



รายงานการวิจัย

การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีริโอฟาจไลติกของเชื้อแซล
โมเนลลาเพื่อใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ
(Isolation and characterization of lytic bacteriophages of
Salmonella spp. for biocontrol)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีริโอฟาจไลติกของเชื้อแซล
โมเนลลาเพื่อใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ
(Isolation and characterization of lytic bacteriophages of
Salmonella spp. for biocontrol)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. พัชรินทร์ ศิริงาน
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 -2560
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2564

กิติกรรมประกาศ

การดำเนินโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รหัสโครงการ SUT3-305-59-24-23 ซึ่งดำเนินการอย่างลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนจากทางสาขาเทคโนโลยีอาหาร ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในการสนับสนุนให้ดำเนินการวิจัยอย่างดี และผู้ช่วยวิจัย นางสาวสิริกานต์ ไชยศรี ที่ช่วยทำการวิจัยให้ลุล่วงตามวัตถุประสงค์ และได้เรียนรู้และแก้ปัญหาไปพร้อมกันกับผู้วิจัย

พัชรินทร์ ศิริงาน



บทคัดย่อ

เชื้อ *Salmonella* เป็นเชื้อก่อโรค Salmonellosis ในมนุษย์ และพบการเพิ่มขึ้นของการติดต่อยาปฏิชีวนะทุกปี แบคทีเรียโอฟาจจึงเป็นทางเลือกใหม่ในการใช้ควบคุมเชื้อทางชีวภาพ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อทำการคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจไลติกของเชื้อ *Salmonella* เพื่อใช้ควบคุมทางชีวภาพ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีกประกอบไปด้วยเนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อไก่ จากตลาดและห้างค้าปลีกในจังหวัดนครราชสีมา พบปริมาณแบคทีเรียโอฟาจในเนื้อหมู 5.6-13.9 Log₁₀PFU/ml และในเนื้อวัวมีปริมาณฟาจ 4.2-9.2 log₁₀ PFU/ml และไม่พบฟาจในเนื้อไก่ โดยใช้เชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในการคัดเลือก ฟาจในเนื้อหมูแยกได้ 2 ไอโซเลต ที่มาจากแหล่งแตกต่างกัน คือ vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM และฟาจในเนื้อวัวแยกได้ 2 ไอโซเลต ที่มาจากแหล่งแตกต่างกัน คือ vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 จากการศึกษาโครงสร้างของฟาจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน TEM สามารถระบุเบื้องต้นได้เป็น family: *Tectiviridae* ซึ่งมีรูปร่างเป็น icosahedra-shaped, ขนาด 63 nm, dsDNA, โดยฟาจทั้งสี่ไอโซเลต มีค่า Eclipse period, Latent period และ Rise period เฉลี่ยอยู่ที่ 37.5±5.00, 62.5±12.58, 32.5±18.93 ตามลำดับ มีค่า Burst size เฉลี่ยอยู่ที่ 37.85±22.92 PFU/cell มีอัตราการยึดเกาะของฟาจต่อโฮสต์แบคทีเรียเฉลี่ยอยู่ที่ 0.0078±0.00059 PFU/mL min⁻¹ โดยมีค่า Adsorption Constant อยู่ที่ 3.291±0.025 ×10⁻¹⁰ mL/min จากการศึกษาการจำเพาะของฟาจต่อเชื้อแบคทีเรีย (Phage host range) ผลปรากฏว่าฟาจกลุ่มนี้สามารถกำจัดเชื้อ *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Anatum* และ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ ได้เช่นกันแต่ประสิทธิภาพอยู่ที่ประมาณ 40 -60% เมื่อเทียบกับโฮสต์ที่ใช้ผลิตฟาจ การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 บนผิวเนื้อหมู, เนื้อวัว และเนื้อไก่ ขนาด 2x2 cm หน้า 2 mm ที่ถูกเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4°C ตลอด 8 ชั่วโมง มีความสามารถในการลดลงของปริมาณแบคทีเรียในเนื้อทั้ง 3 ชนิด ฟาจทุกไอโซเลตสามารถลดจำนวนแบคทีเรียให้มีค่าต่ำกว่าค่าที่ตรวจนับได้ (under detection limit) เมื่อบ่มนาน 6 – 8 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ยังพบเชื้ออยู่ และสามารถเพิ่มจำนวนฟาจบนชิ้นเนื้อประมาณ 1.0-1.5 log₁₀PFU/ml ความสามารถในการกำจัด biofilm ของเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ฟาจที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต มีความสามารถในการลดปริมาณ biofilm โดยฟาจเฉลี่ยอยู่ที่ 53.32-65.62% ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ผลของความกรด-ด่างต่อความคงตัวของฟาจ โดยนำฟาจเติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 3-11 บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 120 นาที พบว่าฟาจคัดเลือกทั้ง 4 ชนิด vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM, vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 มีความคงตัวในช่วง pH ระหว่าง 5-9 โดยเกิดการสูญเสียน้อยกว่า -0.001 ถึง -0.018 log PFU/min และช่วงความกรด (pH3-4) และช่วงความเป็นด่าง pH 10-11 มีอัตราการสูญเสียที่เกิดขึ้น มีค่ามากกว่า 0.020 log₁₀ PFU/min ผลของเกลือ NaCl ที่ช่วงความเข้มข้น 0-25% pH 7.4 ต่อความคงตัวของฟาจ บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 120 นาที พบว่าฟาจที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อหมู และฟาจจากเนื้อวัว มีความคงตัวที่ความเข้มข้นเกลือ 5-10% และความเข้มข้นเกลือ 15% ฟาจเริ่มเสียสภาพ ผลของอุณหภูมิ 5-75 °C ต่อฟาจในสารละลาย SM

buffer pH 7.4 พบว่า ฟาจที่แยกได้ทั้ง 4 สามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิที่ 5-35 °C และเริ่มสูญเสียสภาพที่ 45 °C -75 °C มีอัตราการการลดลงมากกว่า -0.01 ถึง -0.035 log₁₀ PFU/min และสามารถทำลายฟาจที่อุณหภูมิ 65-75 °C เวลา 60 นาที ดังนั้นฟาจที่คัดเลือกได้มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* และ Biofilm จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการควบคุมทางชีวภาพในอาหารโดยเฉพาะเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ : Salmonella, Bacteriophage, Retail meats, Biocontrol, Biofilm



Abstract

Salmonella is an important pathogen cause of salmonellosis in human and an increase in number of multidrug-resistant involved in *Salmonella* that have been reported annually. Bacteriophage is an alternative biological agent to control *Salmonella* in food. Thus, the objectives of this research were to isolate and characterize the lytic bacteriophage of *Salmonella* from retail meat to use as biocontrol. The retail pork, beef and chicken meat from opened-market and supermarket in Nakhon Ratchasima province were used for isolation of salmonella phage by using *S. Typhimurium* ATCC 11331 as host producing bacteria. The numbers of salmonella phages were found in pork and beef but not in chicken meat, about 5.6-13.9 Log₁₀PFU/ml and 4.2-9.2 log₁₀ PFU/ml, respectively. The *vB_solmoM-pSN*, *vB_solmoM-pYM* from pork and *vB_solmoM-bTM* and *vB_solmoM-bKK1* from beef were collected. The morphology of each isolate was icosahedra-shaped, size 63 nm based on TEM. These phages were belonged to family: *Tectiviridae*, that is dsDNA lytic phage. The one step-growth curve of each phage isolate showed that the average of Eclipse period, Latent period and Rise period were 37.5±5.00, 62.5±12.58, 32.5±18.93 respectively. The average burst size was 37.85±22.92 PFU/cell. The average of adsorption on host strain was 0.0078±0.00059 PFU/mL min⁻¹. The Adsorption Constant was 3.291±0.025 x10⁻¹⁰ ml/min. The all phage isolates were able to infect broad host range, resulting in that % EOP on other *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Anatum* strains and *E. coli* strains was about 40-60% compared to host strain. Additionally, these phage isolates were able to eliminate the *S. Typhimurium* that spiked on pork, beef and chicken meat surfaces (WxD size 2x2cm, thickness 2 mm) at MOI=1 leading to that the amount of *Salmonella* was not able to detection within 6-8 h after treatment. Moreover, the all phage isolates exhibited the high efficiency to disperse biofilms resulting in the reduction in the amount of biofilm, approximately 53.32-65.62% for 72 h after treatment. The all isolates were stable under pH 5-9 but not stable under pH 3-4 and also pH 10-11. The effect of NaCl concentration (0-25%) on stability of each phage was determined and found that the all phage isolates were stable under 5-10% NaCl. At >15% NaCl could destroy phage leading in loss of the number of phage titer. The all phage isolates were stable under temperature range of 5-35 °C, while, at 45-75 °C, the phage titers were reduced in reduction rate -0.01 to -0.035 log₁₀PFU/min. The phages were destroyed at 65-75 C for 60 min. Therefore, these lytic salmonella phages could be able to control *Salmonella* and its biofilms as biocontrol in meat and meat products.

Keywords: *Salmonella*, Bacteriophage, Retail meats, Biocontrol, Biofilm

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย.....	7
3.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นโฮสต์.....	7
3.1.2 การทดสอบโฮสต์ที่ใช้ในการคัดแยกฟาจและโฮสต์ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของฟาจ.....	7
3.2 การตรวจหา <i>E.coli</i> /coliform ด้วยวิธี MPN และ การตรวจหา <i>Salmonella</i>	8
3.2.1 วิธีตรวจเชื้อ <i>E.coli</i> /coliform ด้วยเทคนิค MPN.....	8
3.2.2 วิธีตรวจเชื้อ <i>Salmonella</i>	9
3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจ.....	9
3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีก.....	9
3.3.2 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ.....	10
3.3.3 การนับจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ.....	10
3.4 การทำบริสุทธิ์และการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ.....	10
3.4.1 การทำบริสุทธิ์.....	10
3.4.2 การเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ.....	11
3.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของฟาจที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Transmission Electron Microscopy (TEM)	12

3.6 การศึกษาการยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์ S. Typhimurium และ one-step growth curve.....	12
3.7 การศึกษาความจำเพาะและการประสิทธิภาพของแบคทีริโอฟาจ.....	13
3.8 ผลของแบคทีริโอฟาจต่อจำนวนของเชื้อ S.Typhimurium ในเนื้อสัตว์.....	13
3.9 การศึกษาผลของความทนต่อสภาวะต่างๆของแบคทีริโอฟาจ.....	14
3.10 การศึกษาผลของแบคทีริโอฟาจต่อการอยู่รอดของเชื้อ S.Typhimurium ใน biofilm.....	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การตัดแยกและการนับจำนวนฟาจในตัวอย่างเนื้อสัตว์ชายปติก.....	15
4.2 คุณลักษณะของแบคทีริโอฟาจ.....	17
4.2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาและขนาดสารพันธุกรรม DNA ของแบคทีริโอฟาจ.....	17
4.2.2 one-step growth curve และ การยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์ S. Typhimurium.....	18
4.2.3 ความจำเพาะและประสิทธิภาพของฟาจ.....	24
4.2.4 ผลของฟาจต่อจำนวนของเชื้อ S. Typhimurium ในเนื้อสัตว์.....	26
4.2.5 ผลของฟาจต่อการลด biofilm ของเชื้อ S.Typhimurium.....	31
4.2.6 ความทนต่อสภาวะต่างๆของฟาจ (Phage stability under various condition)	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 ผลของฟาจต่อการลดเชื้อ Salmonella บนเนื้อสัตว์.....	49
5.2 ผลของฟาจในการกำจัดไบโอฟิล์ม.....	50
5.3 ผลของ pH, ความเข้มข้นเกลือและอุณหภูมิต่อความคงตัวของฟาจ.....	51
สรุปผลการวิจัย.....	53
บรรณานุกรม.....	54
ประวัติผู้วิจัย.....	58

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	17
ผลปริมาณฟาจที่ได้จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีกจากแหล่งที่มาต่างๆโดยใช้เชื้อ S. Typhimurium ATCC 13311 เป็นโฮสต์ และผลการตรวจเชื้อ Coiliform/ E.coli และ Salmonella	
ตารางที่ 2	19
ข้อมูล Latent period, Eclipse period, Rise period และ burst size	
ตารางที่ 3	24
ความจำเพาะของฟาจ (Specific host range)	
ตารางที่ 4	26
ค่า %EOP ของฟาจที่คัดเลือกแล้วกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาความจำเพาะ ของฟาจ	



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1	9
รูปที่ 2	15
รูปที่ 3	16
รูปที่ 4	17
รูปที่ 5	18
รูปที่ 6	20
รูปที่ 7	21
รูปที่ 8	22
รูปที่ 9	23
รูปที่ 10	25
รูปที่ 11	26
รูปที่ 12	27

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 13 ผลของฟาจต่อจำนวนเชื้อ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (A) และจำนวนฟาจบนพื้นผิวหน้าเนื้อหมู ขนาด 2 cm x2 cm (B) ที่อุณหภูมิ 4°C	28
รูปที่ 14 ผลของฟาจต่อจำนวนเชื้อ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (A) และจำนวนฟาจบนพื้นผิวหน้าเนื้อวัว ขนาด 2 cm x2 cm (B) ที่อุณหภูมิ 4°C	29
รูปที่ 15 ผลของฟาจต่อจำนวนเชื้อ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (A) และจำนวนฟาจบนพื้นผิวหน้าเนื้อไก่ ขนาด 2 cm x2 cm (B) ที่อุณหภูมิ 4°C	30
รูปที่ 16 ผลของฟาจ <i>vB_solmoM-pSN(A)</i> , <i>vB_solmoM-pYM(B)</i> , <i>vB_solmoM-bTM(C)</i> และ <i>vB_solmoM-bKK1(D)</i> ต่อ ปริมาณ Biofilm ของ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 บ่มที่ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง	32
รูปที่ 17 ปริมาณฟาจ <i>vB_solmoM-pSN (A)</i> และปริมาณเชื้อ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง	33
รูปที่ 18 ปริมาณฟาจ <i>vB_solmoM-pYM (A)</i> และปริมาณเชื้อ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง	34
รูปที่ 19 ปริมาณฟาจ <i>vB_solmoM-bTM (A)</i> และปริมาณเชื้อ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง	35
รูปที่ 20 ปริมาณฟาจ <i>vB_solmoM-bKK1 (A)</i> และปริมาณ <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 ที่รอดชีวิต (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง	36
รูปที่ 21 ความคงทนของฟาจ <i>vB_solmoM-pSN</i> ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C	39
รูปที่ 22 ความคงทนของฟาจ <i>vB_solmoM-pYM</i> ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C	40
รูปที่ 23 ความคงทนของฟาจ <i>vB_solmoM-bTM</i> ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C	41
รูปที่ 24 ความคงทนของฟาจ <i>vB_solmoM-bKK1</i> ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C	42
รูปที่ 25 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ <i>vB_solmoM-pSN</i> ที่อุณหภูมิ 4°C	43
รูปที่ 26 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ <i>vB_solmoM-pYM</i> ที่อุณหภูมิ 4°C	43
รูปที่ 27 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ <i>vB_solmoM-bTM</i> ที่อุณหภูมิ 4°C	44

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-bKK1 ที่อุณหภูมิ 4°C	44
รูปที่ 29 ความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-pSN ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2	45
รูปที่ 30 ความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-pYM ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2	46
รูปที่ 31 ความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-bTM ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2	47
รูปที่ 32 ความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-bKK1 ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2	48



คำอธิบายสัญลักษณ์

Pt	ความเข้มข้นแบคทีเรียโอฟาจที่เวลา t (PFU/ml)
P0	ความเข้มข้นแบคทีเรียโอฟาจเริ่มต้น (PFU /ml)
Pf	ปริมาณแบคทีเรียโอฟาจสูงสุดที่เพิ่มจำนวนได้ ในช่วงสุดท้ายของ lag phase
Pi	ปริมาณแบคทีเรียโอฟาจเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนในช่วง lag phase
P _{IB}	ปริมาณแบคทีเรียโอฟาจชนิด A ที่นับได้ในแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น
P _{PB}	ปริมาณแบคทีเรียโอฟาจชนิด A ที่นับได้ในแบคทีเรียโฮสต์
N	ความเข้มข้นแบคทีเรีย (CFU/ml)
t	เวลา (นาที)



บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ และติดต่อสารเคมีที่ฆ่าเชื้อ (disinfectant) เพิ่มสูงขึ้น การควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) ก็เป็นอีกทางเลือกเพื่อลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะลง การใช้แบคทีเรียโอฟาจ เป็นหนึ่งทางเลือกในการควบคุมทางชีวภาพ เนื่องจากแบคทีเรียโอฟาจมีความจำเพาะสูงต่อแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ และไม่มีอันตรายต่อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และไม่เป็นอันตรายต่อคน สัตว์ และ พืช พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมดิน น้ำ น้ำเสีย และมีจำนวนมากในระบบนิเวศจำนวนประมาณ 10^{30} ถึง 10^{32} (Guttman et al., 2005) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *Salmonella Typhimurium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ เป็นเชื้อก่อโรครั่วซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน โดยเฉพาะในสัตว์ปีก นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อสารแอนติไบโอติกของเชื้อซัลโมเนลลา (Multi-drug resistant strains) เพิ่มขึ้น ดังนั้นการใช้แบคทีเรียโอฟาจซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อซัลโมเนลลา ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ในการลดการใช้สารแอนติไบโอติก และควบคุมเชื้อจุลินทรีย์นี้ทั้งในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องมือและอุปกรณ์ในการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ในโรงฆ่าสัตว์และในฟาร์มเลี้ยงสัตว์

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจไลติกของเชื้อ *S. Typhimurium* จากเนื้อสัตว์ขายปลีก
- 1.2.2. เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานรูปร่างของแบคทีเรียโอฟาจไลติกของเชื้อ *Salmonella*
- 1.2.3. เพื่อศึกษาความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์ (phage-host adsorption)
- 1.2.4. เพื่อศึกษาความจำเพาะในความสามารถในการสร้างพลาคว (plaque) ในเชื้อ *Salmonella* (specific phage host range)
- 1.2.5. เพื่อศึกษาจำนวนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่ถูกปลดปล่อย (Burst size) และ latent period ด้วยการศึกษากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและแบคทีเรียโอฟาจที่คัดเลือกในหนึ่งการเจริญเติบโต(one-step growth curve)
- 1.2.6. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอฟาจในการทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* ในการกำจัดไบโอฟิล์มและบนเนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อไก่
- 1.2.7. เพื่อศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง, ผลของความเข้มข้นเกลือ, ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอฟาจ

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียโอฟาจไลติกของเชื้อ *Salmonella* จากเนื้อสัตว์ขายปลีกในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* และสามารถใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ ในการวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจไลติกของเชื้อ *S. Typhimurium* เพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจของเชื้อ *S. Typhimurium* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจที่คัดเลือก คุณลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจในการสร้างพลาไคในเชื้อ *S. Typhimurium* และ *Salmonella* เซโรวาร์อื่นๆ เช่น *S. Enteritidis*, *S. Weltevreden* และแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* เพื่อศึกษาความจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาจในการไลซิสโฮสต์ (specific phage host range) ความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการเกาะติดกับเซลล์โฮสต์ ความสามารถในการทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* บนเนื้อและไบโอฟิล์ม และความคงตัวของพาจในสภาวะต่างๆ เพื่อคัดเลือกพาจที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาและไม่เกิดการต้านทานต่อแบคทีเรียโอฟาจของแบคทีเรียเมื่อใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ

1.4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ วงศ์ Enterobacteriaceae เจริญได้ในสภาวะทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจนในบรรยากาศ (facultative anaerobic) มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็นเชื้อก่อโรคท้องร่วง ไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) หรือเรียกว่าโรคซัลโมเนลโลซิส สำหรับเชื้อ *Salmonella Typhimurium* เป็นกลุ่ม non-typhoid ซึ่งพบการปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะในเนื้อสัตว์ ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อสารแอนติไบโอติกของเชื้อซัลโมเนลลา (Multi-drug resistant strains) เพิ่มขึ้น ดังนั้นการควบคุมทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียโอฟาจจึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับใช้ในการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลา

แบคทีเรียโอฟาจ หรือ พาจ เป็นไวรัสที่มีความจำเพาะสูงต่อแบคทีเรีย ด้วยมีความจำเพาะต่อ receptor บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดไทโคอิก (teichoic acids) และแฟลกเจลลา (Flagella) ค้นพบครั้งแรก โดย Frederick W. Twort ในปี 1915 และ Felix d'Herelle ในปี 1917 และสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในน้ำต่างๆ ดิน อาหาร โดยมีบทบาทในการควบคุมความสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียโอฟาจ เหมือนกับไวรัสอื่นๆ คือไม่มีกลไกที่ใช้ในผลิตพลังงานและไม่มีไรโบโซมในการสังเคราะห์โปรตีน โดยอนุภาคของพาจประกอบด้วยสารพันธุกรรมกรดนิวคลีอิก DNA หรือ RNA ห่อหุ้มแคปซิด (capsid) ที่เป็นโปรตีน หรือ ไลโปโปรตีน (lipoprotein) ดังนั้นแบคทีเรียโอฟาจต้องอาศัยกลไกของเชื้อแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวน สามารถแบ่งชนิดของแบคทีเรียโอฟาจตามวงจรชีวิต (Life cycle) เป็นสองประเภท คือ แบคทีเรียโอฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติก (Lytic) หรือ ไวรัสเลนต์ (Virulent) และแบคทีเรียโอฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซจีนิก (Lysogenic) หรือ เทมเพอเรส (Temperate) สำหรับโพรพาจ (prophage) เป็นสารพันธุกรรมของพาจที่แทรกอยู่ในโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียหรืออยู่ในรูปของพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ (Guttman et al., 2005)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจเพื่อการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค สามารถนำไปใช้ในด้าน การแพทย์ ในอุตสาหกรรมเกษตร โดยนิยมใช้เฉพาะแบคทีเรียโอฟาจไลติก เนื่องจากแบคทีเรียโอฟาจไลติก สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียและไม่ส่งผ่านสิ่งไม่พึงประสงค์สู่เซลล์ของแบคทีเรีย เช่น ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ยีนสารพิษ เป็นต้น (Sulakvelidze, 2011) ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และไม่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่มี ประโยชน์ มนุษย์ พืช และสัตว์ ในปี 2006 องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Administration, USFDA) ได้มีการรับรองการใช้แบคทีเรียโอฟาจเป็น Generally recognized as safe (GRAS) มีความปลอดภัยสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร (Food additives) ให้กับ Listex P100 ของ นักวิจัยชาวเนเธอร์แลนด์ ในการควบคุมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารพร้อมบริโภคและ soft cheese และสหภาพยุโรปอนุญาตให้ใช้แบคทีเรียโอฟาจในการแปรรูป (processing aid) ภายใต้การควบคุม European legislation on food safety (Directive 89/107/EEC) และ Regulation (EC) No. 178/2002 (Von Jagow and Teufer, 2007) นอกจากนี้ List-Shield™ LMP-102 ของบริษัท Intralytix Co. ได้รับการ รับรอง เป็นสารเติมแต่งในเนื้อ เนื้อสัตว์ปีก สำหรับควบคุมเชื้อ *Listeria monocytogenes* และผลิตภัณฑ์พร้อม บริโภค (Ready To Eat.) (Mahony et al., 2011) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอฟาจไลติกนั้นมีความ ปลอดภัยที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพในอาหารได้ ดังนั้นการศึกษาลักษณะของแบคทีเรีย โอฟาจที่ความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ที่คัดแยกได้จากเนื้อ สัตว์ชายปสลิกนั้นมีความเป็นไปได้ในการใช้ในการควบคุมทางชีวภาพในอาหารและพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหาร ทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ลดการ การปนเปื้อนในอาหารเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคอาหาร โดยเฉพาะอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ขาย ปสลิกในท้องตลาด เนื่องจากฟาจที่มีอยู่แล้วในเนื้อสัตว์ และยังสามารถขยายไปสู่การควบคุมเชื้อแบคทีเรียใน เนื้อสัตว์ปีก หมู โค ในฟาร์มและในโรงฆ่าสัตว์ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อสัตว์ และลดการใช้ ยาปฏิชีวนะในสัตว์ได้ในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาไปสู่การใช้แบคทีเรียโอฟาจในการตรวจสอบ แบคทีเรียในอาหารได้ และการจำแนกชนิด (strains) ของเชื้อ *S. Typhimurium* ด้วยเทคนิค Phage typing เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังและตรวจสอบการระบาด (Baggesen et al., 2010)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การระบาดของเชื้อซัลโมเนลลาในประเทศไทยมีความเกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาโดยเฉพาะในเนื้อสัตว์และพบการติดต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อซัลโมเนลลา จากรายงานของ ยุทธพงษ์ ศรีมงคล และคณะ (2554) การสืบสวนโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Salmonella* ในจังหวัดสระแก้ว สาเหตุเกิดจากการรับประทานเนื้อหมูที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* จากรายงานของ สรรเพชญ์ อังกิติตระกูล และคณะ (2554) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในเนื้อวัวในตลาดสดในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น พบว่าพบการปนเปื้อนในเนื้อวัวและบนเขียง ร้อยละ 66.62 และ 44.44 ตามลำดับ และพบการติดต่อยา amoxicillin, gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim, และ tetracycline ร้อยละ 40, 5, 30, และ 35 ตามลำดับ จากรายงานของ สุวัฒน์ มลิจารย์ และ ศิริจันทร์ทิพย์ วนาประเสริฐศักดิ์ (2556) รายงานการตรวจพบ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดราชบุรี ในปี 2554 พบร้อยละ 65 จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ 200 ตัวอย่าง ในปี 2555 ร้อยละ 68 จากจำนวนตัวอย่าง 250 ตัวอย่าง จำแนกตามชนิดของเนื้อสัตว์พบว่าในเนื้อสุกร ไก่ และ โค พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในปี 2554 ร้อยละ 61.26, 80.95 และ 56.25 ในปี 2555 ร้อยละ 65.85, 75.75 และ 83.33 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์เพิ่มสูงขึ้นในเนื้อสุกรและโค แต่ในเนื้อไก่มีจำนวนลดลง แต่ยังมีรายงานการพบการปนเปื้อนในอาหารประเภทอาหารทะเล น้ำและอาหารอื่น ๆ โดยพบความชุกมาก 6 เซโรวาร์ คือ *S. Weltevreden*, *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. 1,4,5,12:i* และ *S. Typhimurium* อย่างไรก็ตาม *S. Typhimurium* เป็นเซโรวาร์ที่สำคัญที่ต้องเฝ้าระวังเนื่องจากก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นสายพันธุ์ที่มีความชุกสูงในอเมริกาและยุโรป และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bangtraku-Inonth et al. 2004) และมีรายงานว่าพบการการติดต่อยาปฏิชีวนะของ *S. Typhimurium* (Sirichote et al., 2010) แสดงให้เห็นว่าการควบคุมเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อเพิ่มความปลอดภัยของผู้บริโภคเนื้อสัตว์ การควบคุมทางชีวภาพโดยการใช้แบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Salmonella* spp. จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและลดการติดต่อของเชื้อลง

แบคทีเรียโอฟาจของเชื้อ *Salmonella* มีการศึกษาในหลายประเทศทั่วโลกเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพและการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียโอฟาจของเชื้อ *Salmonella* สามารถคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม เช่น อาหาร น้ำ น้ำเสีย บ่อน้ำเสีย มูลสัตว์ โดยทั่วไปแบคทีเรียโอฟาจที่แยกได้เป็นฟาจมีหาง (phage tail) จัดอยู่ในวงศ์ *Siphoviridae*, *Myoviridae*, และ *Podoviridae* จากรายงานการศึกษาของนักวิจัยใช้ทั้งฟาจเดี่ยว ๆ และฟาจค็อกเทลในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งในหลอดทดลอง ในอาหาร และในสัตว์

การศึกษาของ Spricigo et al. (2013) ใช้ฟาจค็อกเทล ในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร พบว่าสามารถลดเชื้อ *Salmonella* บนหนังหมู และผักสลัด Lettuce ได้มากกว่า $2 \log_{10}$ per cm^2/g

ตามลำดับ ในเนื้ออกไก่ ลดได้มากกว่า $1 \log_{10}$ CFU/g และในไข่ไก่สดลดได้ $0.9 \log_{10}$ CFU/cm² แสดงให้เห็นว่าฟาจค็อกเทล มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในอาหารได้

การศึกษาของ Wong et al. (2014) ประเมินการใช้ไลติกฟาจ Φ st1 เป็นแบคทีริโอฟาจไลติก วงศ์ *Siphoviridae* สามารถทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* และ *S. Hadar* ในไก่ พบว่าฟาจที่ multiplicity of infection (MOI) (0.1) สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ $6.6 \log_{10}$ CFU/ml ในหลอดทดลอง และหลังจากทำ challenge test ในไก่ 6 ชั่วโมง สามารถลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ลงได้ $2.9 \log$ CFU/ml และไม่พบ *S. Typhimurium* หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าฟาจสามารถควบคุมเชื้อ *Salmonella*

การศึกษาของ AlbinoLuiz et al. (2014) พบว่าฟาจที่คัดแยกได้จากอุจจาระของสุกร เมื่อทำการศึกษาในระบบ In vitro พบว่าฟาจความเข้มข้น 10^7 PFU/mL and 10^9 PFU/mL สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ 1.6 และ $2.5 \log_{10}$ CFU/mL ตามลำดับหลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง และมีประสิทธิภาพในการลดการบุกรุกของเชื้อ *Salmonella* ในระบบทางเดินอาหารของหมูได้เช่นเดียวกัน

จากงานวิจัยเห็นได้ว่าแบคทีริโอฟาจมีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมทางชีวภาพของเชื้อ *S. Typhimurium* ในหลอดทดลอง ในอาหาร และในสัตว์ ในปี 2013 บริษัท Intralytix Co. ได้การรับรองจาก USDA ให้ผลิตภัณฑ์ของบริษัทที่มีชื่อทางการค้าว่า SalmoFresh™ เป็นสารที่มีความปลอดภัย (GRAS) สามารถใช้ในกระบวนการผลิตเนื้อแดงและเนื้อของสัตว์ปีกเพื่อควบคุม *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky และ Thompson (Anon, 2013a). และ Microos ของประเทศเนเธอร์แลนด์ ที่มีชื่อทางการค้าว่า SAMONELEX™ ได้รับการรับรองจาก USDA ให้เป็นสารที่มีความปลอดภัย GRAS เพื่อควบคุมเชื้อ *Salmonella* ในกระบวนการผลิตอาหาร และเริ่มใช้ในฟาร์มไก่ในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2014 นี้ (Anon, 2013b) นอกจากนี้มีสิทธิบัตรฟาจค็อกเทลที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Vischow, Hadar ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อในอาหาร (Llagostera et al., 2014) และสิทธิบัตรฟาจค็อกเทลในการควบคุม *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* (Connerton and Hooton, 2013)

อย่างไรก็ตามการศึกษานในประเทศไทยเกี่ยวกับลักษณะของแบคทีริโอฟาจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* มีน้อยและสายพันธุ์ของ *Salmonella* ที่มีความชุกของการระบาดในประเทศไทยมีความแตกต่างกับประเทศสหรัฐอเมริกา (Wongsuntornpoj et al. 2014) และจากการศึกษาการคัดแยกฟาจของเชื้อ *Salmonella* ในฟาร์มโคนมในประเทศไทยจำนวนฟาจที่คัดแยกได้ 62 isolates มีขนาดโมเลกุล 40-200 kb ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของฟาจที่คัดแยกได้ และเมื่อเทียบกับประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าฟาจที่คัดแยกได้จากประเทศไทยสามารถไลซิสเซลล์ *Salmonella* หลายสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อโฮสต์กว้าง ขณะที่ฟาจที่คัดแยกในประเทศสหรัฐอเมริกามีความจำเพาะต่อโฮสต์แคบ (Wongsuntornpoj et al. 2014) ซึ่งการใช้ฟาจที่คัดแยกได้ในพื้นที่เดียวกับพื้นที่ที่ต้องใช้ในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* ฟาจที่คัดเลือกว่าจะมีประสิทธิภาพต่อการทำลายโฮสต์ของสายพันธุ์ในแต่ละท้องถิ่นได้ดีกว่าเนื่องจากฟาจมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูง และทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาการคัดแยกฟาจจากเนื้อสัตว์ที่ขายปลีกในตลาดสดในประเทศไทย ซึ่งฟาจที่แยกได้นั้นแสดงว่ามีฟาจอยู่แล้วในอาหาร เมื่อทำการศึกษาลักษณะของฟาจ และศึกษาความสามารถของฟาจในการ

ทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* แล้วนั้นสามารถนำข้อมูลมาการประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อ *Samonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร พื้นผิวที่สัมผัสอาหารได้ในอนาคต



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นโฮสต์

เชื้อ *S. Typhimurium* นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง xylose lysine deoxycholate (XLD) agar บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18-20 ชั่วโมง และเขี่ยไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) broth จนถึง mid-log phase ($OD_{600nm} = 0.6$) บ่มในตู้บ่มเขี่ยแบบเขย่า (shaker incubator) ที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm. สำหรับการเก็บสต็อกเชื้อระยะยาว ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ที่มีส่วนผสมของ 20% กลีเซอรอล และเก็บที่ -80°C

3.1.2. การทดสอบโฮสต์ที่ใช้ในการคัดแยกฟาจและโฮสต์ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของฟาจ

เพื่อตรวจสอบโฮสต์ที่ใช้ในการคัดเลือกฟาจและยืนยันว่าโฮสต์ที่ใช้ไม่มีฟาจในเซลล์โฮสต์ซึ่งจะรบกวนการแยกแบคทีเรียฟาจ โดยนำสายพันธุ์ *Salmonella* และ *Escherichia coli* ตามรายการข้างล่างนี้ ใช้สำหรับเป็นแบคทีเรียโฮสต์สำหรับผลิตฟาจและแบคทีเรียโฮสต์สำหรับทดสอบความจำเพาะเลี้ยงบนอาหาร XLD และ EMB ตามลำดับ บ่มที่ 37°C 18-20 ชั่วโมง แบ่งเชื้อทั้งสองออกเป็น 2 ชุด โดยชุดแรก ถ่ายลงในอาหารเหลว NB ที่เติม 10 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ($OD_{600nm} = 0.2$) ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อบ่ม 10 นาที ภายใต้แสง UV ในตู้ lamina air flow โดยชักตัวอย่างออกมาทุก 1, 5 และ 10 นาที

Escherichia coli ATCC 11775

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 43888 (O157:H7)

Escherichia coli NCTC 10538

Salmonella enterica Subsp. Enterica serovar Choleraesuis ATCC 10708

Salmonella enterica Subsp. Enterica serovar Enteritidis ATCC 13076

Salmonella enterica Subsp. Enterica serovar Typhimurium ATCC 14028

Salmonella enterica Subsp. Enterica serovar Typhimurium ATCC 13311

Salmonella enterica Subsp. Enterica serovar Newport ATCC 6962

Salmonella enterica Subsp. Enterica serovar Anatum ATCC 9270

ส่วนชุดที่ 2 เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ผสม 0.2 µg/ml Mitromycin C นำเชื้อที่ได้ไปทำทดสอบการสร้างพ्लัค โดยการเตรียมโลว์น (lawn) ด้วยเทคนิคเอการ์โอเวอร์เลย์ (Agar Overlay plate) โดยนำเชื้อที่ใช้เป็นโฮสต์มา 500 µl ถ่ายใส่ TSB agar ความเข้มข้น 0.6% agar ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ที่หลอมละลายที่อุณหภูมิ 50-55 °C (molten overlay agar) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทบนอาหารแข็ง (TSB 1.5% agar) ที่ตั้งไว้

ให้แข็งตัว สังเกตการณเกิดพลาค ถ้าไม่เกิดพลาคแสดงว่าไม่มีโพรฟาจในเซลล์โฮสต์และใช้เป็นโฮสต์ในการคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจต่อไป

3.2. การตรวจหา *E.coli/coliform* ด้วยวิธี MPN และ การตรวจหา *Salmonella*

3.2.1. วิธีการตรวจเชื้อ *E.coli/coliform* ด้วยเทคนิค MPN

3.2.1.1. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างเนื้อสัตว์จากแหล่งที่มาต่างๆ สับละเอียด 25 g แล้วนำไปผสมกับ Phosphate Buffer ปริมาณ 225 ml. ในถุงตีปั่นที่ปราศจากเชื้อแล้วตีปั่นนาน 4 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนใสที่ได้แล้วนำมาเจือจางด้วย Phosphate Buffer ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 1 และ 0.1 CFU/ml

3.2.1.2. การเตรียมอาหาร

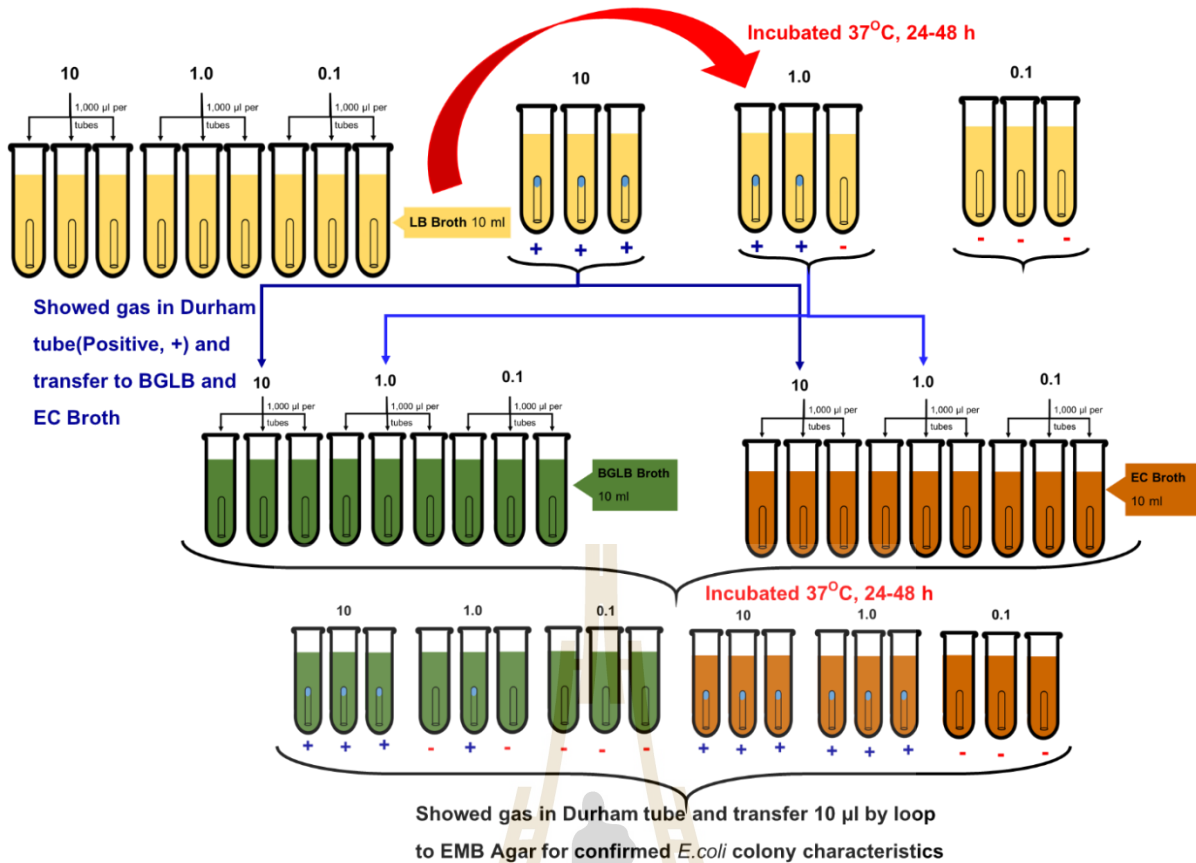
เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Lactose broth (LB), Brilliant-Green Lactose bile broth (BGLG) และ EC broth ใส่หลอดทดลองปราศจากเชื้อ ปริมาณ 10 ml ที่มีหลอดเดอร์แรม (Durham tube) คว่ำอยู่จนท่วมหลอดและไม่มีฟองอากาศภายใน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi

3.2.1.3. การทดลองด้วยวิธี MPN

ปิเปตตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้ว ดูดตัวอย่าง 1 ml. ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยใช้อินทรม 3 จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดเดอร์แรม ซึ่งแสดงผลเป็นบวม ส่วนหลอดที่ไม่เกิด ให้นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้น และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก

จากนั้นนำหลอดที่แสดงผลเป็นบวมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB Broth จำนวน 1,000 µl ถ่ายลงในอาหาร BGLG และ EC broth สำหรับ BGLG Broth นำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดเดอร์แรม ซึ่งแสดงผลเป็นบวม ส่วนหลอดที่ไม่เกิด ให้นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้น และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก ส่วน EC broth ไปบ่มที่ 44°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดเดอร์แรม ซึ่งแสดงผลเป็นบวม ส่วนหลอดที่ไม่เกิด ให้นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้น และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเทียบผลกับตาราง MPN

นำหลอดที่เกิดแก๊สยืนยันว่าเป็น *E.coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง EMB Agar โดยบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะสีเขียวคล้ำ หรืออาจเรียกว่าสีโลหะตะกั่ว (metallic sheen) จากนั้นให้ใช้สำลีพันไม้ปราศจากเชื้อ เชี่ยวเอาโคโลนีที่แยกเดี่ยว ๆ เห็นชัดในแต่ละจานเพาะเชื้อประมาณ 2-3 โคโลนี ใส่ลงในอาหาร 20% Glycerol NB Broth แล้วเก็บที่ -80°C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



รูปที่ 1 ขั้นตอนการตรวจสอบ coliform/E.coli ด้วยวิธี MPN

3.2.2. วิธีตรวจเชื้อ Salmonella

ซึ่งตัวอย่างเนื้อสัตว์จากแหล่งที่มาต่างๆ สับละเอียด 50 g แล้วนำไปผสมกับ 225 ml, RV (Rappaport-Vassiliadis broth). แล้วบ่มไว้ที่ 44°C นานข้ามคืน สังเกตสีของอาหารที่เปลี่ยนไป ส่วนตัวอย่างที่ไม่เปลี่ยนให้บ่มเพิ่มอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่เปลี่ยนสีอาหารได้ ไปทดสอบบนอาหารแข็ง XLD agar แล้วบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะสีชมพูและมีสีดำตรงกลาง และทดสอบทางชีวเคมี

3.3. การคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจ

3.3.1. การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีก

การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจของเชื้อ *S. Typhimurium* ตามวิธีของ Hoonton et al. (2011) นำตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อวัว ที่ขายปลีกในท้องตลาด อย่างละ 5 ตัวอย่าง เติม SM buffer without gelatin (50 mM Tris-HCl [pH7.5], 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄•7H₂O) อัตราส่วน 1: 9 แล้วบ่มที่ 4 °C และเขย่าที่ 100 rpm เวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm 4°C นาน 10 นาที นำไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 µm และเก็บส่วนที่ผ่านการกรองไว้ที่ 4°C ในระหว่างทดลอง แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการกรองมาศึกษาการสร้างพลาคว (Plaque) นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองมาผสมกับเชื้อ *S. Typhimurium* ในอาหารเหลว TSB ที่มี 10 mM MgSO₄ (ความเข้มข้น 10⁸ CFU/ml (OD_{600nm} = 0.1) ในอัตราส่วน 1: 1 ทิ้งไว้ 50 นาที แล้วทำ

การปิเปต 0.5 ml ลงใน 5 ml ของ molten overlay agar (TSB 0.6% agar) อุณหภูมิ 50-55°C ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนอาหารแข็ง (basal agar) (TSB 1.5% agar) ที่ตั้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของพลาควและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพลาคว 3 ครั้ง จำนวน 10 โคโลนี จากนั้นคัดเลือกพลาคว ที่เกิดเคลียร์โซนสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะขุ่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดไลซีสที่สมบูรณ์ จากนั้นจึงนำมาทำซ้ำ 3 ครั้งด้วยวิธีเดียวกันแล้วเก็บแบคทีเรียโอฟาจที่แยกได้ที่ 4°C

3.3.2. การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ

หลังจากได้แบคทีเรียโอฟาจที่คัดเลือกแล้วทำการเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจ โดยนำตัวอย่างที่ได้ในข้อ 1.3 มากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 μm มาผสมกับเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในอาหารเหลว TSB ที่มี 10 mM MgSO_4 ในอัตราส่วน 2 ต่อ 5 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 CFU/ml ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$) ที่ตั้งไว้ 50 นาที แล้วทำการปิเปตตัวอย่างที่ครบกำหนดแล้วผสมลงในอาหาร TSB 0.6% agar ที่หลอมละลายอุณหภูมิ 50-55 °C ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนอาหารแข็ง TSB 1.5% agar ที่ตั้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่ 37 °C 18-20 ชั่วโมง สังเกตการเกิดลักษณะของพลาคว แล้วเติม SM buffer without gelatin ปริมาตร 5 ml/plate นำไปบ่มที่ 4 °C 18-20 ชั่วโมง แล้วใช้กระบอกฉีดยาที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายแบคทีเรียโอฟาจมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 μm เก็บแบคทีเรียโอฟาจที่ผ่านการกรองไว้ที่ 4 °C ตลอดการทดลอง

3.3.3. การนับจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ

หลังจากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจแล้ว นำแบคทีเรียโอฟาจที่ได้มาตรวจนับจำนวน Plaque Forming Unit (PFU) เพื่อหาความเข้มข้น โดยนำแบคทีเรียโอฟาจที่ได้มาทำการเจือจาง (ten-fold serial dilution) ด้วย MRD (Maximum Recovery Diluent) Buffer แล้วปิเปตแบคทีเรียโอฟาจที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 10 μl ลงบนโลว์นที่เตรียมไว้ (Atterbury et al., 2007; Hoonton et al. 2011) แล้วบ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ตรวจนับพลาควที่เกิดขึ้นคำนวณเป็นหน่วย PFU/ml

3.4. การทำบริสุทธิ์และการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ

3.4.1. การทำบริสุทธิ์

การทำบริสุทธิ์โดยประยุกต์จาก Pascale (2009) โดยนำตัวอย่างพลาควความเข้มข้น 10^8 PFU/ml. ที่ได้ ผสมกับ NaCl ความเข้มข้น 0.5M จากนั้นบ่มที่ 4°C 60 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 4 °C นาน 10 นาที แล้วจึงเติม 10% PEG-8000 ทำการเขย่าด้วยมือเบาๆ แล้วบ่มที่ 4 °C นาน 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นชั้นฟิล์มเกิดขึ้นให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 4 °C นาน 10 นาที จะเห็นตะกอนนอนก้นอยู่ จากนั้นเทสารละลายออกแล้วเติม TM buffer ในอัตราส่วน บัฟเฟอร์ต่อปริมาณตัวอย่าง phage เท่ากับ 1:1 แล้วบ่มที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 4 °C นาน 10 นาที จากนั้นเติม 99.9% CsCl ในตัวอย่าง phage ให้มีความเข้มข้นที่ 1.35 g ml^{-1} แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 55,000 rpm 4 °C นาน 4.5 ชั่วโมง

สังเกตชั้นที่เกิดขึ้น จากนั้นแยกเอาเฉพาะแถบที่แยกชั้นออกมา เพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ ตามวิธีการข้างต้น (วิธีการ 2.3.)

3.4.2. การเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ

การทำบริสุทธิ์และการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ โดยประยุกต์จากวิธีของ Banilla et al. (2016) โดยนำเชื้อ *S. typhimurium* ATCC 13311 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 10 mM MgSO₄ TSB และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นเชื้อ 10⁸ CFU/ml (OD_{600nm} = 0.1) ที่ไว้ ที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 30 นาที ใน 250 ml 10 mM MgSO₄ TSB แล้วเติมแบคทีเรียโอฟาจ (ความเข้มข้น >10⁸ PFU/ml) ที่ทำบริสุทธิ์แล้วลงไป 2,500 µl บ่มต่อในสถานะเดิมข้ามคืนจนอาหารเหลวเริ่มใส และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนอาหารเหลวใสทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 ×g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 µm เก็บส่วนที่กรองได้ ผสมกับ 0.1%v/v Chloroform และตั้งที่ไว้ที่ อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 4,000 ×g อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที แล้วถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

จากนั้นนำแบคทีเรียโอฟาจ 50 ml ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 µm ในหลอด concentrator centrifuge tubes 10k cut-off (Corning, US) จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,500 rpm นาน 30 นาที แล้วล้างส่วนที่ข้างอยู่เหนือตัวกรองด้วย 15 ml, SM buffer (ส่วนใสที่ได้จะมีปริมาณน้อยกว่า 10 ml) และนำไปปั่นเหวี่ยงต่อในสถานะเดิม (ส่วนใสที่ได้จะมีปริมาณน้อยกว่า 10 ml) จากนั้นเติม SM Buffer ลงไปใหม่ในปริมาณเดียวกัน ทำเช่นเดียวกันนี้ 3 ครั้ง จึงเก็บส่วนใสที่อยู่เหนือตัวกรองและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3.4.3. การวิเคราะห์ขนาดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ ด้วย PFGE

3.4.3.1. การเตรียม Agarose Gel

เตรียม 1% (W/V) ultra-pure PFGE agarose (Bio-rad) ใน 1X TAE buffer โดยละลายเจลด้วยไมโครเวฟ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 °C จากนั้นถ่ายลง mold ที่มีหัวสับและรองจนเจลแข็ง แล้วนำ plugs ที่เตรียมไว้ลงไป โดยใช้ Lambda PFG Ladder ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 48.5-727.5 kb เป็น marker และนำ plugs ที่เตรียมไว้ในวิธีการที่ 2.2 ใส่ลงไปแล้วปิดทับด้วย 1% (W/V) ultra-pure PFGE agarose ที่เหลือ

3.4.3.2. การเตรียม plugs

นำแบคทีเรียโอฟาจที่มีความเข้มข้นอยู่ที่ ~10⁸ PFU/ml ปริมาณ 50 ml ถ่ายลงไปใน desalt-filter centrifuge tube และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6500 rpm, 4°C นาน 50 นาที จากนั้นเติม SM buffer ลงไปและปั่นที่ความเร็วรอบเดียวกันเป็นเวลา 15 นาที 3 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ และเก็บแบคทีเรียโอฟาจโดยการเติม 10 ml SM buffer นำมาผสมกับ 2.5% (W/V) ultra-pure PFGE agarose (Bio-rad) ใน 1X TAE buffer ที่

อุณหภูมิ 55 °C จากนั้นถ่ายลง mold และรอจน plugs แข็ง แล้วนำมาย่อยด้วย cell lysis buffer ที่เตรียมสด (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 50mM EDTA, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, 0.1 mg/ml proteinase K) แล้วบ่ม ที่ 55°C นาน 60 นาที และล้างด้วย DI water 3 ครั้งก่อนจะถ่ายลงไปใน TE buffer และเก็บไว้ที่ 4°C

3.4.3.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis

นำเจลที่เตรียมไว้ลงไปลงในเครื่อง Electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer, 14°C โดยปรับให้มี initial switch time อยู่ที่ 6.8 s และ final switch time อยู่ที่ 38.4 s (gradient = 6 V/cm และ angle = 120°) และเดินเครื่องจนครบเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 1X red safe (Invitrogen, USA) และบ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงล้างด้วย DI water ก่อนนำไปดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง

3.5. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของฟาจที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Transmission Electron Microscopy (TEM)

เพื่อศึกษารูปร่างและขนาดของแบคทีเรียฟาจ นำตัวอย่างแบคทีเรียฟาจความเข้มข้นประมาณ 10^8 PFU/ml มาย้อมด้วยวิธี Negative staining ตามวิธีของ Atterbury et al. (2007) และ Hoonton et al. (2011) โดยหยดตัวอย่างแบคทีเรียฟาจลงแผ่นพาราฟิล์ม 10 μ l จากนั้นวาง 200 mesh copper grid ลงบนหยดแบคทีเรียฟาจแล้วรอ 1 นาที แล้วใช้กระดาษกรองเช็ดของเหลวส่วนเกินออก จากนั้นหยด 2% Uranyl acetate (EMS, Hatfield, PA, USA) ลงแผ่นพาราฟิล์ม 10 μ l จากนั้นรอ 5 นาที แล้วใช้กระดาษกรองเช็ดของเหลวส่วนเกินออกอีกครั้ง รอให้ grid แห้งนาน 5-12 ชั่วโมง จากนั้นอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope (TEM) ที่ 200 kV (FEI Tecnai G2 20 TWIN-EDS, Nederland)

3.6. การศึกษาการยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์ *S. Typhimurium* และ one-step growth curve

นำฟาจที่คัดแยกได้มาศึกษาการยึดเกาะกับเซลล์ของเชื้อ *S. typhimurium* โดยเตรียมเชื้อที่เจริญในช่วง mid-log phase เติมสารละลายฟาจที่ MOI เท่ากับ 1 บ่มที่ 37 °C เขย่า 120 rpm และทำการสุ่มที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที เพื่อมาตรวจวัดการยึดเกาะบนเซลล์โฮสต์ นำตัวอย่างที่สุ่มแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปนับปริมาณแบคทีเรียโดยทำการเจือจางด้วย Phosphate buffer (pH 7.5) แล้วทำการหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PCA จากนั้นบ่มที่ 37 °C 18-24 ชั่วโมง แล้วรายงานผลเป็น CFU/ml ส่วนที่ 2 ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เวลา 3 นาที ที่ 4 °C (Wong et al. 2014) แล้วนำส่วนใสมาทำการนับจำนวนฟาจที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น (วิธีการ 2.3.) และคำนวณอัตราการยึดเกาะ (Adsorption constant) ตามสมการที่ 1 (Siringan et al. 2014)

$$k = -\ln (P_t/P_0)/N \cdot t \text{ ---สมการที่ 1}$$

สำหรับการศึกษา one-step growth curve นั้นเตรียมเชื้อที่เจริญในช่วง mid-log phase เติบโตแบบคเทอร์ิโอฟาจที่ MOI เท่ากับ 100 บ่มที่ 37 °C เขย่า 120 rpm แล้วทำการสุ่มที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 นาที เพื่อทำการนับจำนวนแบคเทอร์ิโอฟาจที่เกิดขึ้นตามวิธีการข้างต้น (วิธีการ 2.3.) โดยแต่ละช่วงเวลานั้นแบ่งการนับออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกให้ทำการเจือจางด้วย MRD buffer และส่วนที่ 2 เจือจางด้วย MRD buffer ที่มี 1% chloroform อยู่ แล้วเขียนกราฟจำนวนแบคเทอร์ิโอฟาจกับเวลา เพื่อหาค่า Latent period, Eclipse period, Rise period และ ค่าเฉลี่ยจำนวนอนุภาค burst size ตามสมการที่ 2 (Wong et al., 2014)

Burst size (PFU/cell) = P_f / P_i — สมการที่ 2

3.7. การศึกษาความจำเพาะและการประสิทธิภาพของแบคเทอร์ิโอฟาจ

นำแบคเทอร์ิโอฟาจที่คัดแยกได้มาศึกษาความจำเพาะของแบคเทอร์ิโอฟาจต่อแบคทีเรียโฮสต์เซลล์สายพันธุ์อื่นตามตารางที่ 1 โดยเตรียมโลว์นของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ที่ผ่านการทดสอบ Pro-phage แล้วทำการปิเปตแบคเทอร์ิโอฟาจความเข้มข้น 10^5 PFU/ml ที่คัดแยกได้ลงบนโลว์น บ่มที่ 37 °C 18-20 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการสร้างพลาคนโฮสต์แต่ละสายพันธุ์ โดยดูลักษณะการไลซิสเซลล์ ตามวิธีของ Hoonton et al. (2011) เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ถูกย่อยด้วยแบคเทอร์ิโอฟาจชนิดนั้นๆ แล้วผสมกับ 0.6% TSB Agar จากนั้นทำการนับจำนวนแบคเทอร์ิโอฟาจที่ย่อยได้ตามวิธีการข้างต้น (วิธีการ 2.3.) โดยคำนวณ %EOP จากสมการที่ 3

$\%EOP = (P_{IB} / P_{PB})_{\text{ณ ความเข้มข้นเริ่มต้นเดียวกัน}} \times 100$ — สมการที่ 3

3.8. ผลของฟาจไลติกต่อจำนวนของเชื้อ *S.Typhimurium* ในเนื้อสัตว์

การเตรียมตัวอย่างเนื้อ ทำการตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อประเภทต่างๆ ให้มีขนาด ขนาด 2x2 cm หนา 2 mm นำไปฆ่าเชื้อด้วยแสงยูวีเป็นระยะเวลา 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที ทำการตรวจจำนวนเชื้อด้วยใช้เทคนิคการ swab test โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง วัดความขุ่นของอาหารเทียบกับตัวอย่างอาหารที่ไม่มีเชื้อ พบว่าที่เวลา 45 นาทีไม่พบการเจริญของเชื้อ ดังนั้นจึงกำหนดเวลาฆ่าเชื้อบนชิ้นเนื้อไว้ด้วยรังสียูวี เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติมเชื้อ *Salmonella* ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^6 CFU/ml ปริมาตร 100 μ l ลงบนชิ้นเนื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว แล้วบ่ม 30 นาที ที่ 4 °C และทำการเติมฟาจที่คัดเลือกได้ให้มีค่า MOI=1 ทำการสุ่มตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียและจำนวนแบคเทอร์ิโอฟาจ ทุก 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง

3.9. การศึกษาความคงทนต่อสภาวะต่างๆของแบคทีเรียโอฟาจ

นำแบคทีเรียโอฟาจที่ผ่านการคัดเลือก มาทดสอบผลของความเป็นกรด-ด่าง (กำหนดช่วง pH 3-11), ผลของอุณหภูมิ 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 และ 75°C และผลของความเข้มข้นเกลือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25% ต่อความคงทนของฟาจ โดยใช้แบคทีเรียโอฟาจความเข้มข้น 10^5 PFU/ml จากนั้นสุ่มตัวอย่างออกมานับจำนวนแบคทีเรียโอฟาจทุก 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ตามวิธีการข้างต้น (วิธีการ 2.3.)

3.10 การศึกษาผลของฟาจไลติกต่อการอยู่รอดของเชื้อ *S. Typhimurium* ใน biofilm

การเตรียม biofilm เตรียมเชื้อ *S. Typhimurium* นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB with 10mM $MgSO_4$ แล้วบ่มในตู้บ่มที่ 37°C และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm. นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ($OD_{600nm} = 0.1$) แล้วเติมลงไป Microtiter plates 96 well และบ่มที่ 37°C นาน 5 วัน จนสังเกตเห็นการแบ่งชั้นของเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงถ่ายอาหารออกแล้วล้างด้วย pH 7.2, Phosphates Buffer 3 ครั้ง ปริมาณ 200 μ l และสุ่มตัวอย่าง biofilm ออกมานับปริมาณเชื้อเริ่มต้นตามวิธี drop plate โดยกำหนดให้ หลุมที่เติม SM buffer เป็น negative control และ หลุมที่เติมอาหารเหลว TSB เป็น positive control

การวัด biofilm ประยุกต์มาจากวิธีการของ Veloso et al. (2018) โดยหลังจาก biofilm ที่บ่มไว้ครบตามเวลา นำอาหาร TSB ออก จากนั้นล้างด้วย 250 μ l, Phosphates Buffer 3 ครั้ง ตามด้วยเติม 0.1% Crystal violet และตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น satirized ในปริมาณเดียวกัน รอจนแห้ง~1ชั่วโมง จากนั้นเติม 20:80 acetone: ethanol แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ $OD = 595$ nm

การศึกษามูลของแบคทีเรียโอฟาจต่อการอยู่รอดของเชื้อ *S. Typhimurium* ใน biofilm โดยนำตัวอย่างที่คัดแยกได้มาเจือจางด้วยใน SM buffer ให้มีค่าความเข้มข้นฟาจ ประมาณ 10^4 PFU/ml, 10^5 PFU/ml, 10^6 PFU/ml และ 10^7 PFU/ml และ 10^8 PFU/ml ทำให้ค่า MOI แตกต่างกัน จากนั้นเติมแบคทีเรียโอฟาจที่เจือจางแล้วลงไปบน biofilm ที่เตรียมไว้ปริมาณ 200 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยสุ่มตัวอย่าง ทุกๆ 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการแยกอาหารออก และเติมสารละลาย SM buffer ทำการละลาย biofilm ด้วยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้ biofilm หลุดออก แยกตัวอย่างสำหรับตรวจนับจำนวนเชื้อและนับจำนวนฟาจ ด้วยวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียโอฟาจที่กล่าวในข้อ 1.3.1 โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 rpm, 4°C นาน 10 นาที และทำการกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 μ m และทำการเจือจางและนับจำนวนฟาจ สำหรับการนับจำนวนแบคทีเรียใน biofilm ด้วยวิธีที่กล่าวในข้อ 1.3.2. โดยนำตัวอย่างที่ละลายไปโอฟิล์ม มาทำการเจือจาง และทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ด้วยวิธี drop plate บนอาหารแข็ง NA

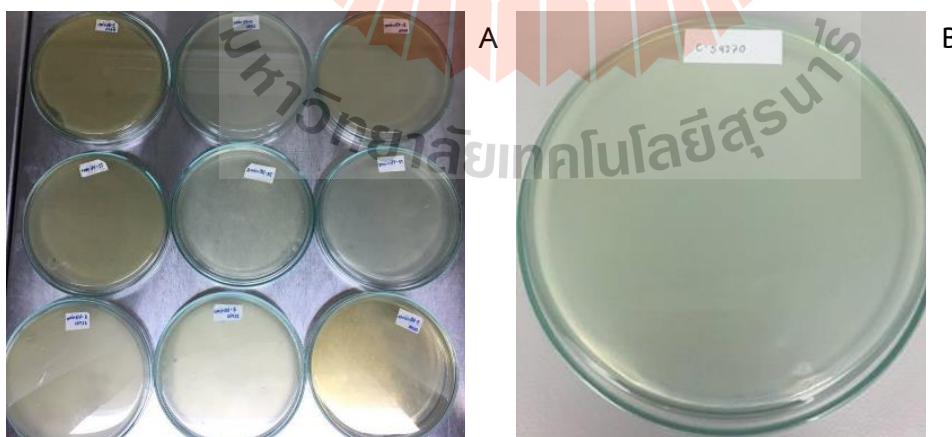
บทที่ 4

ผลการวิจัย

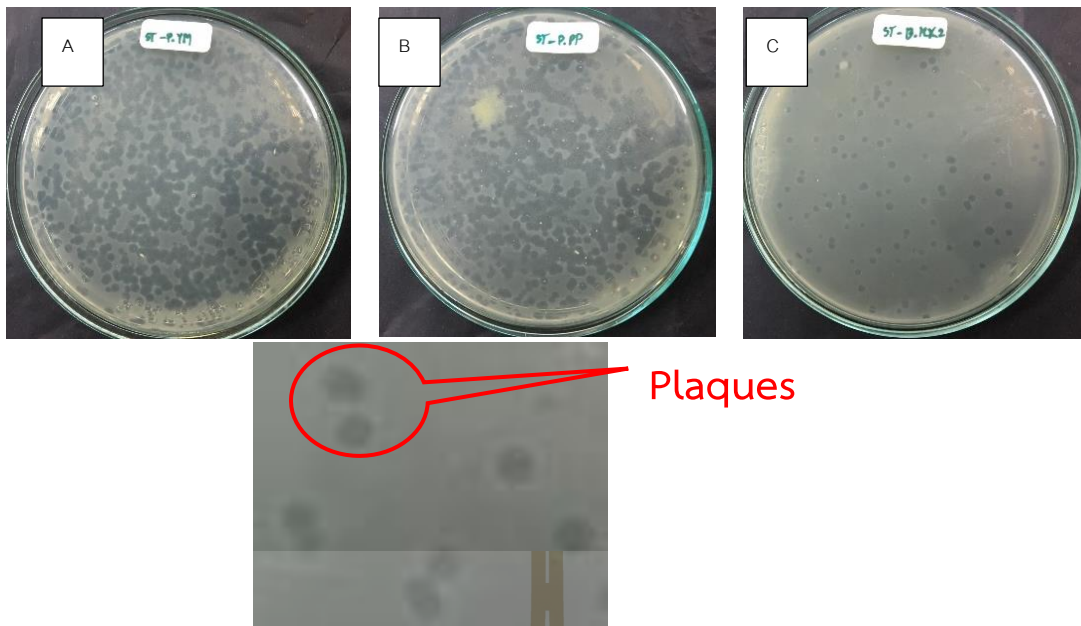
4.1. การคัดแยกและการนับจำนวนฟาจในตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีก

จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีกจากแหล่งที่มาต่างๆภายในตลาดและห้างสรรพสินค้าภายในจังหวัดนครราชสีมา รวม 15 แหล่ง ทำการตรวจสอบ *E.coli* และ coliform และการตรวจสอบ *Salmonella spp.* พบว่า จากตัวอย่างทั้ง 15 แหล่ง แสดงในตารางที่ 1 เนื้อหมูและเนื้อไก่ทุกแหล่งมีการตรวจพบ coliform ในช่วง 3.6 ถึง >1,100 MPN/g และส่วนในตัวอย่างเนื้อวัวพบเพียง 2 แหล่ง จากห้างสรรพสินค้า A (460 MPN/g) และห้างสรรพสินค้า D1 (3.6 MPN/g) เมื่อทำการยืนยันขั้นสมบูรณ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง EMB ปรากฏลักษณะโคโลนิสีเขียวคล้ายโลหะตะกั่ว (metallic sheen) พบในตัวอย่างเนื้อหมู และเนื้อวัว แสดงว่ามีปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* แต่ไม่พบในเนื้อไก่ ผลการตรวจ *Salmonella spp.* พบว่าไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในทุกตัวอย่างเนื้อ ทั้ง 15 แหล่ง แต่อย่างไรก็ตามการคัดแยกฟาจของเชื้อ *Salmonella* ยังสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อทางชีวภาพป้องกันการปนเปื้อนข้ามจากแหล่งอื่นๆ

ทำการคัดแยกฟาจจากตัวอย่างเนื้อ โดยใช้เชื้อ *S.Typhimurium* ATCC 13311 ที่ผ่านการทดสอบ pro-phage ด้วยการกระตุ้นด้วยรังสียูวีซี และ สาร Mitomycin C ความเข้มข้น 0.2 µg/ml (รูปที่ 2) เพื่อนำมาใช้เป็นโฮสต์ในการคัดแยกฟาจไลติกของเชื้อ *Salmonella* พบว่าไม่พบ Plaque เกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อไม่มีโปรฟาจ และจากการตรวจสอบข้อมูล whole genome จากฐานข้อมูล Gene bank ไม่พบ gene ของโปรฟาจในจีโนมเช่นเดียวกัน จึงถูกเลือกมาใช้เป็นโฮสต์ในการคัดแยกฟาจจากตัวอย่างเนื้อชนิดต่างๆ โดยทำการนับจำนวนฟาจในตัวอย่างเนื้อในแต่ละแหล่งแสดงในตารางที่ 2 ในตัวอย่างเนื้อหมูพบฟาจจำนวนมาก ประมาณ 5.6 – 13.9 Log₁₀ PFU/ml และในตัวอย่างเนื้อวัว พบประมาณ 4.2-9.2 Log₁₀ PFU/ml



รูปที่ 2 ลักษณะของเชื้อที่ภายหลังการทดสอบ Pro-phage โดยอยู่ภายใต้ UV นาน 0, 5 และ 10 นาที (A) ลักษณะของเชื้อที่มี 0.2 µg/ml Mitomycin C ผสมอยู่ (B) ก่อนนำเชื่อนั้นมาทำการทดลอง



รูปที่ 3 แสดงลักษณะ plaques ของ phage ที่ตรวจพบได้จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ขายในร้านค้าปลีกและห้างสรรพสินค้า A) *vB_solmoM-pYM* B)

มีการตรวจพบแบคทีริโอฟาจที่สามารถเพิ่มจำนวนและยับยั้งการเจริญของ *S.Typhimurium* ได้ ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ขายปลีก ตรวจพบฟาจจำนวนมากที่สุด โดยพบทั้ง 5 แหล่งที่นำมาทำการศึกษา แต่ทำการคัดเลือกฟาจที่แยกได้ จากตลาด 2 แหล่งที่พบฟาจจำนวนมาก คือ เนื้อหมูจาก ตลาด A และ B โดยทำการระบุชื่อฟาจในเนื้อหมูชื่อ *vB_solmoM-pSN* และ *vB_solmoM-pYM* ตามลำดับ โดยมีปริมาณฟาจความเข้มข้น 13.90 ± 0.13 และ 8.69 ± 0.18 log PFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกฟาจในตัวอย่างเนื้อวัว จากทั้งหมดที่ทำการตรวจพบฟาจ 4 แหล่งจากทั้งหมด 5 แหล่ง แต่เลือกคัดเลือกฟาจจาก 2 แหล่งที่มีการตรวจพบมากที่สุด มาจากห้างสรรพสินค้า A (*vB_solmoM-bTM*) และ D1 (*vB_solmoM-bKK1*) โดยมีปริมาณเท่ากับ 9.18 ± 0.14 และ 9.15 ± 0.03 log₁₀ PFU/ml ตามลำดับ

ตัวอย่างลักษณะ plaque ที่พบ แสดงในรูปที่ 3 มีลักษณะใส (complete lysis plaque) รูปร่างค่อนข้างกลมรีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.432 ± 0.14 cm. ทำการคัดแยกออกไว้จำนวน 10 พลาค์ หรือ 10 อนุภาค นำมาเพิ่มจำนวน และคัดเลือกพลาค์ (plaque) เดี่ยวๆ ที่ลักษณะเคลียร์ใส มาทำบริสุทธิ์โดยการทำให้เหมือนการนับจำนวนฟาจ โดยการทำให้ 3 ซ้ำ จนได้ลักษณะพลาค์ที่เหมือนกันทั้งจานเพาะเชื้อ ทำการคัดเลือกฟาจจำนวน 4 ไอโซเลตจากเนื้อหมูและเนื้อวัว ด้วยกำหนดชื่อดังนี้ *vB_solmoM-pSN*, *vB_solmoM-pYM*, *vB_solmoM-bKK1*, และ *vB_solmoM-bTM* นำมาเพิ่มจำนวน ให้มีความเข้มข้นมากกว่า 8.00 log₁₀ PFU/ml และทำให้บริสุทธิ์ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 ผลปริมาณฟาจที่ได้จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ขายปลีกจากแหล่งที่มาต่างๆโดยใช้เชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เป็นโฮสต์ และผลการตรวจเชื้อ Coliform/*E.coli* และ *Salmonella*

ประเภทเนื้อ	ตัวอย่าง		ปริมาณฟาจในตัวอย่าง (log ₁₀ PFU/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (cm.)	Coliform (MPN/g)	<i>E.coli</i> (MPN/g)	EMB agar*	RV broth	XLD agar**
	แหล่งที่มา	รหัส							
เนื้อหมู	ตลาด A	vB_solmoM-pSN	13.90±0.13	0.466±0.042	15	43	+	+	-
	ตลาด B	vB_solmoM-pYM	8.69±0.18	0.544±0.055	460	460	+	+	-
	ตลาด C	vB_solmoM-pKP	6.89±0.03	0.460±0.021	240	43	+	+	-
	ตลาด D	vB_solmoM-pPP	7.36±0.07	0.454±0.013	43	43	+	+	-
	ตลาด E	vB_solmoM-pMK	5.63±0.12	0.499±0.027	>1100	>1100	+	+	-
เนื้อวัว	ห้างสรรพสินค้า A	vB_solmoM-bTM	9.18±0.14	0.499±0.027	460	460	+	+	-
	ห้างสรรพสินค้า B	vB_solmoM-bTF	8.34±0.06	0.424±0.042	-	-	-	+	-
	ห้างสรรพสินค้า C	-	-	-	-	-	-	+	-
	ห้างสรรพสินค้า D1	vB_solmoM-bKK1	9.15±0.03	0.405±0.042	3.6	3.6	+	+	-
	ห้างสรรพสินค้า D2	vB_solmoM-bKK2	4.21±0.01	0.406±0.037	-	-	-	+	-
เนื้อไก่	ห้างสรรพสินค้า A	-	-	-	460	0	-	+	-
	ห้างสรรพสินค้า B	-	-	-	460	0	-	+	-
	ห้างสรรพสินค้า C	-	-	-	43	0	-	+	-
	ห้างสรรพสินค้า D1	-	-	-	240	0	-	+	-
	ห้างสรรพสินค้า D2	-	-	-	240	0	-	+	-

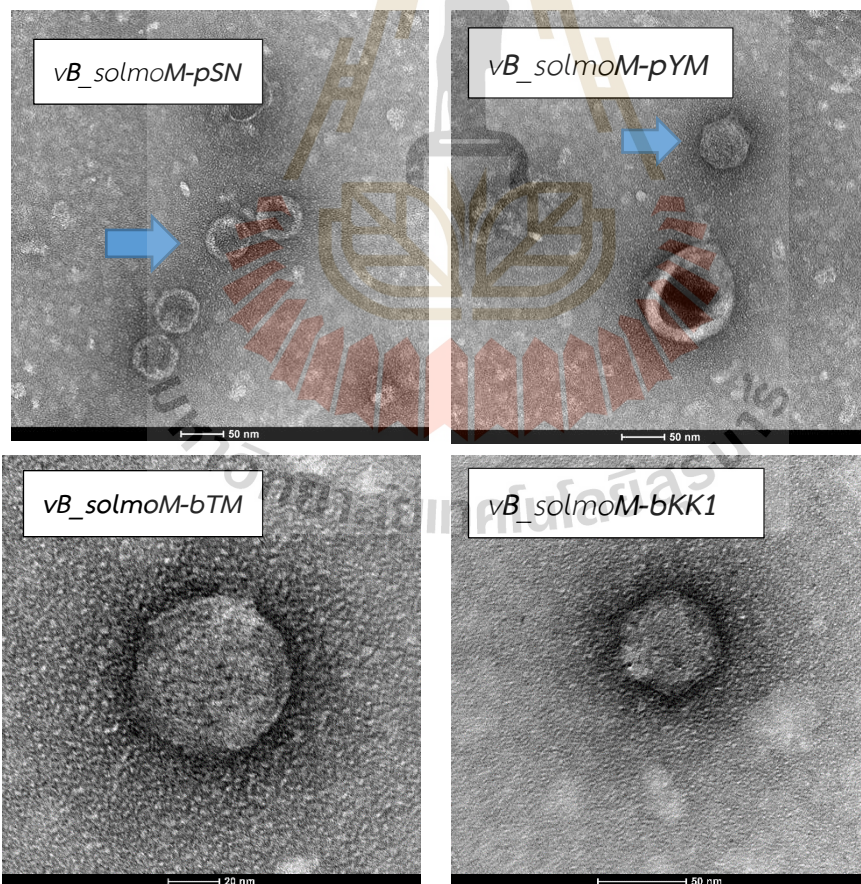
Note. *: ลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *E.coli* บน EMB Agar (+; แสดงลักษณะคล้าย *E.coli*, -; ไม่แสดงลักษณะใดๆหรือลักษณะที่ปรากฏไม่คล้ายกับ *E.coli*)

** : ลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Salmonella* บน EMB Agar (+; แสดงลักษณะคล้าย *Salmonella*, -; ไม่แสดงลักษณะใดๆหรือลักษณะที่ปรากฏไม่คล้ายกับ *Salmonella*)

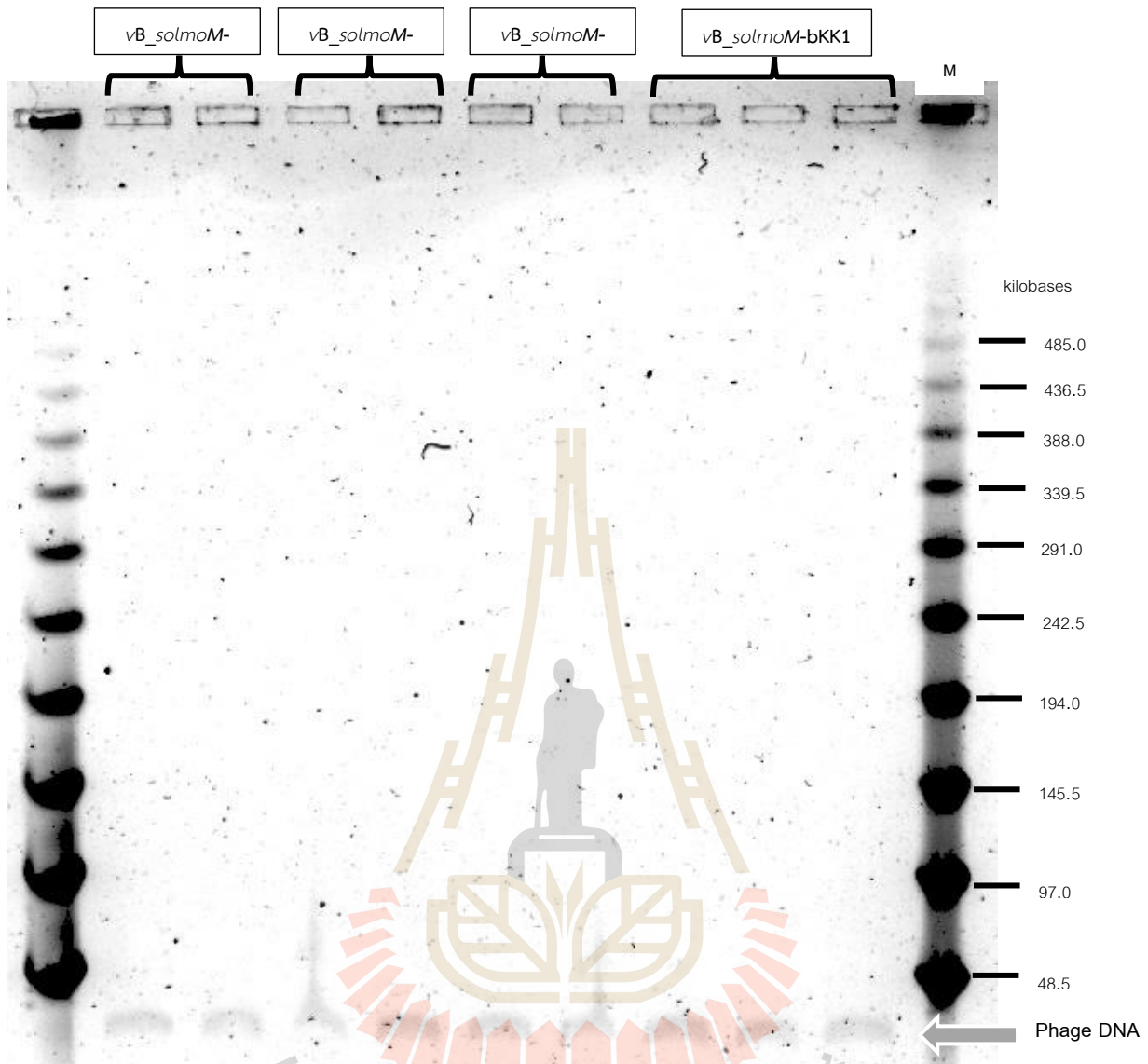
4.2. คุณลักษณะของแบคทีริโอเฟจ

4.2.1. ลักษณะสัณฐานวิทยาและขนาดสารพันธุกรรม DNA ของแบคทีริโอเฟจ

หลังจากทำบริสุทธิ์แบคทีริโอเฟจที่คัดเลือก คือ *vB_solmoM-pSN*, *vB_solmoM-pYM*, *vB_solmoM-bKK*, และ *vB_solmoM-bTM* นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบว่าแบคทีริโอเฟจที่คัดแยก จัดอยู่ในสกุล *Tectiviridae* ที่มีลักษณะรูปร่าง แบบ polyhedral shape ที่มีสารพันธุกรรมดีเอ็นเอสายคู่ (Double stranded DNA) มี Double capsid ขนาดประมาณ 63 nm และมีหางเทียม (pseudo-tail) ดังแสดงในรูป 4 ซึ่งมีรูปร่างคล้ายกัน เนื่องจากใช้โฮสต์ *S. Typhimurium* ตัวเดียวกัน จัดเป็น Enterobacteriophage phage และจากผลของ PFGE (รูปที่ 5) แสดงให้เห็นว่าขนาดสารพันธุกรรม DNA มีขนาดเท่ากัน ทั้ง 4 ไอโซเลต ขนาดน้อยกว่า 48.5 kb เนื่องจากแบนของ DNA อยู่ต่ำกว่า DNA maker ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ 48.5 kb ไม่สามารถคำนวณขนาดของ DNA ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ดังนั้นการประมาณขนาดของ DNA ขนาด 40 kb ซึ่งใกล้เคียง T7 (43-44 kb) แต่จากรายงานฟาจในสกุล *Tectiviridae* ที่มีการคัดแยกมีขนาด DNA ขนาด 15 kb (Ackermann, 2005) ซึ่งฟาจที่คัดแยกได้อาจจะเป็น novel phage



รูปที่ 4 แสดงรูปร่างฟาจ *vB_solmoM-pYM* มีรูปร่าง elongated head 50 nm long and width 50 nm และมี short tail จัดอยู่ในกลุ่ม *Podoviridae* family ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ที่กำลังขยาย 100,000x



รูปที่ 5: ผลแสดงขนาดโมเลกุลของสารพันธุกรรม (DNA) ของ Salmonella phage:

vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM, vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 ที่คัดแยกได้

4.2.2. one-step growth curve และ การยี้ดเกาะกับเซลล์โฮสต์ *S. Typhimurium*

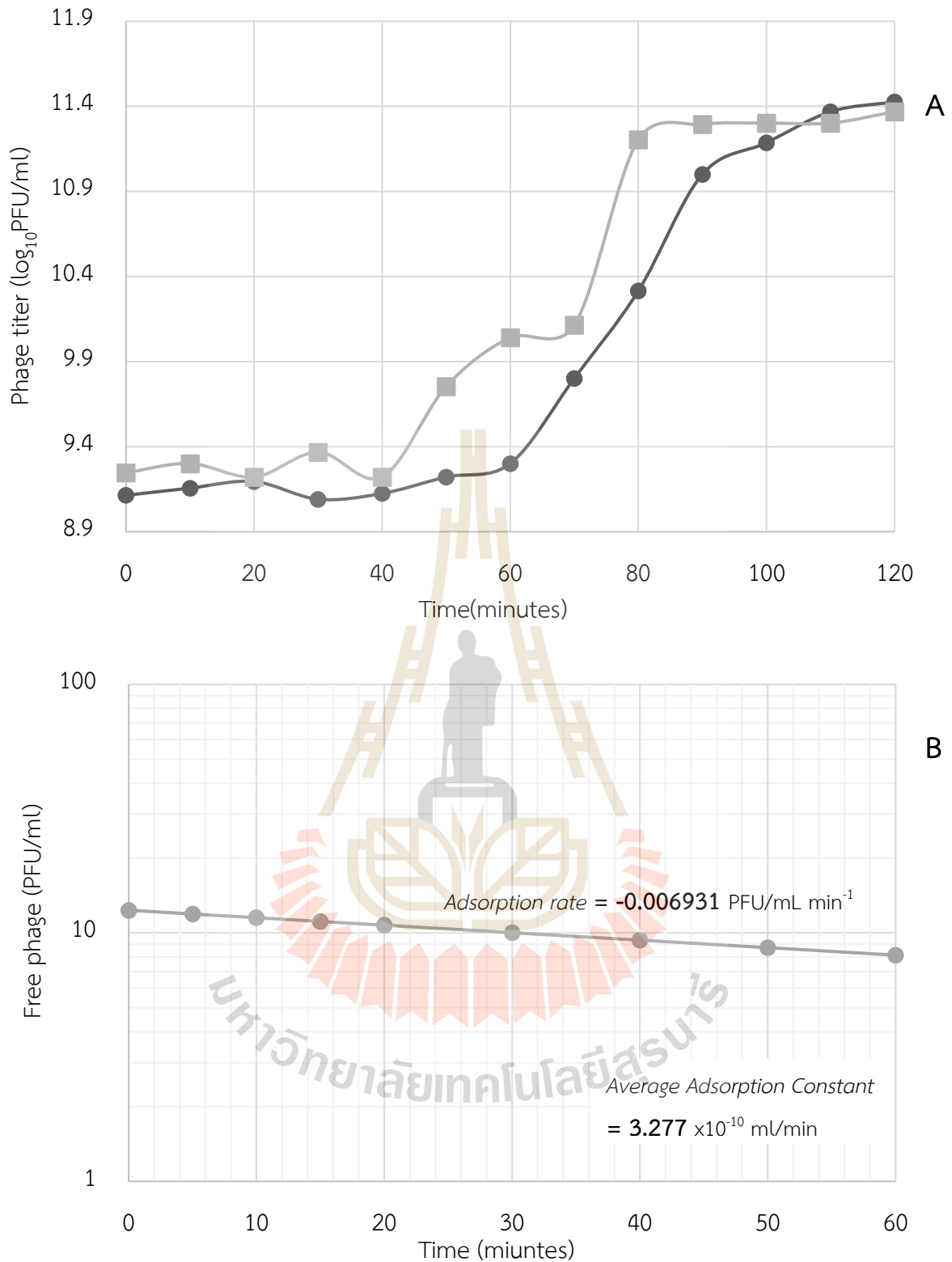
ลักษณะ one-step growth curve ของ vB_solmoM-pSN ฟาจ vB_solmoM-pYM, ฟาจ vB_solmoM-bTM และฟาจ vB_solmoM-bKK1 โดยทำการศึกษาที่ MOI เท่ากับ 100 จะเห็นได้ว่า ลักษณะกราฟเพิ่มจำนวนของอนุภาคฟาจของ vB_solmoM-pS มีการเพิ่มขึ้น (Rise periods) อยู่ 2 ช่วง คือ 1st Rise periods ที่ 20 นาที ก่อนจะคงที่และเข้าสู่ 2nd Rise periods ที่ 10 นาที เช่นเดียวกับกับฟาจ vB_solmoM-pYM, vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 ที่จะมีช่วง 1st Rise periods อยู่ที่นาทีที่ 20, 10 และ 10 ตามลำดับ และมี 2nd Rise periods อยู่ที่นาทีที่ 20, 30 และ 30 ตามลำดับ เว้นแต่ลักษณะการเกิด 2nd Rise periods ของ ฟาจ vB_solmoM-bTM (รูปที่ 7A) กราฟการเพิ่มจำนวนอนุภาคของฟาจ สามารถแบ่งเป็นช่วงได้ ดังนี้ eclipse, latent และ rise period (รูปที่ 6A, 7A, 8A และ 9A) ซึ่งกราฟแบ่งออกเป็น

จำนวนฟาจในตัวอย่างที่มีการเติม chloroform และไม่เติม chloroform ในตารางที่ 2 แสดงข้อมูลเวลาในแต่ละช่วง eclipse, latent และ rise period ตามลำดับ และค่า Burst size ของฟาจ พบว่า ฟาจที่คัดเลือกมีลักษณะแตกต่างกัน โดยฟาจ *vB_solmoM-pYM* มีค่า burst size สูงถึง 64 PFU/cell และรองมาคือฟาจ *vB_solmoM-pS* มีค่า burst size 50 PFU/cell. เนื่องจากค่า burst size คือปริมาณการเพิ่มขึ้นของฟาจต่อการติดเชื้อของแบคทีเรียโฮสต์ หาก burst size มีค่าสูงจึงสามารถบอกได้ว่า ชนิดนั้นมีความสามารถในการเติบโตที่รวดเร็วเมื่อพิจารณา latent periods ของตัวอย่างที่ไม่เติมและตัวอย่างที่เติม chloroform ลงไป จะเพิ่มจำนวนและเข้าสู่ช่วงคงที่ได้รวดเร็วกว่า เนื่องจากการเติม chloroform มีผลเข้าไปปลดปล่อยอนุภาคของแบคทีเรียฟาจออกจากเซลล์ ทำให้มีค่าจำนวนอนุภาคของฟาจสูงกว่า ไม่เติม chloroform (Hyman and Abedon, 2009)

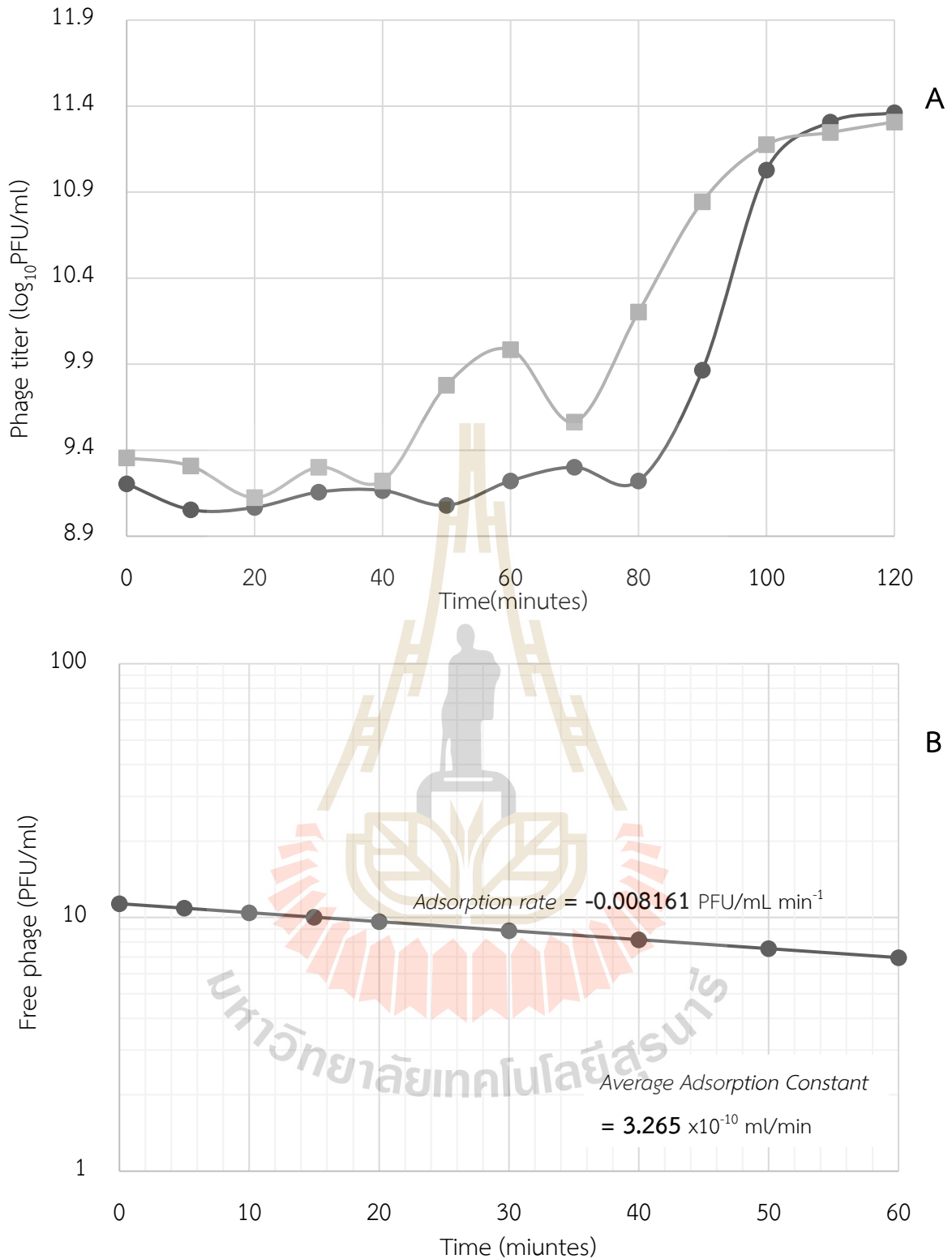
การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับโฮสต์ *S.Typhimurium* ทดลองที่ MOI 1 จากกราฟทำการวัดจำนวนอนุภาคฟาจอิสระกับเวลา ทำการคำนวณค่า absorption rate ของฟาจแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือก *vB_solmoM-pSN* ฟาจ *vB_solmoM-pYM*, ฟาจ *vB_solmoM-bTM* และฟาจ *vB_solmoM-bKK1* ดังแสดงในรูปที่ 6B, 7B, 8B และ 9B ตามลำดับ พบว่าค่า absorption rate มีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 6.931×10^{-3} ถึง $-8.161 \times 10^{-3} \text{ Phage}^{-1} \text{ Cell}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟาจสามารถยึดเกาะกับเซลล์ได้ไม่แตกต่างกันส่วนค่า average absorption constant (r) เป็นค่าใกล้เคียงกันในช่วง 3.265×10^{-10} - $3.322 \times 10^{-10} \text{ ml per min}$ แสดงถึงอัตราการคงที่ของฟาจในการยึดเกาะเซลล์

ตารางที่ 2 ข้อมูล Latent period, Eclipse period, Rise period และ burst size

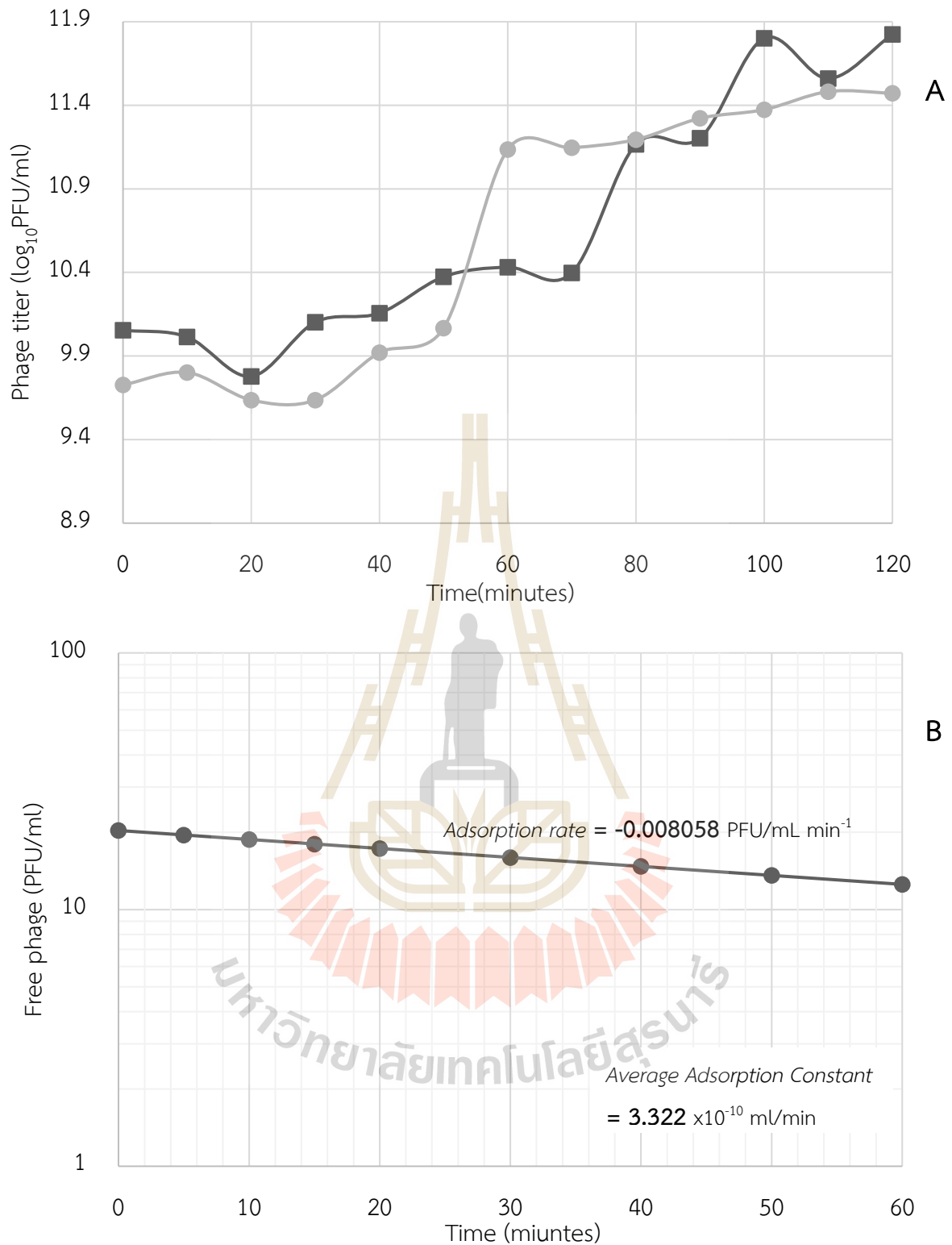
Phage	Eclipse period (minute)	Latent period (minute)	Rise period (minute)	Burst size (PFU/cell)
<i>vB_solmoM-pSN</i>	40	60	30	50.00
<i>vB_solmoM-pYM</i>	40	80	20	64.00
<i>vB_solmoM-bTM</i>	30	60	20	16.40
<i>vB_solmoM-bKK1</i>	40	50	60	21.00



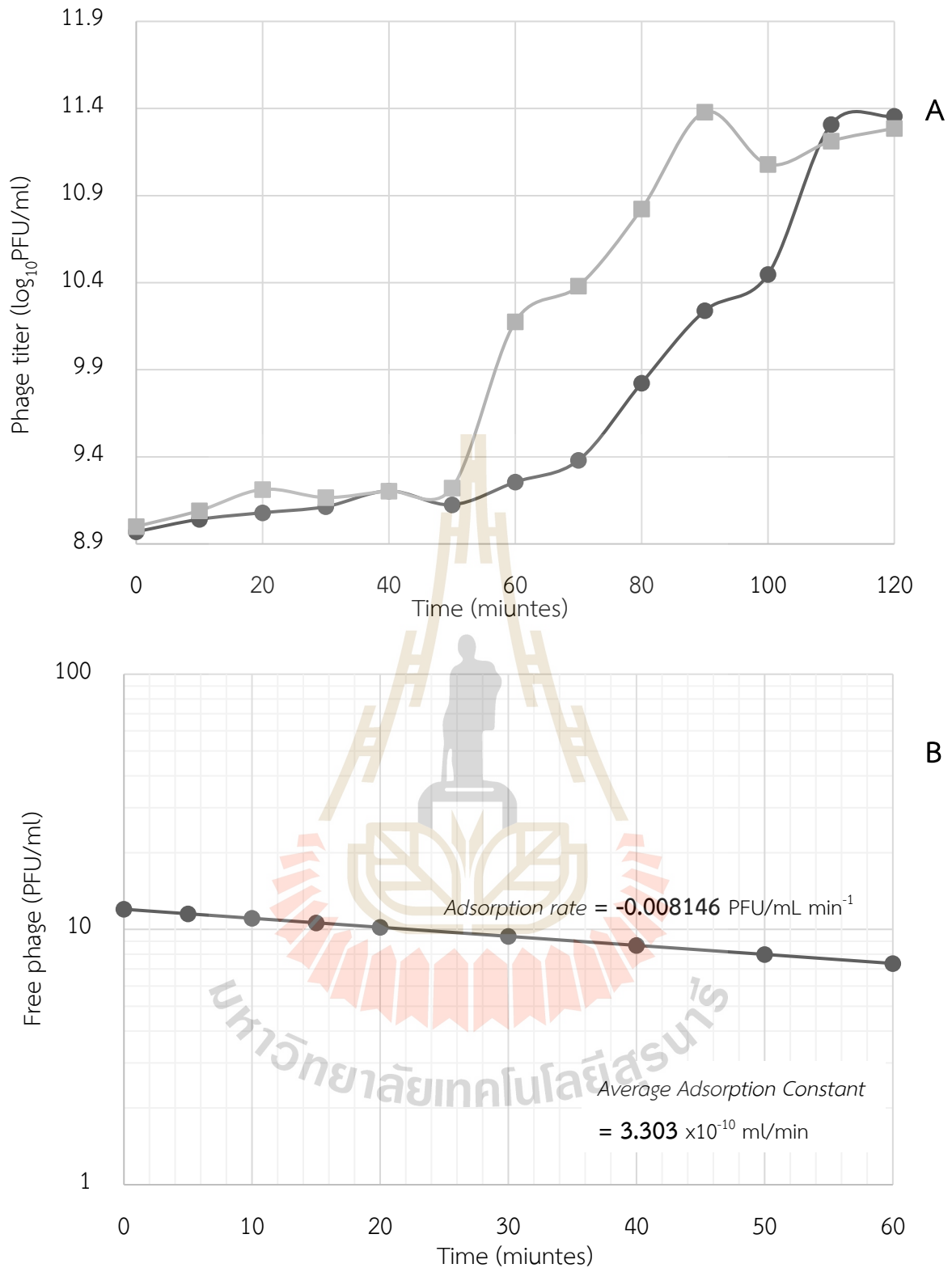
รูปที่ 6 one-step growth ที่ MOI = 100 (A) และ Phage Adsorption ที่ MOI=1 (B) ของฟาจ vB_solmoM-pSN โดยกำหนดให้ (วงกลม: เส้นทึบ = ฟาจที่ไม่มีการเติม 0.1% Chloroform, สีเหลี่ยม: เส้นปะ = ฟาจที่มีการเติม 0.1% Chloroform)



รูปที่ 7 one-step growth ที่ MOI = 100 (A) และ Phage Adsorption ที่ MOI=1 (B) ของฟาจ vB_solmoM-pYM โดยกำหนดให้ (วงกลม: เส้นทึบ = ฟาจที่ไม่มีการเติม 0.1% Chloroform, สีเหลี่ยม: เส้นปะ = ฟาจที่มีการเติม 0.1% Chloroform)



รูปที่ 8 one-step growth ที่ MOI =100 (A) และ Phage Adsorption ที่ MOI=1 (B) ของฟาจ vB_solmoM-bTM โดยกำหนดให้ (วงกลม: เส้นทึบ = ฟาจที่ไม่มีการเติม 0.1% Chloroform, สีเหลี่ยม:เส้นปะ = ฟาจที่มีการเติม 0.1% Chloroform)



รูปที่ 9 one-step growth ที่ MOI = 100 (A) และ Phage Adsorption ที่ MOI = 1 (B) ของฟาจ vB_{solmoM-bKK1} โดยกำหนดให้ (วงกลม: เส้นทึบ = ฟาจที่ไม่มีการเติม 0.1% Chloroform, สีเหลี่ยม: เส้นปะ = ฟาจที่มีการเติม 0.1% Chloroform)

4.2.3. ความจำเพาะและประสิทธิภาพของฟาจ

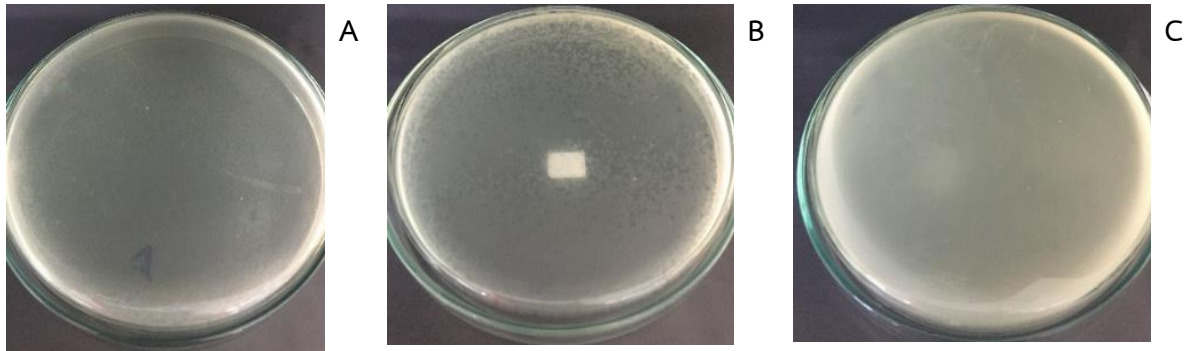
ความจำเพาะของฟาจที่คัดแยกได้จากการใช้เชื้อ *S.Typhimurium* ATCC 13311 เป็น โฮสต์เซลล์ในการคัดเลือก พบว่าฟาจสามารถไลซิสเชื้อได้สมบูรณ์ (complete lysis) ทำการทดสอบความสามารถของฟาจที่คัดเลือกได้ต่อการไลซิสเชื้อในกลุ่มของ *Salmonella* spp. และ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความจำเพาะของฟาจ (Specific host range)

Phage	Bacteria									
	<i>E.coli</i> ATCC 11775	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> ATCC 43888	<i>E.coli</i> NCTC 10538	<i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 (Produced Host)	<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>S.Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S.Newport</i> ATCC 6962	<i>S.Anatum</i> ATCC 9270
vB_solmoM-pSN	√	T	T	√		×	T	√	√	T
vB_solmoM-pYM	√	T	×	T		√	T	×	√	T
vB_solmoM-bTM	T	T	×	T		×	×	×	√	T
vB_solmoM-bKK1	√	T	×	T		×	×	×	T	T

กำหนดให้; T = Turbidity, √ = Completed lysis และ × = non-lysis

ฟาจที่แยกได้สามารถยับยั้งสายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากสายพันธุ์ต้นกำเนิดได้ ดังปรากฏตามตารางที่ 4 ที่แสดงถึงความหลากหลายของความสามารถในการยับยั้ง multivalent host infection ของฟาจ vB_solmoM-pSN ซึ่งสามารถยับยั้งแบบ complete lysis บนเชื้อ *E. coli* ATCC11775, *E. coli* NCTC10538, *S. Enteritidis* ATCC13076, *S. Newport* ATCC6962 ขณะที่ฟาจ vB_solmoM-pYM สามารถยับยั้งเชื้อแบบ complete lysis ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC11775, *S. typhimurium* ATCC14028, *S. Newport* ATCC6962 ส่วนฟาจ vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 สามารถยับยั้งเชื้อได้สมบูรณ์เพียง 1 ชนิด คือ *S. Newport* ATCC6962 และ *E. coli* ATCC1175 ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่าฟาจที่คัดเลือกสามารถควบคุมเชื้อได้ทั้งเชื้อ *Salmonella* และ *E. coli* ได้



รูปที่ 10 แสดงความสามารถฟาจ vB_solmoM-pYM ในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 (A), *S. Anatum* ATCC 9270 (B) และ *E. coli* ATCC 43888 (C)

โดยความสามารถในการยับยั้งต่อแบคทีเรียต่างชนิดแสดงลักษณะไลซิส (lysis) ที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 10 แสดงความสามารถฟาจ vB_solmoM-pYM ในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Anatum* ATCC 9270 และ *E. coli* ATCC 43888 รูปแสดงลักษณะ plaques ของ phage ในการทดสอบ phage host range โดย phage สามารถยับยั้งได้ทั้งหมด (complete lysis) รูปที่ 10A, สามารถยับยั้งได้บางส่วน (partial lysis) รูปที่ 10B และ phage ไม่สามารถยับยั้งได้ (no lysis) รูปที่ 10C

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฟาจที่คัดเลือกในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ (Efficiency of plating, EOP) ประสิทธิภาพการเกิดพลาคของฟาจบนเชื้อ *Salmonella* และ *E. coli* แสดงเป็น %EOP คำนวณจากจำนวนฟาจ (Phage Titer) บนเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่โฮสต์เทียบกับจำนวนฟาจบน *S. Typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งเป็นโฮสต์ในการผลิตอนุภาคฟาจ โดยใช้ฟาจเริ่มต้นที่ความเข้มข้น ($\sim 10^8$ PFU/ml) โดย %EOP แสดงในตารางที่ 4 สูงสุดคือ ฟาจ vB_solmoM-pSN สามารถ Lysis ทั้ง *Salmonella* และ *E. coli* โดยมี %EOP 42- 50% ทุกสายพันธุ์ของ *Salmonella* sp. ยกเว้น *S. Typhimurium* ATCC 14028 และ *S. Choleraesuis* ATCC 10708 ที่ไม่เกิดการ lysis และ *E. coli* มี %EOP 40-52% เกิดพลาคทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ ตามมาด้วยฟาจ vB_solmoM-pYM มี %EOP 40-60% บน *Salmonella* โดยสามารถไลซิสได้น้อยเพียง 14% บน *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และไม่สามารถไลซิส *S. Enteritidis* ATCC 13076 ขณะที่บน *E. coli* จะมี %EOP สูง 60% บน *E. coli* ATCC 11775 และ 32% EOP บน *E. coli* ATCC 25922 เท่านั้น ในขณะที่ฟาจ vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 สามารถไลซิส *Salmonella* และ *E. coli* สายพันธุ์เดียวกัน และไม่เกิดไลซิสในสายพันธุ์เดียวกัน (ตารางที่ 4) และลักษณะพลาคเปรียบเทียบฟาจ vB_solmoM-pSN บนเชื้อ *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และ *S. Newport* ATCC 6962 ในรูปที่ 11 พบว่า ลักษณะพลาคที่ได้แตกต่างกัน บนเชื้อ *S. Choleraesuis* มีลักษณะแบบขุ่นไม่ใส (turbid lysis) ในขณะที่เดียวกันบน *S. Newport* มีลักษณะพลาคใส (complete lysis) ที่ชัดเจนมากกว่า เช่นเดียวกันกับ ฟาจ vB_solmoM-pYM ดังนั้นแสดงว่าฟาจทั้งสองมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *S. Newport* ATCC 6962 ได้ดีกว่า *S. Choleraesuis* ATCC 10708 เนื่องจากตัวเชื้อมียีนส์ของ intact-prophage (Yao et al., 2016) จึงสามารถทนต่อ phage superinfection ได้ทำให้เกิดลักษณะพลาคดังกล่าว

ตารางที่ 4 ค่า %EOP ของฟาจที่คัดเลือกแล้วกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาความจำเพาะของฟาจ

Indicator Hosts	%EOP			
	vB_solmoM-pSN	vB_solmoM-pYM	vB_solmoM-bTM	vB_solmoM-b.KK1
<i>E. coli</i> ATCC 43888*	39.86	x	x	x
<i>E. coli</i> NCTC 10538	50.15	x	47.55	42.52
<i>E. coli</i> ATCC 25922	39.52	32.40	43.33	43.62
<i>E. coli</i> ATCC 11775	51.56	59.93	44.04	65.27
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	x	59.28	x	x
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	x	14.04	x	x
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	100.00	100.00	100.00	100.00
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	47.50	x	x	x
<i>S. Newport</i> ATCC 6962	58.89	59.62	46.52	32.39
<i>S. Anatum</i> ATCC 9270	42.26	39.41	15.99	44.23

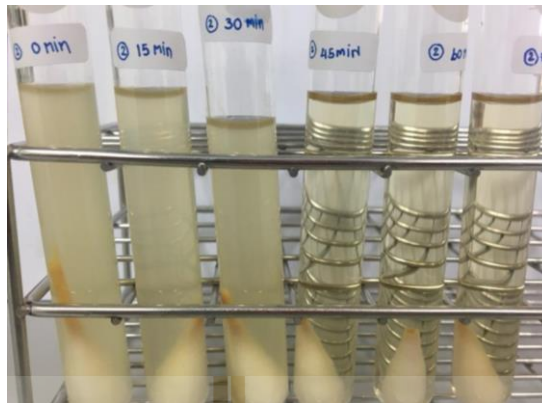


รูปที่ 11 แสดงลักษณะ plaque ของฟาจแต่ละชนิด ในการนับจำนวนอนุภาคฟาจ (phage titer)

4.2.4 ผลของฟาจต่อจำนวนของเชื้อ *S. Typhimurium* ในเนื้อสัตว์

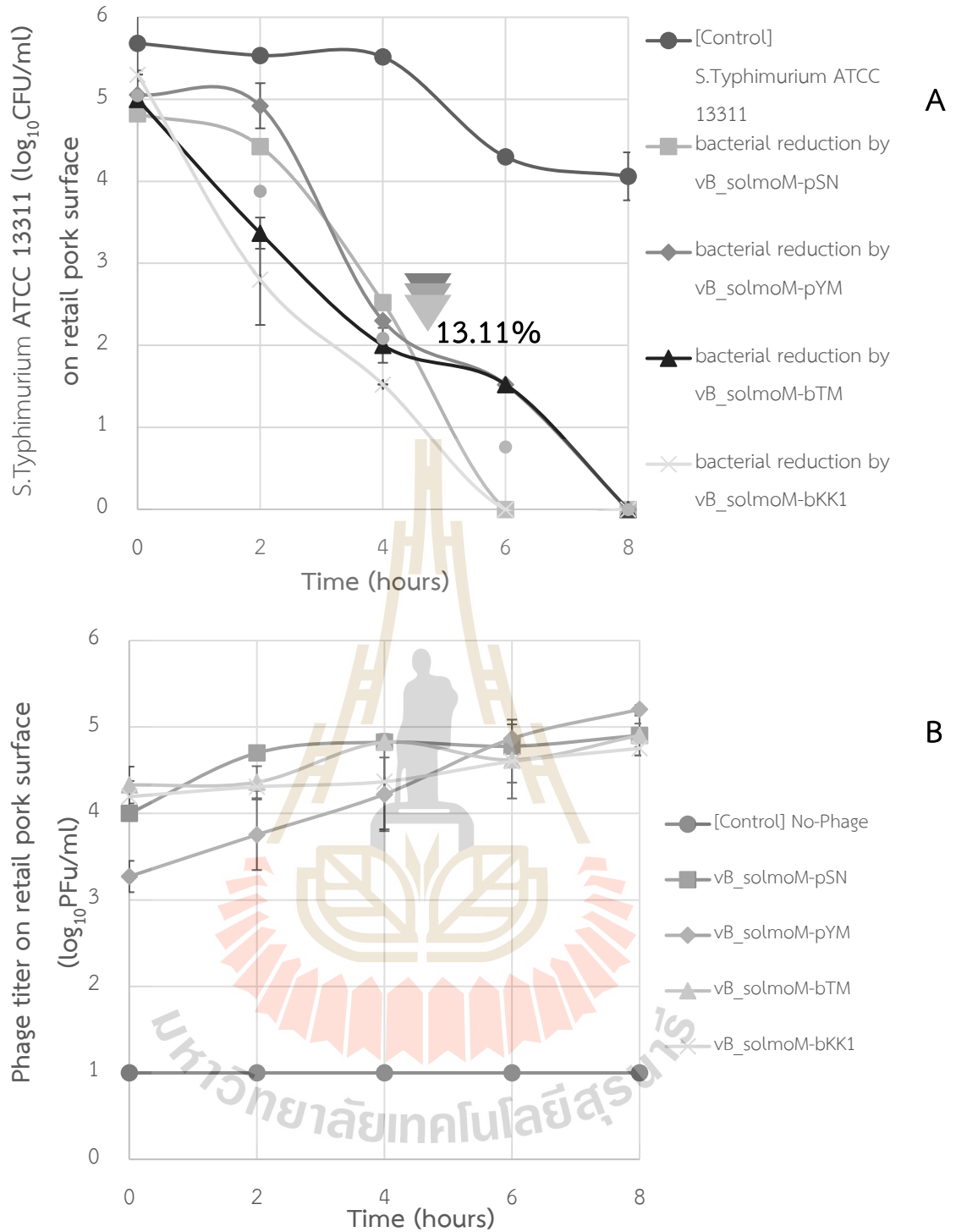
การศึกษามลของฟาจที่คัดเลือก vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM, vB_solmoM-bKK1, และ vB_solmoM-bTM ได้ต่อการอยู่รอดของ *S. Typhimurium* ATCC 11331 บนเนื้อไก่, เนื้อวัว และเนื้อหมู ก่อนการ spike เชื้อ *Salmonella* ความเข้มข้น $5 \log_{10}$ CFU/ml บนชิ้นเนื้อ ขนาด (2 cm x 2 cm) ได้ทำการฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวี เป็นเวลา 45 นาที จากผลการศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวี โดยผลการทดสอบการฆ่าเชื้อ microflora บนชิ้นเนื้อ ด้วยรังสียูวี ดังแสดงในรูปที่ 12 ทำการตรวจการอยู่รอดของเชื้อบนชิ้นเนื้อโดยการ swab และทำการบ่มเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ 45 นาที ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารไม่

เกิดความขุ่น ดังนั้นจึงทำการฆ่าเชื้อบนชิ้นเนื้อด้วยรังสียูวี ก่อนการเติมเชื้อ *Salmonella* บนชิ้นเนื้อ และทำการเติมฟาจที่คัดเลือกที่ความเข้มข้นฟาจที่ทำให้ค่า Multiple Of Infection (MOI) เท่ากับ 1

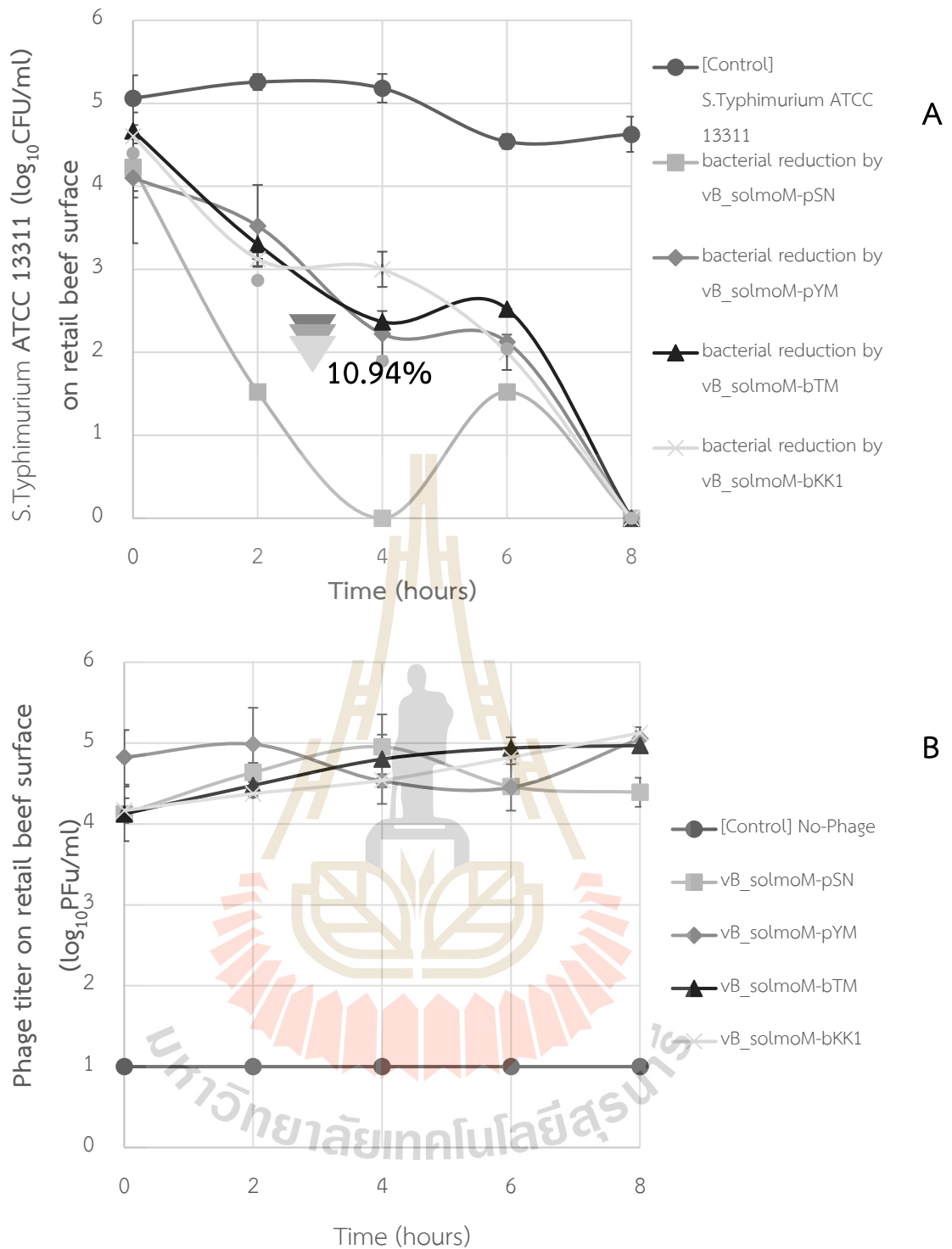


รูปที่ 12 การทดสอบการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บนชิ้นเนื้อ ขนาด 2 cm x 2 cm ด้วย รังสี UV

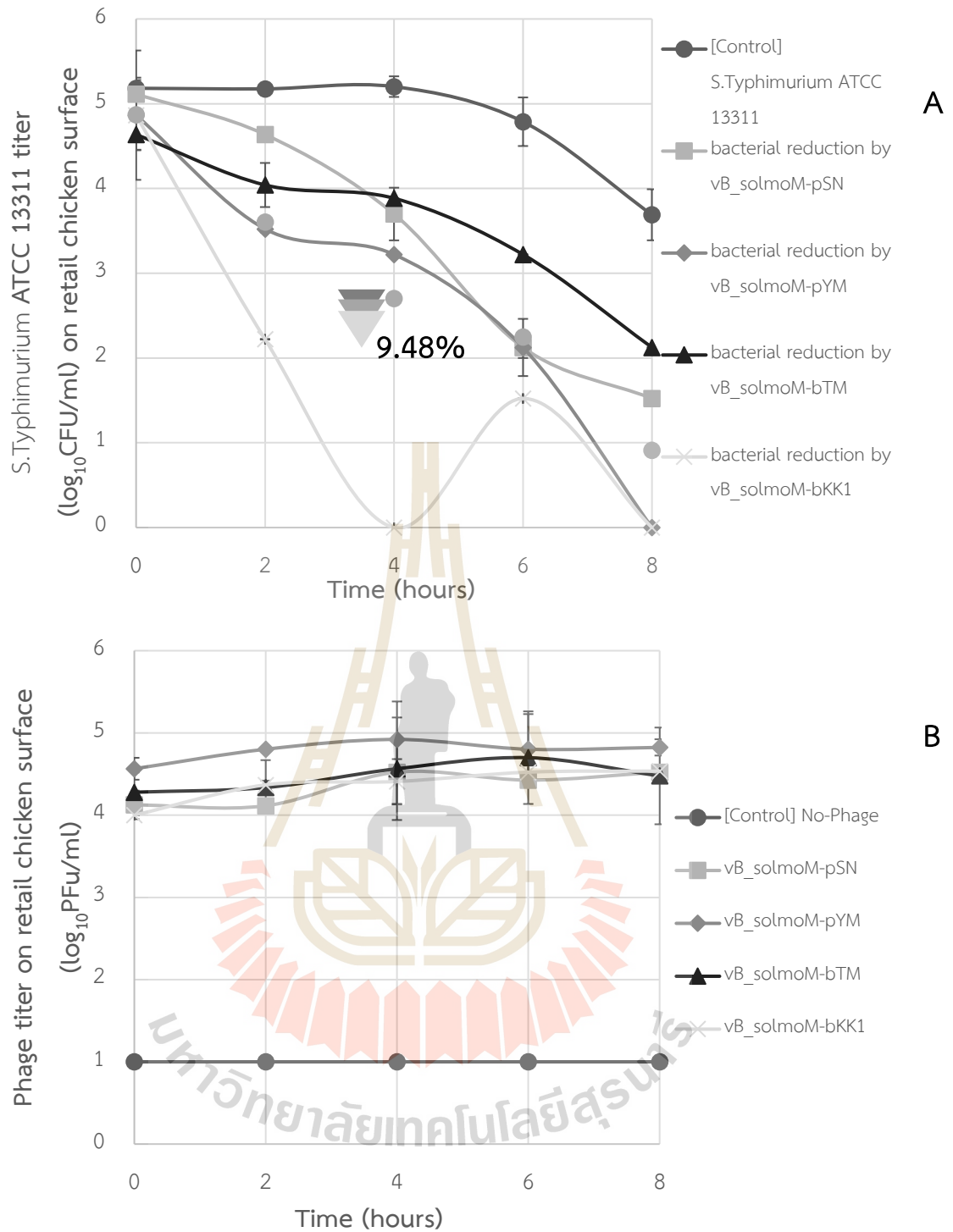
จากรูปแสดงให้เห็นว่าฟาจที่คัดเลือกสามารถลดจำนวนแบคทีเรียบนชิ้นเนื้อทั้งสามชนิดได้ เนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อไก่ (รูป12A, รูป13A และ รูป14A ตามลำดับ) และปริมาณฟาจเพิ่มขึ้น (รูป12B, รูป13B และ รูป14B ตามลำดับ) ตลอดระยะเวลาการบ่ม 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าฟาจ *vB_solmoM-pSN* และ *vB_solmoM-pYM* ที่แยกได้จากเนื้อหมู และ *vB_solmoM-bTM* และ *vB_solmoM-bKK1* ฟาจที่แยกได้จากเนื้อวัว มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* และเพิ่มปริมาณฟาจบนพื้นผิวของเนื้อได้ดี ใช้เวลาในการลดเชื้อเริ่มต้นจนไม่สามารถนับจำนวนเชื้อได้ (under detection limit) เป็นเวลา 6 – 8 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามอัตราการลดลง (Reduction rate) ของเชื้อ *Salmonella* บนเนื้อแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน *vB_solmoM-pSN* มีอัตราการลดเชื้อ *Salmonella* เท่ากับ -0.7033 CFU/hour บนเนื้อหมู -0.4847 CFU/hour บนเนื้อไก่ และ -0.4230 CFU/hour บนเนื้อวัว และ *vB_solmoM-pYM* มีอัตราการลดเชื้อ *Salmonella* เท่ากับ -0.6753 CFU/hour บนเนื้อหมู -0.5564 CFU/hour บนเนื้อไก่ และ -0.4802 CFU/hour บนเนื้อวัว *vB_solmoM-bTM* มีอัตราการลดเชื้อ *Salmonella* เท่ากับ -0.5923 CFU/hour บนเนื้อหมู -0.2922 CFU/hour บนเนื้อไก่ และ -0.5058 CFU/hour บนเนื้อวัว *vB_solmoM-bKK1* มีอัตราการลดเชื้อ *Salmonella* เท่ากับ -0.6702 CFU/hour บนเนื้อหมู -0.5215 CFU/hour บนเนื้อไก่ และ -0.5165 CFU/hour บนเนื้อวัว จากผลสามารถระบุได้ว่าฟาจที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพการลดเชื้อบนเนื้อสัตว์ โดยมีประสิทธิภาพมากบนเนื้อหมู รองลงมาคือ เนื้อวัวและเนื้อไก่ และนอกจากนี้ฟาจสามารถคงอยู่บนเนื้อสัตว์เพื่อควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* โดยปริมาณฟาจเพิ่มขึ้นเล็กน้อยบนพื้นผิวของเนื้อสัตว์



รูปที่ 13 ผลของฟาจต่อจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 (A) และจำนวนฟาจบนพื้นผิวหน้าเนื้อหมู ขนาด 2 cm x2 cm (B) ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 14 ผลของฟาจต่อจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 (A) และจำนวนฟาจบนพื้นผิวหน้าเนื้อวัว ขนาด 2 cm x 2 cm (B) ที่อุณหภูมิ 4°C

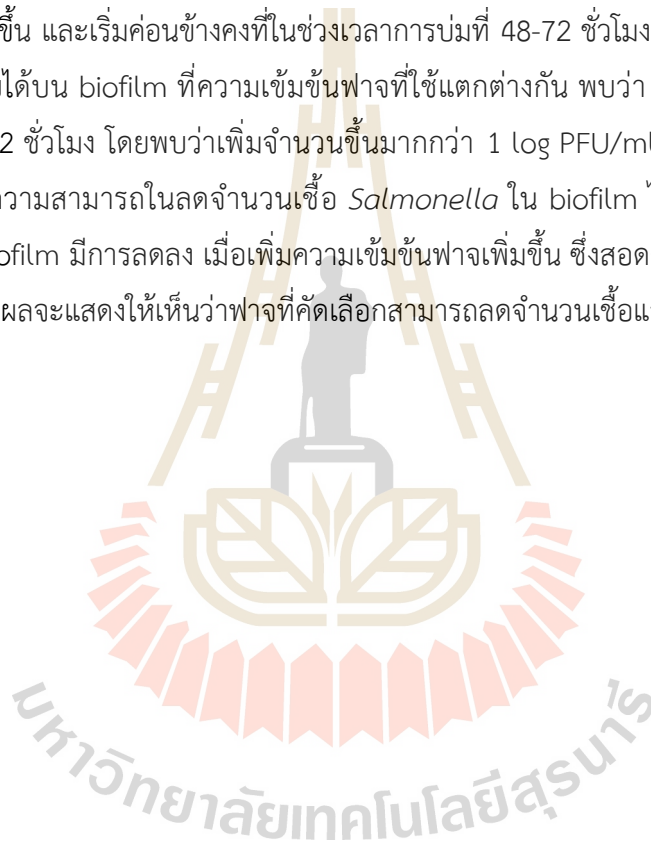


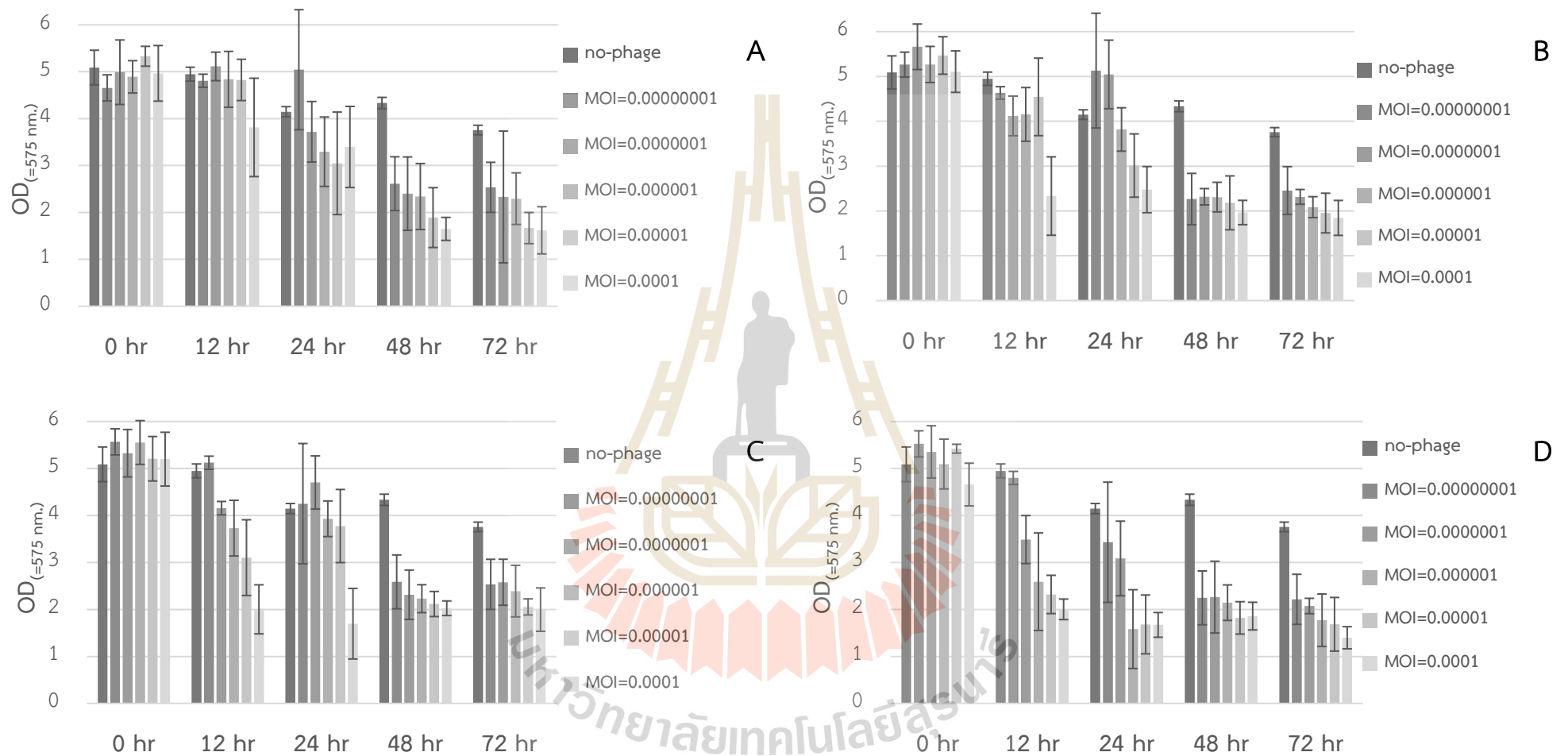
รูปที่ 15 ผลของฟาจต่อจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 (A) และจำนวนฟาจบนพื้นผิวหน้าเนื้อไก่ ขนาด 2 cm x2 cm (B) ที่อุณหภูมิ 4°C

4.2.5. ผลของฟาจต่อการลด biofilm ของเชื้อ *S.Typhimurium*

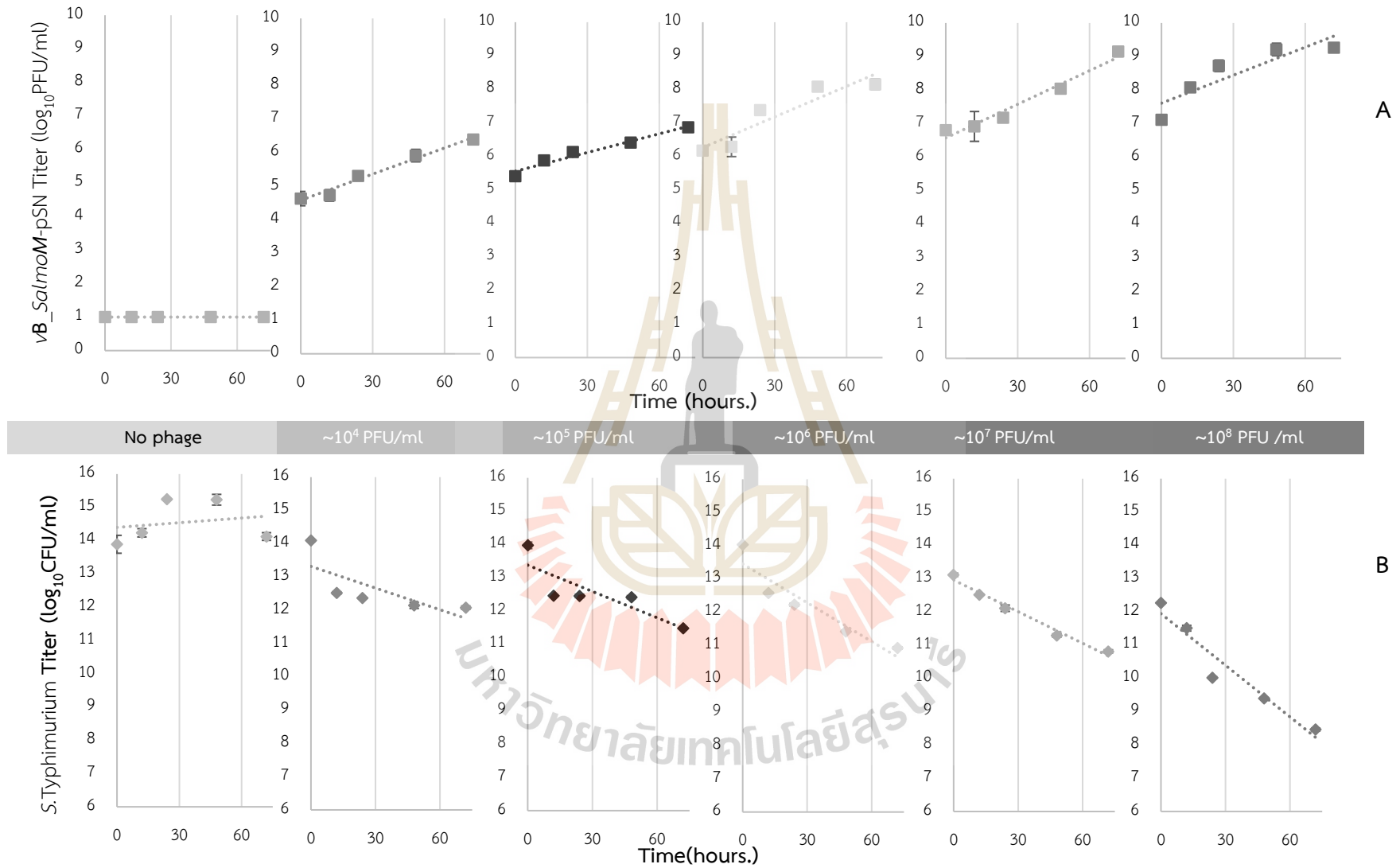
การสร้าง biofilm ของเชื้อ *S.Typhimurium* บน 96 well-polystyrene microtiter plate โดยการบ่มอยู่ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วัน เมื่อนำมาทดสอบการกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อ *Salmonella* ด้วย phage ที่คัดเลือกที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ ประมาณ 10^4 PFU/ml, 10^5 PFU/ml, 10^6 PFU 10^7 PFU/ml และ 10^8 PFU/ml ทำให้ค่า MOI แตกต่างกัน นาน 72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 16(A-D) จากการวัดปริมาณ Biofilm ด้วยการย้อมสี crystal violet ซึ่งย้อมสาร exopolysaccharide ที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมฟาจ จะเห็นได้ว่าสามารถลดปริมาณ biofilm เพิ่มขึ้นตามปริมาณฟาจเพิ่มขึ้น ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นฟาจยิ่งส่งผลให้ปริมาณ biofilm ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเห็นได้จากค่า ($OD_{575\text{ nm}}$) มีแนวโน้มลดลงในการเติมสารละลายฟาจทุกชนิดลงไป โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเริ่มลดลงเมื่อบ่ม 12-24 ชั่วโมง และลดลงเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มนานขึ้น และเริ่มค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลาการบ่มที่ 48-72 ชั่วโมง

ปริมาณฟาจที่นับได้บน biofilm ที่ความเข้มข้นฟาจที่ใช้แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณฟาจสามารถเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นภายใน 12 ชั่วโมง โดยพบว่าเพิ่มจำนวนขึ้นมากกว่า 1 log PFU/ml ณ ชั่วโมงที่ 24 แสดงให้เห็นว่าฟาจสามารถคงความสามารถในลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ใน biofilm ได้ ซึ่งจากผลปริมาณเชื้อ *S.Typhimurium* ใน biofilm มีการลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นฟาจเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ Biofilm ที่ลดลงเช่นเดียวกัน จากผลจะแสดงให้เห็นว่าฟาจที่คัดเลือกสามารถลดจำนวนเชื้อและกำจัดปริมาณ biofilm ได้

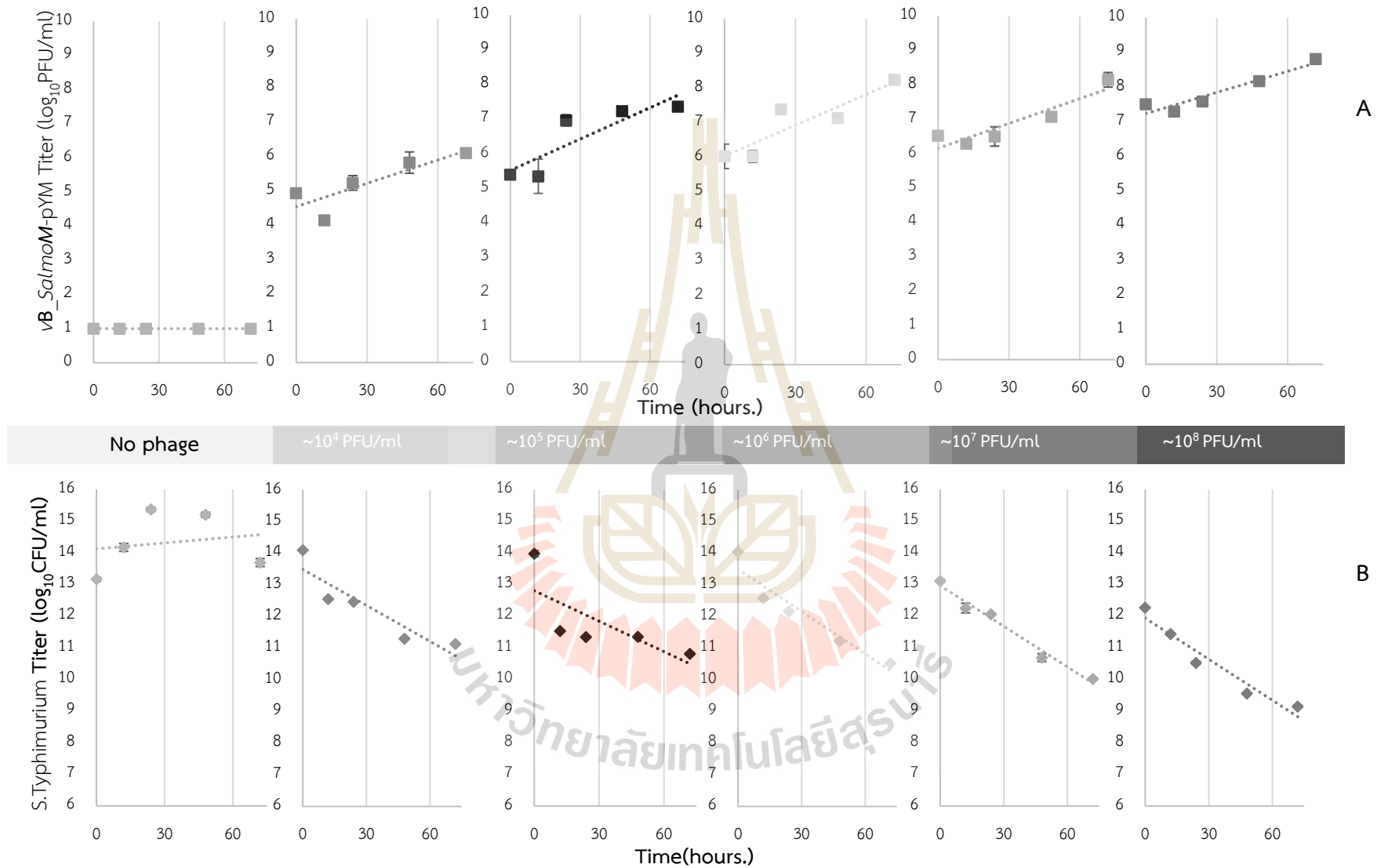




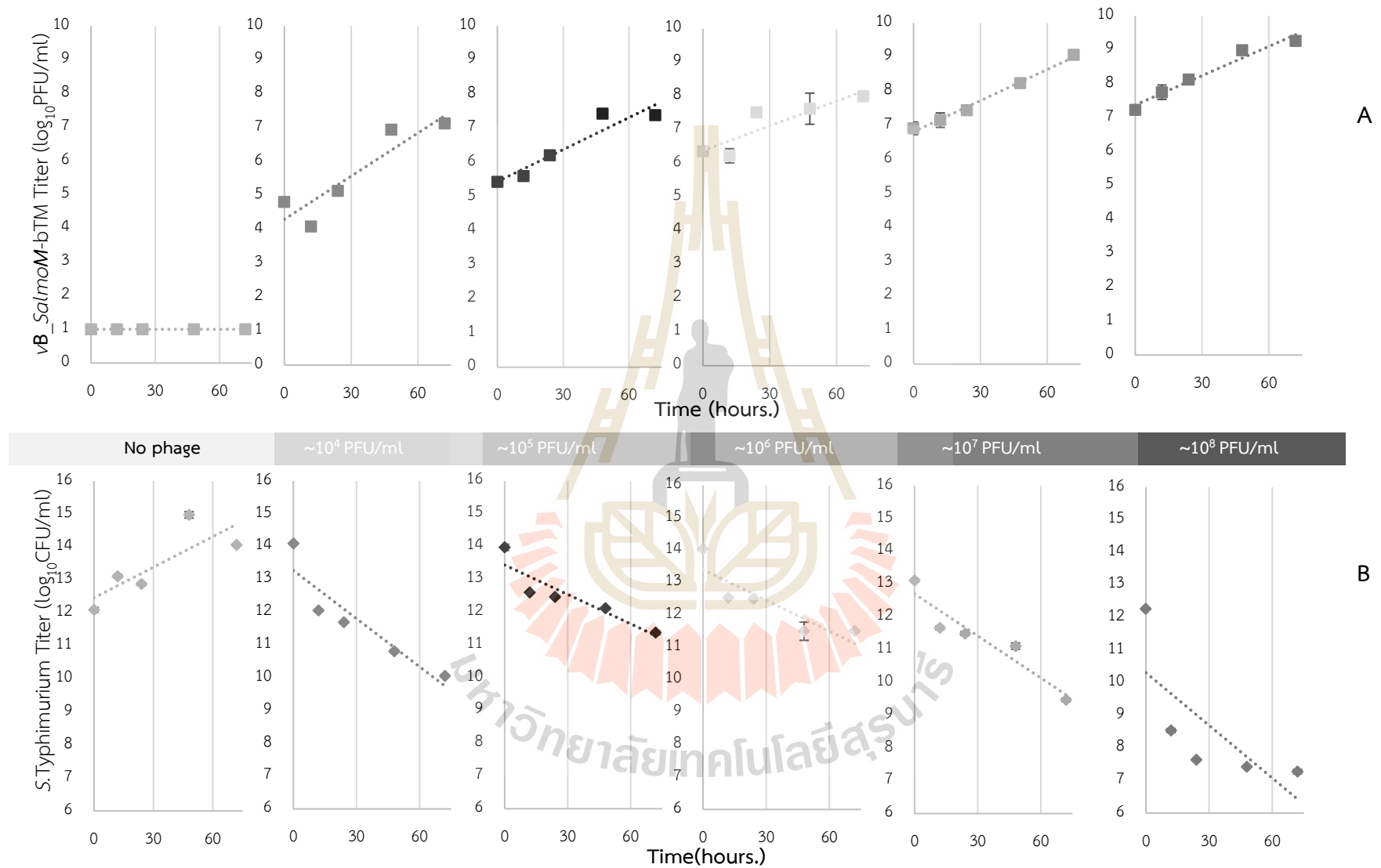
รูปที่ 16 ผลของฟาจ *vB_solmoM-pSN*(A), *vB_solmoM-pYM*(B), *vB_solmoM-bTM*(C) และ *vB_solmoM-bKK1*(D) ต่อ ปริมาณ Biofilm ของ *S.Typhimurium* ATCC 13311 ป่มที่ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง



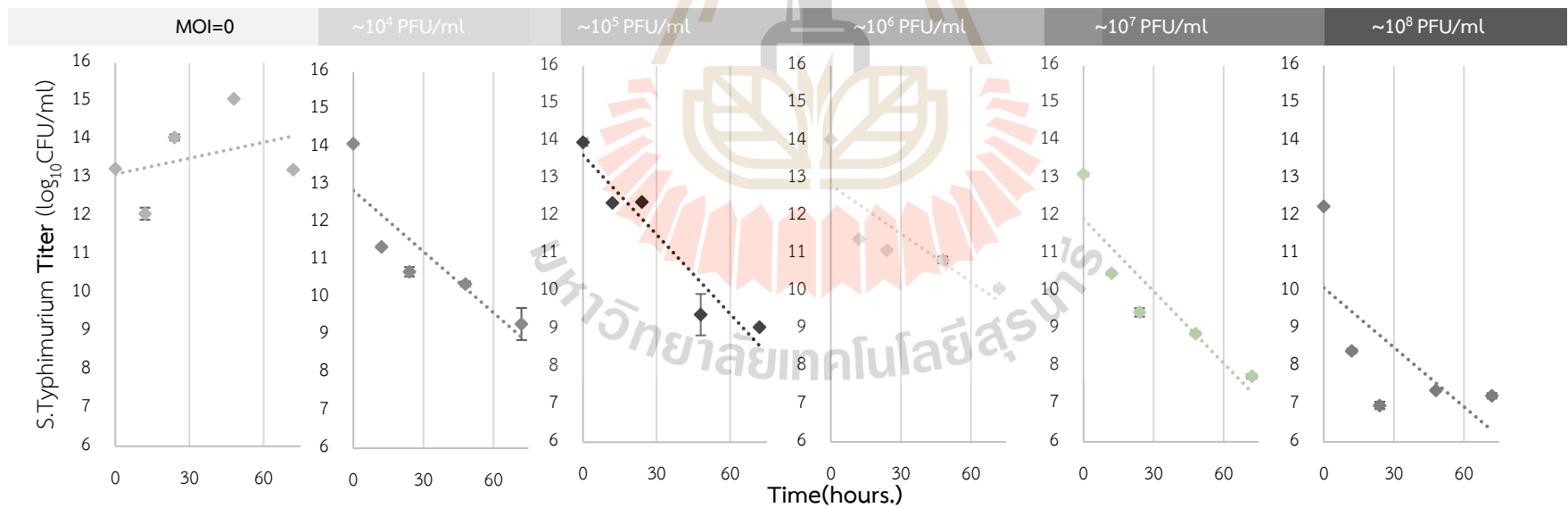
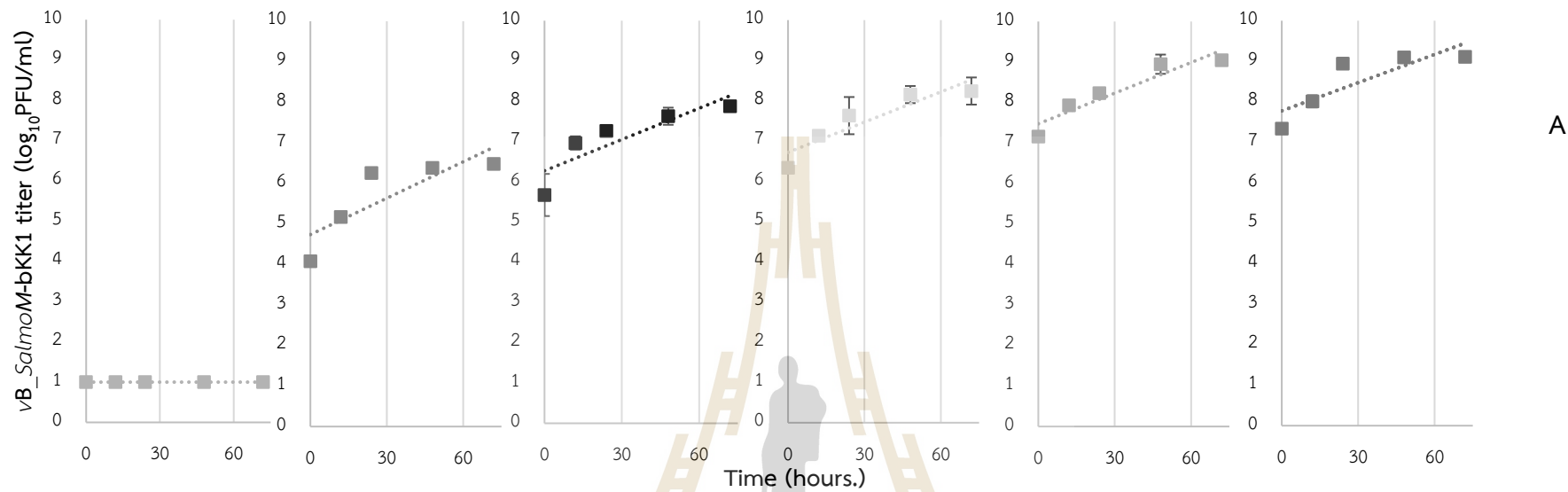
รูปที่ 17 ปริมาณฟาจ vB_solmoM-pSN (A) และปริมาณเชื้อ S.Typhimurium ATCC 13311 (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง



รูปที่ 18 ปริมาณฟาจ vB_solmoM-pYM (A) และปริมาณเชื้อ S.Typhimurium ATCC 13311 (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง



รูปที่ 19 ปริมาณฟาจ vB_solmoM-bTM (A) และปริมาณเชื้อ S. Typhimurium ATCC 13311 (B) หลังจากทำเติมฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง



รูปที่ 20 ปริมาณฟาจ *vB_solmoM-bKK1* (A) และปริมาณ *S.Typhimurium* ATCC 13311 ที่รอดชีวิต (B) หลังจากทำเคมีฟาจที่ความเข้มข้นต่างๆ บน Biofilms และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง

4.2.6. ความทนต่อสภาวะต่างๆของฟาจ (Phage stability under various condition)

ทดสอบความคงตัวของฟาจในสภาวะต่างๆ เพื่อศึกษาความสามารถของฟาจในการทนอุณหภูมิ ความทนความเป็นกรด-ด่าง ทนเกลือ เพื่อประโยชน์ในการนำฟาจไปใช้งานในอาหาร ในการควบคุมเชื้อ *Salmonella*

ผลของความกรด-ด่างต่อความคงตัวของฟาจ โดยนำฟาจเติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 3-11 บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 120 นาที พบว่าฟาจคัดเลือกทั้ง 4 ชนิด vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM, vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 มีความคงตัวในช่วง pH ระหว่าง 5-9 โดยเกิดการสูญเสียเร็วกว่า -0.001 ถึง -0.018 log PFU/min และช่วงความเป็นกรด (pH3-4) และช่วงความเป็นด่าง pH 10-11 มีอัตราการสูญเสียที่เกิดขึ้น มีค่ามากกว่า -0.020 log₁₀ PFU/min แสดงว่าฟาจถูกทำลายจึงทำให้ความเข้มข้นฟาจลดลง ดังแสดงรูปที่ 21-23 มีการลดลงของจำนวนฟาจอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยแสดงอัตราการลดลงที่มากกว่า 0.01 log₁₀ PFU/ min

เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ฟาจสัมผัสสภาวะความเป็นกรดต่าง พบว่าฟาจ vB_solmoM-pSN (รูปที่-21) ที่ pH 3 ฟาจมีความคงตัวได้โดยที่ไม่ก่อให้เกิดความสูญเสียเป็นเวลา 60 นาที ปริมาณฟาจลดลงมากกว่า 1 log₁₀ PFU/ml ก่อนจะเริ่มมีการสูญเสียที่นาที่ที่ 90 อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับที่ pH 4 ที่การสูญเสียเกิดขึ้นช้ากว่า ที่ 120 นาที ในขณะที่ฟาจ vB_solmoM-pYM (รูปที่ 22) จะมีความสามารถในการอยู่รอดในความเป็นกรดอ่อนมากกว่า โดยที่ pH5-6 อัตราการสูญเสียต่ำกว่า -0.01 PFU/min ขณะที่ pH 7-9 มีความคงตัวตลอดระยะเวลาการบ่ม มีอัตราการสูญเสียค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับฟาจ vB_solmoM-pSN แต่ที่ pH3 และ 4 การสูญเสียปริมาณฟาจมากกว่า 1 log₁₀ PFU/ml เริ่มเกิดขึ้นที่นาที่ที่ 60 และ 90 เช่นเดียวกัน

ในขณะที่อัตราการสูญเสียของฟาจ vB_solmoM-bTM ที่แยกได้จากเนื้อวัวที่ pH 3-4 ฟาจสูญเสียสภาพตั้งแต่เริ่มบ่ม (รูปที่ 23) เช่นเดียวกับ pH11 ก่อนจะเริ่มนับได้อีกครั้งที่ pH 5 โดยแสดงอัตราการสูญเสียมากกว่า 0.01 จนถึง pH 6 ก่อนการสูญเสียค่อนข้างน้อย อัตราต่ำกว่า -0.01 log₁₀ PFU/min ที่ pH 7-9 จากนั้นจึงลดลงที่ pH 10 เมื่อพิจารณาระยะเวลาการสัมผัสกับสภาวะความเป็นกรด-ด่าง พบว่า ที่ pH5 และ 6 ฟาจมีการลดปริมาณลดลง ≥ 1 log₁₀ PFU/ml ที่นาที่ที่ 120 ในขณะที่ pH 10 เกิดขึ้นเร็วกว่า ณ นาที่ที่ 60 ซึ่งแนวโน้มการสูญเสียที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกันในฟาจ vB_solmoM-bKK1 โดยที่ pH 3-4 และ pH 10-11 อัตราการสูญเสียเกิดขึ้นมากกว่า -0.01 log₁₀ PFU/min และมีอัตราการลดลงต่ำกว่า -0.01 log₁₀ PFU/min ในช่วง pH 5-9 ตามรูปที่ 24 เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ฟาจสัมผัสสภาวะกรด-ด่าง พบว่า ที่ pH 3 ปริมาณฟาจลดลงมากกว่า 1 log₁₀ PFU/ml ณ นาที่ที่ 30 ในขณะที่ ฟาจ vB_solmoM-bTM เกิดขึ้นเร็วกว่า ในขณะที่ pH 4, 10 และ 11 ปริมาณฟาจเริ่มลดลง ณ นาที่ที่ 90 เป็นต้นไป

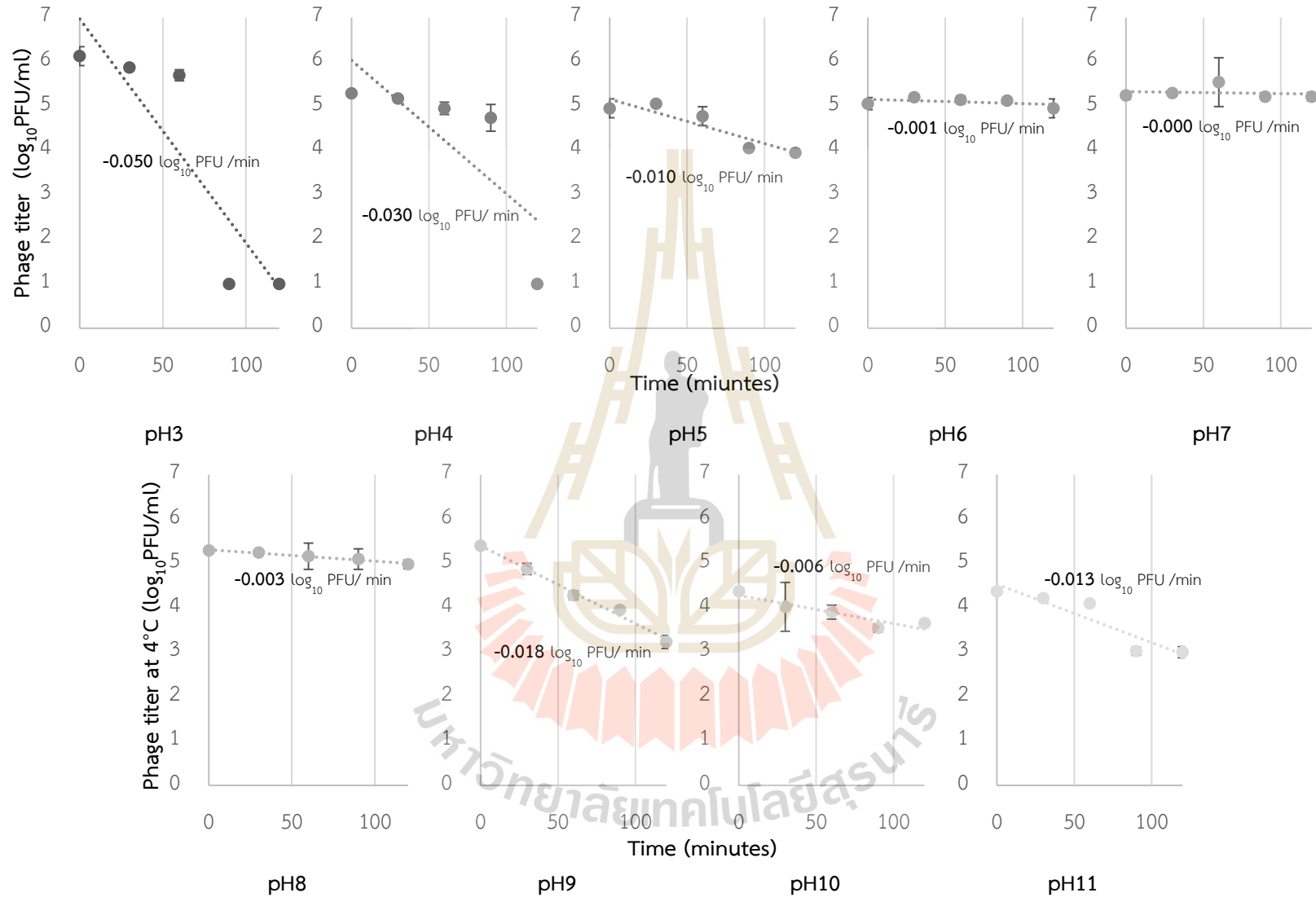
เมื่อพิจารณาตามแหล่งที่มาของฟาจที่แยกได้ พบว่า ฟาจที่แยกจากเนื้อหมูมีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะกรดสูงและด่างสูง pH 3-4 และ pH 10-11 ได้ดีกว่าฟาจที่แยกได้จากเนื้อวัว

ผลของเกลือ NaCl ที่ช่วงความเข้มข้น 0-25% pH 7.4 ต่อความคงตัวของฟาจ บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 120 นาที พบว่าฟาจที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อหมู ฟาจ vB_solmoM-pSN และ vB_solmoM-pYM (รูปที่ 25-25) พบว่าฟาจ vB_solmoM-pSN ที่ความเข้มข้นเกลือ 10% มีอัตราการลดลงของฟาจ -0.007 log₁₀ PFU/min

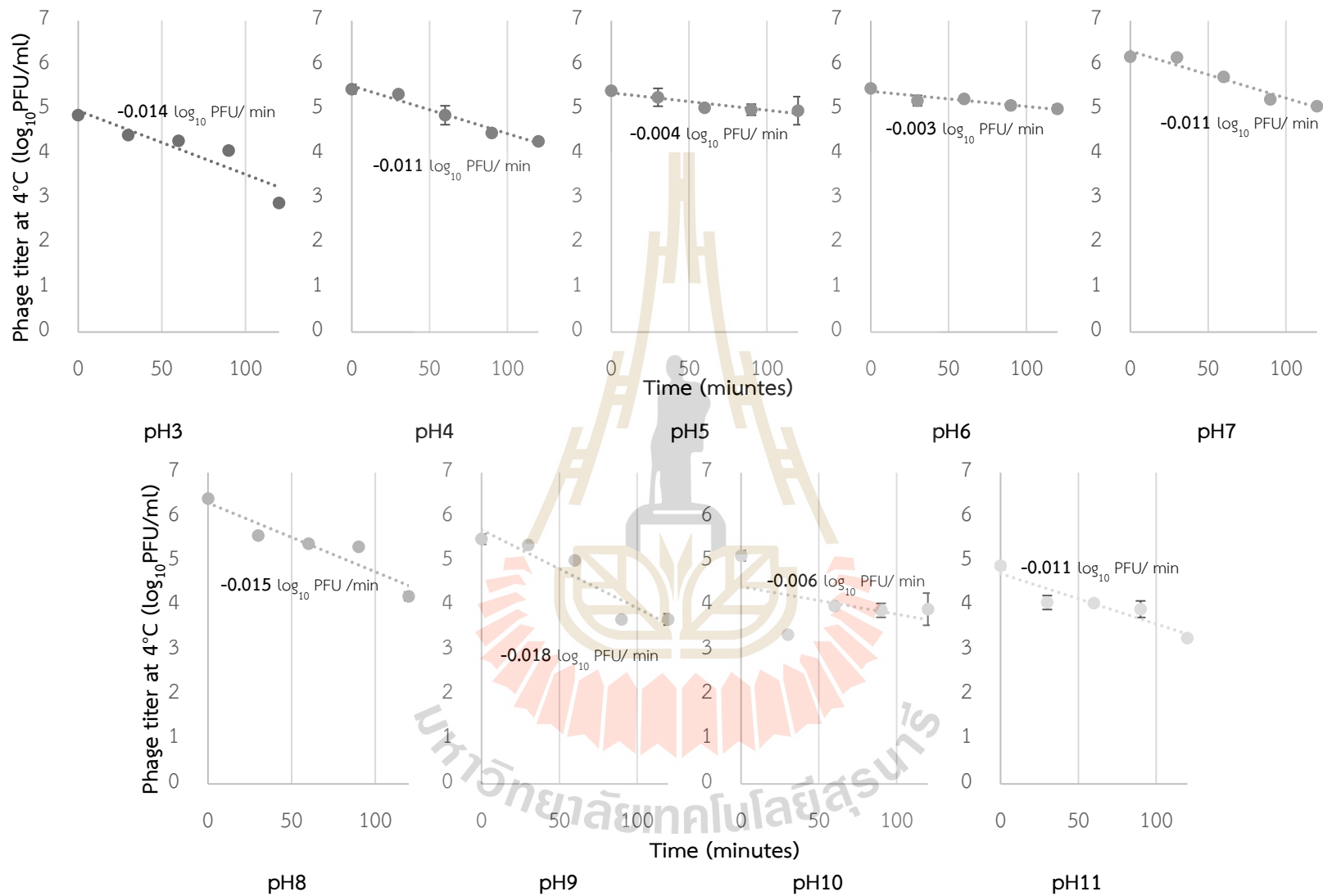
และยังเพิ่มความเข้มข้นเกลือ 15%, 20%, และ 25% อัตราการลดลงของฟาจ $-0.013, -0.021, -0.031 \log_{10}$ PFU/min ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับฟาจ *vB_solmoM-pYM* แต่จะเกิดการเสียชีวิตเร็วกว่า โดยที่ความเข้มข้นเกลือ 10% อัตราการเสียชีวิตของฟาจ $-0.012 \log_{10}$ PFU/ml ในขณะที่ที่ความเข้มข้นเกลือ 15, 20 และ 25% นั้น มีอัตราการลดลง $-0.017, -0.026, -0.034 \log_{10}$ PFU/min เช่นเดียวกับฟาจที่แยกได้จากเนื้อวัว (รูปที่ 27-27) แม้จะมีอัตราการสูญเสียใกล้เคียงกัน แต่เกิดขึ้นรวดเร็วกว่า ในฟาจ *vB_solmoM-bTM* ที่ 10% NaCl ปริมาณฟาจลดลงน้อยกว่า $-0.013 \log_{10}$ PFU/min ที่นาที่ที่ 90 ในขณะที่ฟาจ *vB_solmoM-bKK1* เกิดขึ้นเร็วกว่า ณ นาที่ที่ 70 และเกิดเร็วขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย ที่ความเข้มข้นเกลือ 15, 20 และ 25% การสูญเสียเกิดขึ้น นาที่ที่ 60, 50 และ 30 ตามลำดับ ในฟาจทั้งสอง ที่ความเข้มข้นเกลือ 0-5% พบการสูญเสียปริมาณฟาจต่ำมาก และฟาจที่แยกได้จากเนื้อหมู ฟาจ *vB_solmoM-pSN* และ *vB_solmoM-pYM* สามารถอยู่รอดในสภาวะความเข้มข้นเกลือ 10-15% ได้นานกว่า

การสูญเสียปริมาณฟาจในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ใน SM buffer pH 7.4 โดยปราศจากไฮสโตเซลล์แบบที่เรีย จะพบว่า ฟาจที่แยกได้ทั้ง 4 สามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิที่ 5-35 °C และเริ่มแสดงอัตราสูญเสียเกิดขึ้นมากกว่า $-0.01 \log_{10}$ PFU/min ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นต้นไป โดยในช่วง 5-25 °C นั้น ไม่มีการเสียชีวิตของฟาจทั้ง 4 และอุณหภูมิสูง 35 °C มีการสูญเสียสภาพเล็กน้อย แต่จะมีอัตราการลดลงของจำนวนฟาจที่เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 45 °C (รูปที่ 29-31) ถ้าพิจารณาฟาจที่คัดแยกจากเนื้อหมูและเนื้อวัวพบว่า ฟาจ *vB_solmoM-pSN* และ *vB_solmoM-pYM* ที่มาจากเนื้อหมูเริ่มแสดงการสูญเสียปริมาณฟาจ ณ นาที่ที่ 60 และ 90 ตามลำดับ ที่ 45°C ก่อนจะสูญเสียรวดเร็วกว่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่ม โดยที่อุณหภูมิ 55, 65 และ 75 °C การสูญเสียเกิดขึ้นภายในเวลา 60, 30 และ 30 นาที ตามลำดับ เช่นเดียวกับฟาจ *vB_solmoM-pYM* ซึ่งแนวโน้มการสูญเสียที่เกิดขึ้นนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับฟาจที่แยกได้จากเนื้อวัว (ฟาจ *vB_solmoM-bTM* และ *vB_solmoM-bKK1*) ทั้งสอง แม้ว่าอุณหภูมิที่ทำให้ฟาจลดลงในอัตราที่สูงกว่า $-0.01 \log_{10}$ PFU/min อยู่ที่ 45 °C ซึ่งช้ากว่าฟาจจากเนื้อหมู ในขณะที่อุณหภูมิ 55, 65 และ 75 °C ของฟาจทั้งสองเกิดขึ้นรวดเร็วกว่ากันกับฟาจที่แยกได้จากเนื้อหมู

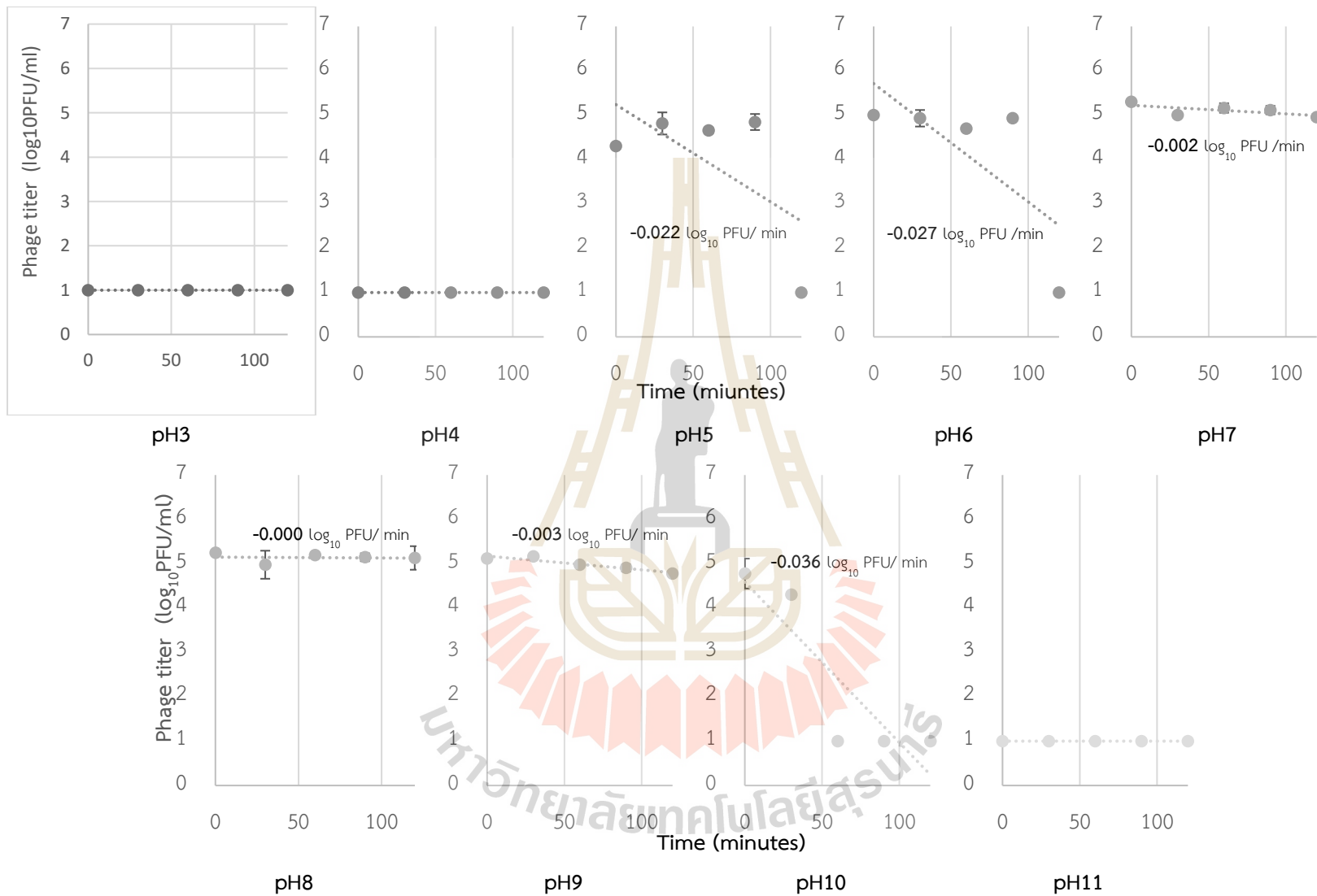
แม้ที่อุณหภูมิที่ 65 และ 75 °C จะมีอัตราการสูญเสียปริมาณฟาจที่ใกล้เคียงกันแต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเริ่มต้น พบว่า ฟาจ *vB_solmoM-pSN* และ *vB_solmoM-pYM* มีการลดลงทันที ที่เริ่มสัมผัสกับอุณหภูมิ 75 °C ในขณะที่ฟาจ *vB_solmoM-bTM* และ *vB_solmoM-bKK1* ยังสามารถอยู่รอดได้ในช่วงเวลาหนึ่งก่อนจะลดลงต่ำกว่าค่า Detection limit ได้ภายในระยะเวลา 120 นาที โดยฟาจ *vB_solmoM-pSN*, *vB_solmoM-bTM* และ *vB_solmoM-bKK1* เกิดขึ้น ณ นาที่ที่ 90 ทั้งสองช่วงอุณหภูมิ ในขณะที่ฟาจ *vB_solmoM-pYM* เกิดการสูญเสียเร็วกว่า ที่ 60 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 75 °C



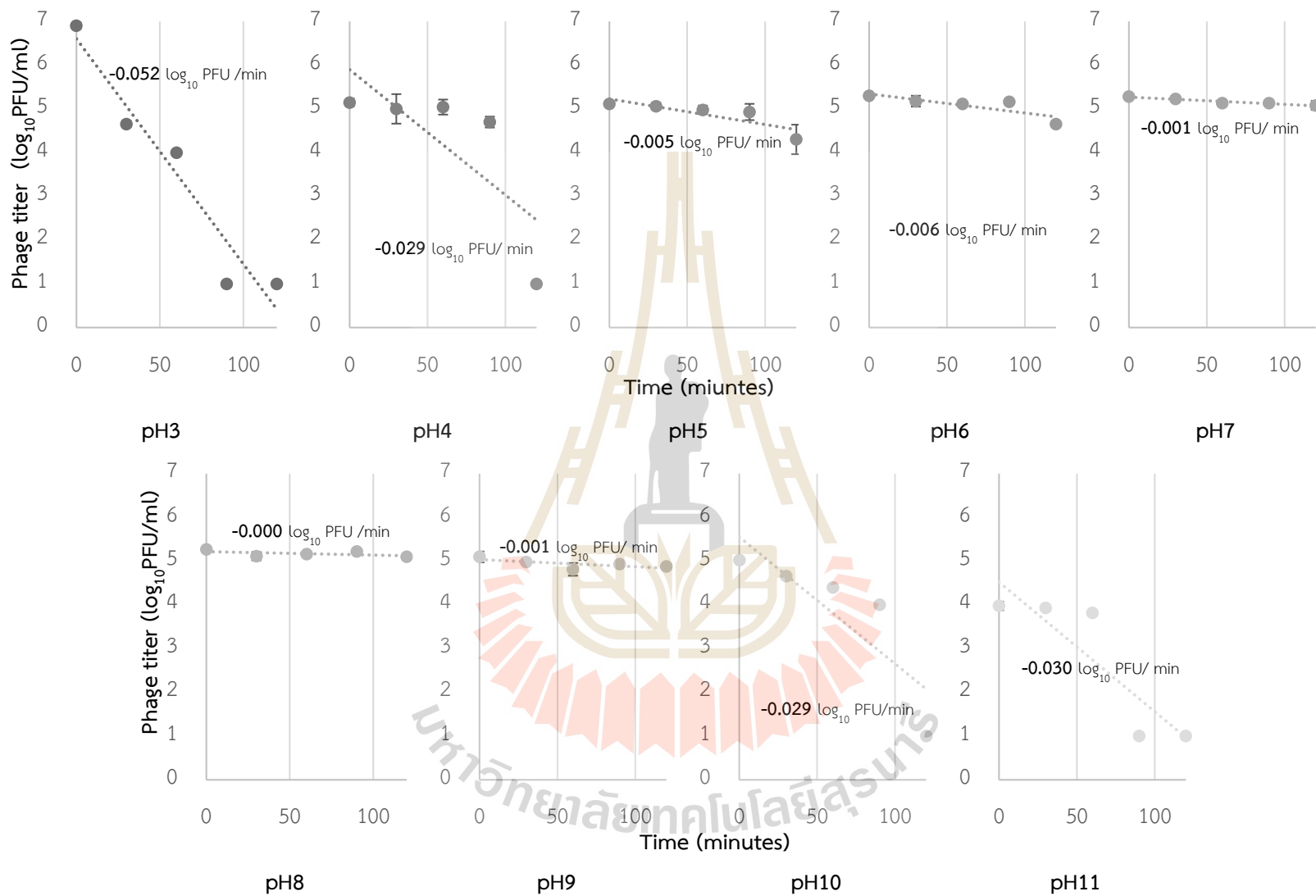
รูปที่ 21 ความคงทนของฟาจ *vB_solmoM-pSN* ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C



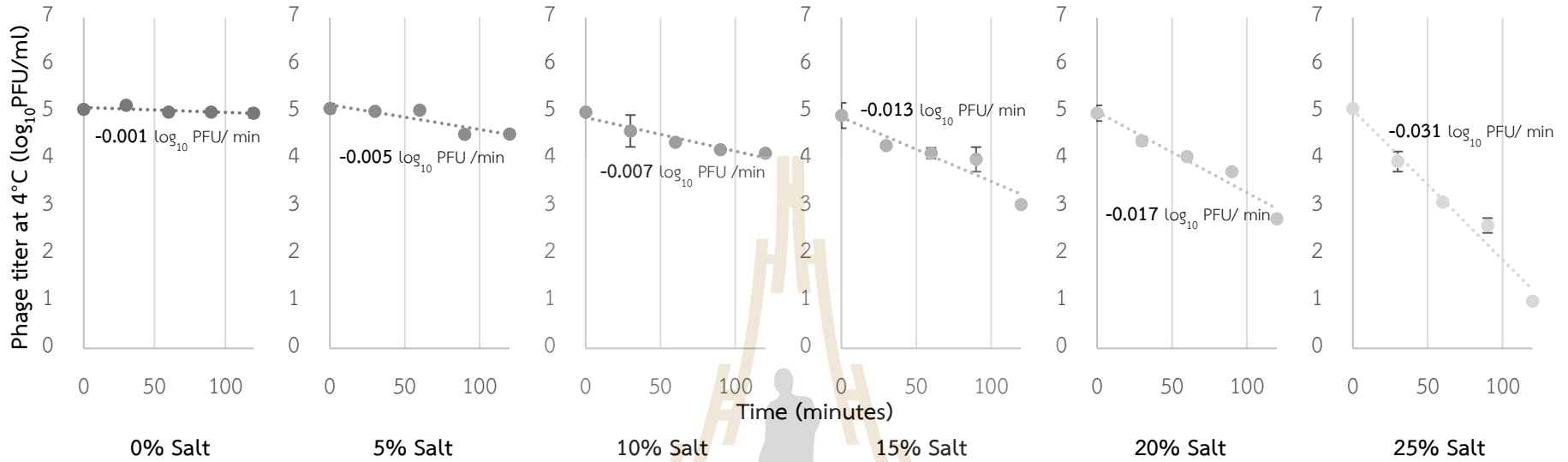
รูปที่ 22 ความคงทนของฟาจ vB_solmoM-pYM ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C



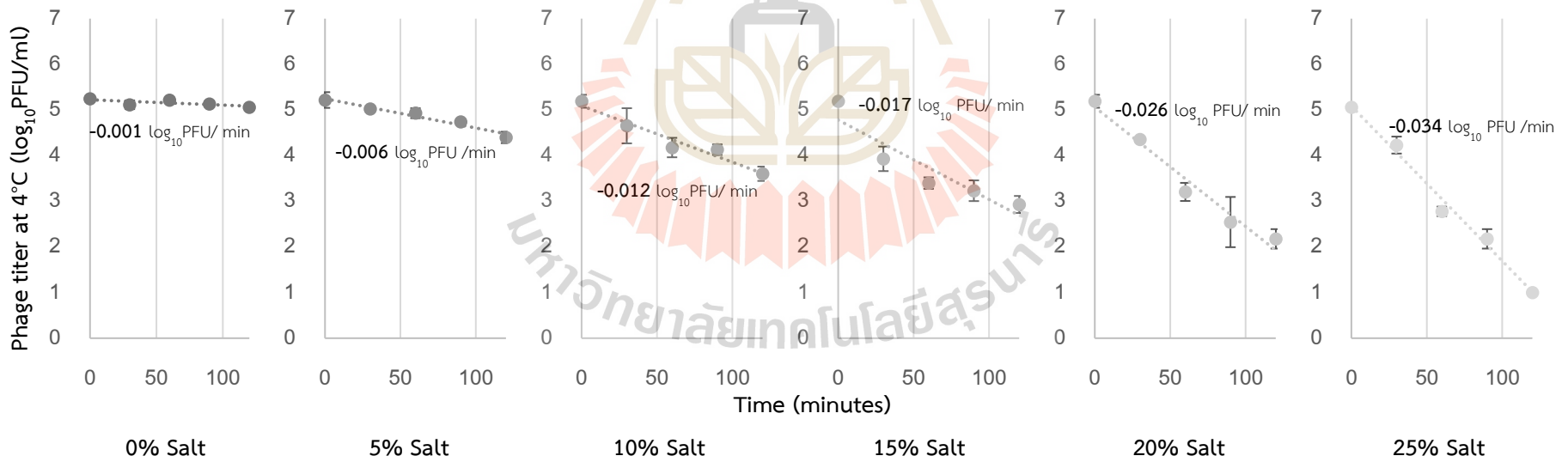
รูปที่ 23 ความคงทนของฟาจ vB_solmoM-bTM ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C



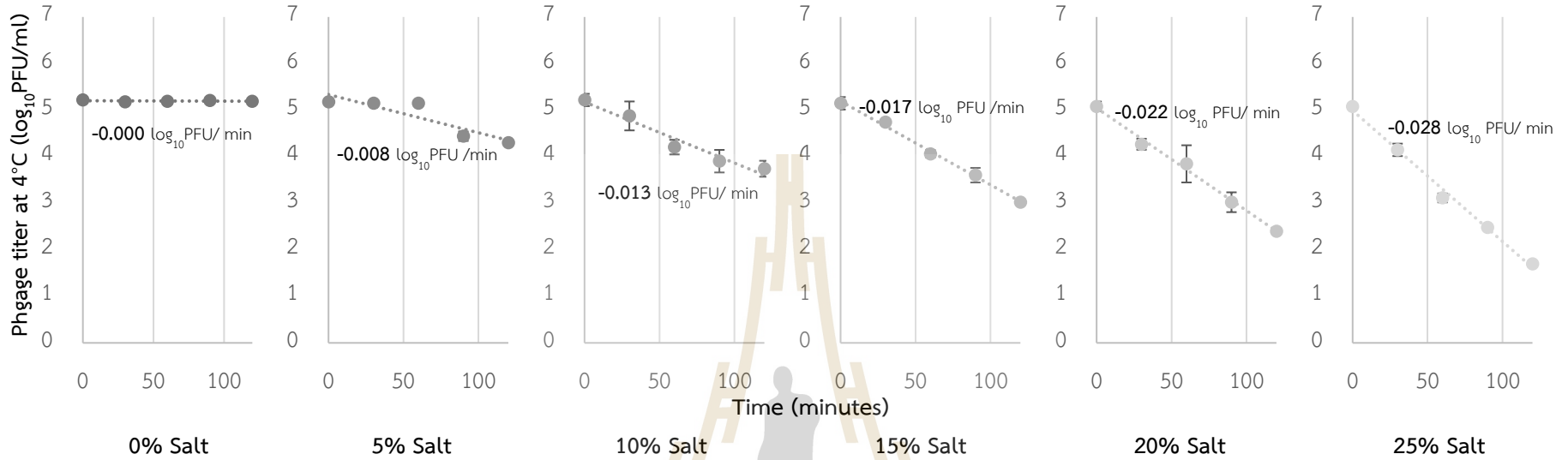
รูปที่ 24 ความคงทนของฟาจ *vB_solmoM-bKK1* ในสภาวะกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 4°C



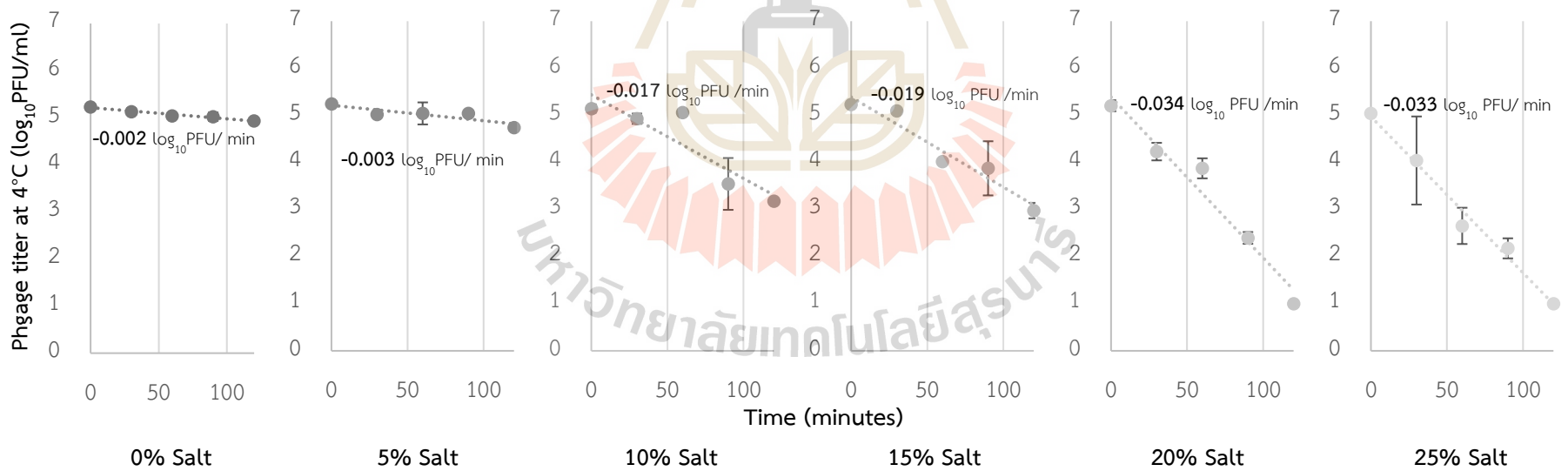
รูปที่ 25 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ *vB_solmoM-pSN* ที่อุณหภูมิ 4°C



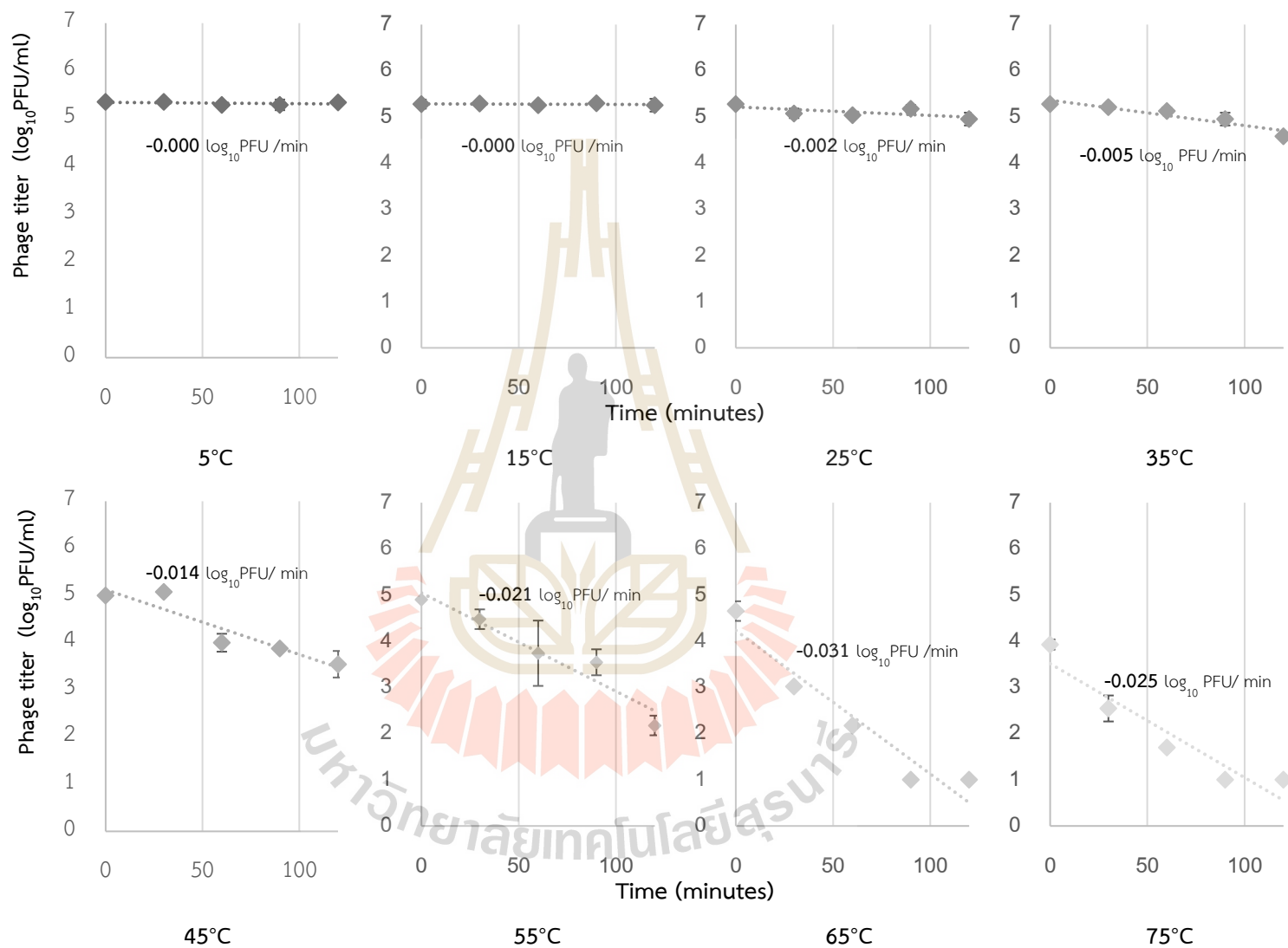
รูปที่ 26 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ *vB_solmoM-pYM* ที่อุณหภูมิ 4°C



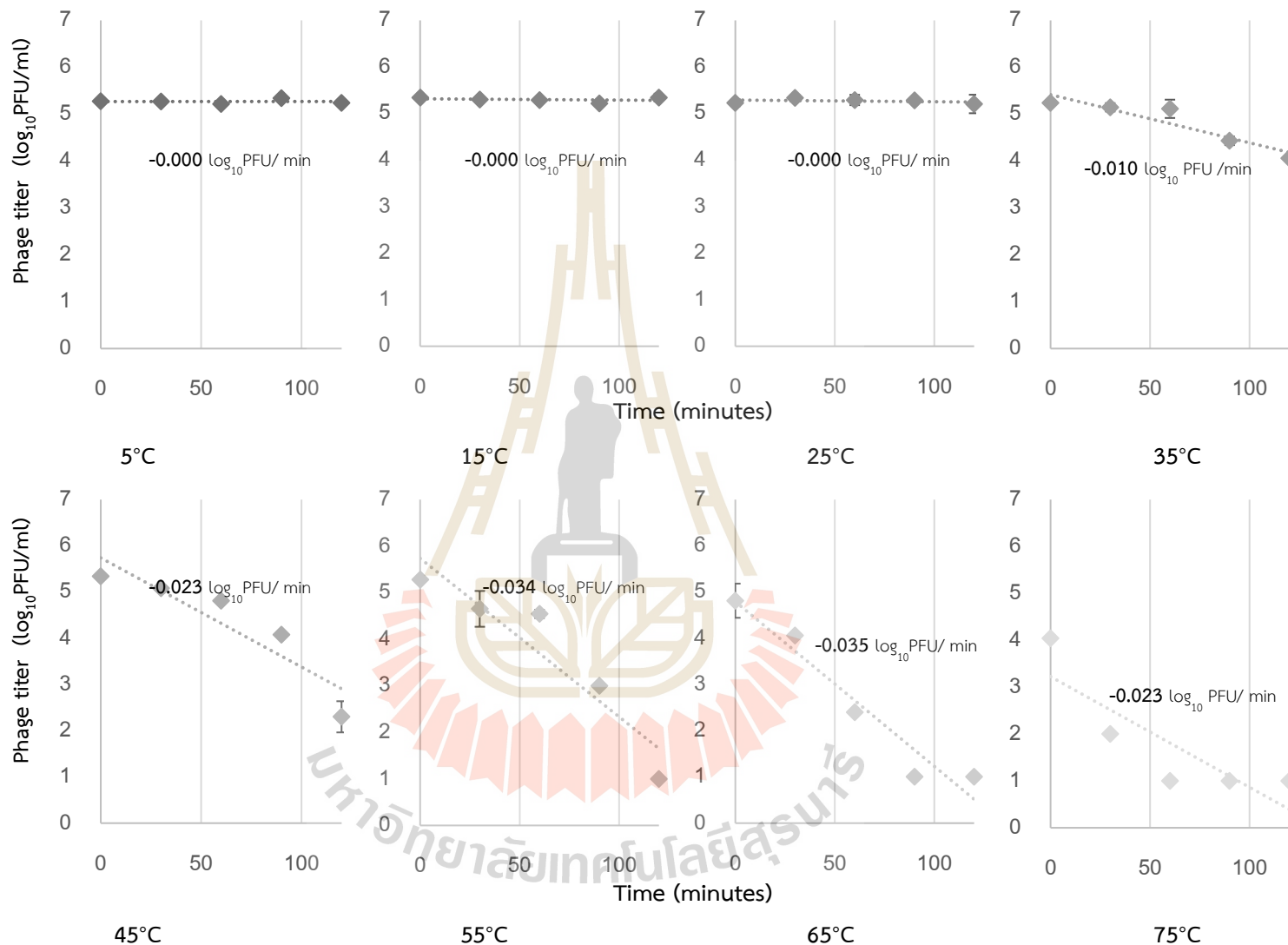
รูปที่ 27 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-bTM ที่อุณหภูมิ 4°C



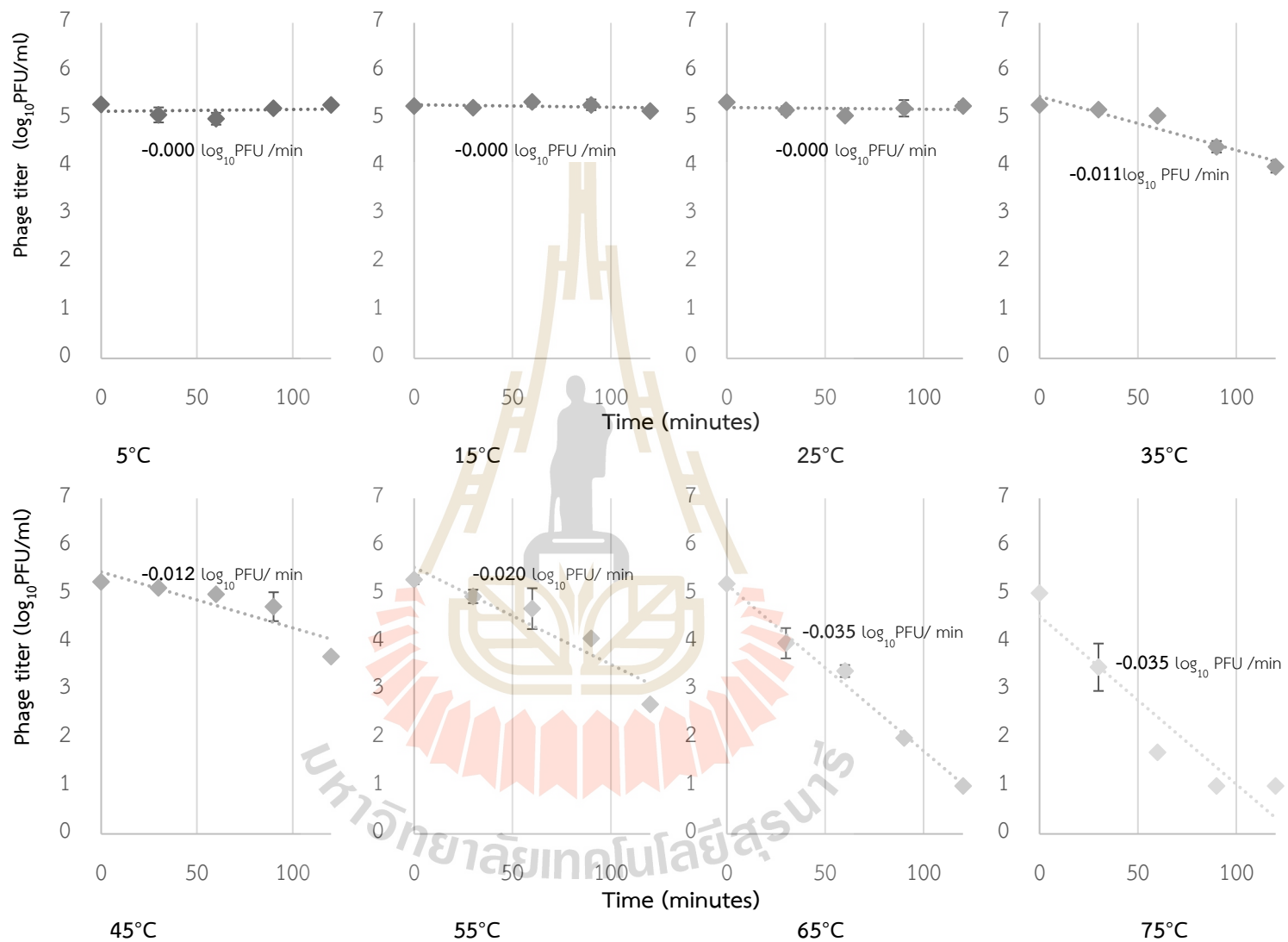
รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อความคงตัวของฟาจ vB_solmoM-bKK1 ที่อุณหภูมิ 4°C



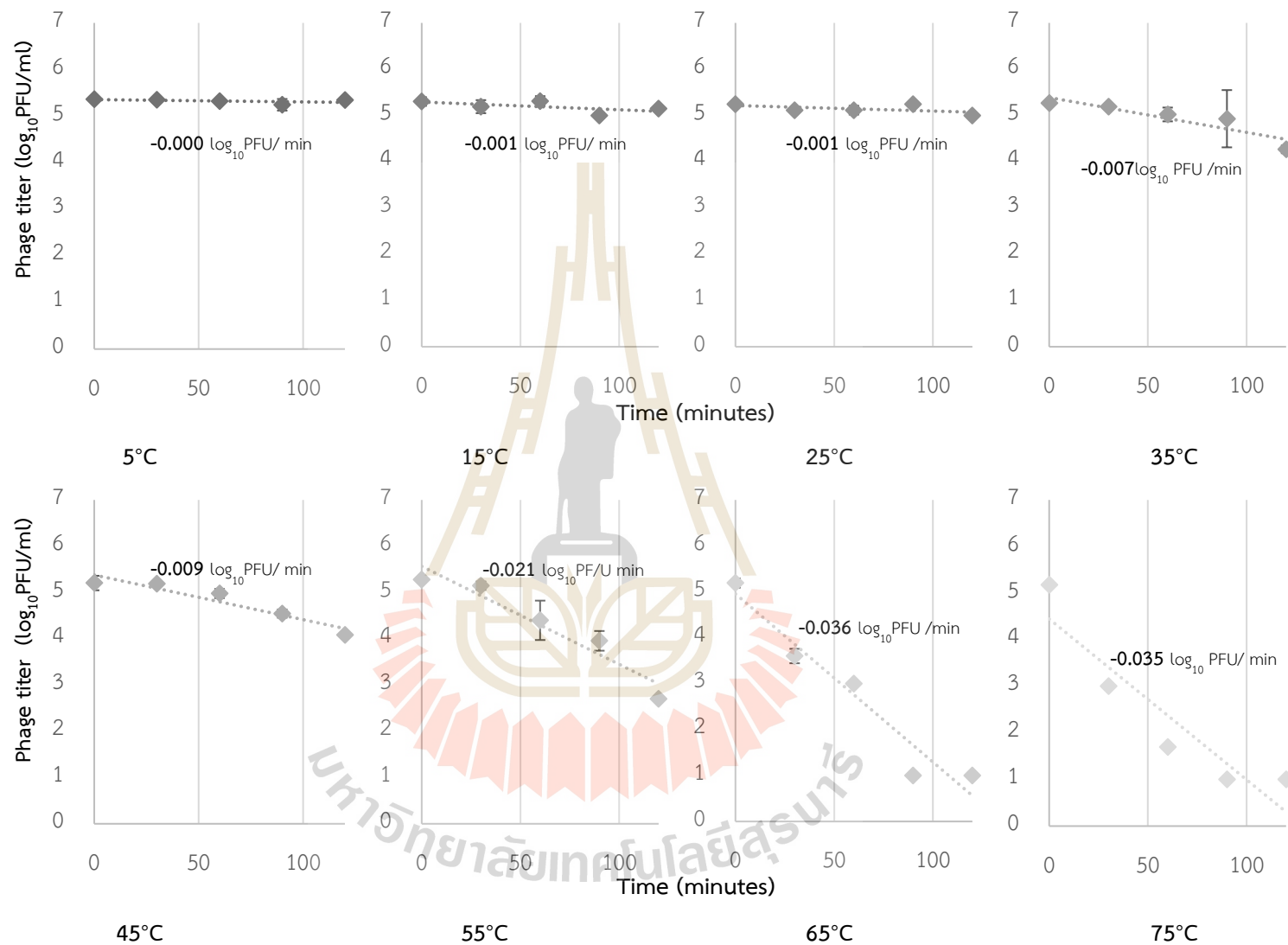
รูปที่ 29 ความคงตัวของฟาจ *vB_solmoM-pSN* ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2



รูปที่ 30 ความคงตัวของฟาจ *vB_solmoM-pYM* ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2



รูปที่ 31 ความคงตัวของฟาจ *vB_solmoM-bTM* ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2



รูปที่ 32 ความคงตัวของฟาจ *vB_solmoM-bKK1* ในช่วงอุณหภูมิ 5-75 °C ที่ pH 7.2

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกฟาจไลติกเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ในเนื้อสัตว์ชายปลึก โดยแยกฟาจจากเนื้อหมู เนื้อไก่ และเนื้อวัว โดยใช้ เชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เป็นโฮสต์ในการคัดเลือก สามารถแยกฟาจจากเนื้อหมูและเนื้อวัว และไม่สามารถแยกฟาจจากเนื้อไก่ โดยกำหนดชื่อฟาจที่คัดเลือกได้เป็น ฟาจ *vB_solmoM-pSN*, *vB_solmoM-pYM*, เป็นฟาจที่แยกได้จากเนื้อหมู และ *vB_solmoM-bTM* และ *vB_solmoM-bKK1* เป็นฟาจที่คัดแยกได้จากเนื้อวัว จากการศึกษาโครงสร้างของฟาจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน TEM สามารถระบุเบื้องต้นได้เป็น family: *Tectiviridae* ซึ่งมีรูปร่างเป็น icosahedra-shaped, ขนาด 63 nm, dsDNA, ขนาดประมาณ 40 kb มีโครงสร้างที่หุ้มด้วยโปรตีน (Protein Capsid) ที่หนาและแข็งแรง มีความยืดหยุ่นของโครงสร้างเป็น ไลโฟโปรตีน และเป็นไลติกฟาจ (Ackermann, 2005) จากการศึกษาฟาจการจำเพาะของฟาจต่อเชื้อแบคทีเรีย (Phage host range) ผลปรากฏว่าฟาจกลุ่มนี้สามารถกำจัดเชื้อ *Salmonella* และ *E.coli* สายพันธุ์อื่นๆ ได้เช่นกันแต่ประสิทธิภาพอยู่ที่ประมาณ 40-60% เมื่อเทียบกับโฮสต์ที่ใช้ผลิตฟาจ แต่อย่างไรก็ตามสามารถประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* และ *E. coli* ได้ จากผลการระบุชนิดฟาจ ลักษณะฟาจที่แยกได้จะคล้ายกับฟาจ PRD1 ซึ่งเป็นฟาจที่แยกได้จากเชื้อ *S. Typhimurium* เช่นเดียวกัน (Rydman and Bamford, 2002) มีโครงสร้างของเยื่อหุ้ม ซึ่งฟาจถูกจัดเป็น Enterobacteriophage ที่สามารถ infect เชื้อ pseudomonads และ *Enterobacteriaceae* (Olsen et al., 1974) โดยมีค่า Eclipse period, Latent period และ Rise period เฉลี่ยอยู่ที่ 37.5 ± 5.00 , 62.5 ± 12.58 , 32.5 ± 18.93 ตามลำดับ มีค่า Burst size เฉลี่ยอยู่ที่ 37.85 ± 22.92 PFU/cell ส่วนลักษณะอัตราการยึดเกาะของฟาจต่อโฮสต์แบคทีเรียเฉลี่ยอยู่ที่ 0.0078 ± 0.00059 PFU/mL min⁻¹ โดยมีค่า Adsorption Constant อยู่ที่ $3.291 \pm 0.025 \times 10^{-10}$ mL/min

5.1. ผลของฟาจต่อการลดเชื้อ *Salmonella* บนเนื้อสัตว์

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 บนผิวเนื้อหมู, เนื้อวัว และเนื้อไก่ ที่ถูกเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4°C ตลอด 8 ชั่วโมง มีความสามารถในการลดลงของปริมาณแบคทีเรียในเนื้อทั้ง 3 ชนิดด้วยฟาจ *vB_solmoM-pSN*, *vB_solmoM-pYM*, *vB_solmoM-bTM* และ *vB_solmoM-bKK1* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียให้มีค่าต่ำกว่าค่าที่ตรวจนับ (under detection limit) ได้เมื่อบ่มนาน 6 – 8 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมฟาจ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลงประมาณ 0.5-1.0 log₁₀ CFU/ml ซึ่งอาจจะเกิดจากที่เก็บเนื้อไว้ที่ 4 °C ซึ่งอาจจะทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บจากความเย็นและเป็นอุณหภูมิไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ *Salmonella* และความสามารถในการเพิ่มปริมาณฟาจเฉลี่ยให้คงอยู่ในเนื้อเฉลี่ยประมาณ 1-1.5 log₁₀ PFU/ml จากการศึกษาของ Abuladze et al. (2008) รายงานความสามารถของฟาจค็อกเทลที่ลดปริมาณ *E.coli* บนบนผิวหน้าของเนื้อวัวดิบลงได้ 94% ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10°C เช่นเดียวกับ ฟาจค็อกเทลที่แยกได้จากเนื้อไก่ เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. Enteritidis* ที่อุณหภูมิ 8 และ 25 °C บนเนื้ออกไก่ พบว่า สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ 1 และ 2 log₁₀ PFU

ตามลำดับ (Duc et. A., 2018) การควบคุมเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยใช้ฟาจ C35 จาก ที่ MOI สูง (MOI=100) แสดงอัตราการเพิ่มขึ้นของฟาจและการลดลงของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นและมีระยะเวลาการเก็บเนื้อัวเพิ่มขึ้นในทุกๆอุณหภูมิการเก็บรักษา (Greee, 1988) ในขณะที่การศึกษาของ Soni et al. (2010) พบว่าการเติมฟาจ P100 ณ MOI = 0.001 ของ *Listeria monocytogenes* ลงไปตัวอย่างเนื้อปลา และบ่มที่ 4°C นาน 10 วัน ปริมาณเชื้อกลับไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งฟาจแต่ละตัวที่แยกได้จากโฮสต์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการเข้ายับยั้งเชื้อที่ MOI แตกต่างกันไปด้วย โดย MOI ยิ่งสูง จะทำให้อัตราการยับยั้งปริมาณเชื้อและอัตราการเพิ่มขึ้นของฟาจต่อโฮสต์เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ในทางเดียวกัน MOI ที่ต่ำกว่า จะส่งผลให้อัตราการยับยั้งปริมาณเชื้อและอัตราการเพิ่มขึ้นของฟาจต่อโฮสต์เกิดขึ้นได้ช้าลง ซึ่งอาจมีปัจจัยในเรื่องความจำเพาะต่อโฮสต์สายพันธุ์นั้นๆด้วยเช่นกัน

ลักษณะพื้นผิวสัมผัสของเนื้อสัตว์แต่ละประเภทที่ส่งผลต่อความสามารถการลดปริมาณของเชื้อและการอยู่รอดของฟาจบนเนื้อหมู, เนื้อไก่และเนื้อวัว ให้เปอร์เซ็นต์การลดปริมาณเชื้อเฉลี่ย อยู่ที่ 100.00 ± 0.000, 83.86 ± 21.672 และ 100.00 ± 0.000% ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของฟาจ เฉลี่ยบนพื้นผิวเนื้อหมู, เนื้อไก่และเนื้อวัว ตลอด 24 ชั่วโมง อยู่ที่ 27.06 ± 21.801, 8.34 ± 4.000 และ 13.69 ± 9.390% ตามลำดับ เช่นเดียวกับฟาจที่แยกได้จาก *Brochothrix thermosphacta* ในตัวอย่างเนื้อวัว ทดสอบบนตัวอย่างผิวหนังเนื้อหมู ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-6°C สามารถลดปริมาณเชื้อบนผิวหนังได้ถึง 68% (Gordon and Dilts, 2002) และฟาจที่แยกได้จาก *Campylobacter* ในตัวอย่างเนื้อไก่ สามารถยับยั้งโฮสต์ตัวเดียวกันนี้บนเนื้อไก่ที่ถูกเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 4°C โดยมีการฟื้นตัวของเชื้ออยู่ที่ 44% เท่านั้น และอยู่ในสภาวะที่คงที่ตลอด 6 วัน ก่อนจะลดลงเรื่อยๆจนถึงวันที่ 10 (Atterbury et al., 2003) และเช่นเดียวกันกับฟาจ SE07 ที่แยกได้จาก *S. Enteritidis* ในตัวอย่างเนื้อไก่ กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ บนตัวอย่างเนื้อวัวและเนื้อไก่ได้ถึง 48.62% และ 48.97% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 48 ชั่วโมง (Thung et al., 2017)

5.2. ผลของฟาจในการกำจัดไบโอฟิล์ม

ความสามารถในการกำจัด biofilm ของเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ฟาจที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต มีความสามารถในการลดปริมาณ biofilm โดยเมื่อยิ่งเพิ่มความเข้มข้นฟาจก็ยังสามารถลดจำนวนเชื้อมากยิ่งขึ้น แสดงความสามารถในการยับยั้งปริมาณ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งเป็นเชื้อโฮสต์ได้อย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ในการทำลายคุณภาพของ biofilm ในฟาจเฉลี่ยอยู่ที่ 53.32-65.62% ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยที่ MOI สูง สามารถทำลาย biofilm สูงถึง 64.65±3.67% สอดคล้องกับการทดลองของ Kelly et al. (2012) ที่ทำการทดลองใน ฟาจ k ที่มีความเข้มข้นฟาจเริ่มต้นที่ 9-10 log₁₀ PFU (MOI= 1,000) สามารถเข้าไปลดปริมาณของเชื้อ *S. aureus* ใน biofilm ลงได้ภายใน 20 ชั่วโมง และสามารถลดค่า OD590nm ให้มีค่าน้อยกว่า 0.1 ใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับฟาจ P100 สามารถลด biovolume of biofilm ของเชื้อ *L. monocytogenes* บนแผ่น polystyrene จากการเติมฟาจความเข้มข้นสูง (8-11 log₁₀ PFU/ml) ลงได้ (Rodríguez-melcón, et al, 2018) นอกจากนี้ที่ MOI เดียวกันยังสามารถลด biofilm บนแผ่นสแตนเลส ลงได้ถึง 3.5-5.4 log₁₀ PFU/cm² (Soni and Nannapaneni, 2010) สำหรับการเพิ่มขึ้นของ

ฟาจ, vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM, vB_solmoM-bTM และ vB_solmoM-bKK1 บน biofilm นั้นมีค่าไม่แตกต่างกันตามชนิดของฟาจ จึงพิจารณาตามค่า MOI พบว่า ที่ MOI สูง แสดงการเพิ่มขึ้นสูงถึง $74.99 \pm 5.662\%$ โดยฟาจที่มีการเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ ฟาจ vB_solmoM-pYM (82.63%) และในทิศทางเดียวกันที่ MOI ต่ำ ให้ผลการเพิ่มปริมาณฟาจเพียง $57.81 \pm 14.963\%$ โดยฟาจที่มีการเพิ่มขึ้นต่ำสุดคือ ฟาจ vB_solmoM-bKK1 (41.15%) ซึ่งลักษณะการเพิ่มขึ้นของฟาจนี้ ส่งผลต่อการลดลงของเชื้อ ใน biofilm เช่นกัน ที่ MOI เดียวกันนั่นเอง รายงานความสามารถในการลดปริมาณเชื้อใน biofilm ของฟาจเฉลี่ยอยู่ที่ $34.56 \pm 7.64\%$ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Karunasagar et al. (2007) ที่ทำการศึกษาระดับยั้งใน biofilm บนแผ่น HDPE ของฟาจจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 49.64% ที่ MOI = 0.1 ภายในเวลา 18 ชั่วโมง จากผลการศึกษาที่กล่าวมาในข้างต้น พบว่า ฟาจที่เติมลงไปต้องมีปริมาณสูงมากพอสมควร (MOI > 0.1) จึงส่งผลต่ออัตราการลดลงของ biofilm, การเพิ่มจำนวนฟาจและการลดปริมาณเชื้อภายใน biofilm เนื่องจากฟาจสามารถผลิต exopolysaccharide-degrading enzymes (glycannases) ได้ จึงจะเข้าไปทำลายชั้น biofilm ที่เชื้อในกลุ่ม *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* และ *L. monocytogenes* สร้างขึ้น (Hudson, et al, 2005) นอกจากนี้ฟาจบางชนิดยังสามารถผลิต lysins ย่อย *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus* spp ได้เช่นกัน (Szafranski, et al., 2017) จึงนิยมใช้ฟาจในการเป็นตัวควบคุม biofilm ของเชื้อต่าง (Abedon, 2015) โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเพิ่มขึ้นของ biofilm จากการศึกษาของ Hughes et al. (2010) รายงานว่า biofilm ของ *Pseudomonas aeruginosa* หลังจากการเติมฟาจลง (MOI=1) ไปมีการลดลงมากกว่า $1 \log_{10}$ CFU/ml ภายในเวลา 4 ชั่วโมง และเมื่อมีการเติมฟาจเพิ่มลงไปทุกๆ 6 ชั่วโมง อัตราการลดลงจะเกิดรวดเร็วขึ้น แม้จะมีการเติมไฮโดรลีสไป ก็ยังสามารถถูกยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ มากกว่าการเติม antibiotic (tobramycin)

5.3. ผลของ pH, ความเข้มข้นเกลือและอุณหภูมิต่อความคงตัวของฟาจ

ความสามารถในการอยู่รอดของฟาจที่นำมาศึกษาทั้ง 4 ทดสอบภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ต่าง ใน SM buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดระยะเวลา 120 นาที สามารถอยู่รอดได้ดีในช่วง pH 7-8 โดยมีการสูญเสียของฟาจเฉลี่ยอยู่ที่ 3.60 ± 3.031 และ $3.76 \pm 1.932\%$ ในขณะที่ pH 3, 4, 5 และ 6 การสูญเสียเกิดเพิ่มขึ้นถึง 69.88 ± 25.507 , 61.04 ± 34.278 , 14.76 ± 6.064 และ $9.15 \pm 7.501\%$ ตามลำดับ ในสภาวะต่าง ที่ pH 9, 10 และ 11 การสูญเสียเกิดขึ้นเท่ากับ 20.97 ± 18.182 , 34.81 ± 29.646 และ $46.45 \pm 24.618\%$ ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ García et al. (2007) พบว่าการอยู่รอดของฟาจภายใต้ pH ที่ต่ำกว่า 5 ส่งผลให้ปริมาณฟาจอยู่รอดได้ลดลง เช่นเดียวกับฟาจที่แยกออกมาได้จากการศึกษาของ Khawaja et al. (2016) ที่มีความสามารถในการอยู่รอดในช่วง pH 6-8 และความสามารถของฟาจ PSPu-4-116 (*Myoviridae*) ที่อยู่รอดได้ ภายใต้ pH 4-9 ซึ่งส่งผลไปสู่สภาวะการเก็บฟาจ ภายใต้ SM buffer ที่เหมาะสมในช่วง pH 7-8 เช่นกัน แต่ในการทดลองเดียวกันนี้เอง ฟาจ PSPu-95 (*Siphoviridae*) จากโฮสต์เดียวกัน กลับแสดงความสามารถในการ

อยู่รอดในช่วง pH 4-10 ซึ่งกว้างกว่า (Bao et al, 2011) สอดคล้องกับ ความสามารถในการอยู่รอดในช่วง pH 4-11 ของฟาจ SE07 ต่อเชื้อ *S. Enteritidis* ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C (Thung et al, 2017) เช่นกัน

ความเข้มข้นเกลือที่อาจมีผลต่อการอยู่รอดของฟาจที่แยกได้ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อหรือการประยุกต์ใช้ในตัวอย่างอาหารอื่นๆ โดยความสามารถในการอยู่รอดเฉลี่ยของฟาจทั้ง 4 ที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 0, 5, 10, 15, 20 และ 25% อยู่ที่ 2.848±2.29, 13.215±3.63, 28.647±8.63, 41.556±2.38, 59.149±15.40 และ 76.817±6.84% ตามลำดับ จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นเกลือ 15% เป็นต้นไป การสูญเสียเกิดขึ้นเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่นเดียวกับฟาจที่แยกได้จากเชื้อ *E.coli* ที่อยู่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือ 20 และ 30% เป็นเวลา 12 และ 10 ชั่วโมง แสดงการลดจำนวนลงของฟาจอยู่ที่ 90และ91.5% (Silva, et al, 2014) โดยฟาจที่แยกได้ส่วนใหญ่จะสามารถอยู่รอดได้ในเกลือความเข้มข้นต่ำ เช่นเดียวกับฟาจ PhVh6 ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเกลือ อยู่ที่ 15,30,45 ppt (Ibrahim et al, 2017)

อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม มีผลต่อความสามารถในการอยู่รอดของฟาจ ณ อุณหภูมิที่ 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 และ 75°C นั้น แสดงผลของการอยู่รอดเท่ากับ 0.357±0.23, 1.344±1.36, 3.174±2.66, 19.764 ± 4.96, 34.320±15.51, 58.658±15.26, 79.825±1.15 และ 77.643±3.19% ตามลำดับ พบว่าที่ ช่วงอุณหภูมิ 5-25°C เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการรักษาสภาพฟาจ ในขณะที่ 35-45 การสูญเสียเริ่มเกิดขึ้นเล็กน้อยก่อนจะสูงมากกว่า 50% ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นต้นไป เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thung et al. (2017) ที่ทดสอบอุณหภูมิสำหรับฟาจ SE07 ของเชื้อ *S. Enteritidis* สามารถอยู่รอดได้ (มากกว่า 8 log) นาน 1 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 25-45°C และคงตัวได้ที่อุณหภูมิที่ 37°C ก่อนจะลดลงน้อยกว่า 2 log₁₀ PFU ที่อุณหภูมิ 65°C (Khawaja, et al., 2016)



สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้จากเนื้อหมูและเนื้อวัว โดยใช้เชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 สามารถระบุคุณลักษณะเบื้องต้นจากภาพกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด จัดเป็นสกุล *Tectiviriae* ซึ่งเป็นไลติกฟาจที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์เซลล์เริ่มต้น แต่ก็แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *S. Anatum*, *S. Newport*, และ *E. coli* เป็นต้น โดยให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับโฮสต์เซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติ polyvalent phage host range ซึ่งเป็นผลดีในการใช้ควบคุมเชื้อได้หลากหลาย โดยเฉพาะในกลุ่ม pathogenic *Enterobacteriaceae*

ผลของกรด-ด่าง, ความเข้มข้นเกลือและอุณหภูมิ ฟาจสามารถคงตัวอยู่ที่ 5-9 และไม่คงตัวในสภาวะที่กรดสูงหรือความเป็นด่างสูง และสามารถทนเกลือได้ถึง 15% อยู่ได้ที่อุณหภูมิ 4-35 °C และสามารถถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ มากกว่า 60 °C ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเราสามารถประยุกต์ใช้ฟาจในอาหารที่มีความเป็นกรดอ่อนและอาหารที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 15% เพื่อควบคุมเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ และถ้าผู้บริโภคมีความกังวลในเรื่องความปลอดภัยในการใช้ฟาจในอาหาร สามารถแนะนำเรื่องการใช้ความร้อนในการปรุงอาหารให้มีความเข้มข้นของอุณหภูมิถึง 70 °C ซึ่งสามารถทำลายฟาจได้

นอกจากนี้ฟาจที่คัดแยกได้ยังสามารถกำจัด *Salmonella* บนเนื้อหมู เนื้อไก่ และเนื้อวัว รวมถึงการกำจัด biofilm ของเชื้อ *Salmonella* ได้ ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นยังสามารถลดปริมาณ Biofilm ได้ดี ฟาจที่คัดเลือกจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อ *Salmonella* ในกระบวนการผลิตหรือในผลิตภัณฑ์เนื้อ

บรรณานุกรม

- ยุทธพงษ์ ศรีมงคล, สมเกียรติ ทองเล็ก, จุฑารัตน์ ศรีณภู, สถาพร เทียมพูล, บัญชากร เหลลาลา, เผด็จ ผกาศรี และ อนุชาติ คล่องยุทธ.(2555). การสอบสวนการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานเนื้อหมูปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* group B อำเภอเขาฉกรรจ์จังหวัดสระแก้ว วันที่ 30 สิงหาคม - 4 กันยายน 2554. *รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์*, 43 (11):161-169.
- สุวัฒน์ มลิจารย์ และ ศิริจันทร์ทิพย์ วนาประเสริฐศักดิ์.(2556). การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดราชบุรี. *ทะเบียนวิชาการ* เลขที่:56 (2)-0116(7)-107.
- สรรเพชญ อังกิติตระกูล, ประสาน ตั้งควัฒนา, อรุณี พลภักดี และ เตชา สิทธิกุล. (2554). ความชุก และการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลลาที่แยกได้จากเนื้อวัวในเขตเทศบาลนครขอนแก่น. *วารสารวิจัย มข*, 16 (2): 105-111.
- Abuladze, T., Li, M., Marc, Y., Menetrez, D.T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (20): 6230–6238.
- Ackermann, H.W. (2005). Bacteriophage Classification, p. 67-90 In Kutter E and Sulakvelidze A (eds), Bacteriophages: biology and applications, *CRC Press*, Boca Raton.
- Anon, 2013a. Intralytix Wins Regulatory Approval for Phage-Based Food Safety Product Effective Against *Salmonella*. [Online] Available at http://www.intralytix.com/Intral_News_PR022713.htm.
- Anon, 2013b. FDA approves SALMONELEXTM against *Salmonella* as new food processing aid [Online] Available at <http://www.micreos.com/news/fda-approves-salmonex-against-salmonella-as-new-food-processing-aid.aspx>.
- AlbinoLuiz, A.A, RostagnoMarcos, H., HúngaroHumberto, M., and MendonçaRegina, C.S. (2014). Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophages for *Salmonella* spp. Bio-control in Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11: 602-609.
- Atterbury, R.J., Connerton, P.L., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D. and Connerton, I.F. (2003). Isolation and Characterization of *Campylobacter* Bacteriophages from Retail Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4511–4518.
- Atterbury, R.J., Van Bergen, M.A., Ortiz, F., Lovell, M.A., Harris, J.A., De Boer, A., Wagenaar, J.A, Allen, V.M, and Barrow, P.A. (2007). Bacteriophage therapy to reduce *salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 4543-4549.

- Baggesen, D.L., Sørensen, G., Nielsen, E.M, and Wegener, H.C. (2010). Phage typing of *Salmonella* Typhimurium is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation, *Euro Surveillance*, 15(4): 19471.
- Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R.S., Lo Fo Wong, D.M.A., and Aarestrup, F.M. (2004). *Salmonella* Serovars from Humans and Other Sources in Thailand, 1993–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 10:131-136.
- Bao, H., Zhang, H. and Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Science*, 90(10): 2370–2377
- Connerton, I.F. and Hooton, S. P.T. (2013). Bacteriophages. WO 2013024304 A1.
- Duc, H.M., Son, H.M., Honjoh, K. and Miyamoto, T. (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *LWT-Food Science and Technology*, 91: 353–360.
- García, P., Madera, C., Martínez, B. and Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*, 10(7): 1232-1239.
- Gordon, G.G. (1988). Effects of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage. *Journal of Food science*, 53(4): 1226-1227.
- Gordon, G.G. and Dilts, B.D. (2002). Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. *Journal of Food Protection*, 65(5): 861–863.
- Guttman, B., Raya, R., and Kutter, E. (2005). Basic phage biology, p. 29-66 In Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (eds), Bacteriophages: biology and applications, *CRC Press*, Boca Raton.
- Hooton, S.P.T., Timms, A.R., Rowsell, J., Wilson, R. and Connerton, I.F. (2011). *Salmonella* Typhimurium specific bacteriophage Φ SH19 and the origins of species specificity in the Vi01-like phage family. *Virology Journal*, 8:498.
- Hudson, J. A., Billington, C., Carey-smith, G. and Greening, G. (2005) Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of food protection*.68(2): 426-437.
- Hughes, G., Walker, J.T., Sharp, R., Hart A. (2010). Bacteriophage for the treatment of bacterial biofilm. WO2004062677 A1.
- Ibrahim, W.N.W., Aznan, A.S., Saari, N.A., Lee, K., Musa, N., Razzak, L.A., Danish-Daniel, M., Zainathan, S.C., Din, M.S.M., Ghaffar, M.A. and Musa, N. (2017) In-vitro characterization of lytic bacterio-phage PhVh6 as potential pathogenic *Vibrio harveyi* biocontrol agent against. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-bioflux*, 10(1): 64-76.

- Karunasagar, I., Shivu, M.M., Girisha, S.K., Krohne, G. and Karunasagar, I. (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*, 268: 288–292.
- Kelly, D., McAuliffe, O., Ross, R.P. and Coffey, A. (2012). Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Letters in Applied Microbiology*, 54(4): 286-291.
- Khawaja, K. A., Abbas, Z. and Rehman, S. (2016) Isolation and characterization of lytic phages TSE1-3 against *Enterobacter cloacae*. *Open Life sciences*, 11(1): 287-292
- Llagostera, M., Barbé, J., Bardina, C., Cortés, M.P., Spricigo, D.A. (2014). Novel *salmonella* bacteriophage compositions and uses thereof. US 20140219968 A1, CA2843182A1, EP2550870A1, EP2750519A1, WO2013014273A1.
- Mahony, J., Auliffe, O.M, Ross, R.P, and Van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:157-163.
- Olsen, R.H., SIAK, J-S. and Gray, R.H. (1974). Characteristics of PRD1, a Plasmid-Dependent Broad Host Range DNA Bacteriophage. *Journal of Virology*, 14(3): 689-699.
- Rodríguez-melcón, C., Capita, R., García-fernández, C. and Alonso-calleja, C. (2018). Effects of Bacteriophage P100 at Different Concentrations on the Structural Parameters of *Listeria monocytogenes* Biofilms. *Journal of Food Protection*, 81(2): 2040-2044.
- Rydman, P.S. and Bamford, D.H. (2002). The Lytic Enzyme of Bacteriophage PRD1 Is Associated with the Viral Membrane. *Journal of Bacteriology*, 184(1): 104-110.
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N.C.M.and Almeida A. (2014) Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture, *Microbial biotechnology*, 7(5): 401-413.
- Sirichote, P., Bangtrakulnonth, A., Tianmanee, K., Unahalekhaka, A., Oulai A., Chittaphithakchai, P., Kheowrod, W., and Hendriksen, R.S. (2010). Serotypes and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* ssp. In Central Thailand, 2001-2006. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 44: 1405-1415.
- Siringan, P., Connerton, P.L., Cummings, N.J., and Connerton, I.F. (2014). Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biol.* 4: 130200. [Online] Available at <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.130200>.
- Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortés, P., and Llagostera, M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 165: 169–174.

- Soni, K.A., Nannapaneni, R. and Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Fresh Channel Catfish Fillets by Bacteriophage Listex P100, *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(4): 427-434.
- Soni, K.A. and Nannapaneni, R. (2010). Removal of *Listeria monocytogenes* Biofilms with Bacteriophage P100. *Journal of Food Protection*, 73(8):1519-1524.
- Stephen T. A. (2015). Ecology of Anti-Biofilm Agents II: Bacteriophage Exploitation and Biocontrol of Biofilm Bacteria. *Pharmaceuticals*, 8(3): 559-589
- Sulakvelidze, A. (2011). Safety by nature: Potential bacteriophage applications. *Microbe*, 6(3):122-126.
- Szafranski, S.P., Winkel, A. and Stiesch, M. (2017). The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *Journal of Biotechnology*, 250: 29-44.
- Thung, T.Y., Premarathne, J.M.K.J., Chang, W.S., Loo, Y.Y., Chin, Y.Z., Kuan, C.H., Tan, C.W., Basri, D.F., Radzi, C.J.W.M. and Radu, S. (2017). Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT-Food Science and Technology*, 78: 222-225.
- Von Jagow, C., and Teufer, T. (2007). Bacteriophages in the production of foodstuffs: a legal introduction. *Europe Food Feed Law Review*, 3: 136-145.
- Wong, C.L., Sieo, C.C., Tan, W.S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., and Ho, Y.W. (2014). Evaluation of a lytic bacteriophage Φ st1 for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 172: 92-101.

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. พัชรินทร์ ศิริงาน
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Patcharin Siringan

- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง
จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30000
โทรศัพท์ (044)224681 โทรสาร (044)224150
E-mail; p_siringan@sut.ac.th

- ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	วิชาเอก	สถาบันการศึกษา
2000	ปริญญาตรี (B.Sc. 2 nd Hon)	Food Technology	Suranaree University of Technology, Thailand
2005	ปริญญาโท (M.Sc.)	Food Technology	Suranaree University of Technology, Thailand
2013	ปริญญาเอก (Ph.D.)	Food Microbiology	University of Nottingham, UK

- ผลงานตีพิมพ์

- Brathwaite, K.J., **Siringan, P.**, Connerton, P.L. and Connerton, I.F. 2015. Host adaption to the bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni*. Res. Microbiol. 166(6): 504-515.
- Siringan, P.**, Connerton, P.L., Cummings, N.J., and Connerton, I.F. 2014. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. Open Biol. 4: 130200. [Online] Available at <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.130200>
- Brathwaite, K.J., **Siringan, P.**, Moreton, J., Wilson, R., and Connerton, I.F. 2013. Genome sequence of universal bacteriophage host strain *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* PT14. Genome Announcements 1(6): e00969-13.
- Connerton, I.F., **Siringan, P.** and Cummings, N.J. 2012. Recombination and diversity amongst *Campylobacter* bacteriophage in chickens (unpublished). *Campylobacter* phage CP30A, complete genome, GeneBank no. NC_018861.1
- Siringan, P.**, Connerton, P.L., Payne, R.J.H. and Connerton, I.F. 2011. Bacteriophage-Mediated Dispersal of *Campylobacter jejuni* Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 77: 3320-3326.

- Siringan, P.,** Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. 2006. Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus* spp.) during fish sauce fermentation. *J. Sci. Food Agri.* 86: 1970-1976.
- Siringan, P.,** Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Chem.* 98: 678-684.
- Siringan, P.,** Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. 2006. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus* spp.). *Food Chem.* 101: 82-89.
- Siringan, P.,** Connerton, P.L. and Connerton, I.F. 2013. The bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni*. CHRO 2013 Conference: 17th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (Aberdeen, UK). Abstract
- Siringan, P.,** Connerton, P.L. and Connerton, I.F. 2010. Bacteriophage treatment on *Campylobacter* biofilms. Society for Applied Microbiology (SfAM) Summer Conference 2010 (Brighton, UK).Poster
- Siringan, P.,** Connerton, P.L. and Connerton, I.F. 2009. Effect of bacteriophages on *Campylobacter* biofilms on a glass surface. CampyUK2009 Scientific program (Norwich, UK). Poster