนะ 63

เอกสารอ้างอิง 65

ภาคผนวก 73

ภาคผนวก ก 74

ภาคผนวก ข 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 วิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่าง..... 32

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบ..... 36

4.2 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*..... 40

4.3 การหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test..... 46

4.4 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน..... 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	6
2.2 การจัดจำแนก Family ของแบคเทอริโอเฟจตามวิธีของ คณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส	11
2.3 วงชีวิตแบบไลติคของแบคเทอริโอเฟจ	13
2.4 วงชีวิตแบบไลโสเจนิคของแบคเทอริโอเฟจ	14
2.5 วิธี double layer หรือ overlay agar method	15
2.6 ลักษณะของพลาคที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย	17
4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง BPA	35
4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง MSA	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) เป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบของเนื้อเยื่อเต้านม ทำให้เต้านมและน้ำนมเกิดความผิดปกติ ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนมดิบ ทำให้ไม่สามารถจำหน่ายน้ำนมดิบได้ ก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้ และเพิ่มต้นทุนในการดูแลรักษาโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ นอกจากนี้เต้านมที่เคยเกิดการอักเสบ หลังผ่านการรักษาแล้วมักจะผลิตน้ำนมได้น้อยกว่าเดิม ซึ่งจัดเป็นปัญหาสำคัญกับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและเสี่ยงต่อการขาดทุนสูง (จตุพร และคณะ, 2557) โรคเต้านมอักเสบจะมีทั้งแบบแสดงอาการ (clinical mastitis) และไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis) แต่ส่วนมากจะเป็นแบบไม่แสดงอาการ ส่งผลให้โคนมที่เกิดการติดเชื้อไม่สามารถระบุได้ว่าเกิดการติดเชื้อ (Kivaria et al., 2007)

โดยทั่วไปโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อที่พบตามพื้นคอก วัสดุรองนอน อุจจาระ อุปกรณ์รีดนม และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis, Bacillus megalerium* และ *Bacillus subtillis* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Diplococcus pneumonia, Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* (สัมฤทธิ์ และคณะ, 2555)

S. aureus เป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ โดยปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมดิบที่หลั่งออกมา และเชื้อดังกล่าวจะสามารถติดต่อไปยังโคนมตัวอื่นต่อไป (Artursson et al., 2016) ดังนั้นในการควบคุมโรคเต้านมอักเสบ จะมุ่งเน้นไปที่การป้องกันการกระจายตัวของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยกำจัดเชื้อที่ก่อโรคด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ และยาต้านการอักเสบ (สัมฤทธิ์ และคณะ, 2555) ยาเหล่านี้ทำให้เกิดปัญหาที่ตามมา คือเชื้อเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ (Laing et al., 2011) เมื่อเชื้อเกิดการดื้อต่อยาชนิดหนึ่ง มักจะมีการดื้อยาในกลุ่มอื่นๆ ตามมา ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มมากขึ้น และทำให้โคนมถูกคัดทิ้งก่อนเวลาอันควร ส่งผลทำให้ต้องซื้อโคนมเพื่อมาทดแทนเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ อาจก่อให้เกิดปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม (สุกัญญา, 2556) แล้วทำให้ส่งผลเสียต่อผู้บริโภคคือ อาจทำให้ผู้บริโภคที่แพ้ยาปฏิชีวนะมีอันตรายถึงชีวิต ทำให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ และพิการแต่กำเนิดได้ และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง (วารสารเกษตรก้าวหน้า, 2535) เพื่อแก้ไขปัญหา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล่านั้นได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) มาเป็นทางเลือกในการรักษา ที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ (O'Flaherty et al., 2005)

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค Basdew and Laing (2011) รายงานการใช้แบคเทอริโอเฟจจากบริษัทต่างๆ ได้แก่ AgriPhage™, BioTector, EcoShield™, FASTPlaqueResponse™, FASTPlaqueTB™, ListSheild™, LISTEX™ P100, MRSA/MSSA blood culture test, MRSA screening test, MicroPhage และ MRSA/MSSA test ในการควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย Dias et al. (2014) ได้นำแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ มาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (Penicillin) และแอมพิซิลลิน (Ampicillin) Fan et al. (2016) ใช้แบคเทอโอเฟจ trx-SA1 ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรม รวมกับแบคเทอริโอเฟจ IME-SA1 ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. aureus* ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะเมธิซิลิน (Meticillin) Kwiatek et al. (2012) แยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติคจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เพื่อทำลายเชื้อกลุ่ม staphylococci ทั้งในมนุษย์และโคนม และ O'Flaherty et al. (2005) ใช้แบคเทอริโอเฟจ K ในแฟมิลี่ *Myoviridae* ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมดิบ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และเพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

2. เพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ แล้วนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาแยกแบคเทอริโอเฟจ จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

2. งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis)

โรคเต้านมอักเสบ เป็นโรคที่เกิดการอักเสบบริเวณส่วนต่างๆ ของเต้านม เช่น กระเปาะสร้างนม ท่อน้ำนม และท่อรวมน้ำนมหรือโพรงหัวนม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเต้านม น้ำนม และส่วนประกอบของน้ำนม ทำให้น้ำนมเกิดการเปลี่ยนแปลงผิดไปจากปกติ ซึ่งจัดเป็นปัญหาที่สำคัญกับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เนื่องจากแม่โคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบ จะให้ผลผลิตและคุณภาพของน้ำนมลดลง ทำให้เกษตรกรไม่สามารถจำหน่ายน้ำนมได้ จึงเกิดการสูญเสียรายได้และเกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายค่ายาในการรักษาโรค และค่าดูแลรักษาโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบอีกด้วย นอกจากนี้เต้านมที่เคยเกิดการอักเสบเมื่อหายแล้วมักจะผลิตน้ำนมได้น้อยกว่าเดิม (จตุพร, 2557)

การเกิดโรคเต้านมอักเสบสามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ ตามอาการอักเสบที่แสดงออกมา คือ เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis) และเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis) โดยส่วนใหญ่การเกิดเต้านมอักเสบของแม่โคนมเป็นแบบไม่แสดงอาการ ซึ่งเป็นการอักเสบของเต้านมในระยะเริ่มต้นแต่ยังไม่ถึงขั้นแสดงอาการอักเสบออกมา โคนมจะไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใดๆ ให้เห็นทั้งอาการผิดปกติที่เต้านม น้ำนม เราสามารถตรวจสอบเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้ โดยการตรวจหาหรือนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนม (Somatic cell count, SCC) โดยพบว่าเต้านมที่เกิดการอักเสบจะมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ และปะปนกับน้ำนมออกมา เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้มีหน้าที่กำจัดเชื้อโรคในเต้านมโดยการจับกิน ซึ่งเป็นการป้องกันตัวเองตามธรรมชาติของเต้านม เพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อโรคเข้าไป (จตุพร, 2557) ถ้าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 250,000 เซลล์ต่อปริมาณน้ำนม 1 มิลลิลิตร ถือว่าปกติ แต่ถ้าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมมากกว่า 500,000 เซลล์ต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร ถือว่าเต้านมเกิดการอักเสบ (Barkema et al., 1998)

สาเหตุการเกิดโรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่พบว่า เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในเต้านม เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ สามารถแบ่งแยกได้เป็น 3 กลุ่ม (Philpot and Nickerson, 1991)

1. เชื้อแบคทีเรียที่ติดต่อจากเต้านมสู่เต้านม (contagious bacteria) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus* แหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญของเชื้อคือ เต้านมที่เกิดการติดเชื้อ เนื่องจากเชื้อสามารถปรับตัว และเจริญได้ดีในเต้านมทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ เชื้อสามารถปนออกมากับน้ำนม และติดต่อไปสู่เต้านมแม่โคตัวอื่นๆ ในขณะรีดนม โดยพาหะของเชื้อคือ เครื่องรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และมือของผู้รีดนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ตามสิ่งแวดล้อม (environmental bacteria) แบคทีเรียที่สำคัญ และพบได้บ่อย ได้แก่ *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. เชื้อเหล่านี้จะอยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวโค เช่น คอกโรงเรือน พื้น อุจจาระโค ในดิน พืช อาหารสัตว์ และสามารถติดต่อเข้าสู่เต้านมทำให้เกิดเต้านมอักเสบ จึงเป็นการยากที่จะกำจัดเชื้อเหล่านี้ให้หมดไป เชื้อเหล่านี้ถ้าเข้าสู่เต้านมแล้วมีโอกาสติดต่อจากเต้านมสู่เต้านมได้ด้วย ดังนั้นการป้องกันเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อกลุ่มนี้ จึงควรรักษาความสะอาดของคอกโรงเรือน พื้น และควรมีการเช็ดล้างทำความสะอาดเต้านม และหัวนมก่อนการรีดนมทุกครั้ง

3. เชื้อแบคทีเรียที่พบได้ไม่บ่อย (rarecause bacteria) เชื้อกลุ่มนี้พบได้ไม่บ่อยนัก และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ แต่จะทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง ซึ่งได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa, Corynebacterium pyogenes, Nocardia* spp., *Mycoplasma* spp., รา และยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียในตระกูลไมโครคอกคาซี (Micrococcaceae) พวกเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งมีคุณสมบัติในการย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) มีรูปร่างกลม (coccus) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5 - 1.0 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ในรูปที่ 2.1 แต่อาจพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ 3 - 4 เซลล์ โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ เป็นมันวาว ทึบแสง มีขอบชัดเจน มีสีเทาสีเหลือง และสีส้มในอาหารชนิดต่างๆ ให้ผลทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลส (coagulase) เป็นบวก และทำให้พลาสมาเกิดเป็นลิ่ม โดยปกติแล้วไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และจะไม่มีการสร้างแคปซูล หรือสร้างแคปซูลได้อย่างจำกัด โดยเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 6 - 46 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญจะอยู่ในช่วง 30 - 37 องศาเซลเซียส ระดับค่าพีเอช (pH) ที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.0 - 10.0 ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.0 - 7.5 และสามารถทนเกลือ (NaCl) ได้สูงร้อยละ 15 - 18 (นราพร และชุติกาญจน์, 2558)

รูปที่ 2.1 เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscrope, SEM)

ที่มา: http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=11181 **(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2560)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น อากาศ ฝุ่น น้ำ นม อาหาร อุปกรณ์ทำอาหารตามส่วนต่างๆ ของคน สัตว์ และจะพบตามทางเดินหายใจ คอ ผม ผิวหนัง ประมาณร้อยละ 50 หรือมากกว่านั้นตามแต่สุขภาพของแต่ละบุคคล ปริมาณจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอาการป่วย หรือในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาล โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เช่น โรคฝี และฝีฝักบัว (furuncles และ carbuncles) โรคผิวหนังหลุดลอก (scalded skin syndrome) โรคปอดอักเสบ (pneumonia) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) เป็นผลจากสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่เชื้อสร้างขึ้นภายหลังจากที่เชื้อได้มีการเจริญเติบโตแล้ว โดยที่ระดับความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับสารพิษเอนเทอโรทอกซินที่ได้รับ สารพิษดังกล่าวทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ท้องเสีย เป็นต้น (นันทนา, 2537) และยังก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์ปีก เช่น โรคเต้านมอักเสบ โดยเฉพาะในโค กระบือ แพะ และแกะ ซึ่งจะก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก

การเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เกิดขึ้นโดยการบุกรุกแพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกายและสามารถสร้างสารพิษ และเอนไซม์ต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (นันทนา, 2537) ได้แก่

1. Hemolysin (Staphylolysin) เป็นสารประกอบที่เชื้อปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ สามารถถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ได้แก่ แอลฟา-ฮีโมไลซิส (Alpha-hemolysin) เป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 3×10^4 มีคุณสมบัติทำลายเม็ดเลือดแดงของกระต่าย และทำลายเกล็ดเลือดได้ทำให้เกิดอาการอักเสบอย่างรุนแรง และทำให้เนื้อเยื่อส่วนนั้นเน่าตาย หากฉีดเข้ากระแสเลือดจะทำให้สัตว์ทดลองนั้นตายได้ เบต้า-ฮีโมไลซิส (Beta-hemolysin) สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแกะ แต่ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงของกระต่าย สังเกตเห็นคุณสมบัตินี้ได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Blood agar เดลต้า-ฮีโมไลซิส (Delta-hemolysin) เป็นพวกฟอสโฟไลเปส มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาว และต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ หลายชนิด และแกมมา-ฮีโมไลซิส (Gamma-hemolysin) มีฤทธิ์น้อยว่าชนิดอื่น ไม่ค่อยมีความสำคัญในการทำให้เกิดโรค

2. Leukocidin (Panton-Valentine leukocidin) ออกฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวของสัตว์หลายชนิด ละลายน้ำได้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่ายกว่าเอ็กซ์เทอโร-ทอกซิน ส่วนบทบาทในการทำให้เกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด

3. เอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเป็นสารที่สามารถละลายน้ำ เชื้อสามารถสร้างสารดังกล่าวได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงประมาณร้อยละ 30 เอนเทอโร-ทอกซินเป็นโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5×10^4 กิโลดาลตัน ทนต่อความร้อน 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส ได้นานประมาณ 30 นาที ทนต่อเอนไซม์ในกระเพาะอาหารได้ 8 ชนิด ได้แก่ A, B, C_1, C_2, C_3, D, E และ H และเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน

4. โคแอคกูเลส (coagulase) เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ทำให้เกิดโรคในคนส่วนมากสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส ซึ่งเอนไซม์นี้ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัวแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ Bound coagulase (clumping factor) เชื่อว่าเป็น receptor ที่จะมีปฏิกิริยากับไฟบริโนเจนในพลาสมา ทำให้เลือดแข็งตัว และ Free coagulase เอนไซม์นี้ทำให้พลาสมาแข็งตัว ทำให้ร่างกายของเซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถกำจัดเม็ดเลือดขาวได้ โดยเอนไซม์จะไปจับกับ Coagulase reacting factor (CRF) ในพลาสมาทำให้โปรทรอมบิน เปลี่ยนไปเป็นทรอมบิน และไฟบริโนเจนเปลี่ยนเป็นไฟบริน ส่งผลให้เม็ดเลือดขาวไม่สามารถจับเชื้อโรคได้ เนื่องจากเลือดเกิดการแข็งตัว

5. Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยทำลายเนื้อเยื่อได้ดี เนื่องจากเอนไซม์จะไปทำลาย hyaluronic acid ซึ่งเป็นสารที่เชื่อมทำให้เซลล์ติดกันเป็นเนื้อเยื่อได้

6. Exfoliatin (Epidermolysin) สารชนิดนี้ส่วนใหญ่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* type II สารพิษดังกล่าวทำให้เกิดอาการหลุดลอกของหนังกำพร้าทั่วร่างกาย (scalded skin syndrome) โรคนี้มักพบในเด็ก สำหรับผู้ใหญ่ที่มีภูมิต้านทานต่ำก็สามารถพบได้เช่นกัน

7. Penicillinase (Beta-lactamase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้ดื้อยากลุ่มเพนนิซิลลิน โดยที่เอนไซม์จะทำลาย beta-lactam ring นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ยังสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส โปรติเนส และดีเอ็นเอส ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อโรคเป็นไปได้มากขึ้นอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 แบคเทอริโอเฟจ

2.3.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรีย ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Frederick W. Twort นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1915 ซึ่งพบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการติดเชื้อ และแพร่ไปยังโคโลนีอื่น โดยตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อนี้ สามารถผ่านเครื่องกรองได้ จึงได้มีการตั้งสมมติฐานไว้อย่างหลากหลาย และอธิบายลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ว่าเป็นสิ่งที่สามารถผ่านเครื่องกรองได้ คล้ายไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ (animal viruses) และพืช (plant viruses) อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวถูกมองข้ามจากนักวิทยาศาสตร์ และไม่มีการศึกษาค้นคว้าต่อ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1917 Félix d'Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดา ซึ่งทำงานอยู่ใน Pasteur Institute ได้ทดลองกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เป็นสาเหตุของโรคบิด และพบว่าได้เกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Twort โดยเขาได้แยกเชื้อ *S. dysenteriae* จากอุจจาระ และนำอุจจาระไปกรอง นำส่วนของเหลวที่ได้ผสมกับอาหารที่มีเชื้อ *S. dysenteriae* ช่วงกำลังเจริญ บ่มไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จึงสรุปว่าสิ่งที่ผ่านเครื่องกรองได้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และให้ความหมายของแบคเทอริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams, 1958)

2.3.2 สมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

1. สามารถดำรงชีวิตแบบอิสระได้ แต่การเพิ่มจำนวนอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ เกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ หรือภายในแบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) เท่านั้น โดยอาศัยเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเจ้าบ้านในการผลิตแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา

2. ไม่จัดเป็นเซลล์เพราะไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโครงสร้างอื่นๆ ของเซลล์

3. องค์ประกอบหลักของแบคเทอริโอเฟจมีเพียงกรดนิวคลีอิก ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดใดชนิดหนึ่ง และส่วนของแคพซิด (capsid) เป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกไว้ภายในช่วยป้องกันกรดนิวคลีอิกที่อาจถูกทำลายด้วย รังสี อุณหภูมิ และสารเคมี

4. กรดนิวคลีอิกที่บรรจุอยู่ภายในส่วนใหญ่เป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) อาจพบชนิดอื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) หรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) ขนาดของกรดนิวคลีอิกแตกต่างกันตามชนิดของแบคเทอริโอเฟจ (Voyles, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ

การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ อาศัยลักษณะรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และชนิดของกรดนิวคลีอิก ดังรูปที่ 2.2 โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามวิธีของ Bradley ซึ่งใช้เป็นพื้นฐานของการจัดหมวดหมู่ของแบคเทอริโอเฟจในปัจจุบัน (Bradley, 1967) ดังนี้ คือ

กลุ่ม A ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีส่วนหาง (tail) ที่มีชีทที่ยืดหดได้ห่อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่พบระยางค์ (appendage) เป็นโครงสร้างส่วนปลาย เช่น ใยหาง (tail fiber) มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ อาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยต่อไปอีกตามลักษณะรูปร่าง

กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีชีทห่อหุ้มจึงไม่สามารถหดตัวได้ แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมี หรือไม่มีรยางค์ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก และไม่มีชีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดตัวได้ อาจมี หรือไม่มีรยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคพโซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคพซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

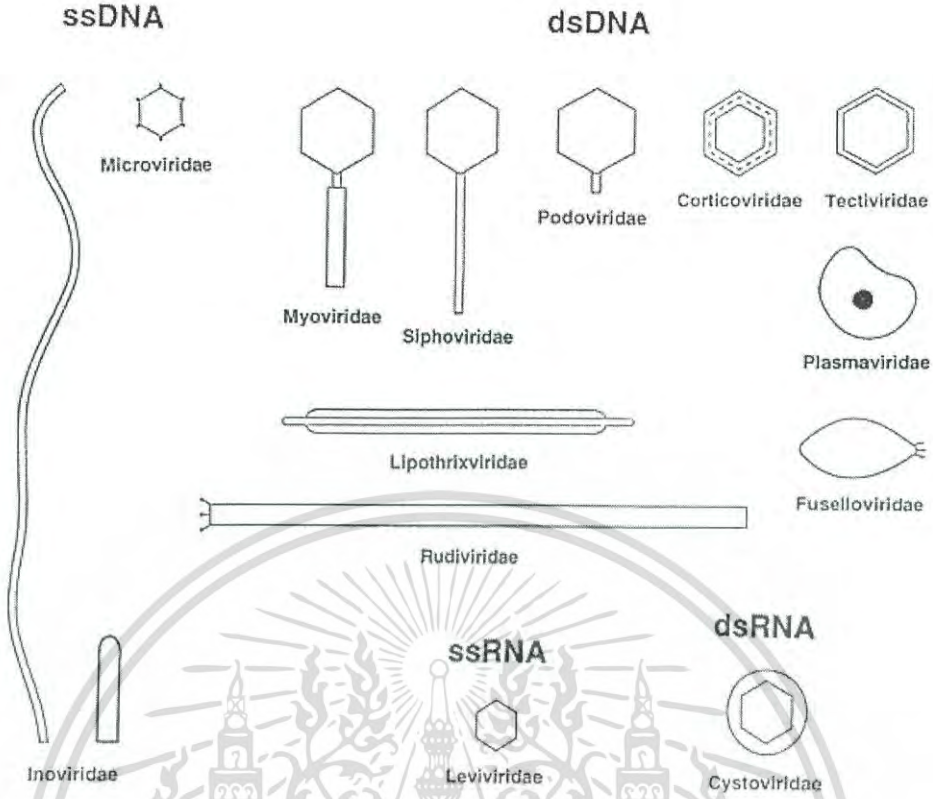
กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคพโซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวที่มีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้ยังพบแบคเทอริโอเฟจ กลุ่ม G ลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน มี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบแต่ไม่พบส่วนของแคพซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เช่น แบคเทอริโอเฟจ MV-L2 โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจที่พบมีรูปร่างอยู่ในกลุ่ม A, B และ C

ในการจัดหมวดหมู่ (classification) ของไวรัสมีการอธิบายน้อยกว่าในแบคทีเรีย เพราะขาดความรู้เบื้องต้น เช่น แหล่งกำเนิด วิวัฒนาการ โดยทั่วไปแบ่งไวรัสออกเป็นกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ไวรัสสัตว์ ไวรัสพืช และไวรัสแบคทีเรีย ซึ่งใช้ความแตกต่างของแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแบ่งกลุ่ม อย่างไรก็ตามไม่สามารถจัดหมวดหมู่และตั้งชื่อ (nomenclature) ให้เป็นระบบเดียวกันได้จนกระทั่งคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (International committee fortaxonomy of viruses, ICTV) ได้พัฒนารูปแบบการจัดหมวดหมู่และแบ่งไวรัสเป็น 122 Families สำหรับชื่อ Family ให้ลงท้ายด้วยคำว่า –viridae เช่น Family Poxviridae ชื่อ Subfamily ให้ลงท้ายด้วยคำว่า -virinae เช่น Subfamily Chorodopoxvirinae และชื่อ Genus ให้ลงท้ายด้วยคำว่า *-virus* เช่น Genus *Orthopoxvirus* (Harley and Klein, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การจัดจำแนก Family ของแบคเทอริโอเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

ที่มา: http://www.smj.ejnal.com/e-journal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1604 **(สืบค้นวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2560)**

จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจที่ผ่านมาพบว่า แบคเทอริโอเฟจที่ถูกศึกษาส่วนใหญ่เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหัวลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีหาง (tail) ถึงร้อยละ 96 ซึ่งจัดอยู่ใน Family *Siphoviridae*, *Myoviridae* หรือ *Podoviridae* โดยมีแบคเทอริโอเฟจที่ถูกจัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* ถึงร้อยละ 61.7 รองลงมาคือ Family *Myoviridae* ร้อยละ 24.5 และ Family *Podoviridae* ร้อยละ 13.9 (Ackermann, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 วงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ

วงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

2.3.4.1 วงชีวิตแบบไลติค (lytic cycle)

แบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มจำนวนโดยใช้วงชีวิตนี้ เรียกว่า ไวรูเลนต์เฟจ (virulent phage) หรือไลติคเฟจ แบคเทอริโอเฟจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตาย เพื่อปล่อยแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา (Boyd, 1995; Maloy et al., 1994) วงชีวิตแบบไลติค ดังรูปที่ 2.3 ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเกาะติด (adsorption) แบคเทอริโอเฟจจะอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติด (attachment site) ของแบคเทอริโอเฟจกับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) บนเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) แคปซูล (capsule) พิไล (pili) แฟลกเจลล่า (flagella) โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นต้น ตำแหน่งเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจ และตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์ของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก ถ้าแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ จะทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเกิดการต้านทานต่อการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจเดิมที่เคยทำให้เกิดการติดเชื้อได้

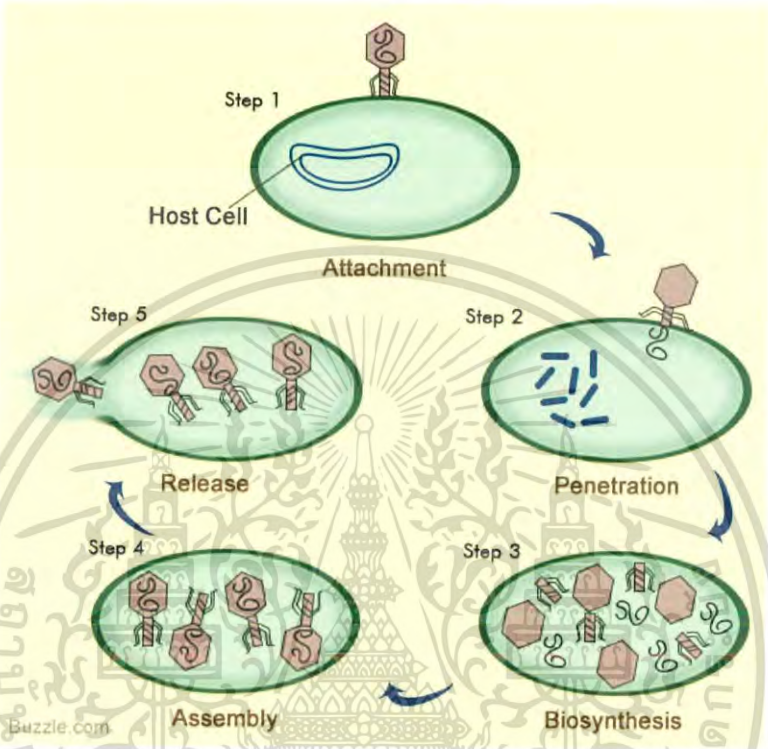
2. การส่งกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (penetration) ขั้นตอนนี้ แบคเทอริโอเฟจจะปล่อยกรดนิวคลีอิกผ่านผนังเซลล์จนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย ส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่นยังคงอยู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

3. การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ (biosynthesis) เมื่อกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียจะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ ตั้งแต่ขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ หลังจากนั้นดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ของแบคเทอริโอเฟจ และ mRNA ของแบคเทอริโอเฟจจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ โดย mRNA ที่สร้างขึ้นในช่วงแรก (early mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์ และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ส่วน mRNA ที่สร้างขึ้นช่วงหลัง (late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ เช่น แคพซิด หาง เป็นต้น หรือแปลรหัสเป็นโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา

4. การประกอบตัวของแบคเทอริโอเฟจ (assembly) ขั้นตอนนี้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคพซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคพซิดจะเชื่อมต่อกับชีทห่อหุ้ม และส่วนหาง แล้วประกอบกันเป็นอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การแตกสลายของแบคทีเรีย (lysis) ขั้นตอนนี้อนุภาคแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่จะถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตาย เซลล์ของแบคทีเรียที่แตกสลายนี้เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) และ โฮลิน (holin) ซึ่งหลั่งโดยแบคเทอริโอเฟจเพื่อย่อยผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียตามลำดับ



รูปที่ 2.3 วงชีวิตแบบไลติคของแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา: http://www.buzzle.com/articles/lytic-cycle.html **(สืบค้นวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2560)**

2.3.4.2 วงชีวิตแบบไลโสเจนิค (lysogenic cycle)

แบคเทอริโอเฟจที่มีวงชีวิตทั้งแบบไลโสเจนิคและแบบไลติค เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) (Alcamo, 1996; Mckane and Kandel, 1996) ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเกาะติด เกิดเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติค

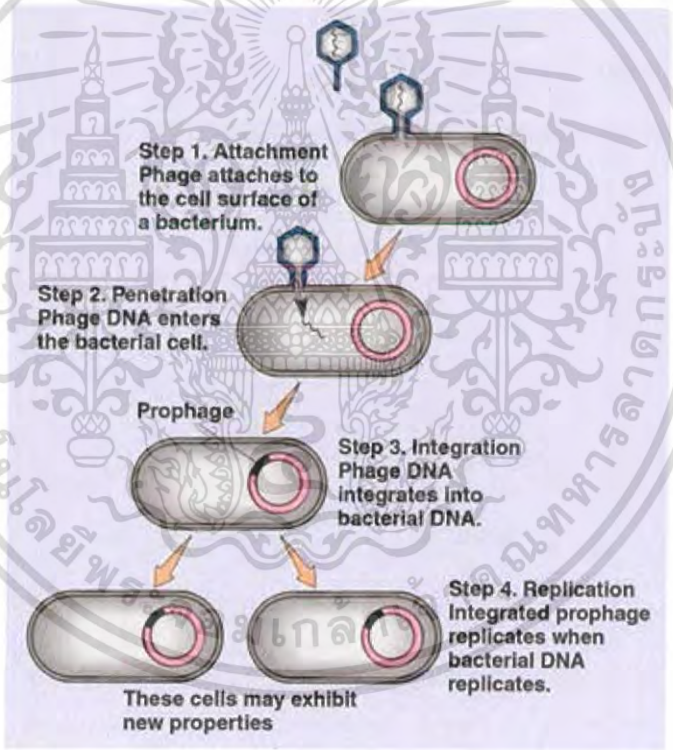
2. การส่งกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคเทอริโอเฟจจะส่งกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจ ที่มีลักษณะเป็นสายตรงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย จากนั้นกรดนิวคลีอิกที่เป็นสายตรงจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวนแบบปิด

3. การสอดแทรกดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจในโครโมโซมของแบคทีเรียเจ้าบ้าน (integration) โดยอาศัยเอนไซม์อินทีเกรส (integrase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกแบคเทอริ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอเฟจ ระยะนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ว่า ไลโสเจน (lysogen) ขั้นตอนนี้จะเริ่มจากการจำลองดีเอ็นเอ ถอดรหัส และแปลรหัส จนได้โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) จึงไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ของแบคเทอริโอเฟจได้ เมื่อแบคเทอริโอเฟจเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้ว แบคเทอริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมแบคทีเรีย

4. การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติค (induction) การชักนำเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ดังนี้ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหาย โปรเฟจจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค และจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอุลตราไวโอเลต หรือสารเคมี เช่น มิโตมัยซิน ซี (mitomycin C) เมื่อแบคทีเรียตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกเหล่านี้ ทำให้โปรตีนควบคุมถูกทำลาย แบคเทอริโอเฟจจะเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค



รูปที่ 2.4 วงชีวิตแบบไลโสเจนิคของแบคเทอริโอเฟจ

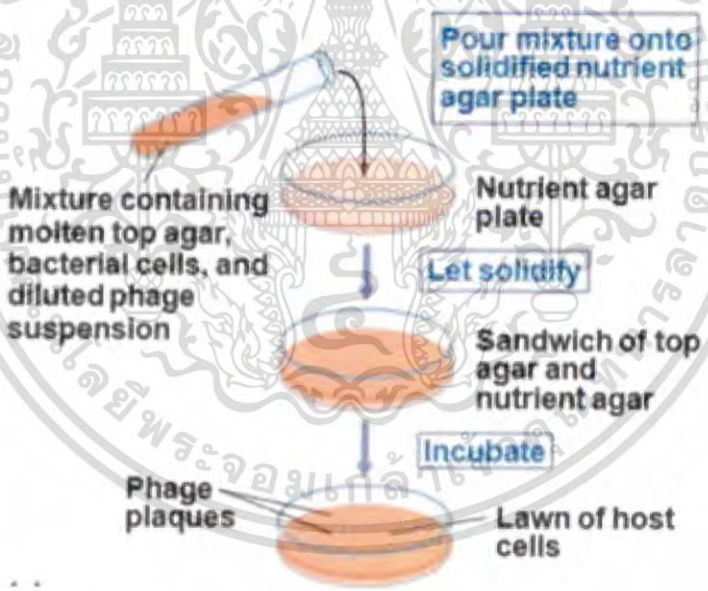
ที่มา: http://blog.targethealth.com/quiz-fill-in-the-blanks-bacteriophages/ **(สืบค้นวันที่ 22 มิถุนายน 2560)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 การทำ plaque assay

แบคเทอริโอเฟจสามารถสังเกตได้จากบริเวณใสหรือพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่าการทำ plaque assay ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ 2 วิธี

วิธี double agar layer จะนิยมใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจมากกว่าวิธี spot test โดยวิธีนี้มีการผสมแบคเทอริโอเฟจ แบคทีเรียเจ้าบ้าน และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (top agar) ในหลอดทดลอง ต่อมาเทส่วนผสมที่ได้นี้ทับซ้อนบนอาหารวุ้นที่เป็นฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ววนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว รอจนวุ้นแข็งตัวแล้ว บ่มโดยคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้ามคืน วิธีการดังรูปที่ 2.5 จากนั้นสังเกตพลาคที่เกิดขึ้น ข้อดีของวิธีนี้จะทำให้เกิดการผสมได้ดีกว่า มีความสม่ำเสมอมากกว่าการใช้วิธีที่ไม่ได้ซ้อนทับของวุ้น ขนาดของพลาคจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีอัตราของการแพร่กระจายของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่มากขึ้น ในชั้นบนของอาหารชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว การแพร่กระจายของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากวุ้นที่เทซ้อนทับมีความเข้มข้นต่ำกว่าวุ้นที่เป็นฐาน ในการตรวจนับและคำนวณจำนวนของแบคเทอริโอเฟจที่มีอยู่ในตัวอย่าง แสดงในหน่วย PFU ต่อมิลลิลิตร วิธีนี้มีประโยชน์อย่างมากในการทำให้แบคเทอริโอเฟจมีความบริสุทธิ์



รูปที่ 2.5 วิธี double layer หรือ overlay agar method

ที่มา: https://image.slidesharecdn.com/chapter52537-141218104348-conversion-gate01/95/chapter52537-microbiology-8th-edition-22-638.jpg?cb=1418899700 **(สืบค้นวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2560)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธี spot test จะเป็นการทดสอบว่าตัวอย่างนั้นมีแบคเทอริโอเฟจ ที่สามารถบุกรุกแบคทีเรียที่มีอยู่ได้หรือไม่ โดยนำแบคทีเรียเจ้าบ้านใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.6 ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวแข็งตัว นำตัวอย่างของเหลวที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจมาหยด หรือจุดลงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถตรวจสอบได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง เป็นการประหยัดเวลาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

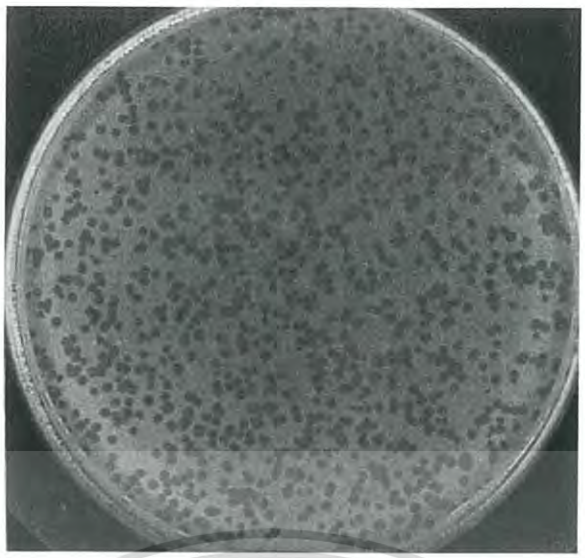
2.3.6 การตรวจสอบการติดเชื้อในแบคทีเรียเจ้าบ้าน

การตรวจสอบการติดเชื้อในแบคทีเรียเจ้าบ้าน ใช้เทคนิคที่เรียกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) หรือ plaque assay ดังอธิบายไว้ในหัวข้อ 2.3.5 การตรวจสอบการติดเชื้อพบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้าน หรือแบคทีเรียที่ไม่ติดเชื้อ สามารถเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารชั้นบนสุด เรียกว่า ลอน (lawn) แต่ถ้าพบว่ามีบริเวณที่มีลักษณะใสขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย เรียกลักษณะนี้ว่า พลาค (plaque) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ เกิดการปลดปล่อยอนุภาคแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา อนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ปลดปล่อยออกมาสามารถเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณข้างเคียง จนเกิดเป็นวงใสสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในบริเวณนี้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (Cappuccino and Sherman, 2001) ซึ่งลักษณะของพลาคแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ได้แก่

พลาคใส (clear plaque) พลาคที่ปรากฏจะมีลักษณะใส ดังรูปที่ 2.6 เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลติค แบคเทอริโอเฟจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลาย และตายจึงเห็นเป็นวงใส แบคเทอริโอเฟจที่ทำให้เกิดพลาคในลักษณะนี้ คือ ไวรูเรนท์เฟจ หรือไลติคเฟจ

พลาคขุ่น (turbid plaque) พลาคที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น แบคเทอริโอเฟจที่ทำให้พลาคมีลักษณะขุ่น คือ เทมเพอเรตเฟจ โดยเริ่มแรกแบคเทอริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบไลติคจนถึงระยะหนึ่ง แบคเทอริโอเฟจบางส่วนจะเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลโสเจนิค ซึ่งแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อโดยแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้ จะไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาค ทำให้เห็นพลาคมีลักษณะขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ลักษณะของพลาคที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย

ที่มา: http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/phage/plaques.html **(สืบค้นวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2560)**

2.3.7 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแบคเทอริโอเฟจ

ความต้องการอิเลคโทรไลท์ (electrolyte requirements) แบคเทอริโอเฟจต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น ไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) หรือไอออนของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการติดเชื้อ ซึ่งความต้องการไอออนชนิดไดวาเลนท์สำหรับการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจนั้น ถูกศึกษามาเป็นระยะเวลานานพบว่า ไอออนชนิดไดวาเลนท์เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเข้าเกาะติดของแบคทีเรียเจ้าบ้าน เพราะไอออนชนิดไดวาเลนท์ เช่น ไอออนของแคลเซียมจะมีส่วนช่วยให้แบคเทอริโอเฟจ สามารถเข้าเกาะติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านซึ่งมีประจุเป็นลบได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ไอออนของแคลเซียมยังมีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอ-เฟจ ส่วนใหญ่ด้วย โดยระดับของไอออนของแคลเซียมที่แบคเทอริโอเฟจ ต้องการเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจให้ได้มากที่สุด และจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจและชนิดของแบคทีเรียเจ้าบ้าน แต่โดยทั่วไปจะมีการเติมไอออนของแคลเซียมลงในอาหารที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจประมาณ 5 - 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมักจะมีการเติมไอออนของแคลเซียมลงไปในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยเพิ่มขนาดของพลาคให้ใหญ่ขึ้นได้

อุณหภูมิ มีผลอย่างมากต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอเฟจบางชนิดสามารถทนที่อุณหภูมิดังกล่าวได้ 5 นาทีในหางนม (skim milk, พีเอช 6.0) บางชนิดทนต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำแห้งที่อุณหภูมิ 90 - 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอเฟจ บางตัวยังสามารถอยู่รอดได้แม้ว่าจะผ่านการทำพาสเจอร์ไรซ์แบบใช้อุณหภูมิสูงแต่ใช้ระยะเวลาสั้น (High Temperature-Short Time; HTST pasteurization, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนสูงเพื่อทำลายแบคเทอริโอเฟจ โดยส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าแบคเทอริโอเฟจจะถูกทำลายหมดไปในกระบวนการผลิตนม แต่ในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิดพบว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักไม่สามารถที่จะผ่านความร้อนสูงเป็นระยะเวลานานได้ เพราะจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นั้นได้ ดังนั้นในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแบคเทอริโอเฟจ ในปัจจุบันจะเน้นศึกษาถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ทำให้แบคเทอริโอเฟจเหลือน้อยที่สุดพอที่จะทำให้การหมักได้ผลดีและไม่ส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแบคเทอริโอเฟจนั้น จะช่วยที่ให้ทราบถึงวิธีที่จะควบคุมแบคเทอริโอเฟจต่อไปในอนาคต

ความเป็นกรดด่าง (pH) แบคเทอริโอเฟจจะถูกทำลายในภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำ เมื่อมีการเติมกรดแลคติคร้อยละ 2.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไปในนม เป็นเวลา 5 นาที แบคเทอริโอเฟจจะถูกทำลายหมด อย่างไรก็ตามการเติมกรดแลคติคลงในนมน้อยกว่าร้อยละ 1 จะมีผลต่อแบคเทอริโอเฟจ น้อยมากแม้ว่าจะบ่มไว้นานถึง 24 ชั่วโมงก็ตาม ต่อมาพบว่าแบคเทอริโอเฟจจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.5 และมากกว่าหรือเท่ากับ 11.8 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 2.5 - 11.8 ส่งผลได้ช้า ส่วนที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 - 7.0 จะต้องใช้เวลามากกว่า 5 วัน แบคเทอริโอเฟจถึงจะถูกทำลายได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันพบว่า แบคเทอริโอเฟจจะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็ว ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5 โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mullan, 2002)

2.3.8 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในด้านต่างๆ

ปัจจุบันได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพันธุวิศวกรรม อุตสาหกรรม เกษตรกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงด้านการแพทย์ (นิตยา และคณะ, 2554) ดังต่อไปนี้

Genetic engineering เป็นการนำแบคเทอริโอเฟจมาเป็น genetic tool เพื่อการตัดต่อพันธุกรรมโดยตัดบางส่วนที่ไม่จำเป็นสำหรับแบคเทอริโอเฟจออกแล้วใช้เป็น cloning vector ที่สามารถใส่ชิ้น DNA ขนาดใหญ่ได้ถึงประมาณ 25 กิโลเบสเข้าไปแทน เช่นแบคเทอริโอเฟจที่มีขนาด genome ประมาณ 49 กิโลเบส เป็นเทมเพอเรตเฟจ ของ *Escherichiae coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปใน DNA จะได้เป็น DNA สายผสม (recombinant DNA) จากนั้นนำเข้าสู่โฮสต์เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย แบคเทอริโอเฟจจะนำ DNA สายผสมแทรกเข้าไปใน genome ของแบคทีเรียและใช้กลไกของโฮสต์ เพื่อสร้างโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจรวมทั้งโปรตีนจาก DNA ที่ใส่เข้าไป

Phage typing เป็นการจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในจีนัส (genus) และสปีชีส์ (species) เดียวกัน ออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ โดยมักใช้แบคเทอริโอเฟจ ชนิดต่างๆ รวมกันเป็นชุด (panel) ในการศึกษา ทั้งนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างการเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจกับตัวรับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเกิดการไลซิส (lysis) ของแบคทีเรียจะสังเกตเห็นพลาค หรือบริเวณใสเกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่เป็นวงใสเล็กๆ บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar surface) เป็นประโยชน์สำหรับงานทางระบาดวิทยาในการสืบหาเชื้อต้นเหตุของการระบาด

Bio-control tool จากคุณสมบัติที่จำเพาะของ endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์จากแบคเทอริโอเฟจ ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (food industry) เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ และแบคทีเรียที่ก่อโรค (pathogenic bacteria) ที่อาจปนมาในอาหาร และผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่สุกโดยไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น เชื้อประจำถิ่น (normal flora) นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการเร่งให้เนยแข็งเกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วขึ้น สำหรับทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการสร้างพืชจำลองพันธุ์ (transgenic plant) ซึ่งมี phage endolysin gene เพื่อต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช (phytopathogenic bacteria)

Phage therapy เริ่มต้นขึ้นในช่วงทศวรรตที่ 1980 ใช้แบคเทอริโอเฟจซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรีย และนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *Escherichiae coli* ในหนูทดลอง และในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด รวมทั้งมีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคในคน ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อมีการค้นพบยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อได้หลายชนิด จึงทำให้ความสนใจในการใช้แบคเทอริโอเฟจลดน้อยลง แต่ในประเทศรัสเซียได้มีการพัฒนาการใช้แบคเทอริโอเฟจมาอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันด้านการแพทย์ได้นำ endolysin บริสุทธิ์ มาใช้เป็น therapeutic agent โดยอาจใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อทำลายแบคทีเรียดื้อยา (antibiotic-resistant bacteria) หรือแบคทีเรียที่สร้าง biofilm ซึ่งถูกกำจัดได้ยาก

2.3.9 ความปลอดภัยของแบคเทอริโอเฟจต่อการนำมาใช้งาน

การใช้แบคเทอริโอเฟจเป็นแนวทางเลือกใหม่ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย และใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายเชื้อแบคทีเรียอย่างจำเพาะ และมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเป้าหมาย โดยที่ไม่ทำอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในร่างกายของคน และสัตว์ ทั้งยังไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ของคน และสัตว์อีกด้วย หลังจากที่แบคเทอริโอเฟจทำลายเชื้อก่อโรคแล้ว แบคเทอริโอเฟจก็จะไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้จึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการมีแบคเทอริโอเฟจตกค้างในร่างกายคน และสัตว์ (พงศ์ศักดิ์ และคณะ, 2553) อีกทั้งยังมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ 1,000 เท่า ภายในเซลล์เจ้าบ้าน (Basdew and Laing, 2011) องค์กรอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FAD) ได้อนุญาตให้ใช้แบคเทอริโอเฟจที่สามารถยับยั้ง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ และสัตว์ปีก (Peek et al., 2006)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

Ding et al. (2016) ได้ทำการประเมินความเสี่ยงในการบริโภคน้ำนมที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และการตรวจวัดสารพิษในอาหารที่มีส่วนผสมของนมที่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่มีการหลั่งสารพิษของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci ในการทดลองพบว่า อุณหภูมิการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมแปรรูปในโรงงาน และการให้ความร้อนส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และมีปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิการเก็บรักษาน้ำนมในฟาร์ม อุณหภูมิในกระบวนการให้ความร้อน และระยะเวลาในการแปรรูป ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญในการลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนสารพิษของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci ในน้ำนมคือ การควบคุมสภาวะการเก็บรักษาทั้งก่อนและหลังให้ความร้อนของน้ำนม

Mehli et al. (2017) ได้ทำการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ความหลากหลายทางพันธุกรรม และการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในน้ำนมดิบ หางนม (whey) และเนยแข็งจากฟาร์มโคนม โดยนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci ที่ให้ผลโคแอคกูเลสเป็นบวกจากตัวอย่าง 69 ตัวอย่าง ทั้งในน้ำนมดิบ หางนม และเนยแข็ง ในฟาร์มโคนม 5 แห่ง พบว่าในน้ำนมดิบทั้งหมดมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci จากนั้นนำมาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci จากยีนเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) และตำแหน่งของยีนที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มาวิเคราะห์โดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าเป็นกลุ่มเดียวกันร้อยละ 61 โดยพบยีนที่ก่อให้เกิดสารพิษทั้งหมด 16 ยีน สามารถระบุได้ว่าเป็นยีน *sec* ร้อยละ 87.5 และยีน *tst* ร้อยละ 52.5

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ

Gill et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการทำงานของแบคเทอริโอเฟจ K ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในหางนม โดยแบคเทอริโอเฟจ K มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ Newbould 305 ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาทั้งในตัวอย่างหางนม และโปรตีนในนม เมื่อทำการบ่มเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* กับแบคเทอริโอเฟจ พบว่าแบคทีเรียมีความทนทานต่อการทำลายของแบคเทอริโอเฟจ มากขึ้นทั้งในหางนม และโปรตีนในนม โดยตัวอย่าง 23 ชนิด พบว่าปริมาณแบคเทอริโอเฟจลดลง และเมื่อทำการทดลองหาองค์ประกอบของโปรตีนในหางนม (milk whey) เพื่อตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในหางนม โดยมีชุดการทดลอง คือ การให้ความร้อน การเติมเอนไซม์โปรติเอส การกรอง การทำให้เกิดการกระจายในอาหารเหลว ที่ส่งผลให้การจับตัวกันของแบคเทอริโอเฟจ ลดลง ผลจากการส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่า เกิดการเกาะติดกันบริเวณพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* กับหางนม และผลจากโครมาโทรกราฟฟีของหางนมแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดใหญ่จะจับกับบริเวณพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* ทำให้ขัดขวางการเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจบนผิวของเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus*

O'Flaherty et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ K ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในน้ำนมดิบ โดยแบคเทอริโอเฟจ K สามารถเพิ่มจำนวนได้ในน้ำนมดิบ ทำให้สามารถทำลายแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ และเมื่อนำน้ำนมดิบมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ทำให้แบคเทอริโอเฟจไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ผลการตรวจสอบการบุกรุกของแบคเทอริโอเฟจ พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในน้ำนมดิบที่มีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และจากการส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่าในน้ำนมดิบเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนกับเม็ดไขมันนมในขณะที่มีการให้ความร้อน

Dias et al. (2014) ได้ทำการศึกษาการใช้แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ มาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (Penicillin) และแอมพิซิลลิน (Ampicillin) โดยทำการแยกแบคเทอริโอเฟจ 10 ชนิด เพื่อนำมาทำลายเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากผลการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย เพราะทำให้แบคทีเรียเกิดการแตกตัว มีช่วงโฮสต์เรจน์กว้าง และทนต่อความร้อน

Kwiatek et al. (2012) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติค ที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยมีจุดประสงค์เพื่อแยกแบคเทอริโอเฟจ เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ในการควบคุมโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย จากการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจ MSA6 ที่แยกได้นั้นสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci ทั้งในมนุษย์และโคนม แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจชนิดอื่นๆ ในแฟมิลี่ *Myoviridae* (ได้แก่ Twort, K, G1 และ 812) ให้ผลเช่นเดียวกันกับแบคเทอริโอเฟจ MSA6 จากผลที่ได้สามารถนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

Tabla et al. (2012) ได้ทำการศึกษาแบคเทอริโอเฟจ เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ Sa9 ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ โดยการให้ความดันสูงร่วมกับการใช้แบคเทอริโอเฟจ 2 ชนิด คือ vB_SauS-phi-IPLA35 (philPLA35) และvB_SauS-phi-IPLA88 (philPLA88) บ่มนมพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci เริ่มต้นแตกต่างกันคือ $1x10^4$ และ $1x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าการทำงานร่วมกันระหว่างการให้ความดันสูงแก่น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ และแบคเทอริโอเฟจ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันในแต่ละเวลาของการให้ความดันสูง พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Han et al. (2013) ได้ทำการแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจ SAH-1 ชนิดไลติคที่ทำลายเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยแบคเทอริโอเฟจ นี้สามารถแยกได้จากน้ำเสียในฟาร์มโคนม และจัดอยู่ในแฟมิลี่ *Myoviridae* จากการทดลองพบว่า แบคเทอริโอเฟจ SAH-1 มีช่วงโฮสต์เรนจ์กว้างที่สามารถทำลายบุกรุกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ระดับ MOI เท่ากับ 1 และ 100 แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจ SAH-1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้

Lee et al. (2015) ได้ทำศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำทิ้ง และศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจ เพื่อใช้ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ในไบโอฟิล์ม โดยทำการแยกแบคเทอริโอเฟจ BECP2 และ BECP6 จากน้ำทิ้งแล้วทำการหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ในน้ำนมและไบโอฟิล์ม จากการทดลองการนำแบคเทอริโอเฟจมายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ลดลงจาก 6 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาประยุกต์ใช้กับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ในไบโอฟิล์มบน glass wool, microtiter plate และ stainless steel coupon พบว่า ความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ในไบโอฟิล์มลดลงจาก 1.1 เหลือ 0.6 เมื่อวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจ BECP2 และ BECP6 อาจมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ในไบโอฟิล์มตามธรรมชาติได้

Bueno et al. (2012) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในการผลิตเนยแข็งประเภทเฟรชชีส (fresh cheese) และฮาร์ดชีส (hard cheese) โดยใช้แบคเทอริโอเฟจ 2 ชนิด คือ vB_SauS-phi-IPA35 และ vB_SauS-phi-SauS-IPLA88 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมรอบโรงงาน โดยมีการทดสอบโดยการนำน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในการผลิตเนยแข็งประเภทเฟรชชีส และฮาร์ดชีส แล้วเติมแบคเทอริโอเฟจทั้งสองชนิดลงไป โดยมีเนยแข็งที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอเฟจลงไปเป็นตัวอย่างควบคุม จากการทดลองพบว่า ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะลดลงในช่วงระยะการสร้างเคิร์ดในเนยแข็งประเภทเฟรชชีส โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ลดลงถึง 3.83 log CFU ต่อกรัม ภายใน 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม และไม่พบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci หลังการสร้างเคิร์ด (24 ชั่วโมง) นอกจากนี้ยังไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ ส่วนในเนยแข็งประเภทฮาร์ดชีส เมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจลงไป ทำให้ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci ลดลง 4.64 log CFU ต่อกรัม ภายใน 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ส่วนในขั้นตอนการบ่มตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci 1.24 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่ชุดตัวอย่างควบคุมสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 6.73 log CFU ต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Haddad et al. (2016) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 ในน้ำนมดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตเนยแข็งด้วยแบคเทอริโอเฟจค็อกเทล โดยทำการออกแบบแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลในแฟมิลี่ *Myoviridae, Siphoviridae* และ *Podoviridae* ทำการทดสอบโดยการนำน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 มาเติมแบคเทอริโอเฟจค็อกเทล 2 ชนิด ที่ระดับ MOI แตกต่างกัน โดยแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลชนิดที่หนึ่ง ประกอบด้วย Team1, P68, LH1-MUT และแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลชนิดที่สองประกอบด้วย phi812, 44AHJD, phi2 ส่วนตัวอย่างควบคุมคือ น้ำนมดิบพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 และไม่มีการเติมแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลลงไป ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลชนิดที่หนึ่ง ในขั้นตอน maturation และขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีน (coagulation) ที่ระดับ MOI ทั้ง 3 ได้แก่ 15, 45 และ 150 มีการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม และในน้ำเวย์ที่ถูกขับออกจากเคิร์ด (cheddaring) เมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจที่ระดับ MOI ทั้ง 3 ได้แก่ 15, 45 และ 150 มีการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 เมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจค็อกเทลชนิดที่สองลงไปในขั้นตอน maturation และขั้นตอนการบ่ม (ripening) พบว่ามีการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 ซึ่งผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคเทอริโอเฟจค็อกเทลทั้งสองชนิดสามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SMQ-1320 ในเนยแข็ง

Garcia et al. (2007) ได้ทำการศึกษาการนำแบคเทอริโอเฟจ มาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในกระบวนการเกิดเคิร์ด โดยใช้แบคเทอริโอเฟจชนิดไลติค 2 ชนิด คือ ϕH5, ϕA72 และแบคเทอริโอเฟจค็อกเทล ϕ88, ϕ35 ที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในน้ำนมจืดยูเอชที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติคลงในน้ำนมทำให้สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้อย่างรวดเร็วในขณะที่เกิดเคิร์ด ส่วนในเคิร์ดที่มีพีเอชเป็นกรดไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเมื่อเติมเอนไซม์เรนเนท (rennet) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* หมดไป แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติค สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์นมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish, Union Science, Thailand)
2. หลอดทดลอง (Test Tube, PYREX®, Maxico)
3. ปิเปตแก้ว (Pipette, PRECICOLOR HBG, Germany) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปต (Micropipette, GILSON, France) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
5. ทิป (Tip, ExtraGene Inc., Taiwan) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
6. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube, Becton Dickinson, USA)
7. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube, ExtraGene Inc., Taiwan)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask, PYREX, USA)
9. บีกเกอร์ (Beaker, PYREX, Germany)
10. ขวดแก้ว (Duran Bottle, SCHOTT DURAN, Germany)
11. ตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร (CORNING®, Germany)
12. ตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.45 ไมโครเมตร (CORNING®, Germany)
13. หลอดฉีดยา (Syringe, NIPRO, Thailand)
14. สไลด์ (Slide, SAIL, China)
15. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass, HAD, Union Science)
16. กระบอกตวง (Cylinder, NALGENE®, USA)
17. ไมโครมิเตอร์ (Micrometer, Nikon, Japan)
18. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
19. แท่งแก้วงอ (Spreader)
20. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
21. ช้อนตักสาร (Spatula)
22. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
23. จานหลุมทดสอบ CMT
24. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำนม
25. ไม้พันสำลี (Cotton swabs)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator, mermert, The Novacel® Solution for LASER Fiber & LASER CO_2)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker, Lab. Companion, USA)
3. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, TOMY, JAPAN)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge, eppendorf, Germany)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow, HOLTEN, HOLTEN LAMINER AIR A/S)
6. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, ARC120, Adventurer, USA)
7. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance, BP 221S, sartorios, Germany)
8. กระดาษวัดพีเอช (pH Paper, Universal indicator, Germany)
9. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, BINDER, SCIENTIFIC PROMOTION)
10. ตู้เย็น (Refrigerator, NR-BT264, Panasonic, Japan)
11. เครื่องผสม (Vortex Mixer, G560E, Scientific Industries, USA)
12. กล้องจุลทรรศน์ (Optical Microscopes, OLYMPUS, OLYMPUS POTICAL)
13. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper, SONIC, Thailand)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, MERCK, Germany)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder Type I, TM Media, India)
3. ทริปโตน (Tryptone Powder, Sisco, India)
4. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
5 สารละลาย Saline-Magnesium (SM solution)
6. ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl, Vivantis, USA)
7. เจลาติน (Gelatin, Fisher Chemical, USA)
8. น้ำยา ซี.เอ็ม.ที. (CMT, Giss, Thailand)
9. สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
10. น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram Iodine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
11. สีซาฟรานิน (Safranin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
12. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2, ศิริบัญชา, ประเทศไทย)
13. ชุดทดสอบโคแอคกูแลส (Coagulase Test, Scaharlau, Spain)
14. กลีเซอรอล (Glecerol, CARLO ERBA reagents, France)
15. วาสลีน (Vasline, Vasline® Jelly, Univernity)
16. สีนิโกรซิน (Nigrosin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
18. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Agar (BPA, Difco™, Becton, Dickinson and Company Sparks) ที่เติม Egg Yolk Tellurite Supplement (Scaharlau, Spain) (ภาคผนวก ก)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB, Difco™, Becton, Dickinson and Company Sparks) (ภาคผนวก ก)
3. อาหาร Mannitol Salt Agar (MSA, BBL™, Becton, Dickinson and Company Sparks (ภาคผนวก ก)

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus*

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* สำหรับการทดลองครั้งนี้มาจากน้ำนมดิบจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ 14 ตัวอย่าง จาก 2 ฟาร์ม โดย 12 ตัวอย่างมาจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ ใสสว่าง ได้แก่ W1A, W1D, W2B, W3D, W4A, W5B, W5D, W7D, W8A, W8B, W8C และ W8D และ 2 ตัวอย่างจากคุณมนัส ขยายแย้ม ได้แก่ M2A และ M3B

3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

1. น้ำนมดิบจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จำนวน 14 ตัวอย่าง โดยเก็บน้ำนมดิบจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ดินบริเวณคอกโคนมจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส จำนวนฟาร์มละ 3 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณคอกโคนมด้วยช้อนตักสารสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตัวอย่างละ 10 กรัม แยกใส่ถุงพลาสติก (ถุงร้อนใสสำหรับใส่อาหาร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มัดปากถุงให้แน่นด้วยหนังยาง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. น้ำทิ้งบริเวณคอกโคนมจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส จำนวนฟาร์มละ 3 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณคอกโคนมตัวอย่างละ 40 มิลลิลิตร ใช้หลอดฉีดยาปลอดเชื้อดูดตัวอย่างใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ราวกั้นคอกโคนมจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส จำนวนฟาร์มละ 3 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างราวกั้นคอกโคนม โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ผ่านการ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฆ่าเชื้อแล้วมาทำการป้าย (swab) บนราวกั้นคอก จากนั้นนำไม้พันสำลีมาใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ SM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* คัดเลือกจากน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ที่มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมดิบ (Somatic cell count, SCC) สูงกว่า 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และตัวอย่างน้ำนมดิบดังกล่าวถูกนำมาทดสอบด้วยวิธีเต้านมอักเสบแคลิฟอร์เนีย (Califonia matitis test, CMT) โดยใช้ชุดตรวจสอบซีเอ็มที (ศริญญา, 2554)

ในการใช้ชุดตรวจสอบซีเอ็มทีขั้นตอนแรกต้องทำความสะอาดเต้านมก่อน โดยใช้ผ้าชุบน้ำสะอาดทำการเช็ดรอบๆ เต้านม หลังจากนั้นนำสำลีชุบเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดรอบๆ เต้านม และบริเวณรูหัวนม เพื่อไม่ให้เชื้อแบคทีเรียจากเต้านม และรูหัวนมมาปนเปื้อนในน้ำนม ทำการบีบเต้านมทั้ง 4 เต้า ทั้งเต้านมหน้าขวา (A) หน้าซ้าย (B) หลังขวา (C) และหลังซ้าย (D) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนจานหลุมทดสอบ เติมน้ำยาซีเอ็มที 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผสมกับน้ำยาซีเอ็มทีแล้วมีลักษณะหนืด จับตัวเป็นลิ่ม เพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

3.6.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

3.6.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Baird-Parker Agar (BPA)

นำตัวอย่างน้ำนมดิบปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง BPA แล้วทำการขีดเชื้อแบบตัดกัน (cross streak) บนอาหาร BPA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีดำ กลม มันวาว มีบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี

3.6.2.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar (MSA)

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากอาหารแข็ง BPA ตามลักษณะที่กล่าวไว้ดังหัวข้อ 3.6.2.1 ทดสอบบนอาหารแข็ง MSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (นันทนา, 2537) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA จะมีลักษณะสีเหลือง และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (Coagulase) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัว (นันทนา, 2537) โดยเติมโคแอคกูเลส พลาสมา (coagulase plasma) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เขี่ยโคโลนีจากอาหารแข็ง LB ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจดูการแข็งตัว เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที 1, 4 และ 6 ชั่วโมง หากไม่เกิดการแข็งตัวภายในระยะเวลาดังกล่าวให้ทำการบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง

3.6.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากอาหารแข็ง MSA มาขีดเชื้อแบบตัดกันบนอาหารแข็ง Luria-Bertani Agar (LB Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (นันทนา, 2537) หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ จะเกิดฟองอากาศบริเวณที่แตะเชื้อลงไป

3.6.2.5 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ Gram strain โดยหยดน้ำปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยแบคทีเรียจากอาหารแข็ง LB มาเกลี่ย (smear) ลงบนหยดน้ำรอจนแห้ง แล้วนำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ (fix) 2 - 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสีคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนซ้ำอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้นาน 1 นาที หยดเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 10 - 15 วินาที ล้างเอทานอลออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีซาฟรานินออกด้วยน้ำ รอจนแห้ง ส่องดูการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.6.2.6 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ในอาหารเหลว LB ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลงบริเวณตรงกลางของแผ่นปิดสไลด์ นำวาสลีน (vaseline) ทารอบหลุมของสไลด์หลุม แล้ววางแผ่นปิดสไลด์บนสไลด์หลุม โดยให้บริเวณที่เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ตรงกลางระหว่างหลุม ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำลังขยาย 400 เท่า (กัญจนา และคณะ, 2544) โดยแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ (motile) จะมีแฟลเจลล่าที่ยื่นออกมาจากปลายของเซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ (non-motile) จะไม่มีแฟลเจลล่า

3.6.2.7 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* บนอาหารแข็งมีโคโลนีสีเหลืองเข้ม หรือสีเหลืองทอง มีรูปร่างกลม ขอบเรียบ มันวาว โค้งนูน และสีขุ่นทึบแสง (นราพร และชุติกาญจน์, 2558)

วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Prakash, 2014)

3.6.2.8 การวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ negative strain โดยใช้สีนิโกรซิน (nigrosin) การย้อมด้วยวิธีนี้ภายในตัวเซลล์ของแบคทีเรียจะไม่ติดสี แต่พื้นหลังสไลด์จะติดสี หยดสีนิโกรซินลงบริเวณปลายด้านหนึ่งของสไลด์ แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อหยดน้ำลงข้างหยดสี จากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ลงในหยดน้ำ ใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นมาวางแตะหยดทั้งสอง จากนั้นลากสไลด์ช้าๆ ตามแนวยาวให้ส่วนผสมแผ่ออก รอจนแห้ง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (กัญจนา และคณะ, 2544)

3.6.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* 1 โคโลนี จากอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริ-ฟิวจ์ ที่มีอาหารเหลว LB และกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ร้อยละ 20 โดยปริมาตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.6.4 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่คาดว่าเป็น *S. aureus* (inoculum)

ทำการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวน 1 โคโลนี จากอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะนิ่งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.5 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

3.6.5.1 การสกัด (Extraction) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน

ใช้วิธีดัดแปลงของ Williamson et al. (2013) ชั่งตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (ดิน) 1 กรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ พีเอชเท่ากับ 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 10 วินาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำไปใช้ในขั้นต่อไป

3.6.5.2. การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation without Enrichment)

3.6.5.2.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

ดูดตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บของเหลวที่กรองได้ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test และ plaque assay

3.6.5.2.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างดิน

ใช้วิธีดัดแปลงของ Williamson et al. (2013) นำของเหลวที่ได้จากตัวอย่างดินที่ผ่านการสกัดตามหัวข้อ 3.6.5.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test และ plaque assay

3.6.5.2.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างของเหลว

ตัวอย่างที่เป็นของเหลวที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ ได้แก่ (1) ตัวอย่างน้ำทิ้งคอกโคนม และ (2) ราวกั้นคอกโคนม ในขั้นตอนนี้เก็บตัวอย่างโดยการนำไม้พันสำลีจุ่มสารละลายบัฟเฟอร์ SM แล้วนำมาเช็ดบนราวกั้นคอก และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ SM เป็นตัวทำละลาย (diluent) อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่คาดว่าจะมีในตัวอย่าง

นำตัวอย่างของเหลวใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Beaudoin et al., 2007) ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test และ plaque assay

3.6.5.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation with Enrichment)

3.6.5.3.1 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่

นำส่วนใสที่ได้จากการกรอง (ดิน, น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก) ปริมาตร 3 - 7 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ลงไปปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

3.6.5.3.2 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ในขั้นตอนการทดลองนี้ทำต่อเนื่องจากข้อ 3.6.5.3.1 โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (2X LB broth) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ปริมาตรเท่ากับอาหารที่เหลือในขวดรูปชมพู่เดิมที่ดูดออกไป) ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ซึ่งทำให้ได้ปริมาตรอาหารเท่าเดิม (50 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่ โดยทำซ้ำในลักษณะเดิมตามที่กล่าวข้างต้น จำนวน 2 รอบ

ในการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก จากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส ด้วยวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 วิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	วิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจ		
	Without Enrichment	Extraction	With Enrichment
น้ำนมดิบจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส	✓		
ดินจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส	✓	✓	✓
น้ำทิ้งจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส	✓		✓
ราวกั้นคอกจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส	✓		✓

3.6.5.4 วิธีการทำ spot test

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB แข็งตัว นำส่วนใสที่ได้จากการกรองของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดหรือจุดลงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ

3.6.5.5 วิธีการทำ plaque assay

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำส่วนใสที่ได้จากการกรอง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่ได้จากการกรอง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาคบนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.5.6 วิธีการชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจจากจานอาหารวุ้นสองชั้น

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารวุ้นสองชั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทุกๆ 30 นาที จะทำการวนจานอาหารวุ้นสองชั้น เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.6.5.7 วิธีการเก็บบริเวณใส (picking) ที่ได้จากการทำ spot test

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยบริเวณใสจากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

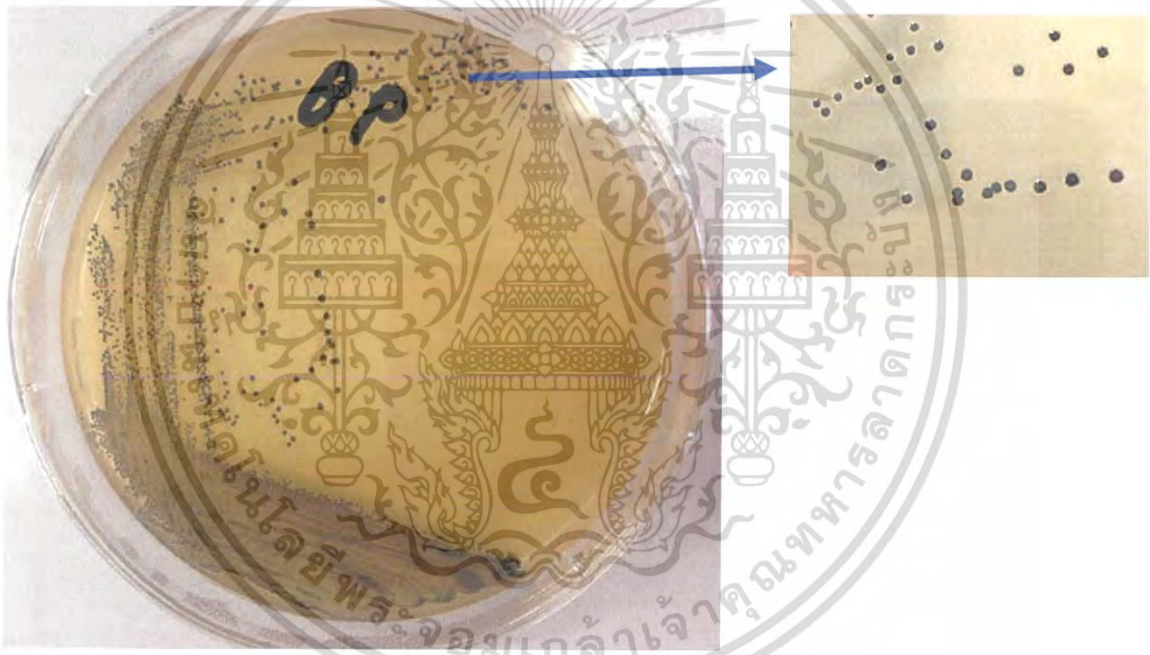
ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เนื่องจากในงานวิจัยของ Artursson et al. (2016) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ โดยปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมดิบที่หลั่งออกมา การศึกษาครั้งนี้ใช้ลักษณะของตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ที่ตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีค่าสูงกว่า 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และการทดสอบเต้านมอักเสบแคลิฟอร์เนีย โดยใช้ชุดทดสอบซีเอ็มที โดยผลที่ได้น้ำนมมีลักษณะหนืด จับตัวเป็นลิ่ม ซึ่งลักษณะดังกล่าวบ่งบอกว่าน้ำนมดิบที่ได้จากโคนมดังกล่าวนั้นเป็นโรคเต้านมอักเสบ จำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่นำมาใช้จากฟาร์ม 2 ฟาร์ม จำนวน 14 ตัวอย่าง คือ ฟาร์มคุณกมลวัฒน์ ใสสว่าง จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ W1A, W1D, W2B, W3D, W4A, W5B, W5D, W7D, W8A, W8B, W8C และ W8D และคุณมนัส ขยายแย้ม จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ M2A และ M3B จากนั้นนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง BPA และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* มาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง MSA ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาด และลักษณะของโคโลนี ขนาดเซลล์ การเคลื่อนที่ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์โคแอคกูเลส (กัญจนา และคณะ, 2544)

4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Baird-Parker Agar (BPA)

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้ง 14 ตัวอย่าง นำมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง BPA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง ได้แก่ W8A, W2B, W8C, W3D, W8D และ M3B มีลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* คือ โคโลนีสีดำ กลม มันวาว โค้งนูน และมีบริเวณใสรอบนอกโคโลนี (clear zone) (Thapaliya et al., 2017) ดังรูปที่ 4.1 จากการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 โคโลนี (1 โคโลนี คือ 1 ไอโซเลท) จากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ 17 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} และจากฟาร์มคุณมนัส 2 ไอโซเลท ได้แก่ S_9 และ S_{10} ดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* มีลักษณะโคโลนีสีดำ กลม มันวาว นูน มีบริเวณขุ่นรอบโคโลนี และมีบริเวณใสรอบนอกบริเวณขุ่น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถรีดิวซ์เทลลูไรท์ (tellurite) ในอาหารแข็ง BPA ทำให้โคโลนีมีสีดำ (Thapaliya et al., 2017) เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะสร้างเอนไซม์เลซีธีเนส (lethicinase) มาย่อยเลซีธีน (lecitine) ในไข่แดงทำให้เกิดกลีเซอไรด์ (diglycerides) ที่ไม่ละลายน้ำและตกตะกอนทำให้เกิดบริเวณขุ่นรอบโคโลนี และปฏิกิริยาโปรตีโอไลซิส (proteolysis) ย่อยโปรตีนทำให้เกิดบริเวณใสรอบนอกโคโลนี อาหารแข็ง BPA จัดเป็นอาหารเลือกจำเพาะ (selective media) เพราะมีโซเดียม ไพรูเวท (sodium pyruvate) ที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย ไกลซีน (glycine) ลิเทียม (lithium) และเทลลูไรท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นที่ปนเปื้อน (นันทนา, 2549)



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง BPA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบ

ฟาร์ม	ที่มาของตัวอย่างน้ำนมดิบ	รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
คุณกมลวัฒน์	W2B	S_1, S_2, S_{17} และ S_{18}
คุณกมลวัฒน์	W3D	S_4
คุณกมลวัฒน์	W8A	S_5, S_6, S_{15} และ S_{16}
คุณกมลวัฒน์	W8D	S_7, S_8, S_{11} และ S_{12}
คุณกมลวัฒน์	W8C	S_{13} S_{14} S_{19} และ S_{20}
คุณมนัส	M3B	S_9 และ S_{10}

W คือ ฟาร์มคุณกมลวัฒน์, M คือ ฟาร์มคุณมนัส, A คือ เต้านมขวาด้านหน้า, B คือ เต้านมซ้ายด้านหน้า, C คือ เต้านมขวาด้านหลัง, D คือ เต้านมซ้ายด้านหลัง

4.1.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar (MSA)

ในการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง และเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง MSA จากสีชมพูเป็นสีเหลืองทั้งหมด 18 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} ดังรูปที่ 4.2 และมี 1 ไอโซเลท ได้แก่ S_9 มีลักษณะโคโลนีสีชมพู ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดลองการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA ข้างต้น มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง และเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง MSA จากสีชมพูเป็นสีเหลือง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอล ทำให้โคโลนีมีสีเหลือง และรอบๆ โคโลนีมีสีเหลืองเช่นกัน แต่เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลสจะไม่สามารถย่อยน้ำตาลแมนนิทอล ทำให้โคโลนีมีสีชมพู และรอบๆ โคโลนีอาจมีสีแดง การเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง MSA เกิดจากอินดิเคเตอร์ฟีนอลเรด (phenol red) ซึ่งจะมีสีชมพูเมื่อพีเอชมากกว่า หรือเท่ากับ 8.0 และมีสีเหลือง เมื่อพีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6.8 ดังนั้นโคโลนีที่มีสีเหลืองแสดงว่าโคโลนีนั้นผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลส (นันทนา, 2337)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง MSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.1.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส โดยใช้โคแอคกูเลส พลาสมา เมื่อใส่เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ทั้ง 19 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สังเกตการแข็งตัว จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9 S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} เกิดการแข็งตัว ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ข้างต้น เกิดการแข็งตัวของโคแอคกูเลส พลาสมา เนื่องจากเอนไซม์โคแอคกูเลส มีผลทำให้ไฟบริโนเจน (fibrinogen) ในโคแอคกูเลส พลาสมาเปลี่ยนเป็นไฟบริน (fibrin) จึงทำให้แอคกูเลส พลาสมาเกิดการแข็งตัว (นันทนา, 2337)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 เมื่อแตะเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ทั้ง 19 ไอโซเลท จากอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองอากาศ จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} มีฟองอากาศเกิดขึ้นดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ข้างต้น เกิดฟองอากาศออกซิเจน (O_2) เมื่อทดสอบกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ดังกล่าว เนื่องจากแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกกลายเป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ (นันทนา, 2537)

4.1.5 การติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} ดังตารางที่ 4.2

จากผลการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ข้างต้น เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต มีรูปร่างกลม และมีการจัดเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีผนังเซลล์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หนา และมีกรดไทโคอิค (teichoic acid) ซึ่งมีประจุลบอยู่ในชั้นผนังเซลล์ ทำให้ย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) จะไม่ถูกชะออกเมื่อล้างด้วยสารชะสี เช่น อะซิโตน (acetone) หรือเอทานอล (ethanol) (กนกรัตน์ และคณะ, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท ในอาหารเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ไม่มีแฟลเจลล่าที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (กัญจนา และคณะ, 2544)

4.1.7 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการตรวจดูลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลม โค้งนูน ขอบเรียบ มีสีขาวนวลและสีเหลืองนวล ซึ่งลักษณะดังกล่าวคือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (นราพร และชุติกาญจน์, 2558)

ในการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท ด้วยเวอร์เนียบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} มีขนาดโคโลนี 0.65 - 2.01 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.2 โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะมีขนาดโคโลนี 1 - 4 มิลลิเมตร (นราพร และชุติกาญจน์, 2558)

4.1.8 การวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการย้อมสีพื้นหลังด้วยนิโกรซิน ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9 S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} มีขนาดเซลล์ 0.83 - 1.30 ไมโครเมตร ดังตารางที่ 4.2 การย้อมสีพื้นหลังด้วยนิโกรซิน ทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียใสไม่ติดสีของนิโกรซิน แต่พื้นหลังจะติดสีดำของนิโกรซิน (กัญจนา และคณะ, 2544) โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะมีขนาดเซลล์ 0.8 - 1.0 ไมโครเมตร (นราพร และชุติกาญจน์, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร BPA	การเจริญบนอาหาร MSA	การสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสที่ 4 ชั่วโมง (1)	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	การติดสีแกรม	ขนาดของโคโลนี (mm.) และลักษณะของโคโลนี (2)	ขนาดของเซลล์ (μm.)	การเคลื่อนที่
S_1	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.58 *	1.06	ไม่เคลื่อนที่
S_2	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	2+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	0.98 *	1.10	ไม่เคลื่อนที่
S_4	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.86 **	1.03	ไม่เคลื่อนที่
S_5	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	2+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	0.65 *	1.16	ไม่เคลื่อนที่
S_6	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.50 *	1.06	ไม่เคลื่อนที่
S_7	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.25 *	1.06	ไม่เคลื่อนที่
S_8	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	2+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	0.91 *	1.30	ไม่เคลื่อนที่
S_9	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → ชมพู	2+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	0.98 *	0.83	ไม่เคลื่อนที่

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร BPA	การเจริญบนอาหาร MSA	การผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลสที่ 4 ชั่วโมง (1)	การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	การติดสีแกรม	ขนาดของโคโลนี (mm.) และลักษณะของโคโลนี (2)	ขนาดของเซลล์ (μm.)	การเคลื่อนที่
S_{10}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.43 *	1.10	ไม่เคลื่อนที่
S_{11}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.41 *	0.96	ไม่เคลื่อนที่
S_{12}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.45 *	1.13	ไม่เคลื่อนที่
S_{13}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	2+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.05 *	0.96	ไม่เคลื่อนที่
S_{14}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.40 *	1.06	ไม่เคลื่อนที่
S_{15}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.16 *	1.03	ไม่เคลื่อนที่
S_{16}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.95 *	0.96	ไม่เคลื่อนที่
S_{17}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	2+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.81 *	1.00	ไม่เคลื่อนที่

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร BPA	การเจริญบนอาหาร MSA	การผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลสที่ 4 ชั่วโมง (1)	การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	การติดสีแกรม	ขนาดของโคโลนี (mm.) และลักษณะของโคโลนี (2)	ขนาดของเซลล์ (μm.)	การเคลื่อนที่
S_{18}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.80 *	1.13	ไม่เคลื่อนที่
S_{19}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	2.01 *	1.06	ไม่เคลื่อนที่
S_{20}	สีดำ นูน มีบริเวณใส	ชมพู → เหลือง	3+	เกิดฟอง O_2	แกรมบวก	1.83 *	1.03	ไม่เคลื่อนที่

การอ่านผล

(1) การผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลส
- 0 ไม่เกิดการจับตัว
- 1+ จับตัวเป็นก้อน ไม่รวมกลุ่ม
- 2+ จับตัวเป็นก้อนน้อย รวมกลุ่ม
- 3+ จับตัวเป็นก้อนใหญ่
- 4+ จับตัวเป็นก้อนหมดทั้งหลอด ไม่ขยับเมื่อคว่ำหลอด

(2) ลักษณะของโคโลนี
- * รูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีสีขาวนวล
- ** รูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และสีเหลืองนวล

4.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม ได้แก่ ตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก เนื่องจากในงานวิจัยของ Levin and Bull (1996) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความจำเพาะกับแบคเทอริโอเฟจในบริเวณเดียวกัน ในงานวิจัยของ Precott (2002) พบว่าบริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จะมีโอกาสแยกแบคเทอริโอเฟจได้น้อย เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจสามารถเพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรียเจ้าบ้านเท่านั้น และในงานวิจัยของ Adam (1959) พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเจ้าบ้านเท่านั้น ซึ่งแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดมีแบคทีเรียเจ้าบ้านเพียงหนึ่งสกุล ดังนั้นการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจในครั้งนี้ จึงได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ แล้วนำแบคทีเรียดังกล่าวสำหรับเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจให้มากขึ้น

การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ในตัวอย่างที่นำมาใช้แยกแบคเทอริโอเฟจ ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ด้วยวิธี spot test และ plaque assay หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างที่นำมาใช้แยกแบคเทอริโอเฟจ และตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จำนวนตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจมีจำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจมีจำนวนทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ 14 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ 12 ตัวอย่าง ได้แก่ W1A, W1D, W2B, W3D, W4A, W5B, W5D, W7D, W8A, W8B, W8C และ W8D และจากฟาร์มคุณมนัส 2 ตัวอย่าง ได้แก่ M2A และ M3B ตัวอย่างดินบริเวณคอกโคนม 6 ตัวอย่าง จากทั้งสองฟาร์ม ฟาร์มละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MS1, MS2, MS3, WS1, WS2 และ WS3 ตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณคอกโคนม 6 ตัวอย่าง จากทั้งสองฟาร์มๆ ละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MW1, MW2, MW3, WW1, WW2 และ WW3 และตัวอย่างราวกั้นคอกโคนม 6 ตัวอย่าง จากทั้งสองฟาร์มๆ ละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MH1, MH2, MH3, WH1, WH2 และ WH3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม ได้แก่ ตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก นำไปตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test และ plaque assay บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.1.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จำนวน 14 ตัวอย่าง กรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำไปตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่าตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เกิดบริเวณใสของจุดบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ M2A และ M3B โดยมีไอโซเลท S_{10} เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ส่วนบริเวณใสของจุดที่ได้จากการทำ spot test ของตัวอย่างน้ำนมดิบ W3D ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลท S_6 และอีก 11 ตัวอย่าง ได้แก่ W1A, W1D, W2B, W4A, W5B, W5D, W7D, W8A, W8B, W8C และ W8D ไม่พบบริเวณใส จากนั้นนำจานอาหารสองชั้นของตัวอย่างน้ำนมดิบ M2A และ M3B ที่เกิดบริเวณใสมาชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SM ตามขั้นตอน 3.6.5.6 ส่วนบริเวณใสของจุดที่ได้จากการ spot test ของตัวอย่างน้ำนม W3D ทำการเก็บบริเวณใสของจุดที่ได้ตามขั้นตอน 3.6.5.7 ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากผลการทดลองไม่พบการเกิดพลาค

จากผลการทดลองการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ไม่พบการเกิดพลาค เนื่องจากน้ำนมดิบประกอบด้วย น้ำ โปรตีน เช่น โปรตีนเคซีน โปรตีนเวย์ต่างๆ ได้แก่ เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (β-lactoglobulin) แอลฟา-แลคโตอัลบูมิน(α-lactoalbumin) อิมมูโนกลอบูลิน (immunoglobulin) ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin) และยังประกอบด้วย ไขมัน น้ำตาลแลคโตส วิตามิน และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม เป็นต้น (O'Flaherty et al., 2005) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้มีผลต่อการแยกแบคเทอริโอเฟจของตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยตัวอย่างน้ำนมดิบที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจไม่ผ่านการตกตะกอนเคซีนด้วยเอนไซม์เรนเนท (rennet) จึงทำให้ตัวอย่างของแบคเทอริโอเฟจติดอยู่กับตะกอนเคซีน (García et al., 2007) เมื่อนำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูขนาด 0.20 ไมโครเมตร อาจทำให้แบคเทอริโอเฟจติดอยู่กับตะกอนเคซีนที่ไม่ผ่านตัวกรอง นอกจากนี้ตะกอนเคซีนยังเป็นตัวขัดขวางการเกาะติดระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Das and Marshall, 1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างดิน

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างดินบริเวณคอกโคนมที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน จำนวน 6 ตัวอย่าง กรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำไปตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างดินเกิดบริเวณใสบนอาหารวุ้นสองชั้น จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MS1, MS2 และ MS3 โดยมีไอโซเลท S_{10} เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ส่วนบริเวณใสของจุดที่ได้ของตัวอย่างดิน จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ WS1, WS2 และ WS3 โดยมีไอโซเลท S_6 เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากนั้นนำจานอาหารวุ้นสองชั้นของตัวอย่างดิน MS1, MS2 และ MS3 ที่เกิดบริเวณใสชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SM ตามขั้นตอน 3.6.5.6 ส่วนบริเวณใสของจุดที่ได้จากตัวอย่างดิน WS1, WS2 และ WS3 ทำการเก็บจุดที่ได้ตามขั้นตอน 3.6.5.7 ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากผลการทดลองไม่พบการเกิดพลาค

การสกัดแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างที่เป็นของแข็ง โดยอาศัยสภาวะทางประจุไฟฟ้า (Primrose and Day, 1977) จะใช้วิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมีจะใช้สารชะที่มีความสามารถในการเข้าไปแทนที่อนุภาคแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งยึดเกาะอยู่กับอนุภาคของตัวอย่าง โดยผ่านการรบกวนประจุไฟฟ้าระหว่างอนุภาคและปฏิกิริยา hydrophobic (Gerba, 1984) สารชะส่วนใหญ่เป็นสารที่มีพีเอชเป็นกลางหรือด่าง ได้แก่ โพแทสเซียมซิเตรท (potassium citrate) โซเดียม-ดีออกซีคอลเลท (sodium deoxycholate) น้ำปราศจากไอออน (deionized water) สารสกัดจากเนื้อ และไกลซีน ร่วมกับการใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่น (sonication) การปั่นผสม (blending) การปั่นผสมแบบวน (vortexing) (Williamson et al., 2013) โดยทั่วไปใช้สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และเหมาะสมสำหรับการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย และการนับจำนวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์จากหลายๆ ตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม (Hu, 1998) ไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ มีด้าน hydrophilic และ hydrophobic อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 ทำให้ไกลซีนมีคุณสมบัติในการละลายดีขึ้นจากการที่ค่าพีเอชมากกว่าค่าพีไอ (pI) และทำให้สารละลายไกลซีนมีประจุสุทธิเป็นลบ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มแรงผลักทางประจุไฟฟ้าระหว่างอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ กับอนุภาคของตะกอน โดยดึงประจุบวกของอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ และอนุภาคของตะกอนออกมา (Gerba, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างของเหลว

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณคอกโคนม จำนวน 6 ตัวอย่าง และราวกั้นคอก จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่มีการเตรียมตัวอย่างด้วยการเช็ดราวกั้นคอกแล้วนำมาละลายไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM เมื่อกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำไปตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่าตัวอย่างน้ำทิ้งเกิดบริเวณใสบนจุดที่ทำ spot test จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MW1, MW2 และ MW3 และตัวอย่างราวกั้นคอกเกิดบริเวณใส จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MH1, MH2 และ MH3 โดยมีไอโซเลท S_{10} เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ส่วนบริเวณจุดใสที่ได้จากการ spot test ตัวอย่างน้ำทิ้งจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ WW1, WW2 และ WW3 มีไอโซเลท S_6 เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากนั้นนำจานอาหารสองชั้นของตัวอย่าง MW1, MW2, MW3, MH1, MH2 และ MH3 ที่เกิดบริเวณใสมาชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SM ตามขั้นตอน 3.6.5.6 ส่วนจุดใสที่ได้ของตัวอย่างของเหลว WW1, WW2 และ WW3 ตามขั้นตอน 3.6.5.7 ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากผลการทดลองไม่พบการเกิดพลาค

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_9	1, 2, 3	MS1	ไม่พบบริเวณใส *
	4, 5, 6	MS2	ไม่พบบริเวณใส
	7, 8, 9	MS3	ไม่พบบริเวณใส
	10, 11, 12	MW1	ไม่พบบริเวณใส
	13, 14, 15	MW2	ไม่พบบริเวณใส
	16, 17, 18	MW3	ไม่พบบริเวณใส
	19, 20, 21	MH1	ไม่พบบริเวณใส
	22, 23, 24	MH2	ไม่พบบริเวณใส
	25, 26, 27	M2A	ไม่พบบริเวณใส
	28, 29, 30	M3B	ไม่พบบริเวณใส
	31, 32, 33	MH3	ไม่พบบริเวณใส
	34	M2A	ไม่พบบริเวณใส
S_{10}	35, 36, 37	MS1	พบบริเวณใส **
	38, 39, 40	MS2	พบบริเวณใส
	41, 42, 43	MS3	พบบริเวณใส
	44, 45, 46	MW1	พบบริเวณใส
	47, 48, 49	MW2	พบบริเวณใส
	50, 51, 52	MW3	พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_{10}	53, 54, 55	MH1	พบบริเวณใส
	56, 57, 58	MH2	พบบริเวณใส
	59, 60, 61	M2A	พบบริเวณใส
	62, 63, 64	M3B	พบบริเวณใส
	65, 66, 67	MH3	พบบริเวณใส
	68	M2A	พบบริเวณใส
S_1	69, 70, 71	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	72, 73, 74	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	75, 76, 77	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	78, 79, 80	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	81, 82, 83	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	84, 85, 86	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	87, 88, 89	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	90, 91, 92	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	93, 94, 95	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	96, 97, 98	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	99, 100, 101	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	102, 103, 104	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	105, 106, 107	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	108, 109, 110	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	111, 112, 113	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	114, 115, 116	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	117, 118, 119	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_2	120, 121, 122	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	123, 124, 125	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	126, 127, 128	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	129, 130, 131	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	132, 133, 134	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	135, 136, 137	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	138, 139, 140	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	141, 142, 143	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	144, 145, 146	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	147, 148, 149	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	150, 151, 152	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	153, 154, 155	W4A	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_2	156, 157, 158	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	159, 160, 161	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	162, 163, 164	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	165, 166, 167	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	168, 169, 170	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_3	171, 172, 173	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	174, 175, 176	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	177, 178, 179	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	180, 181, 182	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	183, 184, 185	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	186, 187, 188	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	189, 190, 191	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	192, 193, 194	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	195, 196, 197	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	198, 199, 200	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	201, 202, 203	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	204, 205, 206	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	207, 208, 209	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	210, 211, 212	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	213, 214, 215	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	216, 217, 218	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	219, 220, 221	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_4	222, 223, 224	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	225, 226, 227	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	228, 229, 230	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	231, 232, 233	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	234, 235, 236	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	237, 238, 239	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	240, 241, 242	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	243, 244, 245	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	246, 247, 248	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	249, 250, 251	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	252, 253, 254	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	255, 256, 257	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	258, 259, 260	W5D	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_4	261, 262, 263	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	264, 265, 266	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	267, 268, 269	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	270, 271, 272	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_5	273, 274, 275	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	276, 277, 278	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	279, 280, 281	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	282, 283, 284	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	285, 286, 287	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	288, 289, 290	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	291, 292, 293	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	294, 295, 296	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	297, 298, 299	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	300, 301, 302	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	303, 304, 305	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	306, 307, 308	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	309, 310, 311	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	312, 313, 314	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	315, 316, 317	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	318, 319, 320	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	321, 322, 323	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_6	324	WS1	พบบริเวณใส
	325, 326	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	327, 328	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	329	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	330,332	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	331	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	333, 334	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	335	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	336	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	337, 338	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	339, 341	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	340	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	342, 343, 344	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	345, 346, 347	WH2	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_6	348, 349, 350	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	351, 352, 353	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	354, 355, 356	W3D	พบบริเวณใส
	357, 358, 359	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	360, 361, 362	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	363, 364, 365	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	366, 367, 368	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	369, 370, 371	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	372, 373, 374	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_7	375, 376, 377	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	378, 379, 380	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	381, 382, 383	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	384, 384, 386	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	387, 388, 389	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	390, 391, 392	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	393, 394, 395	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	396, 397, 398	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	399, 400, 401	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	402, 403, 404	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	405, 406, 407	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	408, 409, 410	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	411, 412, 413	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	414, 415, 416	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	417, 418, 419	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	420, 421, 422	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	423, 424, 425	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_8	426, 427, 428	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	429, 430, 431	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	432, 433, 434	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	435, 436, 437	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	438, 439, 440	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	441, 442, 443	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	444, 445, 446	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	447, 448, 449	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	450, 451, 452	WH3	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_8	453, 454, 455	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	456, 457, 458	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	459, 460, 461	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	462, 463, 464	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	465, 466, 467	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	468, 469, 470	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	471, 472, 473	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	474, 475, 476	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{11}	477, 478, 479	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	480, 481, 482	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	483, 484, 485	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	486, 487, 488	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	489, 490, 491	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	492, 493, 494	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	495, 496, 497	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	498, 499, 500	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	501, 502, 503	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	504, 505, 506	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	507, 508, 509	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	510, 511, 512	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	513, 514, 515	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	516, 517, 518	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	519, 520, 521	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	522, 523, 524	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	525, 526, 527	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{12}	528, 529, 530	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	531, 532, 533	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	534, 535, 536	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	537, 538, 539	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	540, 541, 542	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	543, 544, 545	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	546, 547, 548	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	549, 550, 551	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	552, 553, 554	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	555, 556, 557	W2B	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_{12}	558, 559, 560	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	561, 562, 563	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	564, 565, 566	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	567, 568, 569	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	570, 571, 572	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	573, 574, 575	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	576, 577, 578	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{13}	579, 580, 581	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	582, 583, 584	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	585, 586, 587	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	588, 589, 590	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	591, 592, 593	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	594, 595, 596	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	597, 598, 599	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	600, 601, 602	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	603, 604, 605	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	606, 607, 608	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	609, 610, 611	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	612, 613, 614	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	615, 616, 617	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	618, 619, 620	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	621, 622, 623	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	624, 625, 626	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	627, 628, 629	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{14}	630, 631, 632	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	633, 634, 635	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	636, 637, 638	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	639, 640, 641	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	642 643, 644	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	645, 646, 647	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	648, 649, 650	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	651, 652, 653	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	654, 655, 656	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	657, 658, 659	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	660, 661, 662	W3D	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_{14}	663, 664, 665	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	666, 667, 668	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	669 670, 671	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	672, 673, 674	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	675, 676, 677	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	678, 679, 680	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{15}	681, 682, 683	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	684, 685, 686	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	687, 688 689	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	690, 691, 692	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	693, 694, 695	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	696, 697, 698	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	699, 700, 701	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	702, 703, 704	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	705, 706, 707	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	708, 709, 710	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	711, 712, 713	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	714, 715, 716	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	717, 718, 719	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	720, 721, 722	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	723, 724, 725	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	726, 727, 728	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	729, 730, 731	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{16}	732, 733, 734	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	735, 736, 737	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	738, 739, 740	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	741, 742, 743	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	744, 745, 746	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	747, 748, 749	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	750, 751, 752	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	753, 754, 755	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	756, 757, 758	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	759, 760, 761	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	762, 763, 764	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	765, 766, 767	W4A	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_{16}	768, 769, 770	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	771, 772, 773	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	774, 775, 776	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	777, 778, 779	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	780, 781, 782	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{17}	783, 784, 785	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	786, 787, 788	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	789, 790, 791	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	792, 793, 794	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	795, 796, 797	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	798, 799, 800	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	801, 802, 803	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	804, 805, 806	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	807, 808, 809	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	810, 811, 812	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	813, 814, 815	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	816, 817, 818	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	819, 820, 821	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	822, 823, 824	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	825, 826, 827	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	828, 829, 830	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	831, 832, 833	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{18}	834, 835, 836	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	837, 838, 839	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	840, 841, 842	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	843, 844, 845	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	846, 847, 848	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	849, 850, 851	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	852, 853, 854	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	855, 856, 857	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	858, 859, 860	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	861, 862, 863	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	864, 865, 866	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	867, 868, 869	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	870, 871, 872	W5D	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_{18}	873, 874, 875	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	876, 877, 878	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	879, 880, 881	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	882, 883, 884	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{19}	885, 886, 887	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	888, 889, 890	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	891, 892, 893	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	894, 895, 896	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	897, 898, 899	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	900, 901, 902	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	903, 904, 905	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	906, 907, 908	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	909, 910, 911	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	912, 913, 914	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	915, 916, 917	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	918, 919, 920	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	921, 922, 923	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	924, 925, 926	W8A	ไม่พบบริเวณใส
	927, 928, 929	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	930, 931, 932	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	933, 934, 935	W8D	ไม่พบบริเวณใส
S_{20}	936, 937, 938	WS1	ไม่พบบริเวณใส
	939, 940, 941	WS2	ไม่พบบริเวณใส
	942, 943, 944	WS3	ไม่พบบริเวณใส
	945, 946, 947	WW1	ไม่พบบริเวณใส
	948, 949, 950	WW2	ไม่พบบริเวณใส
	951, 952, 953	WW3	ไม่พบบริเวณใส
	954, 955, 956	WH1	ไม่พบบริเวณใส
	957, 958, 959	WH2	ไม่พบบริเวณใส
	960, 961, 962	WH3	ไม่พบบริเวณใส
	963, 964, 965	W2B	ไม่พบบริเวณใส
	966, 967, 968	W3D	ไม่พบบริเวณใส
	969, 970, 971	W4A	ไม่พบบริเวณใส
	972, 973, 974	W5D	ไม่พบบริเวณใส
	975, 976, 977	W8A	ไม่พบบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับจุด spot	ตัวอย่าง	ผลจากการ spot test
S_{20}	978, 979, 980	W8B	ไม่พบบริเวณใส
	981, 982, 983	W8C	ไม่พบบริเวณใส
	984, 985, 986	W8D	ไม่พบบริเวณใส

ไม่พบบริเวณใส * คือ ไม่พบบริเวณที่แบคทีเรียเจ้าบ้านถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอเฟจ

พบบริเวณใส ** คือ พบบริเวณที่แบคทีเรียเจ้าบ้านถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอเฟจ

WS1 คือ ตัวอย่างดินจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์บริเวณที่ 1

WW1 คือ ตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์บริเวณที่ 1

WH1 คือ ตัวอย่างราวกั้นคอกจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์บริเวณที่ 1

W1A, W1D, W2B, W3D, W4A, W5B, W5D, W7D, W8A, W8B, W8C, W8D คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มคุณกมลวัฒน์

MS1 คือ ตัวอย่างดินจากฟาร์มคุณมนัสบริเวณที่ 1

MW1 คือ ตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มคุณมนัสบริเวณที่ 1

MH1 คือ ตัวอย่างราวกั้นคอกจากฟาร์มคุณมนัสบริเวณที่ 1

M2A, M3B คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มคุณมนัส

4.2.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยมีการเพิ่มปริมาณ

การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม ได้แก่ ตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก เมื่อทำการตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบการเกิดพลาค การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ในตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ในตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ

4.2.2.1 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างดินที่ผ่านการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน จำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณคอกโคนม จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างราวกั้นคอก จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่มีการเตรียมตัวอย่างด้วยการเช็ดแล้วนำมาละลายไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM และกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ผ่านการกรองไปเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB มีการเติมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากการทดลองพบว่าตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก รวมทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ไม่พบการเกิดพลาค

4.2.2.2 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างดินที่ผ่านการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน จำนวน 6 ตัวอย่าง น้ำทิ้งบริเวณคอกโคนม จำนวน 6 ตัวอย่าง และราวกั้นคอกที่มีการเตรียมตัวอย่างด้วยการเช็ดแล้วนำมาละลายไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM จำนวน 6 ตัวอย่าง และกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ผ่านการกรองของแต่ละตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* โดยใช้อาหารเหลว LB และเติมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดึงตัวอย่างปริมาตรครึ่งหนึ่ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ในปริมาณที่เท่ากัน นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ ด้วยวิธี plaque assay ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนี้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่ โดยทำซ้ำในลักษณะเดิมตามที่กล่าวข้างต้น จำนวน 2 รอบ จากการทดลองพบว่าตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก รวมทั้งหมด 18 ตัวอย่าง และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่ จำนวน 2 รอบ ไม่พบการเกิดพลาค

จากผลการทดลองการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างดินที่ผ่านการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน หรือตัวอย่างจากราวกั้นคอก ไม่พบการเกิดพลาค เนื่องจากในดินมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* น้อยมากจึงทำให้แบคเทอริโอเฟจไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Germida and Castida, 1981) จากตัวอย่างน้ำทิ้ง ไม่พบการเกิดพลาค เนื่องจากน้ำทิ้งอาจมีอนุภาคต่างๆ ในน้ำทิ้ง (นวลพรรณ, 2544) ซึ่งอาจเปรียบเทียบได้เช่นเดียวกับโปรตีนในน้ำนมดิบที่ทำให้แบคเทอริโอเฟจไปเกาะติด เมื่อนำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูขนาด 0.20 ไมโครเมตร แบคเทอริโอเฟจที่เกาะติดกับอนุภาคน้ำทิ้ง ทำให้ไม่สามารถผ่านตัวกรองลงมาได้ นอกจากนี้อาจเกิดจากการเก็บรักษาตัวอย่างมีระยะเวลานาน เมื่อนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ ส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ และสูญเสียกิจกรรม เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะเสถียร และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่กับแบคทีเรียเจ้าบ้าน และอยู่ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติของตัวอย่างนั้นๆ (García et al., 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบ ดิน น้ำทิ้ง และราวกั้นคอก จากฟาร์มคุณกมลวัฒน์ และคุณมนัส ทำการตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test และ plaque assay โดยการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจและไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ดังตาราง ที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ที่ 4.4 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่นำมาแยก	วิธีการที่ใช้แยก	ผลการทำ spot test	ผลการทำ plaque assay
S_6	ฟาร์มคุณกมลวัฒน์	น้ำนมดิบ (W3D)	Without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
		ดิน	Without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
			Extraction with Enrichment	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		น้ำทิ้ง	Without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		ราวกั้นคอก	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		น้ำนมดิบ (W3D) ที่ได้จากการ picking	-	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		ดินที่ได้จากการ picking	-	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		น้ำทิ้งที่ได้จากการ picking	-	-	ไม่พบการเกิดพลาค

ตาราง ที่ 4.4 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่นำมาแยก	วิธีการที่ใช้แยก	ผลการทำ spot test	ผลการทำ plaque assay
S_1, S_2, S_4, S_5, S_7, S_8, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18} และ S_{19}	ฟาร์มคุณกมลวัฒน์	น้ำนมดิบ	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
		ดิน	Extraction without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
			Extraction with Enrichment	-	-
		น้ำทิ้ง	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
			With Enrichment	-	-
		ราวกั้นคอก	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
			With Enrichment	-	-

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตาราง ที่ 4.4 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่นำมาแยก	วิธีการที่ใช้แยก	ผลการทำ spot test	ผลการทำ plaque assay
S_9	ฟาร์มคุณมนัส	น้ำนมดิบ	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
		ดิน	Extraction without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
			Extraction with Enrichment	-	-
		น้ำทิ้ง	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
			With Enrichment	-	-
		ราวกั้นคอก	Without Enrichment	ไม่พบบริเวณใส	-
			With Enrichment	-	-

ตาราง ที่ 4.4 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่นำมาแยก	วิธีการที่ใช้แยก	ผลการทำ spot test	ผลการทำ plaque assay
S_{10}	ฟาร์มคุณมนัส	น้ำนมดิบ	Without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
		ดิน	Extraction without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
			Extraction with Enrichment	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		น้ำทิ้ง	Without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		ราวกั้นคอก	Without Enrichment	พบบริเวณใส	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	-	ไม่พบการเกิดพลาค
		ตัวอย่างที่ได้จากการชะ - SM บัฟเฟอร์	-	-	ไม่พบการเกิดพลาค

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้อาหารแข็ง Baird-Parker Agar นำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาดและลักษณะโคโลนี ขนาดเซลล์ การเคลื่อนที่ คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยา ได้แก่ การเจริญบนอาหารแข็ง Mannital Salt Agar ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์โคแอคกูเลส ผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* จากน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19} และ S_{20} จึงนำมาเป็นใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

จากการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม เมื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test ผลที่ได้คือ พบบริเวณใสจากเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ไอโซเลท S_6 และ S_{10} จึงนำไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ผลที่ได้คือไม่พบการเกิดพลาค จากนั้นจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ จากตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อมของฟาร์มโคนม โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเชื้อแบคทีเรียใหม่ แล้วนำมาตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ผลที่ได้ไม่พบการเกิดพลาค จึงได้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใหม่ แล้วนำมาตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ผลที่ได้ไม่พบการเกิดพลาคเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงยังไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย ที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ ควรนำมาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจให้เร็ว เนื่องจากจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ และสูญเสียกิจกรรม

2. ในขั้นตอนการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ควรใช้เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในระยะ log phase เพื่อให้แบคเทอริโอเฟจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจควรทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า *S. aureus*

4. ในการเก็บรักษาตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจควรเก็บในที่ที่ไม่มีแสง หรือมีแสงรบกวนน้อย เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจมีความไวต่อแสง (Dirckze et al., 1979)

5. ตัวอย่างน้ำทิ้ง ควรสกัดเอาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจในน้ำทิ้งออกก่อนการนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ เพื่อไม่ให้อนุภาคอื่นๆ ที่ตกตะกอนมีแบคเทอริโอเฟจติด และถูกคัดแยกทิ้งไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกน, ชาญชุติ จรรยาสัณห์, พรพรรณ ดีรพัฒน์, พิพัฒน์ ลักษมีจรัชกุล, เฟื่องฟ้า อุตรารัชต์กิจ, ลีรา กิตติกุล, อรษา สุตเธียรกุล และอัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ . 2548. **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บุญศิริการพิมพ์ จำกัด.

กัญจนา ธีระกุล, เกษตร ทวีเศษ, พัชรี สุนทรนันท และพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2544. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2554. "การตรวจสอบคุณภาพอาหารด้านสุขศาสตร์ เพื่อความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค". สำนักพิมพ์ศิลปากร

เกียรติศักดิ์ ตันเจริญ, เอกชัย สร้อยน้ำ, ศุภชาติ ปานเนียม สุวิมล พันธุ์ดี และณรงค์ จึงสมานญาติ. 2550. "ผลของสารสกัดจากพืชต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก อันเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ในโคนม." หน้า 597-602. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาสัตว์และสัตวแพทยศาสตร์.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จตุพร กระจายศรี, อนุสรณ์ จำแสนชื่น, จำลอง มิตรชาวไทย และชนาธิป ธรรมการ. 2557. "ประสิทธิภาพของวัคซีน Mastivac สำหรับป้องกันโรคเต้านมอักเสบในแม่โคนม." *สัตวแพทย์มหานครสาร.* 9(1) : 37-48.

จุรีรัตน์ ลีสมิทธิ์. 2548. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ญาณินี ริ้วบำรุง, ณัฐณิชา ปวีณพงศ์ และพงศ์ชนก เนตรขำ. 2556. "การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์. 2552. "การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ได้จากแหนมในประเทศไทย" ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ณัฐธิดา เถื่อนหรุ่น, พัชรินทร์ ดีเรือก และพีรเวธน์ สุวรรณสิทธิ์. 2555. "การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis.*" ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ณัฐวรา อมาตยกุล, นันทิยา วรวุฒิพงษ์ และวิชนันท์ วรรณศรีจันทร์. 2556. "การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ดวงมณี เปรมศิริ, และธนัชพร มูฮำหมัดฮาซัน. 2555. "การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

นันทวัน ศรีกาฬสินธุ์, พรรณสิทธิ์ ภูวสรรเพชร และอัญชลี เพ็งสาธร. 2543. "การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23 เอส ไรโบโซมดีเอ็นเอ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นภัทร ณัทธรมานิต และกุลนิษฐ์ สุวรรณสมบูรณ์. 2555. "การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus hyicus*." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นราพร สมบูรณ์นะ และชุติกาญจน์ จิตบุญทวีสุข. 2558. "กลไกการอยู่รอดของ *Staphylococcus aureus* ภายในเซลล์มนุษย์." *พุทธชินราชเวชสาร.* 32(1) : 65-73.

นริศร นางาม และเสรี แข็งแอ. 2559. "การแยกฟาจจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเพื่อรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ *Escherichia coli* (Colibacilosis) ในไก่เนื้อ" *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.* 44(3) : 493-504.

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. 2553. "การแยกเชื้อแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ" รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

พรทิพย์ สุขสวัสดิ์. 2549. "การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย" ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรรณชรินทร์ ศรัทธา และสุพรรณี เสนาอาด. 2543. "การตรวจหา *Staphylococcus aureus* ในขนมไทย." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณทิพา จันทร์ทัง. 2553. "การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียแลคติคที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย" ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

มงคล ประทุมมณี. 2548. "สถานการณ์โรคเต้านมอักเสบของโคนม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคนม." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ.

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. บทปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาและกิณวิทยาทางการแพทย์. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. นครศรีธรรมราช.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2535. "การใช้ยาปฏิชีวนะในโคนมทำอย่างไร." *วารสารเกษตรก้าวหน้า.* ปีที่7(2) : 1-2.

วรพงษ์ วงษ์ปัญญา และอภิชญา ทองทับ. 2542. "การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23 เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานี กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง. 2554. **วิธีทดสอบ *Staphylococcus aureus.*** สุราษฎร์ธานี.

ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข. 2547. "อายุรศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง" เอกสารประกอบการเรียนวิชาคลินิกปฏิบัติ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุกัญญา บุตรพรม. 2556. "ผลของการใช้ครีมสอดรูหัวนม เพื่อป้องกันการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โครระยะหยุดพักรีดนม" ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สัมฤทธิ์ อินทร์เฉลียว, ศรีน้อย ชุ่มคำ และสมจิตร ถนอมวงศ์วัฒนะ. 2555. "ผลของน้ำผึ้งต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในโคนม." หน้า 733-739. ใน **การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9 สาขาสัตว์และสัตวแพทย์.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2553. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อามีนี เจ๊ะลี, สมพงศ์ โอทอง และศุภชัย นิติพันธ์. 2558. "การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนมด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อ การดื้อยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล." *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ.* 18(3) : 17-24.

อัจฉรัตน์ สุวรรณภักดี, รังสิมา สายศรทิพย์, และศุภารัตน์ สุทธิมุสิก. 2555. "ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม: *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli.*" *แก่นเกษตร.* 40(2) : 230-235.

Ackermann, H.W. 2001. "Frequency of Morphilogical Phage Descriptions in the Year 2000. Archaeology of Virology. 146 : 843-857.

Adams, M.H. 1958. **Bacteriophages.** New York : Interscience publishers, Inc.

Alcamo, E. 1996. **Fundamentals of Microbiology.** 5th ed. United States of America : Benjamin / Cummings.

Artursson, K. Söderlund, R. Liu, L. Monecke, S. and Schelin, J. 2016. "Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics." Veterinary Microbiology. 193 : 156-161.

Basdew, I.H. and Laing, M.D. 2011. "Biological control of bovine mastitis using bacteriophage therapy." University of KwaZulu-Natal.

Barkema, H.W. Schukken, Y.H. Lam, T.J.G.M. Beiboer, M.L. Wilmink, H. Benedictus, G. and Brand, A. 1998. "Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts." Journal of Dairy Science. 81: 411-419.

Beaudoin, R.N. DeCesaro, D.R. Duekee, D.L. and Barbaro, S.E. 2007. "Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of its bacterial host cell." Rivier Academic Journal, 3 : 1-8.

Boyd, R.F. 1995. **Basic Medical Microbiology.** 5th ed. United States of America : Little Brown.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bradley, D.E. 1967. "Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins."Bacteriological Reviews. 31 : 230-314.

Bueno, E. Garcia, P. Martinez, B. and Rodriguez, A. 2012. "Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses." International Journal of Food Microbiology. 158 : 23–27.

Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 2001. **Microbiology: A Laboratory Manual.** San Francisco : Benjamin Cummings.

Clokie, M.R.J. and Kropinski, A.M. 2009. **Bacteriophages Methods and Protocols Volume 1 : Isolation, Characterization and Interactions.** New York : Humana Press.

Das, N.K. and Marshall, R.T. 1967. "Adsorption of Staphylococcal Bacteriophage by Milk Proteins." Apply Microbiology. 15 : 1095-1098.

Dias, R.S. Eller, M.R. Duarte, V.S. Pereira, A.L. Silva, C.C. Mantovani, H.C. Oliveira, L.L. M Silva, E.A. and Paula, S.O. 2014. "Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis." Jounal of Animal Science. 91 : 3930-3939.

Ding, T. Yu, Y.Y. Schaffner, D.W. Chen, S.G. Ye, X.Q. and Liu, D.H. 2016. "Farm to consumption risk assessment for *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in fluid milk in China." Food Control. 59 : 636-643.

Fan, J. Zeng, Z. Mai, K. Yang, Y. Feng, J. Bai, Y. Sun, B. Xie, Q. Tong, Y. and Ma, J. 2016. "Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1." Veterinary Microbiology. 191 : 65–71.

Garcia, P. Madera, C. Martinez, B. and Rodriguez, A. 2007. "Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages." International Dairy Journal. 17 : 1232–1239.

Gerba, C.P. 1984. "Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces." Advances in Applied Microbiology. 30 : 133-168.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gill, J.J. Sabour, P.M. Leslie, K.E. and Griffiths, M.W. 2006. "Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K." Journal of Applied Microbiology. 1364-5072.

Haddad, L.E. Roy, J.P. Khalil, G.E. Gelais, D.S. Champagne, C.P. Labrie, S. Moineau, S. 2016. "Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production." International Journal of Food Microbiology. 217 : 7-13.

Han, J.E. Kim, J.H. Hwang, S.Y. Casiano, H. Choresca, Jr. Shin, S.P. Jun, W.J. Chai, J.Y. Park, Y.H. and Park, S.C. 2013. "Isolation and characterization of a *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis." Research in Veterinary Science. 95 : 758-763.

Harley, O.P. and Klein, D. A. 1993. **Microbiology.** 2nd ed. Oxford : Wm.C.Brown.

Kivaria, F.M. Noordhuizen, J.P. and Nielen, M. 2007. "Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania." Preventive Veterinary Medicine. 78 : 274-285.

Króla, J. Waneckaa, A. Twardon, J. Mrowiec, J. Dropinska, A. Bania, J. Podkowik, M. Kowal, A.K. and Pasciak, M. 2016. "Isolation of *Staphylococcus microti* from milk of dairy cows with mastitis." Veterinary Microbiology. 182 : 163-169.

Kwiatek, M. Parsion, S. Mizak, L. Gryko, R. Bartoszcze, M. and Kocik, J. 2012. "Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains." Archives of Virology. 157 : 225–234.

Lange, C.C. Brito, M.A. Reis, D.R. Machado, M.A. Guimarães, A.S. Azevedo, A.L. Salles, É.B. Alvim, M.C. and Silva, F.S. and Meurer, I.R. 2015. "Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing." Veterinary Microbiology. 176 : 382-388.

Lee, Y.D. and Park, J.H. 2015. "Characterization and application of phages isolated from sewage for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm." LWT - Food Science and Technology. 60 : 571-577.

Maloy, S.R. Cronan, J.F. and Freifelder, D.J. 1994. **Microbial Genetics.** 2nd ed. Boston : Jones and Bartlett.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mckane, L. and Kandel, J. 1996. **Microbiology.** United States of America : McGraw-Hill.

Mehil, L. Hoel, S. Thomassen, G.M.B. Jakobsen, A.N. and Karlsen, H. 2017. "The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies." International Dairy Journal. 65 : 20-27.

Mishra, A.K. Sharma, N. Kumar, A. Kumar, N. Gundallahalli Bayyappa, M.R. Kumar, S. and Kumar, N. 2014. "Isolation characterization and therapeutic potential assessment of bacteriophages virulent to *Staphylococcus aureus* associated with goat mastitis." Iranian Journal of Veterinary Research. 15 : 320-325.

Mullan, W.M.A. 1986. "Bacteriophage Induced Starter Problems." Dairy Industries International. 51: 39-42.

Mushtaq, S. Rather, M.A. Qazi, P.H. Aga, M.A. Shah, A.M. Shah, A. and Ali, M.N. 2016. "Isolation and characterization of three benzylisoquinoline alkaloids from *Thalictrum minus* L. and their antibacterial activity against bovine mastitis." Journal of Ethnopharmacology. 193 : 221-226.

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

Peek, R. and Reddy, K.R. 2006. "FDA Approves Use of Bacteriophage to be Added to Meat and Pourtry Product." Gastroenterology and Hepatology News.

Philpot, W.N. and Nickerson, S.C. 1991. **Mastitis: Counter Attack.** Babson Bros. Co. Ltd. Illinois. USA.

Prakash, S. B. 2014. **Laboratory Protocols in Applied Life Sciences.** India. Taylor and Fransic Group.

Tabla, R. Marinez, B. Rebollo, J.E. González, J. Ramírez, M.R. Poa, I. Rodríguez, A. and Garcia, P. 2012. "Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments." International Journal of Food Microbiology. 156 : 209–213.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thapaliya, D. Taha, M. Dalman, M.R. Kadariya, J. and Smith, T.C. 2017. "Environmental contamination with *Staphylococcus aureus* at a large, Midwestern university campus." Science of the Total Environment. 1363–1368.

Voyles, B.A. 2002. **The Biology of Viruses.** 2nd ed. New York : McGraw–Hill.

Williamson, K.E. Corzo, K.A. Drissi, C.L. Buckingham, J.M. Thompson, C.P. and Helton, R.R. 2013. "Estimates of viral abundance in soils are strongly influenced by extraction and enumeration methods." 49 : 857-869.

สำนักอนามัยกรุงเทพมหานคร. [Online]. Available : https://web.ku.ac.th/schoolnet/snet6/envi3/water/solu.html.

Baxamusa, B.N. 2010. **Lytic Cycle.** [Online]. Available : http://www.buzzle.com/articles/lytic-cycle.html.

Khakhum, N. Yordpratum, U. Wongratanacheewin, R. 2010. **Bacteriophages and their medical applications.** [Online]. Available : http://www.smj.ejnal.com/e-journal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1604.

Kumar, P. 2009. **Viruses.** [Online]. Available : http://www.peoi.org/Courses/ Coursesen/bot/frame12.html.

Michael, T. Madigan, Martinko, J.M. Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2012. **Brock biology of microorganisms.** [Online]. Available : https://image.slidesharecdn.com/chapter52537-141218104348-conversion-gate01/95/chapter52537-microbiology-8th-edition-22-638.jpg?cb=1418899700.

Oeggerli, M. 2013. **School of Life Sciences.** [Online]. Available : http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=11181.

Safe Symptoms. **How do viruses reproduce.** [Online]. Available : https://safesymptoms.com/how-do-viruses-reproduce/.

San Diego State University. 2002. **Phage plaques.** [Online]. Available : http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/phage/plaques.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหาร Baird-Parker Agar (BPA)

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาณที่ใช้คือ 63 กรัมต่อน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Enzymatic Digest of Casein	10	กรัม
Beef Extract	5	กรัม
Yeast Extract	1	กรัม
Lithium Chloride	5	กรัม
Glycine	12	กรัม
Sodium Pyruvate	10	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

pH 6.8 ± 0.2

ชั่งอาหารปริมาณ 63 กรัม ละลายในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 950 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเติม Egg Yolk Tellurite Supplement ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

2. อาหาร Luria-Bertani Agar (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2±0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหาร Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2±0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Mannitol Salt Agar (MSA)

Pancreatic Digest of Casein	5	กรัม
Pancreatic Digest of Animal Tissue	5	กรัม
Beef Extract	1	กรัม
NaCl	75	กรัม
D-mannitol	10	กรัม
Phenol red	0.0250	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.4 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สารละลาย Sailine-magnesium diluent plus gelatin (SMG)

NaCl	5.844	กรัม
$MgSO4•7H_2O$	2.460	กรัม
1 M Tris-HCL (พีเอช 7.5)	50	มิลลิลิตร
gelatin	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 M (1 M Tris-HCl) พีเอช 7.5

Tris-HCl	7.882	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.5 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงข้อมูลผลการทดสอบ Somatic cell count (SCC) และ Califonia matitis test (CMT)

ฟาร์ม	ชื่อวัว	SCC*1000	CMT	ที่มาของตัวอย่างน้ำนม
คุณกมลวัฒน์	โชคชัย 5	2312	1+	W1A
	โชคชัย 5	2312	1+	W1D
	ส้มโอ	1135	2+	W2B
	เสาวนีย์	2335	2+	W3D
	ฟ้าปุ้ย	1248	3+	W4A
	เฉิดฉาย	797	1+	W5B
	เฉิดฉาย	797	2+	W5D
	โชคชัย 4	2562	2+	W7D
	บุหงา	1659	2+	W8A
	บุหงา	1659	3+	W8B
	บุหงา	1659	1+	W8C
	บุหงา	1659	1+	W8D
คุณมนัส	เก่ง	3789	3+	M2A
	เก้า	1486	3+	M3B

W คือ ฟาร์มคุณกมลวัฒน์, M คือ ฟาร์มคุณมนัส, A คือ เต้านมขวาด้านหน้า, B คือ เต้านมซ้ายด้านหน้า, C คือ เต้านมขวาด้านหลัง, D คือ เต้านมซ้ายด้านหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้