

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 ที่มาจกแหล่งแตกต่างกัน คือ vB_solmoM-pSN, vB_solmoM-pYM และฟาจในเนื้อวัวแยกได้ 2 ไอโซเลต ที่มาจกแหล่งแตกต่างกัน 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% ฟาจเริ่มเสถียรภาพ 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