

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อแบคทีริโอฟาจจากน้ำนมโค เพื่อนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อใช้ในอุตสาหกรรมนมจากแหล่งน้ำนมดิบของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตนมดิบรายย่อยเชียงใหม่และเชียงราย 3 แห่ง มีจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง  $1.1 \times 10^5 - 2.5 \times 10^9$  cfu/ml ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบได้ 20 ไอโซเลท และแยกแบคทีริโอฟาจโดยวิธี Double Layer Agar Technique ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสได้ 17 ไอโซเลท ทดสอบความต้านทานของแบคทีเรียต่อฟาจโดยวิธี Spot Test 56 ไอโซเลท วิจัยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกโดยวิธี gene sequencing และชุดทดสอบ API ได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ดังนี้ นมดิบของสมาชิกโรงงานนม อสก. ห้วยแก้ว เชียงใหม่ 3 ราย ได้แก่ รหัส 7010 พบ *Enterococcus faecium* ทั้งหมด 1 สายพันธุ์ รหัส 7021 พบ *E. faecium* ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ และ *E. faecalis* 2 สายพันธุ์ รหัส 7009 พบ *E. faecium* 1 สายพันธุ์ สหกรณ์โคนมแม่ใจ พบ *E. durans* 4 สายพันธุ์ *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ และ *Leuconostoc* spp. 1 สายพันธุ์ สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ พบ *E. faecium* 6 สายพันธุ์ และ *Leuconostoc* spp. 1 สายพันธุ์ คัดเลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากนมดิบคือ *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) ที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่ใจและ *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-19 (hสด) ที่แยกได้จากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง มาเลี้ยงในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ในสภาวะมีฟาจ โดยฟาจที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ  $\phi$ FSCMU40-061 ที่คัดแยกได้จาก *E. faecium* FSCMU40-061 ซึ่งเป็นฟาจที่มีขนาดดีเอ็นเอมากกว่า 3000 คู่ สามารถย่อยสลายแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกได้หลายสายพันธุ์ทั้งแกรมบวก รูปร่างกลมและแท่ง จึงใช้เป็นฟาจมาตรฐานในการทดสอบ พบว่า FSCMU 44-10 (IMJ) สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.31 และมีฟาจ  $5.3 \log$  pfu/ml และ h สด FSCMU 44-19 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.27 และมีฟาจ  $6.2 \log$  pfu/ml ในขณะที่เชื้อ *Streptococcus thermophilus* TISTR894 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR895 ซึ่งใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อฟาจ พบว่า *S. thermophilus* TISTR894 ผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.33 มีฟาจ  $7.7 \log$  pfu/ml และ *Lb. bulgaricus* TISTR895 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.37 และมีฟาจ  $5.6 \log$  pfu/ml สรุปว่า *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) ที่แยกได้จากการทดลองนี้มีความสามารถในการทนต่อฟาจมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก แกรมบวก รูปร่างกลม อีก 2 สายพันธุ์ ที่ได้ในการทดลองนี้

This project aimed to isolate LAB resistant to bacteriophage from raw milk to be used to produce fermented milk products. There were 3 raw milk sources from farms in Chiang Mai and Chiang Rai province contained  $1.1 \times 10^5$ - $2.5 \times 10^9$  cfu/mL total counts which 20 isolates of LAB and 17 phages (bacteriophage, phage) were isolated by Double Layer Agar Technique at  $44^\circ\text{C}$ . Bacteria were tested against 56 isolated phages for bacterial resistance by Spot Test. There were 19 LAB strains identified from raw milk by gene sequencing technique and API test kits from 3 raw milk sources. One strain of *Enterococcus faecium* from Hauy Kaew Dairy Factory member no. 7010, whereas 2 strains of *E. faecium* and 2 strains of *E. faecalis* were found from member no. 7021 and *E. faecium* from member no. 7009. There were 4 strains of *E. durans*, one strain of *E. faecalis* and one strain of *Leuconostoc* spp. isolated from Mae Jo, while 6 and 1 strains of *E. faecium* and *Leuconostoc* spp. respectively were identified from Sanpatong-Maewang Co-operatives in Chiang Mai. Selected 2 strain of LAB, *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) isolated from Mae Jo Co-operatives and *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-19 (หสจ) from Sanpatong-Maewang was cultured in 10% skim milk with 8 log(pfu/ml) phage. Phage  $\Phi$ FSCMU40-061, isolated from *E. faecium* FSCMU40-061 was used as reference phage. It contained more than 3000 base pairs DNA and was able to lyse both Gram positive cocci and rod LAB. FSCMU 44-10 (IMJ) was able to produce ave. 0.31% acid with 5.3 log(pfu/ml) phage and FSCMU 44-19 (หสจ) was able to produce ave. 0.27% acid with 6.2 log(pfu/ml) phage. *Streptococcus thermophilus* TISTR894 and *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 895 were used as reference culture. *S. thermophilus* TISTR894 was able to produce ave. 0.33% acid with 7.7 log(pfu/ml) phage and *Lb. bulgaricus* TISTR 895 produced ave. 0.37% acid with 5.6 log(pfu/ml) phage. In conclusion, isolated *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) from this experiment showed the highest phage resistance compared to the other 2 LAB gram positive cocci.