



การเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมโค กลุ่มเซลล์โซมาติกสูงและต่ำในจังหวัดพัทลุง

Comparison of Bacterial Population Structure in High and Low Somatic Cell Bovine Milk in Patthalung Province

ศุภชัย นิติพันธ์^{1*} นฤกุล อินทรสังขา¹ และ จิตรพล ประดิษฐ์ธรรม¹

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93210

*Corresponding Author, E-mail: supachai_nitipan@hotmail.com

Received: 13 September 2017 | Revised: 2 May 2018 | Accepted: 4 October 2018

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมโคที่แตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มปริมาณเซลล์โซมาติกต่ำ (Low somatic cell; LSC) และกลุ่มปริมาณเซลล์โซมาติกสูง (High somatic cell; HSC) ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงและไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์โซมาติกตรวจนับด้วยวิธี California mastitis test (CMT) และเครื่องนับเซลล์ Fossomatic 5000 โดยจำแนกความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้ข้อมูลสารพันธุกรรมตำแหน่ง V3 ของยีน *16S rRNA* ด้วยเทคนิค DGGE เก็บตัวอย่างจากฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยทักษิณ อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร PCA จากทั้งสองกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างตัวอย่าง HSC และ LSC จำนวนแบคทีเรียเฉลี่ย (Log CFU/ml) เท่ากับ 4.75 ± 0.9 , 4.29 ± 0.87 และ 3.81 ± 1.32 ในตัวอย่าง CMT0 CMT+2 และ CMT+3 ตามลำดับ พบแบคทีเรีย 4 ไฟลัม ได้แก่ Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria และ Bacteroidetes จากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ มีจีโนส *Staphylococcus* และ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียเด่น และ *Corynebacterium* spp. มีความถี่ในตัวอย่างกลุ่ม HSC สูงกว่า LSC ในขณะที่ *Sphingobacterium* spp. พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม HSC ไม่พบใน LSC ในขณะที่วิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบไฟลัม Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria และ Uncultured bacteria มีจีโนส *Streptococcus* spp. *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียเด่น

ABSTRACT

This study is aimed to compare the bacterial population structure of two different raw milk sample groups, low somatic cell (LSC) and high somatic cell (HSC) samples, using culture-dependent and culture-independent methods. The somatic cell count was estimated by California Mastitis Test (CMT) and Fossomatic 5000. Based on difference of V3 sequences of *16S rRNA* gene using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), bacterial diversity was identified. The bovine raw milk samples were collected from dairy farm of Thaksin University, Phayayom district, Patthalung province. The total bacterial counts in both samples were grown on Plate Count Agar (PCA) that showed no significant difference ($p < 0.05$) between HSC and LSC which were 4.75 ± 0.9 , 4.29 ± 0.87 and 3.81 ± 1.32 Log CFU/ml of CMT0, CMT+2 and CMT+3, respectively. There are four bacterial phyla from culture-

dependent methods including Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria and Bacteroidetes. This method showed that the genera of *Staphylococcus* and *Bacillus* were dominant bacteria and *Corynebacterium* spp. were frequency detected from HSC samples higher than LSC samples. Moreover, *Sphingobacterium* spp. were presented in HSC but not in LSC. While culture-dependent methods showed three phyla including Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria as well as uncultured bacteria. *Streptococcus* spp. *Lactobacillus* spp. and *Bacillus* spp. were detected as dominant bacteria.

คำสำคัญ: โครงสร้างประชากร แบคทีเรีย น้ำนมโค โชมaticเซลล์ พัทลุง

Keywords: Bacterial population structure, Bacteria, Bovine milk, Somatic cell, Patthalung

บทนำ

โรคเต้านมอักเสบในโคนม (Bovine mastitis) เป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ น้ำนมจากโคนมที่เป็นโรคจะมีปริมาณและคุณภาพลดลง โคนมที่เป็นโรคนี้อาจแบ่งตามอาการได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (Clinical mastitis) และกลุ่มโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (Subclinical mastitis) การประเมินความรุนแรงของโรคในกลุ่มไม่แสดงอาการใช้วิธีการประเมินเซลล์โชมaticในน้ำนมด้วยวิธี CMT (California mastitis test) ซึ่งโคนมที่เกิดการอักเสบของเต้านมจะมีจำนวนเซลล์โชมaticในน้ำนมมากกว่าโคนมปกติ เซลล์โชมaticเหล่านี้เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อในเต้านม และเป็นเซลล์เนื้อเยื่อที่หลุดลอกออกจากต่อมน้ำนม (Secretory tissue) เมื่อโคนมแสดงอาการรุนแรงหรือเป็นโรคแบบเรื้อรัง (Lee et al., 1980)

โรคเต้านมอักเสบมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียหลายชนิด แบ่งเป็นกลุ่มตามความถี่ที่พบได้ 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกลุ่มหลัก (Major mastitis pathogenic bacteria) เช่น แบคทีเรีย *Streptococcus* spp. (*Str. agalactiae* *Str. dysgalactiae* *Str. uberis* *Str. bovis*) (Picard et al., 2004; Rasolofo et al., 2010) และ *Staphylococcus aureus* (Renee et al., 2001; Kalorey et al., 2007; Kuang et al., 2009; Rasolofo et al., 2010; Kuehn et al., 2013) เป็นต้น และแบคทีเรียกลุ่มรอง (Minor mastitis pathogenic bacteria) เช่น *Escherichia coli* *Enterobacter* spp. *Bacillus* spp. *Klebsiella* spp. และ *Corynebacterium* spp. (Kuehn et al., 2013; Braem et al., 2012) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียอาศัยในสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียอื่น ๆ ที่มีรายงานเพียงเล็กน้อย เช่น *Pseudo-*

monas spp. *Mycoplasma* spp. *Sphigomonas* spp. และ *Lactobacillus* spp. (Lafarge et al., 2004; Oikonomou et al., 2012) เป็นต้น วิธีมาตรฐานของการตรวจแบคทีเรีย คือ การเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture-dependent method) แล้วจำแนกชนิดด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งต้องใช้เวลานานและไม่สามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ทุกกลุ่ม เนื่องจากข้อจำกัดของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้เลี้ยง จึงมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจระบุชนิดของเชื้อในน้ำนมโดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-independent) เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยตรงในตัวอย่างน้ำนมมีหลายวิธี เช่น fluorescence in situ hybridization (FISH) (Intrasungkha et al., 2009) denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Kuang et al., 2009) restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Frey et al., 2006) และ High-throughput sequencing (Zhang et al., 2014) เป็นต้น

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงต้องการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์โชมaticสูง (HSC) และตัวอย่างที่มีเซลล์โชมaticต่ำ (LSC) ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยใช้ข้อมูลสารพันธุกรรมตำแหน่ง V3 ของยีน 16S rRNA และเทคนิค DGGE ค้นหาความแตกต่างของแบคทีเรียจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียเครื่องหมายสำหรับเฝ้าระวังการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนม

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนม

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมของมหาวิทยาลัยทักษิณ อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ก่อนเก็บตัวอย่างทำความสะอาดเต้านมโคด้วย 0.02% Bioten (Alkyl benzyl methyl ammonium chloride) และบีบน้ำนมครั้งแรกทิ้ง จากนั้นตรวจเซลล์โซมาติกด้วยวิธี CMT แล้วใช้เกณฑ์ค่า CMT แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกตัวอย่างที่มีค่าเซลล์โซมาติกต่ำ (Low somatic cell: LSC) CMT เท่ากับ 0 และกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าเซลล์โซมาติกสูง (High somatic cell: HSC) CMT เท่ากับ +2 และ +3 แต่ละตัวอย่างเก็บน้ำนมปริมาณ 100 ml รักษาอุณหภูมิ 4°C จนถึงห้องปฏิบัติการ แบ่งน้ำนมเป็น 3 ส่วน ปริมาตร 20 30 และ 50 ml สำหรับสกัด gDNA ของแบคทีเรียโดยตรง ตรวจหาปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Fossomatic 5000 ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์แพทยภาคใต้ อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช และตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ

การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี spread plate (AOAC, 2005)

เจือจางตัวอย่างน้ำนมปริมาณ 25 ml ใน Butterfield's Phosphate Buffer (BPB) ปริมาตร 225 ml แล้วเจือจางต่อเนื่อง (Serial dilution) จนได้ความเจือจางในระดับ 10^{-5} ปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางปริมาณ 0.1 ml ใส่ในจานอาหาร Plate count agar (PCA) (Himedia, India) บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากตรวจนับแบคทีเรียแล้วใช้สาลีปลอดเชื้อกวาด (Swap) เชื้อบนจานอาหารลงในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 3 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex mixture นาน 1 นาที ตูดส่วนใส 2 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับขั้นตอนสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA; gDNA) แบคทีเรีย

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมกลุ่ม LSC และ HSC กลุ่มละ 4 ตัวอย่างซึ่งมีความแตกต่างของปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้แก่ HTSU-01 HTSU-02 HTSU-05 HTSU-06 MTSU-11 MTSU-13 MTSU-19 และ MTSU-20 ปริมาตร 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ และตะกอนเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้างต้น นำมาสกัด gDNA ของ

แบคทีเรียด้วยชุดสกัด PureLink Genomic DNA kits (Invitrogen, USA) วิธีตามคำแนะนำของบริษัท จากนั้นวัดปริมาณ gDNA ที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 1.5% agarose gel electrophoresis ในสารละลาย TAE buffer กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (10 v/cm) นาน 45 นาที ย้อมด้วย SyBr gold (Thermo Fisher Scientific, USA) และตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ถ่ายภาพด้วย Gel Doc XR™ System (Bio-Rad)

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ V3 (variable region) ของแบคทีเรีย ด้วยวิธี nested PCR

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ 27f: (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1525r (AAGGAGG TGATCCAGCC) (Lane et al., 1991) ปริมาตรรวม 50 µl ประกอบด้วย 5X Phusion HF buffer (Thermo Scientific, EU) 7 mM MgCl₂ 200 µM dNTP 25 µM primer set 1 U High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, U.K) และ 10 ng ของ gDNA ใช้เครื่องเทอร์โมไซเคิลรุ่น T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA) ประกอบด้วย 30 รอบ ของ 95 °C 1 นาที 54 °C 45 วินาที และ 72 °C 45 วินาที แล้วทำบริสุทธิ์ผลผลิต PCR ด้วย PureLink PCR product purification (Invitrogen, USA) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ แล้วเพิ่มปริมาณตำแหน่ง V3 ด้วยไพรเมอร์ 357f-GC (CCTACGGGAGGCA GCAG; GC-clamp: cggccggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggg) และ 518r (ATTACCGCGGCTGCTGG) (Muyzer et al., 1993) ปริมาตร 50 µl มีส่วนประกอบเหมือนกับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ข้างต้น แต่ใช้ผลผลิต PCR ของ ยีน 16S rRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และมีอุณหภูมิดังนี้ 30 รอบ ของ 95 °C 45 วินาที 55 °C 30 วินาที และ 72 °C 30 วินาที ตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วยสี SyBr gold

การวิเคราะห์ความแตกต่างของ V3 ด้วยวิธี DGGE

ผลผลิต PCR ของ V3 นำมาแยกความแตกต่างบน 8% Polyacrylamide gel ที่มี Urea และ Formamide ความเข้มข้นแบบลำดับส่วนตั้งแต่ 40-60% ด้วยกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ นาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 °C ย้อมแถบดีเอ็นเอบนเจลด้วยสี SyBr Gold ตัดแถบที่สนใจและแช่ใน TE buffer ปริมาตร 20 µl บ่มที่ 4 °C ข้ามคืน แล้วใช้เป็นต้นแบบเพิ่มปริมาณส่วน V3 อีกครั้ง (Re-amplification) ด้วยไพรเมอร์คู่เดิมแต่ไม่มีส่วน GC clamp

ทำบริสุทธิ์ผลผลิต PCR และส่งหาลำดับเบสด้วยวิธี Sanger's sequencing (Macrogen, Korea) จัดการข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีน *16S rRNA* จาก GenBank ด้วยวิธี BLAST เลือกใช้พารามิเตอร์ที่โปรแกรมกำหนดให้ (Default parameter)

ผลการวิจัย

ปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่องนับเซลล์แบบอัตโนมัติ Fossomatic 5000

กลุ่มตัวอย่างน้ำนมที่มีค่าเซลล์โซมาติกต่ำ (LSC) CMT เท่ากับ 0 ได้แก่ HTSU-01-HTSU-10 และกลุ่มตัวอย่างน้ำนมที่มีค่าเซลล์โซมาติกสูง (HSC) แบ่งเป็น 2 ระดับ คือ CMT+2 รหัส MTSU-11 MTSU-12 MTSU-13 MTSU-18 MTSU-19 MTSU-20 และ CMT +3 รหัส MTSU-14 MTSU-15 MTSU-16 MTSU-17 ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณเซลล์โซมาติกมีค่าเฉลี่ยเป็น Log SCC (cell/ml) เท่ากับ 5.12 ± 0.41 6.38 ± 0.21 และ

6.82 ± 0.08 จากตัวอย่าง CMT0 CMT+2 และ CMT+3 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ปริมาณเซลล์โซมาติกจากตัวอย่างกลุ่ม LSC และ HSC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และปริมาณเซลล์โซมาติกจากการวิธี CMT และเครื่องนับเซลล์ Fossomatic 5000 ให้ค่าที่สอดคล้องกัน คิดเป็น 70% (14/20) โดยใช้เกณฑ์ของ National Mastitis Council (1999)

การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

แบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนมเลี้ยงบนอาหาร PCA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง CMT0 เท่ากับ 4.75 ± 0.9 CMT+2 เท่ากับ 4.29 ± 0.87 Log CFU/ml และ CMT+3 เท่ากับ 3.81 ± 1.32 Log CFU/ml (ตารางที่ 1) พบว่ากลุ่มตัวอย่าง LSC มีปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ยเท่ากับ 4.75 ± 0.9 Log CFU/ml กลุ่มตัวอย่าง HSC เท่ากับ 4.10 ± 1.05 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CMT0 และกลุ่ม CMT+2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลุ่ม CMT0 และ CMT+3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

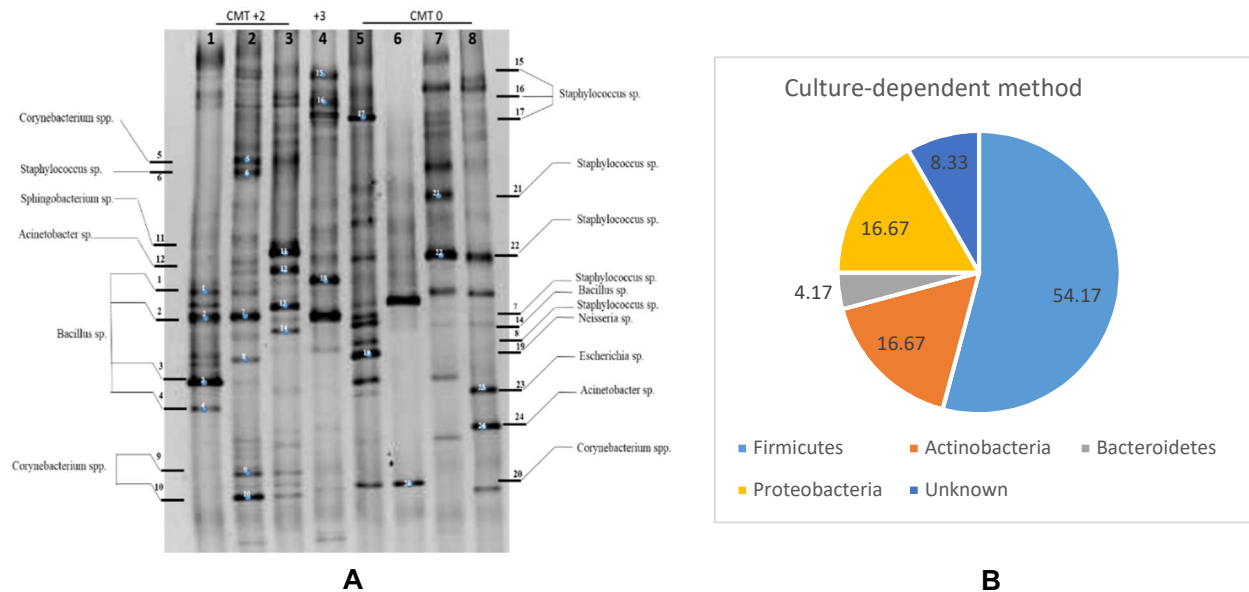
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเซลล์โซมาติก

CMT level	Average of total bacteria (Log. CFU/ml)	Average of SCC x 1000 (cell/ml)
CMT0 (n=10)	4.75 ± 0.9 (n=9) ^a	181.27 ± 113.07 (n=8) ^a
CMT+2 (n=6)	4.29 ± 0.87 (n=6) ^{a,b}	2653.34 ± 1165.95 (n=6) ^b
CMT+3 (n=4)	3.81 ± 1.32 (n=2) ^b	6786.00 ± 1139.06 (n=4) ^c

โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในน้ำนมด้วยวิธี DGGE

โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมที่ตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง เชื้อพบว่าแบคทีเรียจากวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหาร PCA ก่อนมีความแตกต่างทั้งหมด 24 ไรโบไทป์ (รูปที่ 1A) เป็นแบคทีเรียในไฟลัม (Phylum) Firmicutes (54.17%) มากที่สุด เป็นจีส *Staphylo-*

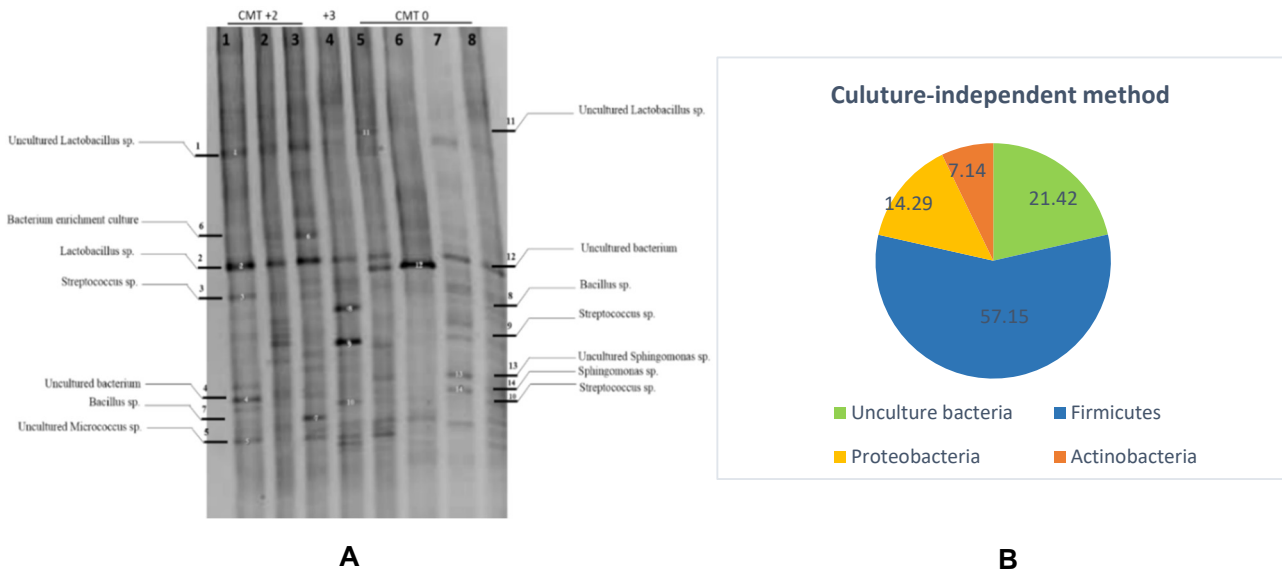
coccus (61.53%) และ *Bacillus* (38.47%) รองลงมาไฟลัม Proteobacteria (16.67%) จีส *Acinetobacter* (49.80%) *Neisseria* (25.19%) *Escherichia* (25.01%) ไฟลัม Actinobacteria (16.67%) จีส *Corynebacterium* (25.19%) และไฟลัม Bacteroidetes (25.19%) จีส *Sphingobacterium* (49.62%) (รูปที่ 1B)



รูปที่ 1 ความแตกต่างของแบคทีเรียจากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (A) เทคนิค DGGE (B) ความถี่ของแบคทีเรียแต่ละไฟลัม 1: MTSU-11; 2: MTSU-13; 3: MTSU-20; 4: MTSU-19; 5: HTSU-01; 6: HTSU-02; 7: HTSU-05; 8: HTSU-06

ส่วนวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างทั้งหมด 14 ไรโบไทป์ (รูปที่ 2A) แบคทีเรียที่พบได้แก่ ไฟลัม Firmicutes (57.15%) เป็นจีโนส *Streptococcus* (37.50%) *Lactobacillus* (37.50%) *Bacillus* (25%) รองลงมาคือไฟลัม

Proteobacteria (14.29%) เป็นจีโนส *Shingomonas* (100%) และ ไฟลัม Actinobacteria (7.14%) เป็นจีโนส *Micrococcus* (100%) นอกจากนี้ยังพบ Uncultured bacteria (21.43%) (รูปที่ 2B) ซึ่งไม่พบในวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 2 ความแตกต่างของแบคทีเรียจากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (A) เทคนิค DGGE (B) ความถี่ของแบคทีเรียแต่ละไฟลัม 1: MTSU-11; 2: MTSU-13; 3: MTSU-20; 4: MTSU-19; 5: HTSU-01; 6: HTSU-02; 7: HTSU-05; 8: HTSU-06

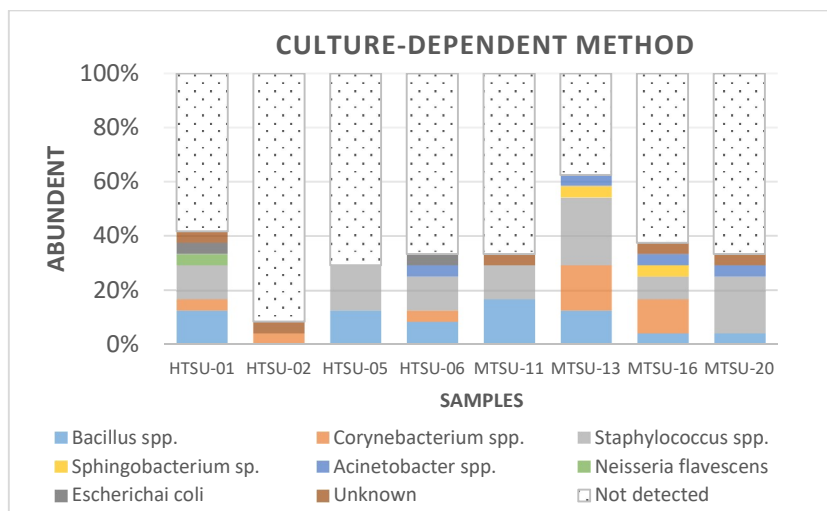
ตารางที่ 2 ความถี่และอัตราส่วนแบคทีเรียในตัวอย่างกลุ่ม LSC และ HSC ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Phylum	Average of frequencies (%)					
	Culture-dependent method			Culture-independent method		
	LSC	HSC	Ratio (HSC/LSC)	LSC	HSC	Ratio (HSC/LSC)
Firmicutes	18.75	26.04	1.39	26.79	32.14	1.20
Actinobacteria	3.13	7.29	2.33	3.58	5.35	1.50
Proteobacteria	4.17	3.13	0.75	10.73	10.73	1.00
Bacteroidetes	0.00	2.08	IC	-	-	-
Uncultured bacteria	-	-	-	8.93	8.93	1.00

LSC: Low somatic cell HSC: High somatic cell IC: Incalculable -: Not detected

จากตารางที่ 2 โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างกลุ่ม HSC และกลุ่ม LSC มีความแตกต่างกัน วิธีอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3) พบแบคทีเรียในฟิล์ม Actinobacteria คือ *Corynebacterium* spp. และ Firmicutes คือ *Staphylococcus* spp. มีความถี่ในกลุ่มตัวอย่าง HSC สูงกว่ากลุ่ม LSC อัตราส่วนระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม (HSC/LSC) เท่ากับ

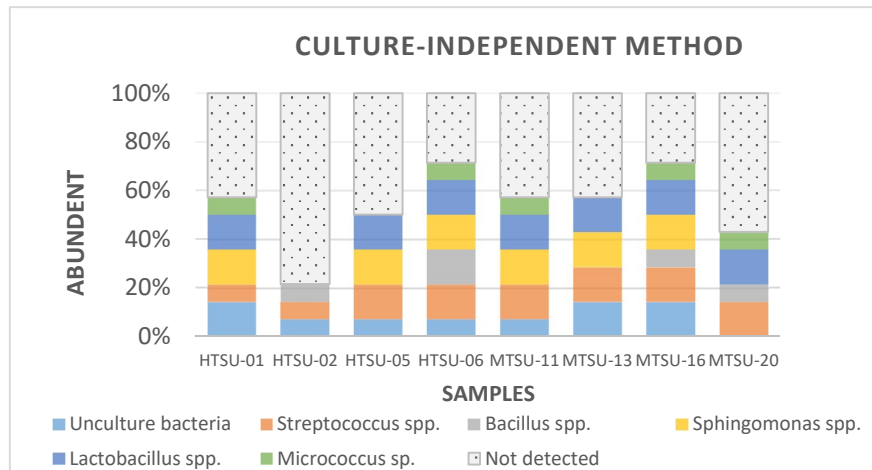
2.33 และ 1.39 ตามลำดับ ตรงข้ามกับแบคทีเรียในฟิล์ม Proteobacteria พบในกลุ่มตัวอย่าง LSC สูงกว่ากลุ่ม HSC เท่ากับ 0.75 เท่า และพบแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มตัวอย่าง LSC คือ *Escherichia coli* (2 ตัวอย่าง) *Neisseria flavescens* (1 ตัวอย่าง) และแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มตัวอย่าง HSC คือ ฟิล์ม Bacteroidetes คือ *Sphingobacterium* spp. (2 ตัวอย่าง)



รูปที่ 3 ความถี่ของแบคทีเรียแต่ละชนิดในตัวอย่างน้ำนมกลุ่ม LSC และ HSC จากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ส่วนโครงสร้างประชากรจากวิธีการไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4) ความคล้ายคลึงกันในตัวอย่างไม่ทั้ง 2 กลุ่มพบแบคทีเรียในฟิล์ม Actinobacteria คือ *Micrococcus* spp. และแบคทีเรียในฟิล์ม Firmicutes คือ *Streptococcus* spp.

Lactobacillus spp. และ *Bacillus* spp. มีความถี่ในกลุ่มตัวอย่าง HSC สูงกว่ากลุ่ม LSC อัตราส่วน (HSC/LSC) เท่ากับ 1.50 และ 1.20 ตามลำดับ ส่วนฟิล์ม Proteobacteria และ Uncultured bacteria มีความถี่ในการพบเท่ากัน



รูปที่ 4 ความถี่ของแบคทีเรียแต่ละชนิดในตัวอย่างน้ำนมกลุ่ม LSC และ HSC จากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วิจารณ์ผลการวิจัย

ปริมาณเซลล์โซมาติก

ปริมาณเซลล์โซมาติกในตัวอย่างน้ำนมโคจากการตรวจด้วยวิธี CMT และการนับด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ Fossomatic 5000 โดยใช้ค่าเกณฑ์มาตรฐานการแบ่งกลุ่มระดับความรุนแรงของโรคเต้านมอักเสบของ National Mastitis Council (1999) มีความสอดคล้องกัน 70% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Prathumanee (2005) ที่เปรียบเทียบปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมโคของพื้นที่ อ. ป่าพะยอม จ. พัทลุง ให้ผลสอดคล้องของทั้งสองวิธีเท่ากับ 64.1% โดยเซลล์โซมาติกที่มากขึ้นเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโคนมเมื่อเกิดการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม (Intramammary Infection; IMI) โดยกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์แมคโคฟาจ (Macrophage) เพิ่มขึ้นเพื่อยับยั้งการติดเชื้อ (Harmon, 1994) และมีการชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิลส์ (Neutrophils) และลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) มายังบริเวณติดเชื้อและทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้น (Harmon, 1994) ส่งผลให้เกิดการลอกหลุดของเซลล์เนื้อเยื่อต่อมน้ำนม (Secretory tissue) (Lee et al., 1980) แต่พบว่าค่าเซลล์โซมาติกจากทั้งสองวิธีไม่สอดคล้องในบางตัวอย่างทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของการแปรผลโดยวิธี CMT อาศัยการประเมินความหนืดของสารพันธุกรรมจากเซลล์โซมาติกหลังจากทำให้เซลล์แตกตัวด้วยสารตึงผิว (Detergent) และแปรผลด้วยความชำนาญของผู้ตรวจตัดสินใจให้ค่าระดับ CMT มีเกณฑ์ทั้งหมด 4 ระดับ คือ CMT0 CMT+1 CMT+2 และ CMT+3 ตามความหนืดที่ตรวจได้ แต่การตรวจด้วยเครื่องตรวจ

นับอัตโนมัติ Fossomatic 5000 อาศัยการย้อมสารพันธุกรรมในเซลล์ด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent) แล้วผ่านตัวอย่างเข้าสู่ flow cell เมื่อเซลล์ที่ผ่านการย้อมสีได้รับพลังงานจากแหล่งกำเนิดพลังงานภายในเครื่องเกิดการปลดปล่อยพลังงานระดับสูงทำให้เครื่องสามารถตรวจจับเซลล์แต่ละเซลล์ได้โดยตรง (Foss electric manual, Denmark; 1997) ดังนั้นความคลาดเคลื่อนของการตรวจเซลล์โซมาติกจากตัวอย่างเดียวกันอาจให้ค่าไม่สอดคล้อง

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างกลุ่ม HSC และ LSC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 4.75 ± 0.9 4.29 ± 0.87 และ 3.81 ± 1.32 Log CFU/ml จากตัวอย่างกลุ่ม CMT0 CMT+2 และ CMT+3 ตามลำดับ น้อยกว่ารายงานของ Intrasingkha et al. (2009) ตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำนมดิบในถังน้ำนมรวมในเขตอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.64-6.67 Log CFU/ml และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์โซมาติกและปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเช่นเดียวกับรายงานของ Prathumanee (2005) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจากการศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate count agar) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในผลิตภัณฑ์จากน้ำนม (AOAC, 2005; Wehr and Frank, 2004) เพียงอย่างเดียว แต่เนื่องจาก PCA เป็นอาหารพื้นฐานประกอบด้วย Casein enzymic hydrolysate Dextrose Yeast extract และ Agar

(Himedia, India) ค่ากรด-เบส เท่ากับ 7.0 อาจเป็นข้อจำกัดสำหรับแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร PCA เช่น จีโนส *Lactobacillus* spp. ต้องการอาหารจำเพาะ คือ MRS (de Man Rogosa and Sharpe) ซึ่งมีสารอาหารมากกว่าอาหาร PCA และค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.2-6.5 หรืออาจเจริญบนอาหาร PCA ได้ต่ำกว่า Log 2 CFU/ml ซึ่งน้อยกว่าค่า detection limit ของวิธี DGGE (Chahrom and Prakitchai-wattana, 2018) จึงไม่สามารถตรวจพบได้

นอกจากนี้พบว่าปริมาณแบคทีเรียจากตัวอย่างกลุ่ม CMT0 สูงกว่า CMT+3 ทั้งนี้อาจเกิดจากระยะของการติดเชื้อกลุ่ม CMT0 เป็นระยะเริ่มต้นที่โคได้รับเชื้อเข้าสู่เต้านมและแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แต่กลุ่ม CMT+3 เป็นระยะที่ร่างกายของโคนมเริ่มตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากเพื่อมาทำลายเชื้อเหล่านี้ ดังนั้นเมื่อนำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่พบใน CMT0 จึงสูงกว่า CMT+3

โครงสร้างประชากรแบคทีเรีย

โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตัวอย่าง HSC และ LSC ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง พบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันเมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยง แต่โครงสร้างประชากรแบคทีเรียคล้ายคลึงกันเมื่อใช้วิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพราะวิธีทั้งสองแตกต่างกันในกระบวนการเตรียม gDNA ต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตำแหน่ง V3 การเพาะเลี้ยงเชื้ออาจทำให้แบคทีเรียที่มีจำนวนน้อยในตัวอย่างถูกเจือจาง และไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ หรือมีปริมาณน้อยกว่าค่า detection limit ของวิธี DGGE ซึ่งต้องมีปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า Log 2 CFU/ml (Chahrom and Prakitchai-wattana, 2018) หรืออาจเกิดจากการสัดส่วนของ gDNA ที่สกัดได้จากของแบคทีเรียที่เจริญได้ดีไปรบกวนการเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ในขั้นตอนการำ PCR ของแบคทีเรียที่มีจำนวนน้อย (Coenye and Vandamme, 2003; Frey et al., 2006) แต่วิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการเตรียม gDNA โดยตรง (Direct extraction) ทำให้ได้ปริมาณ gDNA ของแบคทีเรียทุกชนิดใกล้เคียงกัน จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

วิธีอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อพบโครงสร้างของแบคทีเรียทั้งหมด 4 ไฟลัม ได้แก่ Firmicutes Proteobacteria Actino-

bacteria และ Bacteroidetes มีความถี่เท่ากับ 54.17% 16.7% 16.7% และ 4.2% ตามลำดับ (รูปที่ 1B) ส่วนวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงพบโครงสร้างของแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes Proteobacteria และ Actinobacteria มีความถี่เท่ากับ 57.15% 14.29% และ 7.14% ตามลำดับ ที่เหลือเป็นแบคทีเรียกลุ่ม uncultured bacteria เท่ากับ 21.42% (รูปที่ 2B) ทั้งสองวิธีมีความถี่ของแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes Proteobacteria และ Actinobacteria ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับรายงานของ Braem et al., (2012) ใช้เทคนิค DGGE ศึกษาโครงสร้างของแบคทีเรียบริเวณจุลกรมของโคนม พบแบคทีเรียทั้ง 4 ไฟลัม มีความถี่ของ Firmicutes Actinobacteria Proteobacteria และ Bacteroidetes เท่ากับ 42% 32% 25% และ 1% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียในตัวอย่าง HSC และ LSC จากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อพบแบคทีเรียไฟลัม Actinobacteria จีโนส *Corynebacterium* และ Firmicutes จีโนส *Staphylococcus* และ *Bacillus* มีความถี่ในตัวอย่างกลุ่ม HSC สูงกว่ากลุ่ม LSC อัตราส่วน (HSC/LSC) เท่ากับ 2.33 และ 1.39 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้พบแบคทีเรียทั้งสองจีโนสจากตัวอย่างบริเวณจุลกรมของโคนมสุขภาพดีและเป็นโรคเต้านมอักเสบ (Braem et al., 2012) บริเวณผิวหนัง (Verdier-Metz et al., 2012) และน้ำนม (Kuehn et al., 2013) แบคทีเรียจีโนส *Staphylococcus* จัดเป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบในโคนม (Major pathogenic mastitis) โดยเฉพาะสายพันธุ์ *S. aureus* (Kuang et al., 2009; Kuehn et al., 2013; Oikonomou et al., 2012; Braem et al., 2012; Rasolof et al., 2010) ส่วนจีโนส *Corynebacterium* เช่น *C. bovis* มักตรวจพบในระยะติดเชื้อและอักเสบของเต้านม (Gill et al., 2006; Braem et al., 2012) ตรงกันข้ามกับแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria มีความถี่ในกลุ่มตัวอย่าง LSC สูงกว่ากลุ่มตัวอย่าง HSC (HSC/LSC) เท่ากับ 0.75 แบคทีเรียที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *E. coli* *N. flavescens* และ *Acinetobacter* spp. ทั้งหมดเป็นเชื้อประจำถิ่นของโคนมอาศัยอยู่ในบริเวณต่าง ๆ เช่น ผิวหนัง เต้านม ท่อน้ำนม (Gill et al., 2006) และมีรายงานพบในตัวอย่างน้ำนม (Kuang et al., 2009; Oikonomou et al., 2012) ด้วยเช่นกัน ส่วนแบคทีเรียที่พบเฉพาะในตัวอย่าง HSC คือ จีโนส *Sphingobacterium* จัดอยู่ในไฟลัม Bacteroidetes มีความถี่เท่ากับ 4.12% ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Oikonomou et al.

(2012) ที่ใช้เทคนิค Metagenomics และ Pyrosequencing ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคเต้านมอักเสบ พบแบคทีเรียจีส *Sphingobacterium* ในตัวอย่างน้ำนมที่มีค่าเซลล์โซมาติกสูงมีความถี่เท่ากับ 4% นอกจากนี้ยังมีการคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อ *S. lactis* sp. nov. และ *S. alimentarium* sp. nov. ได้จากตัวอย่างน้ำนม โดยใช้อาหาร PCA เดิม 1% skimmed milk (Schmidt et al., 2012)

วิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อพบแบคทีเรียไฟลัม Actinobacteria และ Firmicutes มีความถี่ในตัวอย่าง HSC สูงกว่าตัวอย่าง LSC อัตราส่วน HSC/LSC เท่ากับ 1.50 และ 1.20 ได้แก่ จีส *Micrococcus* (Actinobacteria) และจีส *Streptococcus Lactobacillus* และ *Bacillus* (Firmicutes) ส่วนไฟลัม Proteobacteria และ Uncultured bacteria มีความถี่ไม่แตกต่างกันจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม แบคทีเรียจีส *Micrococcus* มีรายงานการตรวจพบในตัวอย่างผิวหนังบริเวณเต้านม จุกนม (Teat) (Woodward et al., 1987) และท่อน้ำนม (Teat canal) (Gill et al., 2006) ส่วนจีส *Streptococcus Bacillus* และ *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นพบที่ผิวหนังของโคนม และน้ำนม (Samarzija et al., 2012; Oikonomou et al., 2012; Kuang et al., 2009; Fortina et al., 2004; Callon et al., 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจีส *Streptococcus (S. uberis)* จัดเป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ (Major pathogenic mastitis) (Zadoks et al., 2011) จีส *Sphingomonas* พบจากการศึกษาโดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับรายงานของ Kuehn et al. (2013) และ Oikonomou et al. (2012) พบเชื้อ *Sphingomonas* spp. ในกลุ่มตัวอย่างโคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการด้วยวิธี Metagenomics

สรุปผลการวิจัย

ตัวอย่างน้ำนมในกลุ่ม HSC และ LSC พบว่ามีปริมาณเซลล์โซมาติกใกล้เคียงกันเมื่อใช้วิธีการตรวจด้วยวิธี CMT และด้วยเครื่องอัตโนมัติ Fossomatic 5000 มีความถูกต้องสูงถึง 70% เมื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดพบว่ามีกลุ่มตัวอย่าง HSC มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่ต่างกับกลุ่ม LSC และเมื่อตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียพบว่าเมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อพบแบคทีเรีย 4 ไฟลัม คือ Firmicutes Proteobacteria Actino-

bacteria และ Bacteroidetes เมื่อเปรียบเทียบความถี่การตรวจพบแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียไฟลัม Actinobacteria และ Firmicutes มีความถี่สูงในตัวอย่างกลุ่ม HSC โดยเฉพาะจีส *Corynebacterium* spp. รองลงมาเป็น *Staphylococcus* spp. และ *Bacillus* spp. แบคทีเรียไฟลัม Bacteroidetes คือจีส *Sphingobacterium* พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม HSC เท่านั้น ส่วนวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อพบ 3 ไฟลัม คือ Firmicutes Proteobacteria และ Actinobacteria มีความคล้ายคลึงกันในตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม และพบแบคทีเรียที่แตกต่างจากวิธีเพาะเลี้ยงคือ แบคทีเรียไฟลัม Actinobacteria คือ *Micrococcus* spp. และ Firmicutes คือ *Streptococcus* spp. และ *Lactobacillus* spp. มีความถี่ในกลุ่มตัวอย่าง HSC สูงกว่ากลุ่ม LSC การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมในเขตพื้นที่จังหวัดพัทลุงซึ่งยังไม่มีรายงานก่อนหน้านี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการวางแผนเฝ้าระวัง ติดตาม และควบคุมการระบาดของโรคในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยทักษิณ สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการวิจัยเลขที่สัญญา 02-3/2556 คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ และศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตวแพทยภาคใต้ จ. นครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. (2005). FDA Bacteriological Analytical Manual, 18th ed. Washington, DC.
- Braem, G., Vlieghe, S.D., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F. and Vuyst, L.D. (2012). Culture-Independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. J Vet Microbiol. 157(2): 383-390.
- Callon, C., Millet, L. and Montel, M.C. (2004). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. J Dairy Res. 71(1): 231-244.
- Chahrom, K. and Prakitachaiwattana, C. (2018). Application of reverse transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. in foods. Int J Food Microbiol. 264(2): 46-52

- Coenye, T. and Vandamme, P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operon in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett.* 228(2): 45-49.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D. and Manachini, P.L. (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveal *Enterococcus italicus* sp nov. *Int J Sys Evo Microbiol.* 54(1): 1717-1721.
- Frey, J.C., Angert, E.R. and Pell, A.N. (2006). Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal- restriction fragment length polymer-phism-based analyses. *J Microbiol Met.* 67(1): 9-19.
- FOSS Electric. (1997). *Fossomatic 5000 Type 71300 operators manual*. Denmark: Hillerod. 126p.
- Gill, J.J., Sabour, P.M., Gong, J., Yu, H., Lestie, K.E. and Griffiths, M.W. (2006). Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 56: 471-481.
- Harmon, R.J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell count. *J Dairy Sci.* 77(2): 2103-2112.
- Intrasungkha, N., Prathumanee, M., Suksathit, S. and Wattanachant, C. (2009). Alternative methods for mastitis diagnosis in dairy cows. *Thaksin J.* 12(1): 13-25. (in Thai)
- Kalorey, D.R., Yuvaraj, S., Kurkure, N.V., Chousalkar, K.K. and Barbuddhe, S.B. (2007). PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. *J Vet Sci.* 8(1): 151-154.
- Kuang, y., Tani, k., Synnott, A. J., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H. and Tanji, T. (2009). Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. *J Biochem Eng.* 45(3): 76-81.
- Kuehn, J. S., Patrick, J. G., Daniel, M., Ruichen, R., Qunfeng, D., Paul, J., Chong, P. and Gregory, J. P. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 25(1): 267-273.
- Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A. and Delcroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *App Env Microbiol.* 70: 5644-5650.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*, Chichester: John Wiley & Sons. pp. 115-147.
- Lee, C.S., Wooding, F.B. and Kemp, P. (1980). Identification, properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows. *J Dairy Res.* 47(3): 39-50.
- Muyzer, G., Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59(3): 695-700.
- National Mastitis Council. (1999). A Look at Physiological and Regulatory SCC Standards in Milk. NMC Newsletter Udder Topics. FortWorth, Texas. Retrieved January 26, 2014: From <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/145793.pdf>.
- Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H. and Bicalho, R.C. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *PLOS ONE.* 7(10): 1-14.
- Picard F., Ke D., Boudreau D., Boissinot M., Huletsky A., Richard, D., Ouellette, M., Roy, P. and Bergeron, M. (2004). Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species, *J Clin Microbiol.* 42(2): 686-695.
- Prathumanee, M. (2005). Occurrence of mastitis disease in dairy farms at Papayom district, Phatthalung province and development of mastitis diagnostic techniques for dairy cow. Faculty of Science, Thaksin University, Patthalung. 83p. (in Thai)
- Rasolofo, E.A., Daniel, S.G., Gisele, L.P., and Denis R. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamic during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol.* 138(2): 108-118.
- Renee, R., Khampoune, S., Hayssam, K., Pascal, D., Marc, D. and Jacqueline, L. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol.* 39(1): 2584-2589.

- Samarzija, D., Zamberlin, S. and Pogacic T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*. 62: 77-95.
- Schmidt, V. S. J. , Wenning, M. and Scherer, S. (2012). *Sphingobacterium lactis* sp. nov. and *Sphingobacterium alimentarium* sp. nov., isolated from raw milk and a dairy environment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62(1): 1506-1511.
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F. and Veisseire, P. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl Env Microbiol*. 78(3): 326-333.
- Wehr, H. M. and Frank, J. H., (2004). *Standard Methods for the Microbiological Examination of Dairy Products*, 17th Ed., Washington, D.C.: APHA Inc.
- Woodward, W.D., Besser, T.E., Ward, A.C. and Corbeil, L.B. (1987). In vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Can. J Vet Res*. 51(1): 27-31.
- Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J. and Schukken, Y.H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16(1): 357-372.
- Zhang, R., Huo, W., Zhu, W., Mao, S. (2014). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *J Sci Food Agric*. 95(1): 1072-1079.

