สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF *Salmonella enterica* SEROVAR Typhimurium

T133346

ญาณินี ริ้วบำรุง

ณัฐณิชา ปวีณพงศ์

พงศ์ชนก เนตรขำ

วท.
ล4,249 ก
2556

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.133346
วัน,เดือน,ปี.....6 มี.ค. 2557

b.12641066
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF *Salmonella enterica* SEROVAR Typhimurium

YANINEE REWBAMRUNG

NATNICHA PAWEENAPONG

PONGCHANOK NEDKAM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Study on isolation of a bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

ชื่อนักศึกษา ญาณินี ริ้วบำรุง รหัสนักศึกษา 53051352

ณัฐณิชา ปวีณพงศ์ รหัสนักศึกษา 53051355

พงศ์ชนก เนตรขำ รหัสนักศึกษา 53051400

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2556

คณะกรรมการสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว	
กรรมการ	ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา	
กรรมการ	ดร.วิมลมาศ บุญมี	วิมลมาศ บุญมี

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium		
ชื่อนักศึกษา	ญาณินี	ริ้วบำรุง	รหัสนักศึกษา 53051352
	ณัฐณิชา	ปวีณพงศ์	รหัสนักศึกษา 53051355
	พงศ์ชนก	เนตรขำ	รหัสนักศึกษา 53051400
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
ปีการศึกษา	2556		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ	บุญมี	

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบ และมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งต้องควบคุมเป็นพิเศษ โครงงานพิเศษนี้จึงได้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกไวรัสแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 เพื่อใช้ในการควบคุมจำนวนเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ในการทดลองแยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมได้ทดลองแยกด้วย 2 วิธี คือ วิธีการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของไวรัสแบคทีเรียในตัวอย่างที่เป็นของเหลว และวิธีการสกัดในตัวอย่างประเภทของแข็ง จากการทดลองสามารถแยกไวรัสแบคทีเรียได้ 1 ตัวอย่าง คือ มูลนก จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน (glycine buffer) พบพลาคที่มีลักษณะกลม ใส ขนาด 0.83 มิลลิเมตร หลังจากนั้นทำให้ไวรัสแบคทีเรียบริสุทธิ์

คำสำคัญ : ไวรัสแบคทีเรีย, *Salmonella*, การสกัด, การชะ, พลาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on isolation of a bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium		
Students	Yaninee	Rewbamrung	student ID 53051352
	Natnicha	Paweenapong	student ID 53051355
	Pongchanok	Nedkam	student ID 53051400
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Industrial Microbiology		
Academic Year	2013		
Advisor	Dr.Wimonmat Boonmee		

ABSTRACT

Salmonella is pathogenic bacteria, cause Gastroenteritis and important in food industries that must control. This special project studied on isolation the bacteriophage that specific with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562, which is able to use to control the number of the bacteria. The studies on isolation of the bacteriophage from environment samples with 2 methods were done. First method, liquid samples used and enrichment samples were performed. Second method, solid samples used and samples extraction with glycine buffer were carried out. The plaque assay was used to determine bacteriophage particle. The result showed that only one sample of bird feces from 28 samples with the second method was successful. Then the lytic plaque was purified. Finally, the bacteriophage stock was prepared by using plate lysate.

Keywords : Bacteriophage, *Salmonella*, Isolation, Extraction, Plaque

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium โครงงานนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี ที่ให้คำปรึกษาต่างๆ ทั้งความรู้เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ ในการทดลอง “การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium” (Study on isolation of a bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว และ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ได้สละเวลาในการเป็นประธานกรรมการสอบและกรรมการสอบงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณเพื่อนๆ ที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จ

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจเกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ญาณินี ริ้วบำรุง
ณัฐณิชา ปวีณพงศ์
พงศ์ชนก เนตรขำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.	4
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ	4
2.1.2 นิเวศวิทยาของเชื้อ	5
2.1.3 การจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp.	6
2.1.4 การก่อโรค	7
2.1.5 การแยกเชื้อ *Salmonella* spp.	12
2.2 ไวรัสของแบคทีเรีย	14
2.2.1 การจัดจำแนกชนิดของไวรัสของแบคทีเรีย	15
2.2.2 นิเวศวิทยาไวรัสของแบคทีเรีย	16
2.2.3 ความจำเพาะในไวรัสของแบคทีเรีย	16
2.2.4 วงจรชีวิตของไวรัสแบคทีเรีย	17
2.2.5 กลไกของ lytic phage ในการทำลายแบคทีเรีย	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.6 การทำ plaque assay	20
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	25
3.1 อุปกรณ์	25
3.2 สารเคมี	26
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3.4 เชื้อจุลินทรีย์	27
3.5 วิธีทดลอง	27
3.5.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium	27
3.5.1.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย	27
3.5.1.2 ขั้นตอนการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย	27
3.5.2 การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย Salmonella enterica serovar Typhimurium	28
3.5.2.1 การเก็บตัวอย่าง	28
3.5.2.2 ขั้นตอนการแยกไวรัสของแบคทีเรียสำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว	30
3.5.2.3 ขั้นตอนการแยกไวรัสของแบคทีเรียสำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง	30
3.5.2.4 การทำ plaque assay	30
3.5.2.5 การไวรัสของแบคทีเรียให้บริสุทธิ์	31
3.5.2.6 การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารแขวนลอยไวรัสของแบคทีเรีย	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	33
4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium	33
4.2 การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium	34
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
5.1 สรุปผลการวิจัย	39
5.2 ข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp.	6
2.2 พาหะนำเชื้อ *Salmonella* spp. และปริมาณเชื้อที่มีผลต่อร่างกาย	11
2.3 อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp.	11
2.4 ขั้นตอนการแยกเชื้อและยืนยันเชื้อ *Salmonella* spp.	13
2.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella*	14
3.1 ตัวอย่างที่นำมาคัดแยกไวรัสของแบคทีเรีย	28
4.1 ผลของตัวอย่างที่นำมาคัดแยกไวรัสของแบคทีเรีย	34
ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับเวลา	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp.	5
2.2 รูปร่างลักษณะ order และ families ของ major phage groups	16
2.3 ลักษณะของพลาค (plaque) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	18
2.4 วงจรชีวิตของ bacteriophage	18
2.5 โครงสร้างพื้นฐานของ endolysin	19
2.6 spot test method	21
2.7 double agar layer method	21
3.1 การเก็บ plaque	31
4.1 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562	33
4.2 ลักษณะของพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
4.3 โครงสร้างกรดอะมิโนไกลซีน (glycine)	37
ข-1 กราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลายทั้งในแถบเอเชียและยุโรป ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ อาทิเช่น เนื้อไก่ เนื้อหมู เป็นต้น (บุญศรี, 2552)

ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อเหล่านี้สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย เนื่องจากมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสมบูรณ์ จึงได้มีการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ แต่ในการใช้สารเคมีนั้น หากใช้ในปริมาณน้อยเกินไปก็ไม่สามารถยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นได้ แต่ถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไปก็จะกลายเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ก่อให้เกิดปัญหาด้านความปลอดภัย และประเทศคู่ค้าบางประเทศก็ปฏิเสธสินค้าที่ปนเปื้อนสารเคมี การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นปัญหาสำคัญอย่างมาก โดยเฉพาะการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยและเป็นปัญหาในการส่งออกมากที่สุด คือเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษและเป็นสิ่งที่ต้องควบคุมในอุตสาหกรรมอาหาร (Juneja และ Marks, 2006) เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จะก่อให้เกิดอาการลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) หรืออาหารเป็นพิษในอาหารหลายประเภท ได้แก่ เนื้อ, สัตว์ปีก, นม ,ไอศกรีม, ชีส, ไข่, ผลิตภัณฑ์จากไข่, ช็อกโกแลต และเครื่องเทศ และอาหารเหล่านี้สามารถเป็นพาหะในการแพร่เชื้อได้ (D'Aoust, 1989) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ค่อนข้างเป็นปัญหาใหญ่ในหลายๆ ประเทศ โดยมากในแถบยุโรป ซึ่งหากมีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์อาหาร แม้ว่าจะพบเป็นปริมาณน้อยกว่าจำนวนที่ยอมรับได้ก็ตาม จะถูกปฏิเสธมิให้นำเข้าประเทศ (สุมณฑา, 2545) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

แบคเทอริโอเฟจหรือเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย ได้รับการเสนอให้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย โดยที่ไม่มีการข้ามสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ และมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ จึงได้มีการศึกษาถึงวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ และทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองเพื่อดูประสิทธิภาพและผลที่ได้ ซึ่งมีงานวิจัยที่กล่าวถึงประสิทธิภาพของเฟจในการยับยั้งปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลายงานวิจัย รวมถึงในปี 2007 ทางองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้อนุญาตให้มีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์แบคเทอริโอเฟจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* โดยใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ประเภทสารถนอมอาหารในชื่อทางการค้า "Listex P100" สำหรับอาหารพร้อมรับประทาน (ready-to-eat) และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (U.S. Food and Drug Administration, 2007)

จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจ ทำให้ทางผู้วิจัยมีความสนใจในประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือไวรัสของแบคทีเรีย เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ แต่จะส่งผลโดยตรงต่อเชื้อแบคทีเรียที่จำเพาะเท่านั้น โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจของ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium จากตัวอย่างต่างๆ และเมื่อการแยกเป็นไปโดยสำเร็จ จะทำให้แบคเทอริโอเฟจที่ได้มีความบริสุทธิ์ (purification) รวมถึงเก็บรักษา (storage) ให้มีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานสำหรับศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการแยกไวรัสของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ที่มีการเพาะเลี้ยงไว้อยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ

1.2.2 เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S.enterica* serovar Typhimurium ที่มีการเพาะเลี้ยงไว้อยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ

1.3.2 ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม รวมถึงทำให้บริสุทธิ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อเป็นแนวทางที่มีประโยชน์ต่อผู้ส่งออกเนื้อไก่และไข่ให้มีวิธีที่เป็นทางเลือกในการจัดการกับปัญหาการพบเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ในผลิตภัณฑ์อาหาร

1.4.2 สามารถที่จะนำเอาไวรัสของแบคทีเรียที่ได้จากการทำการทดลองในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อไก่และไข่ได้ โดยไม่ส่งผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค

1.4.3 เป็นการลดการใช้สารเคมีในการกำจัดและป้องกันเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium เพราะเนื่องจากการใช้สารเคมีซ้ำๆ จะส่งผลให้เชื้อมีวิวัฒนาการเกิดการดื้อต่อสารเคมี ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ แต่ในการใช้ไวรัสของแบคทีเรียเพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย สามารถมีวิวัฒนาการที่จะจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.

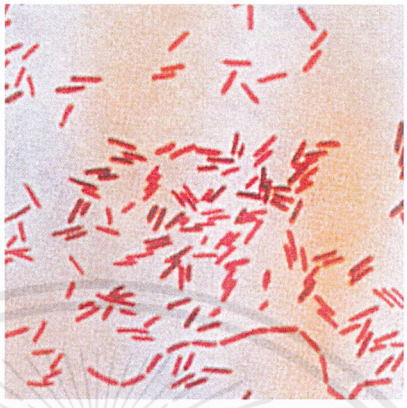
เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. เป็นที่รู้จักมายาวนานกว่า 100 ปี ในการก่อให้เกิดการเจ็บป่วยที่มีอาการตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงอาการอาหารเป็นพิษอย่างรุนแรง (ลำไส้อักเสบ) หรือแม้กระทั่งอาการไข้ไทฟอยด์ (Enteric fever) ,พาราไทฟอยด์ (Paratyphoid) และโลหิตเป็นพิษ (Bacteraemia/Septicaemia) (Blackbern และ McClure,2009) เชื้อแบคทีเรีย *S.* Enteriridis ที่เกี่ยวข้องกับโรค Salmonellosis ถูกแยกในห้องปฏิบัติการเป็นครั้งแรกได้ในปี ค.ศ.1888 โดย Gaertner แยกเชื้อจากเนื้อวัวและคนที่บริโภคเนื้อวัวเป็นส่วนใหญ่ รวมถึงผู้ที่มีอาการโรคอาหารเป็นพิษอย่างร้ายแรง (Topley และ Wilson, 1929) แบคทีเรีย *Salmonella* พบได้บนผิวหนัง, ขน และอุจจาระของไก่ในช่วงเวลาการฆ่า และสภาพในโรงฆ่าสัตว์มีแนวโน้มที่จะช่วยให้การแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในซากมีปริมาณสูงสุด (Green และคณะ, 1982) , (Adams และคณะ, 1990) เชื้อ *Salmonella* เป็นสิ่งที่สำคัญซึ่งต้องพิจารณาในแง่ของสารที่เป็นต้นเหตุของอาการเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นทั่วโลก (Blackbern และ McClure, 2009)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ (Brenner และคณะ, 2005)

เป็นแบคทีเรียรูปท่อนตรง ขนาด 0.7 – 1.5 × 2.0 – 5.0 ไมโครเมตร จัดอยู่ใน Family *Enterobacteriaceae* ติดสีแกรมลบ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) เป็นเชื้อที่อยู่ในสภาวะมีหรือไม่มีออกซิเจนได้ (facultative anaerobic) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีโดยทั่วไปเท่ากับ 2-4 มิลลิเมตร สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้ ก๊าซส่วนใหญ่จะสร้างจากการหมัก D-glucose ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะสร้างบนอาหาร TSI (triple sugar iron agar) ไม่สร้างอินโดล (indole) สามารถใช้ซิเตรท (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนหลักได้ ปฏิกิริยากับไลซีนและ ornithine decarboxylase ให้ผลบวก ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ไม่เกิดการ oxidative deamination ของ phenylalanine และ tryptophan ไม่สามารถหมัก sucrose, salicin, inositol และ amygdalin ได้ ไม่สร้างเอนไซม์ lipase และเอนไซม์ deoxyribonuclease รวมถึงยังเป็นเชื้อที่ก่อโรคกับมนุษย์ ได้แก่ ไข้เอนเทอริก (Enteric fever) , ลำไส้อักเสบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Gastroenteritis) และโลหิตเป็นพิษ (Septicemia) สามารถก่อโรคได้ในสัตว์หลายๆ สปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกับมนุษย์ บางซีโรวาร์ (serovar) ต้องปรับตัวเข้ากับเซลล์เจ้าบ้าน (host)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp.

ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html

2.1.2 นิเวศวิทยาของเชื้อ (Brenner และคณะ, 2005)

แม้ว่าเชื้อ *Salmonella* บางซีโรวาร์ จะต้องปรับตัวเข้ากับเซลล์เจ้าบ้าน แต่ส่วนใหญ่เชื้อจะมีความสามารถในการเจริญในสิ่งมีชีวิตได้มาก (host range) เช่น ซีโรวาร์ Typhimurium บางซีโรวาร์อยู่ในบางพื้นที่ของโลก เช่น ซีโรวาร์ Sendai อยู่ทางตะวันออก ซีโรวาร์ Berta อยู่ทางทวีปอเมริกาเหนือ แต่อีกหลายๆ ซีโรวาร์ก็สามารถพบได้ทั่วไป เช่น ซีโรวาร์ Typhimurium

เชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์ เช่น *S. enterica* subsp. *salamae* , subsp. *arinzonae* และ subsp. *diarizonae* สามารถแยกได้จากสัตว์เลือดเย็น แทบจะไม่พบในมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น สายพันธุ์ subsp. *houtenae* และ *S. bongori* สามารถแยกได้จากสิ่งแวดล้อมและแทบจะไม่ก่อโรคในมนุษย์

เชื้อ *Salmonella* สามารถเจริญได้ภายในช่วงของปัจจัยต่างๆ ดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp.

ปัจจัย	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
อุณหภูมิ	5.2[a]	46.2
พีเอช	3.8[b]	9.5
Water activity	0.94	> 0.99

a = สายพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส

b = สายพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่เจริญที่พีเอชต่ำกว่า 4.5

ที่มา : Bell และ Kyriakides (2002)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายๆ งานที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.

Jenson และคณะ (2006) ได้ศึกษาสภาพแวดล้อมในคอกเลี้ยงสุกร พบว่าเชื้อ *Salmonella* Typhimurium เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในสุกร และสามารถอยู่รอดในดินและน้ำภายในคอกของสุกรเป็นเวลาหลายสัปดาห์

Rowe และคณะ (1987) ได้สำรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในโรงงานผลิตนมผง จากเครื่อง spray drying

Steele และ Galton (1967) ได้ศึกษาการระบาดของเชื้อ *Salmonella* ที่เกิดกับมนุษย์ 61 ครั้ง สรุปผลได้ว่า 23% มาจากไข่และผลิตภัณฑ์ไข่ ,16% มาจากไก่และไก่งวง , 8% มาจากโคและสุกร , 3% มาจากไอศกรีม , 2% มาจากสลัดมันฝรั่ง และ 9% มาจากอาหารอื่นๆ

2.1.3 การจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. (สุมณฑา, 2545)

ในอดีตการจัดจำแนกเชื้อเชื้อ *Salmonella* อาศัยชนิดของซีโรวาร์ (serovar) ที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางซีโรวิทยา (serology) คือ ปฏิกิริยาการตกตะกอนของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่ผิว (somatic cell) และที่แส้ (flagella cell) ซึ่งมีความสัมพันธ์กันเป็นตัวกำหนดสปีชีส์ ต่อมาได้มีการใช้เทคนิคอื่นที่ใช้ยีนเป็นตัวทดสอบ เรียกว่า DNA-DNA hybridization และ multilocus enzyme electrophoresis (MEE) typing ทำให้เชื้อ *Salmonella* ทั้งหมดถูกนำมาจัดใหม่เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* ทั้งสองสปีชีส์จำแนกออกเป็นอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายสปีชีส์ย่อย (subspecies) เชื้อ *Salmonella* กว่า 2,000 ซีโรวาร์ ถูกนำมาจัดอยู่ในสปีชีส์ *Salmonella enterica* ซึ่งแยกย่อยออกเป็น 5 กลุ่ม หรือ supspecies ดังนี้

Group II : *S. enterica* subsp. *salamae*

Group III a : *S. enterica* subsp. *arizonae*

Group III b : *S. enterica* subsp. *diarizonae*

Group IV : *S. enterica* subsp. *houtenae*

Group VI : *S. enterica* subsp. *indica*

แบคทีเรียกลุ่ม V เดิมถูกจัดขึ้นเป็นสปีชีส์ คือ *Salmonella bongori* การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนำไปสู่วิธีการเขียนชื่อแบคทีเรียใหม่ เดิมเขียนว่า *Salmonella typhimurium* ได้เปลี่ยนเป็น *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (หรือ *Salmonella* Typhimurium) โดยชื่อ genus ใช้ตัวเอน ชื่อสปีชีส์ย่อยใช้ตัวธรรมดา และตัวอักษรแรกให้เป็นตัวพิมพ์ใหญ่ หรือเขียนย่อว่า *S.* Typhimurium

การจำแนกโดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยา จะอาศัยสมบัติของโปรตีนที่มีความจำเพาะตามลักษณะทางพันธุกรรมที่ประยุกต์ใช้ทดสอบสปีชีส์ของแบคทีเรีย สำหรับเชื้อ *Salmonella* ในขั้นแรกจะทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่ผิวเซลล์ เรียกว่า somatic antigen (O-antigen) ก่อน โดยจำแนกซีโรวาร์ออกเป็นกลุ่มๆ ตามตัวอักษรอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ เช่น A, B, C เรื่อยไป เช่น เชื้อ *Salmonella* ที่มี O-antigen 6 และ 7 ได้รับการจัดไว้ในกลุ่ม C_1 ในขั้นที่สองเป็นการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่แส้ เรียกว่า flagella antigen (H-antigen) ซึ่งจำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ เฟส 1 หรือเฟสจำเพาะ (specific phase) และเฟส 2 หรือเฟสกลุ่ม (group phase) เฟส 1 ประกอบด้วย *Salmonella* ไม่กี่สปีชีส์ เชื้อส่วนใหญ่จัดอยู่ในเฟส 2 เชื้อหนึ่งอาจมี H-antigen ตกอยู่ในเฟสใดเฟสหนึ่ง หรือตกอยู่ทั้งสองเฟสก็ได้ เฟส 1 ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็ก ส่วนเฟส 2 ใช้เลขอารบิก เช่น การวิเคราะห์แอนติเจนของ *S.* Choleraesuis ปรากฏผลเป็น 6,7,c,1,5 เลข 6 และ 7 เป็นตัวแทนของ O-antigen group C_1 ตัวอักษร c แทน H-antigen เฟส 1 และเลข 1,5 แทน H-antigen เฟส 2

ชื่อของเชื้อ *Salmonella* เป็นข้อตกลงระหว่างประเทศ ซีโรวาร์ที่บ่งถึงสปีชีส์ถูกตั้งชื่อขึ้นตามสถานที่ที่แยกเชื้อนั้นได้เป็นครั้งแรก เช่น *S.* London, *S.* Miami และ *S.* Richmond เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนหน้านี้ได้มีการตั้งชื่อเชื้อ *Salmonella* หลายแบบ เช่น *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดไข้ไทฟอยด์ในหนูทดลอง

2.1.4 การก่อโรค (Brenner และคณะ, 2005)

เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ต้องปรับตัวเข้ากับเซลล์เจ้าบ้านชนิดใดชนิดหนึ่งมักจะเป็นเชื้อที่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นบางชนิดในการเจริญ (auxotrophic) พบเป็นจำนวนมากในสัตว์บาง ซีโรวาร์อาจยังไม่ทราบลักษณะการก่อโรค

ซีโรวาร์ที่ปรับตัวเข้ากับมนุษย์ เช่น ซีโรวาร์ Typhi , Paratyphi A และ Sendai มักจะก่อให้เกิดอาการ septicemia-typhoidic syndrome ซึ่งไม่ก่อโรคในสัตว์ชนิดอื่น โรค Salmonellosis จะติดต่อจากคนไปสู่คน โดยไม่ต้องอาศัยพาหะตัวกลาง จะมาจากการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร พบได้มากในประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งมีสุขอนามัยที่ไม่ดี ส่วนไข้ไทฟอยด์มาจากการติดเชื้อของซีโรวาร์ Typhi ซึ่งเป็นปัญหาหลักที่น่าเป็นห่วงของประชากร องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ประมาณการว่ามีประชาชนมากกว่า 16.6 ล้านคนที่ป่วยเป็นไข้ไทฟอยด์ต่อปี และอีกเป็นสาเหตุให้ 600,000 คนเสียชีวิตประจำทุกปี

ซีโรวาร์อื่นที่ปรับตัวเข้ากับสัตว์ เช่น ซีโรวาร์ Abortusovis จะปรับตัวอยู่กับแกะ และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้แกะแท้งลูก ซีโรวาร์ Typhisuis ปรับตัวอยู่กับสุกร และซีโรวาร์ Gallinarum ปรับตัวอยู่กับสัตว์ปีก

เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่พบได้ทั่วไป เช่น ซีโรวาร์ Typhimurium เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อทางอาหารเป็นพิษ (food-borne infection) ปริมาณเชื้อที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เท่ากับ $<10^3$ CFU โรค Salmonellosis ที่เกิดกับเด็กทารกและเด็กเล็ก จะแสดงอาการที่หลากหลายออกมา จากการป่วยที่มีลักษณะคล้ายไข้ไทฟอยด์ที่ร้ายแรง ด้วยอาการโลหิตเป็นพิษอ่อนๆ หรือไม่แสดงอาการติดเชื้อ ในตึกผู้ป่วยเด็กจะติดเชื้อส่วนมากผ่านทางมือของคน

Parys และคณะ (2012) กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* serovar Typhimurium เป็นเชื้อที่แยกได้บ่อยที่สุดจากการติดเชื้อจากโรงฆ่าสุกรในยุโรป

Cavallaro และคณะ (2011) รายงานว่าเนยถั่วลิสงที่ปนเปื้อนและผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดการระบาดของโรค Salmonellosis ทั่วประเทศสหรัฐอเมริกา โดยทำการศึกษาทั้งหมด 714 กรณี จาก 46 รัฐ พบว่าประชาชน 23% จากทั้งหมดถูกนำส่งโรงพยาบาล และ 1% เสียชีวิต รวมถึงได้ทำการศึกษาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารใด ๆ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนยถั่วลิสง ผลิตภัณฑ์ที่มีเนยถั่วลิสงเป็นองค์ประกอบและผลิตภัณฑ์ไก่แช่แข็ง เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ และยังพบการระบาดของโรคติดเชื้อซึ่งเกี่ยวข้องกับอาหารแปรรูปมากขึ้นอีกด้วย

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* มี 3 ชนิด (นงลักษณ์, 2547)

1) ไข้เอนเทอริก : ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ (Enteric fever : typhoid and paratyphoid)

ไข้ไทฟอยด์มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ Typhi ส่วนพาราไทฟอยด์มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ Paratyphi A , B และ C อาการของโรคคล้ายกัน แต่ไข้พาราไทฟอยด์จะมีความรุนแรงน้อยกว่า และมีอาการอ่อนกว่าไข้ไทฟอยด์ คือ พาราไทฟอยด์มีระยะฟักตัว 1-10 วัน มีอาการโลหิตเป็นพิษ เนื่องจากเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด (Bacteremia) เกิดขึ้นในตอนแรก มักมีไข้อยู่ 1-3 สัปดาห์ ไม่ค่อยมีผื่น ส่วนไข้ไทฟอยด์มีระยะฟักตัวของโรค 10-14 วัน มีไข้สูงตลอด ปวดศีรษะ ท้องผูก อ่อนเพลียในสัปดาห์แรก อาจมีผื่นขึ้นตามลำตัว หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ ปวดกล้ามเนื้อ ไข้จะขึ้นสูงตลอดเวลา (39.5-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน และลดลงในสัปดาห์ที่ 3 หรือ 4 ตับและม้ามโต เม็ดเลือดขาวลดน้อยลง อุจจาระมีเลือดปนอออกมาด้วย

การเกิดโรคมาจากการกินเชื้อที่ปะปนอยู่กับอาหารหรือน้ำเข้าไป ทำให้เกิดอาการอักเสบของลำไส้ เชื้อจะบุกรุกผ่านเยื่อบุเมือก (mucosa) เข้าต่อมน้ำเหลืองในลำไส้ ซึ่งเชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้นและผ่านเข้ากระแสเลือดโดยผ่านทางท่อน้ำเหลืองขนาดใหญ่ที่อก เชื้อกระจายเข้าตับ ถุงน้ำดี ม้าม ไต ไขกระดูก ในระหว่างที่เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อบางส่วนจะถูกทำลายโดยฟาโกไซต์ รวมทั้งในตับ เชื้อส่วนที่เหลือจะเพิ่มจำนวนมากและเข้ากระแสเลือดใหม่ ทำให้เชื้อกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ระยะที่เข้ากระแสเลือด เชื้อบางส่วนจะถูกทำลายด้วยแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ ทำให้ปล่อย endotoxin ออกมา ทำให้มีไข้ และเกิดอาการรุนแรง จากถุงน้ำดีเชื้อจะกระจายเข้าเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และอวัยวะน้ำเหลืองที่ลำไส้ เกิดการอักเสบ การตายของเนื้อเยื่อและลอกออก จึงมีเลือดปนออกมากับอุจจาระ และอาจทำให้ลำไส้ทะลุด้วย

นอกจากเชื้อจะอยู่ในเลือดแล้ว ยังอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ที่ติดเชื้อ รวมทั้งในอุจจาระ เมื่อเชื้อเข้าไต จะทำให้มีเชื้อปนมากับปัสสาวะ เชื้อที่เข้าสู่อวัยวะอื่นๆ อาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ เช่น เยื่อหุ้มกระดูกอักเสบเป็นหนอง กระดูกอักเสบ เป็นฝีหนองในไต ถุงน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 2-5% ของผู้ป่วยที่หายจากโรคไทฟอยด์ จะมีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในร่างกายได้นานเป็นปี หรือตลอดไป ผู้เป็นพาหะเรื้อรังจะมีเชื้ออยู่ในถุงน้ำดี และถูกขับออกมากับปัสสาวะและอุจจาระ จึงทำให้เชื้อนี้อยู่รอดได้

2) ลำไส้อักเสบ (Enterocolitis, Gastroenteritis)

เกิดจากเชื้อ *Salmonella* หลายซีโรวาร์ บางชนิดทำให้เกิดโรคในสัตว์เลือดอุ่น รวมทั้งคน ซีโรวาร์ที่ทำให้เกิดโรคคือ ซีโรวาร์ Enteritidis และ Typhimurium

ระยะฟักตัวของโรค 12-24 ชั่วโมง หรือมีอาการหลังจากกินอาหารที่มีเชื้อปะปน 8-48 ชั่วโมง อาการของโรค คือ ปวดศีรษะรุนแรง คลื่นไส้อาเจียน อุจจาระร่วงรุนแรง ปวดท้อง มีไข้ต่ำเป็นอยู่ 2-5 วัน ไม่ค่อยเกิดอาการ Bacteremia เหมือนไข้ไทฟอยด์ เชื้อจะเจริญอยู่ในลำไส้เท่านั้น เมื่อเชื้อบุกรุกเข้าผนังลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ อาจจะปล่อย enterotoxin ออกมา ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว มีมูกเลือด เม็ดเลือดขาวปนออกมา ไม่พบเชื้อในเลือด แต่พบในอุจจาระ

3) โลหิตเป็นพิษ (Septicemia)

การติดเชื้อ *Salmonella* ในกระแสเลือด มักเกิดจากซีโรวาร์ Choleraesuis เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็อาจเกิดจากเชื้อซีโรวาร์ใดก็ได้ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะไปเจริญในกระแสเลือด เพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้มีไข้สูง หนาวสั่น เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลดลง การแยกเชื้อจะพบในกระแสเลือดเท่านั้น ไม่พบในอุจจาระ โรคนี้จะเป็นอยู่นานจนเรื้อรัง แบคทีเรียในเลือดจะกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ ไตอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ไขกระดูกและกระดูกอักเสบ

ซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* ที่ก่อโรค ปริมาณเชื้อที่ได้รับ รวมถึงอาการของโรค แสดงดังตารางที่ 2.2 และตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 พาหะนำเชื้อ *Salmonella* spp. และปริมาณเชื้อที่มีผลต่อร่างกาย

ซีโรวาร์	ปริมาณเชื้อที่ได้รับ (โดยประมาณ) (CFU/mL)	พาหะนำเชื้อ
S. Typhimurium	1.7×10^{1}	น้ำ
S. Newport	$6\text{-}23\times10^{1}$	แฮมเบอร์เกอร์
S. Eastbourne	$1\text{-}2.5\times10^{1}$	ช็อกโกแลต
S. Heidelberg	$1\text{-}5\times10^{1}$	ชีส

ที่มา : Blaser และ Newman (1982)

ตารางที่ 2.3 อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp.

โรค	ซีโรไทป์ที่เกี่ยวข้อง	ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดอาการ	ลักษณะอาการของโรค
ลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis)	ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกของ *S. enterica* subsp. *enterica* ซีโรไทป์ Agona, Dublin, Hadar, Enteritidis, Poona, Typhi, Typhimurium, Virchow และสมาชิกของ *S. enterica* subsp. *Arizonae*	ปกติต้องได้รับเชื้อในปริมาณสูง > 10,000 เซลล์ ถึงจะทำให้เกิดอาการเจ็บป่วย แต่ถ้าได้รับเชื้อในปริมาณต่ำ < 100 เซลล์ จากอาหารที่มีไขมันสูงก็ทำให้เกิดอาการได้	ระยะฟักตัว 6-72 ชั่วโมง โดยทั่วไปจะมีอาการในช่วง 12-36 ชั่วโมง และกินเวลายาวนาน 2-7 วัน มีอาการท้องเสีย ปวดท้อง อาเจียน มีไข้ บางครั้งอาจเกิดอาการรุนแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp.(ต่อ)

โรค	ซีโรไทป์ที่เกี่ยวข้อง	ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดอาการ	ลักษณะอาการของโรค
ไข้เอนเทอริก (Enteric fever)	*S.* Typhi และ *S.* Paratyphi	ได้รับเชื้อปริมาณ < 1000 เซลล์	ระยะฟักตัว 7-28 วัน เฉลี่ย 14 วัน ไข้ไทฟอยด์จะมีไข้สูง วิงเวียน คลื่นไส้ ปวดท้อง เบื่ออาหาร คลุ้มคลั่ง ท้องผูกในช่วงแรก ท้องเสียในช่วงหลัง ต้องพักฟื้นนาน 8 สัปดาห์ ถ้าเป็นพาหะเชื้อจะอยู่หลายเดือนถึงหลายปี
โลหิตเป็นพิษ (Septicaemia)	สมาชิกของ *S. enterica* subsp. *enterica*	ก่อโรคเมื่อพบเชื้อในกระแสเลือด	อาการไข้สูง วิงเวียน เจ็บหน้าอกและท้อง หนาวสั่นและเบื่ออาหาร

ที่มา : Blackburn และ McClure (2009)

2.1.5 การแยกเชื้อ *Salmonella* spp.(นงลักษณ์, 2547)

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สามารถคัดแยกได้โดยใช้วิธีดังนี้

1. อาหารบอกความแตกต่าง (differential media) เช่น Eosin-methylene blue agar, Mac Conkey agar หรือ Deoxycholate agar อาหารเหล่านี้จะบอกความแตกต่างของโคโลนีที่เจริญว่าเป็นชนิดย่อย lactose หรือไม่ ซึ่งเชื้อ *Salmonella*, *Shigella* รวมทั้ง *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas* เป็นเชื้อที่ไม่ย่อย lactose เชื้อแกรมบวกจะถูกยับยั้งการเจริญไว้ อาหาร bismuth sulfite เป็นอาหารที่ใช้ตรวจ *S.* Typhi ได้รวดเร็ว เพราะให้โคโลนีสีดำเนื่องจากเชื้อจะสร้างก๊าซ H_2S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารคัดเลือก (selective media) เช่น *Salmonella-Shigella* (SS) agar, Hektoen enteric agar หรือ deoxycholate citrate agar ซึ่งอาหารนี้จะเร่งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* ให้เจริญดีกว่าเชื้ออื่น

3. อาหารที่ส่งเสริมการเจริญ (enrichment media) เช่น selenite F broth หรือ tetrathionate broth ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ และทำให้เชื้อ *Salmonella* เพิ่มจำนวนมากขึ้น หลังจากบ่มเชื้อไว้ 1-2 วัน จึงนำไปใส่ในอาหารบอกความแตกต่างและอาหารคัดเลือก

4. การตรวจสอบขั้นสุดท้าย (final identification) โคโลนีที่สงสัยจากอาหารแข็ง จะนำไปทดสอบทางชีวเคมี และนำไปทดสอบทางซีโรวิทยา โดยทำการตกตะกอนในสไลด์ (slide agglutination) กับ serum ที่จำเพาะ

ขั้นตอนการแยกเชื้อและยืนยันเชื้อ *Salmonella* spp. ที่สุ่มตรวจจากตัวอย่างและการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* ดังตารางที่ 2.4 และตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 ขั้นตอนการแยกเชื้อและยืนยันเชื้อ *Salmonella* spp.

ขั้นตอน	สภาวะ
Pre-enrichment ลงตัวอย่างในอาหารที่ใช้ในการฟื้นฟูเซลล์ เช่น BPW (buffered peptone water) ในอัตราส่วน 1:9	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง
Selective enrichment ถ่ายตัวอย่างลงในอาหารเหลวที่ใช้คัดเลือกเชื้อ เช่น MKTTn หรือ RVS broth	MKTTn บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง RVS บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
Selective plating ทำการ streak บนอาหารแข็ง Brilliant green agar หรือ XLD agar	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะคาดว่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* มา streak บนอาหาร Nutrient agar	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
ตรวจสอบทางชีวเคมี	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง
ตรวจ O antigen และ H antigen ด้วยซีรัมบนสไลด์	

ที่มา : Roberts และ Greenwood (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp.

การทดสอบ	ผลทดสอบ
เอนไซม์ catalase	+
เอนไซม์ oxidase	-
การสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลแลคโตส	-
การสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส[a]	+
การสร้าง indole	-
เอนไซม์ urease	-
H_2S ในอาหาร TSI	+
การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก[a]	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+

+ = ผลบวก

- = ผลลบ

a = ยกเว้น serovar Typhi จะให้ผลลบ

ที่มา : Bell และ Kyriakides (2002)

2.2 ไวรัสของแบคทีเรีย (อัญชุลี, 2555)

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือเฟจ (Phage) เป็นไวรัสของแบคทีเรียซึ่งสามารถใช้แบคทีเรียเป็นเจ้าบ้านในการเพิ่มจำนวน โดยมีอยู่มากมายและหลากหลายในธรรมชาติ ไวรัสของแบคทีเรีย ถูกค้นพบครั้งแรกในปีค.ศ.1915 โดย Twort พบว่ามีสารบางอย่างที่เปลี่ยนโคโลนีของเชื้อ *Micrococcus* sp. ให้มีลักษณะใส ซึ่งเกิดจากการทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยสิ่งที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวน่าจะเป็นไวรัส ต่อมา Felix D'Herelle รายงานว่าสิ่งที่สามารถทำให้เซลล์ของ *Shigella* sp.ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (broth) แตก นั้นคือไวรัสของแบคทีเรียและเรียกว่า bacteriophage (Ackermann, 1997) ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากและมีความจำเพาะสูง โดยพบว่าไวรัสของแบคทีเรียแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

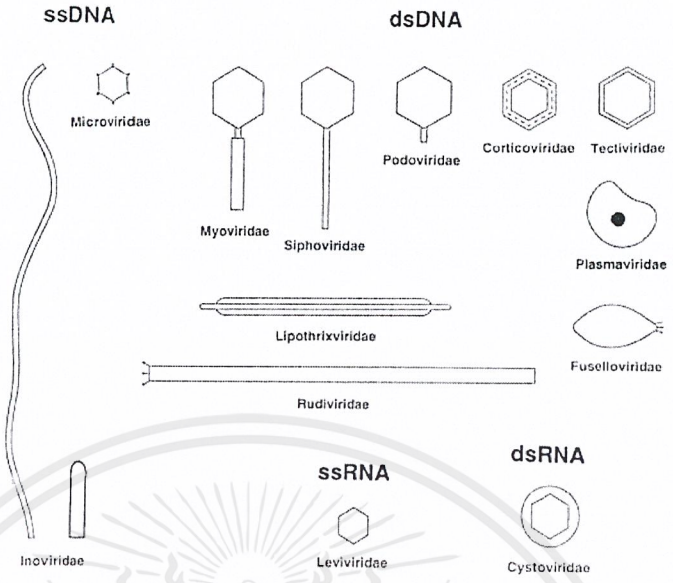
ละชนิดมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ไวรัสของแบคทีเรียจัดเป็น obligate parasite สามารถเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฉพาะภายในเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น

ดังนั้นจึงมีผู้นำไวรัสของแบคทีเรียไปใช้เป็นเครื่องมือพื้นฐานสำหรับการพัฒนาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) เพื่อนำยีนที่สนใจใส่เข้าไปในแบคทีเรีย นอกจากนี้ด้วยความจำเพาะของไวรัสของแบคทีเรียต่อแบคทีเรียจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การจำแนกแบคทีเรีย (phage typing) การควบคุมทางชีววิทยา (biocontrol) และการใช้เพื่อรักษา (phage therapy) เนื่องจากเอนไซม์ที่สำคัญของไวรัสของแบคทีเรีย คือ เอนโดไลซิน (endolysin) ซึ่งไวรัสของแบคทีเรียใช้ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อจะปลดปล่อยประชากรของไวรัสของแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์แบคทีเรียออกสู่ภายนอก เป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ (infectious disease) ที่เกิดจากแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มซึ่งยากต่อการรักษา

2.2.1 การจำแนกชนิดไวรัสของแบคทีเรีย (อัญชุลี, 2555)

ไวรัสแบคทีเรียทุกชนิดประกอบด้วยจีโนม (genome) ซึ่งหุ้มล้อมด้วยโปรตีน (capsid) โดย genome นั้นอาจจะเป็น double-stranded DNA, single-stranded DNA, double-stranded RNA หรือ single-stranded RNA ซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และวงกลม (circular) capsid ของไวรัสแบคทีเรียมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น hexagonal ขนาดเล็ก filamentous หรือรูปร่างซับซ้อนที่ประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง (รูปที่ 2.2) ปัจจุบัน International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดจำแนกออกเป็น 1 order 13 families และ 30 genera ตามชนิดของกรดนิวคลีอิก (nature of nucleic acid) และรูปร่างลักษณะ (particle morphology) โดยไวรัสแบคทีเรียจำนวนมากกว่าร้อยละ 96 เป็น tailed phage และส่วนใหญ่มี dsDNA เป็นสารพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 รูปร่างลักษณะ order และ families ของ major phage groups

ที่มา : Ackermann (2003)

2.2.2 นิเวศวิทยาไวรัสของแบคทีเรีย (อัญชุลี, 2555)

ไวรัสแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยประมาณกันว่ามีจำนวนและความหลากหลายสูงที่สุดในโลกของสิ่งมีชีวิตและพบได้ทั่วไปในน้ำ อุจจาระ ดินและแม้แต่น้ำทะเล โดยพบว่าจำนวนของไวรัสแบคทีเรียและเจ้าบ้านจะมีความไม่แน่นอน สามารถเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสแบคทีเรียในทะเล (marine phage) ยังมีบทบาทโยงสัมพันธ์ชนิดอาหาร (food web) โดยการไปทำลายเซลล์เจ้าบ้านให้แตกออกทำให้สารอาหารต่าง ๆ ถูกปล่อยออกมาหรือมีการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปอื่นซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ต่อไป

2.2.3 ความจำเพาะในไวรัสของแบคทีเรีย (อัญชุลี, 2555)

ไวรัสแบคทีเรียสามารถพบได้ในแบคทีเรียกว่า 140 genera และยังพบในสิ่งมีชีวิตจำพวก archaea และ eubacteria และมีการศึกษามากมายกว่า 1,500 ชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ไวรัสแบคทีเรียมีความจำเพาะกับเซลล์เจ้าบ้านในระดับหนึ่ง โดยไวรัสแบคทีเรียจะจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ teichoic acid, lipoteichoic acid, flagella, capsule, lipopolysaccharide และ porin เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.2.4 วงจรชีวิตไวรัสของแบคทีเรีย (อัญชุลี, 2555)

ไวรัสของแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามวงจรชีวิตในแบคทีเรีย คือ

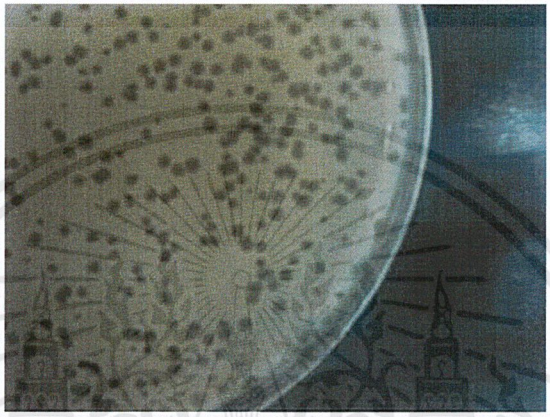
1. lytic phage หรือ virulent phage หมายถึง ไวรัสแบคทีเรียที่เมื่อเข้าสู่แบคทีเรียแล้วมีการเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นภายในเซลล์โดยใช้สารต่าง ๆ จากเซลล์เจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนและจีโนม จากนั้นจะประกอบส่วนต่าง ๆ เข้าเป็น phage progeny แล้วทำให้แบคทีเรียแตกออกเพื่อให้ progeny ออกมาเพื่อเข้าสู่เซลล์อื่นต่อไปเมื่อเลี้ยงไวรัสแบคทีเรียร่วมกับแบคทีเรียแล้วผสมวุ้นราดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จะสังเกตเห็นแบคทีเรียถูกทำลายเป็นวงใส เรียกว่า plaque (รูปที่ 2.3)

2. lysogenic phage หรือ temperate phage หมายถึง ไวรัสแบคทีเรียที่เข้าสู่แบคทีเรียแล้วไม่มีการสร้าง phage progeny แต่จีโนมของไวรัสแบคทีเรียจะสอดแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรีย โดย genetic recombination เรียกจีโนมของไวรัสแบคทีเรียระยะนี้ว่า prophage เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี prophage แฝงอยู่ด้วย กระบวนการนี้เรียกว่า lysogenization แบคทีเรียที่มี prophage แฝงอยู่เรียกว่า lysogen หรือ lysogenic bacteria แต่ก็มี prophage ชนิดที่จีโนมของไวรัสแบคทีเรียไม่ได้อยู่ในสภาพสอดแทรกรวมกับโครโมโซมของแบคทีเรีย แต่อยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 2.4) การอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์เจ้าบ้านและ lysogenic phage สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตผ่านทาง lateral หรือ horizontal gene transfer ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับเซลล์เจ้าบ้านได้มากมาย เช่น เปลี่ยนแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคให้เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Salmonella* spp. เมื่อถูก lysogenize ด้วยไวรัสแบคทีเรีย e จะมีลักษณะของ somatic O antigen เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดี (Antibody) ที่จำเพาะ สำหรับเชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* ซึ่งสร้าง diphtheria toxin ที่ทำให้เกิดโรคคอตีบนั้นพบว่า แบคทีเรียสร้างสารพิษ (toxin) ได้เพราะมี ß phage เข้าไป lysogenize อยู่ สายพันธุ์ของ *C. diphtheriae* ที่ไม่ถูก lysogenize ด้วย ß phage จะไม่สร้างสารพิษ และไม่ทำให้เกิดโรคนอกจากนี้แล้วยังพบว่าการสร้าง ß toxin จาก *Clostidium botulinum* ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (Botulism) และสารพิษจาก hemolytic *Streptococcus* group A ซึ่งทำให้เกิดผื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
133346

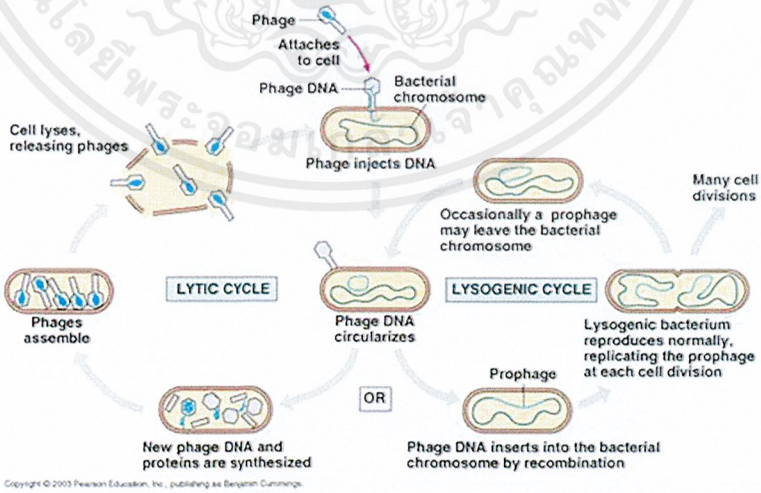
ในโรคไข้อีดำอีแดง (Scarlet fever) ถูกควบคุมโดยยีนของ lysogenic phage เช่นกัน นอกจากนี้ ไวรัสแบคทีเรียยังช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์เจ้าบ้านถูกทำลายจากไวรัสแบคทีเรียอื่นได้อีกด้วย

อย่างไรก็ตามวงจรชีวิตของไวรัสแบคทีเรียทั้งสองประเภท สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงระหว่างกันและกันได้ (interchangeable) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อม สารอาหารภายในเซลล์เจ้าบ้าน เป็นต้น



รูปที่ 2.3 ลักษณะของพลาค (plaque) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มา : http://www.smj.ejnal.com/ejournal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1604



รูปที่ 2.4 วงจรชีวิตของ bacteriophage

ที่มา : www.niles-hs.k12.il.us/jacnau/chpt184.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 กลไกของ lytic phage ในการทำลายแบคทีเรีย (อัญชุลี, 2555)

กลไกการทำงานของ lytic phage ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนกระทั่งเกิดการแตกของเซลล์ประกอบด้วยโปรตีนที่ทำงานร่วมกัน 2 ชนิดคือ holin และ endolysin โดย holin เป็น hydrophobic protein ขนาดเล็ก ซึ่งจะสอดแทรก holin monomer เข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากทางด้านในของเซลล์แล้วประกอบเป็น holin oligomers ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์หลังจากนั้น เอนโดไลซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์สามารถผ่านเข้าไปย่อยทำลายชั้นเปปติโดไกลแคน ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและปลดปล่อยอนุภาคออกมา เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) มีผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้การออกฤทธิ์ของเอนไซม์แตกต่างกันด้วย โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้นเปปติโดไกลแคนที่หนาและอยู่ด้านนอกสุดดังนั้น เอนโดไลซินจึงสามารถทำงานเป็นเอกโซไลซิน (exolysin) ได้ด้วย เพื่อทำลายแบคทีเรียจากทางด้านนอก รวมถึงมี teichoic acid และ lipoteichoic acid เป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะสำหรับเอนไซม์ในการจดจำ โดยใช้ส่วนของ binding domain สำหรับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ที่ป้องกันไม่ให้เอนไซม์ทำงานจากด้านนอก แต่เมื่อชั้น lipopolysaccharide ถูกทำลายด้วยการใช้ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) หรือสารซักฟอก (detergent) ก็สามารถถูกทำลายจากภายนอกได้ด้วยเอนไซม์เอนโดไลซิน (Loessner, 2005) เอนโดไลซิน หรือ phage lysozyme เป็นเอนไซม์ของไวรัสแบคทีเรียที่ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก (รูปที่ 2.5) โดย C-terminal binding domain หรือ substrate recognition ทำหน้าที่ในการจดจำและจับกับ substrate ที่จำเพาะบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และ N-terminal catalytic domain หรือ enzymatic hydrolysis ทำหน้าที่ในการตัดพันธะหลัก (major bond) บริเวณชั้นของเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรียให้แยกออก ส่วน L คือ linker ซึ่งเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เชื่อมระหว่างโครงสร้างหลักทั้งสองให้สามารถขยับได้

รูปที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานของ endolysin

ที่มา : Fischetti (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

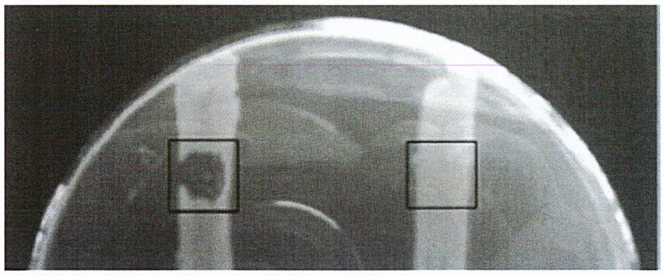
2.2.6 การทำ plaque assay

ไวรัสแบคทีเรียสามารถสังเกตได้จากโซนใสหรือ plaque ที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า การทำ plaque assay ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ 2 วิธี ได้แก่ วิธี double agar layer หรือ overlay agar method และวิธี spot test

วิธี spot test จะเป็นการทดลองแบบคร่าวๆ ว่าตัวอย่างนั้นมีไวรัสแบคทีเรียที่สามารถบุกรุกแบคทีเรียที่มีอยู่ได้หรือไม่ โดยลากเชื้อด้วยไม้พันสำลี (swab) ที่มีเชื้อแบคทีเรียลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งในลักษณะเป็นเส้นตรงขีดยาวบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ กำหนดให้เส้นแรกเป็นเส้นควบคุมที่จะไม่มีการหยดตัวอย่างของเหลว เส้นที่สองเป็นเส้นสำหรับทดลอง ทิ้งให้แห้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างของเหลวที่คาดว่าจะมีไวรัสแบคทีเรียปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาหยดลงบนเส้นของแบคทีเรียที่จะทดลอง นำไปบ่มข้ามคืน แล้วสังเกตโซนใสหรือพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทดสอบได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง เป็นการประหยัดเวลาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

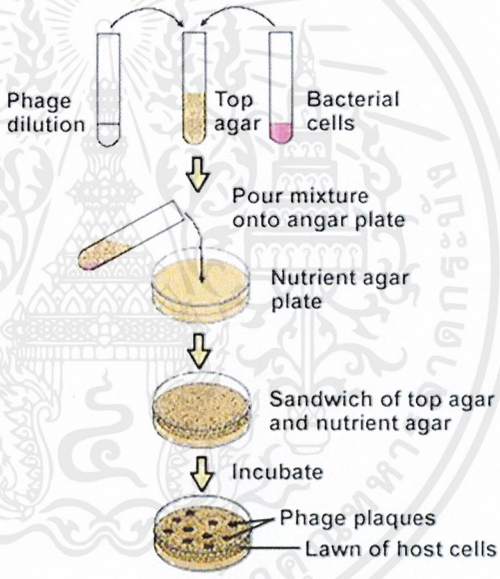
วิธี double agar layer จะนิยมใช้ในการแยกไวรัสแบคทีเรียมากกว่าวิธี spot test โดยวิธีนี้จะมีการรวมไวรัสแบคทีเรีย เซลล์เจ้าบ้านและอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ต่อมาจะทำการเทส่วนผสมที่ได้นี้ทับซ้อนบนวุ้นที่เป็นฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชั้นหนึ่ง แล้ววนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วเช่นเดียวกับ pour plate technique รอจนวุ้นแข็งตัวแล้วคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มข้ามคืน สังเกตพลาคที่เกิดขึ้น ข้อดีของวิธีนี้จะทำให้เกิดการผสมได้ดีกว่า มีความสม่ำเสมอมากกว่าการใช้วิธีที่ไม่ได้ซ้อนทับของวุ้น ขนาดของพลาค จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีอัตราของการแพร่กระจายของอนุภาคไวรัสแบคทีเรียที่มากขึ้นในการเททับวุ้น ซึ่งการแพร่กระจายที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากวุ้นที่เทซ้อนทับมีความเข้มข้นต่ำกว่าวุ้นที่เป็นฐาน และจะให้จำนวนพลาคมากกว่า รวมทั้งสะดวกในการตรวจนับและคำนวณจำนวนของไวรัสแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างซึ่งแสดงในหน่วย pfu ต่อมิลลิลิตร วิธีนี้มีประโยชน์อย่างมากในการทำให้ไวรัสแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 spot test method (ซ้าย) พลาคของไวรัสแบคทีเรีย (ขวา) ตัวควบคุม

ที่มา : Clokie และ Kropinski (2009)



รูปที่ 2.7 double agar layer method

ที่มา : http://202.204.115.67/jpkch/jpkch/2008/wswx/chapter%209.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kocharunchitt, Ross และ Mcneil (2009) ได้ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียที่สามารถควบคุมจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Oranienburg ได้ 2 ไอโซเลต คือ SSP5 และ SSP6 ซึ่งนำไปทดลองในสภาวะทดลองและทดลองจริงกับเมล็ด alfalfa โดยในสภาวะทดลองพบว่าไวรัสของแบคทีเรียไอโซเลต SSP5 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากกว่าไอโซเลต SSP6 และในการทดลองปนเปื้อนกับเมล็ด alfalfa พบว่าไวรัสของแบคทีเรียไอโซเลต SSP6 สามารถลดจำนวนเชื้อได้ 1 log CFU/กรัม ภายหลังจากการทดลองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Guenther และคณะ (2012) พบว่าการใช้ virulent phage หรือ lytic phage ซึ่งเป็นไวรัสของแบคทีเรียชนิดร้ายแรง มีผลในการทำลายแบคทีเรียทันทีที่มีการเพิ่มจำนวนไวรัสของแบคทีเรีย และปลดปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย ทดลองโดยการใช้ไวรัสของเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ผลที่ได้พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ได้มากถึง 5 log units และหากทำการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่าสามารถจำกัดการเจริญของแบคทีเรียให้อยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าปริมาณที่ตรวจนับได้

Atterbury และคณะ (2007) ทดลองแยกไวรัสแบคทีเรียของเชื้อ *Salmonella* ได้ทั้งหมด 232 ไอโซเลต จากฟาร์มไก่ โรงฆ่าสัตว์ และน้ำเสียในปีค.ศ. 2004 และ 2005 โดยมีการทดลองนำไวรัสของแบคทีเรียให้บุกรุกเชื้อแบคทีเรีย พบว่าไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟาร์มไก่สามารถลดจำนวนโคโลนีเชื้อ *S. enterica* serotype Enteritidis ในลำไส้ใหญ่ได้ ≥ 4.2 $\log_{10}$CFU ภายใน 24 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับเชื้อควบคุม ส่วนไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงฆ่าสัตว์สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serotype Typhimurium ได้ ≥ 2.19 $\log_{10}$CFU ภายใน 24 ชั่วโมง

Hungaro และคณะ (2013) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้ไวรัสของแบคทีเรียกับการใช้สารเคมีในการลดจำนวน *S.* Enteritidis ในหนังไก่ สามารถแยกไวรัสของแบคทีเรียได้ 5 ไอโซเลต จากมูลไก่ แล้วนำหนังไก่มาทดลองกับไวรัสของแบคทีเรียและสารเคมี พบว่าให้ผลจำนวนจุลินทรีย์ที่ลดลงเช่นเดียวกัน คือ เชื้อจุลินทรีย์ลดลง 1 log CFU/ตร.ซม.

Tiwari, Kim และ Kim (2013) ได้ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียที่สามารถเข้าบุกรุกเชื้อและมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ได้ไอโซเลต SE2 พบว่าไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้สามารถควบคุมเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างมีประสิทธิภาพในการลดการแพร่กระจายของไบโอฟิล์มและมีคุณสมบัติสามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงและค่าความเป็นด่างได้

Verma และคณะ (2013) ได้ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียที่สามารถบุกรุกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Abortusequi ที่ทำให้เกิดอาการแท้งในม้า พบว่าไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้ 2 ไอโซเลต สามารถควบคุมเชื้อ *Salmonella* Abortusequi ได้ดีและในอนาคตสามารถนำไปพัฒนา phage lysate เป็นวัคซีนสำหรับการใช้รักษาอาการแท้งในม้าได้

Higgins และคณะ (2007) ได้ทำการแยกและคัดเลือกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียที่สามารถเข้าบุกรุกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis* พบว่าไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis* ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกให้เหลือ 11,224 CFU/กรัม ได้ในเวลา 24 ชั่วโมง

Carey-Smith และคณะ (2006) ได้แยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียที่สามารถบุกรุกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *S.* Typhimurium PT160, *Salmonella* LT2 และ *S.* Infantis พบว่าไวรัสแบคทีเรียไอโซเลต FGCSSa1 มีความสามารถในการเจริญในสิ่งมีชีวิต (host range) กว้างโดยสามารถบุกรุกเชื้อแบคทีเรียได้ 6 ไอโซเลตจากทั้งหมด 8 ไอโซเลต

Ahiwale และคณะ (2013) ได้แยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำในแม่น้ำ Pavana ประเทศอินเดีย ที่สามารถบุกรุกเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* serovar Paratyphi B พบว่าไวรัสของแบคทีเรียที่ได้มีความเสถียรในช่วงค่าพีเอช 4-9 และอุณหภูมิ 4–40 องศาเซลเซียส สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Paratyphi B สายพันธุ์ต้านยาได้

Williamson, Wommack และ Redosovich (2003) ได้ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน โดยใช้สารชะต่างๆ ในการเป็นตัวสกัดออกจากตะกอน ได้แก่ สารสกัดจากเนื้อ 10% (ค่าความเป็นกรดด่าง) , ไกลซีน ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ (ค่าความเป็นกรดด่าง 8) , potassium citrate 1% (ค่าความเป็นกรดด่าง 7) และ sodium pyrophosphate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ค่าความเป็นกรดด่าง 7) โดยใช้สารชะที่เย็น แล้วไปผ่านการ sonication ทำให้เกิดการหลุดออกของไวรัสของแบคทีเรียรวมอยู่ในสารละลาย พบว่าไกลซีนและสารสกัดจากเนื้อให้จำนวนของไวรัสของแบคทีเรียที่มีชีวิตมากกว่า potassium citrate และ sodium pyrophosphate ส่วนการใช้สารสกัดจากเนื้อแม้ว่าจะเหมาะสมกับการนำไปแยกไวรัสของแบคทีเรีย แต่การนำไปศึกษาวิเคราะห์ epifluorescence microscopy จะไม่สามารถทำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Williamson และคณะ (2013) ได้ทำการทดลองแยกไวรัสของแบคทีเรียจากดินโดยมีการเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน 4 ชนิด คือ ชนิดของสารชะ ได้แก่ potassium citrate (ค่าความเป็นกรดด่าง 7) , sodium deoxycholate (0.1% w/v) (ค่าความเป็นกรดด่าง 7) และน้ำ deionized (ค่าความเป็นกรดด่าง 7) ปัจจัยที่สอง คือ วิธีการรบกวนทางกายภาพ ได้แก่ sonication , blending , beat-beating และ vortexing พบว่าการเลือกใช้ชนิดของสารชะและวิธีการรบกวนทางกายภาพกับดินแต่ละชนิด มีผลต่อจำนวนไวรัสของแบคทีเรียที่แยกได้ต่างกัน คือ วิธี sonication หรือ blending เหมาะสมกับการใช้สกัดด้วยสาร potassium citrate ซึ่งจะให้จำนวนไวรัสของแบคทีเรียมากที่สุดในการทดลองกับตัวอย่างดินทั้งหมด

Hu (1998) ได้ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินโดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือ ใช้ glycine buffer method และ beef extract method ในการเป็นสารชะไวรัสของแบคทีเรียจากดิน พบว่าวิธี glycine buffer method นั้นมีความสะดวก รวดเร็ว และเหมาะสมสำหรับการตรวจหาไวรัสของแบคทีเรียและการนับจำนวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์จากหลายๆ ตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish) (Union Science Co.,Ltd., Thailand)

3.1.2 แท่งแก้วคนสาร (stirring glass rod)

3.1.3 คิวเวตต์ (cuvette)

3.1.4 แท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader)

3.1.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

3.1.6 บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex,USA)

3.1.7 เครื่อง spectrophotometer (Thermo scientific รุ่น genesys 10s UV-vis)

3.1.8 ตู้บ่มแบบเขย่า (shaker incubator) (Unitron รุ่น 250)

3.1.9 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex, Germany), 500 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)

3.1.10 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.11 หลอด microcentrifuge tube (Extragene Inc, Taiwan)

3.1.12 ช้อนตักสาร (spatula)

3.1.13 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hermle รุ่น Z383K, Germany)

3.1.14 กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.1.15 ไมโครปิเปต (micropipette) (Gilson, France)

3.1.16 ทิป (tip) ขนาด 100,1000 ไมโครลิตร (Extragene Inc, Taiwan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.17 ตู้บ่มเชื้อ (Contherm, รุ่น 7050, New Zealand)

3.1.18 เครื่องวัดพีเอช (Ohaus, รุ่น starter 3000)

3.1.19 ตัวกรอง 0.45 μm (Minisart high flow syringe filters, 16555)

3.1.20 ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร,10 มิลลิลิตร (HBG,Germany)

3.1.21 หลอดทดลองแก้ว (test tube) (Pyrex, USA)

3.1.22 กระบอกฉีดยา (syringe) (Nipro, Thailand)

3.1.23 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร (Becton Dickinson, USA)

3.1.24 เครื่อง vortex mixer (Scientific industries, รุ่น G560E, USA)

3.1.25 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert รุ่น one14, Germany)

3.1.26 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spectrafuge รุ่น 16m)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.3 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 สารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์

3.2.5 สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน (glycine buffer) ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8

3.2.6 สารละลายบัฟเฟอร์ SM

3.2.7 สารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารแข็ง TSA (trypticase soy agar) (ภาคผนวก ก)

3.4.2 อาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก)

3.4.3 อาหารแข็ง LB 2 สูตร (มีวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 0.6 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ก)

3.4 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีทดลอง

3.5.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

3.5.1.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 จากหลอดอาหารแข็ง NA slant โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง NA slant แล้วทำการขีดเชื้อแบบตัดกัน (cross streak plate) บนอาหารแข็ง LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 5562 จากอาหารแข็ง LB จำนวน 2 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.5.1.2 ขั้นตอนการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *S.* Typhimurium TISTR 5562

นำหัวเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 5562 ที่ได้จากข้อ 3.5.1.1 ไปเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Rolfe และคณะ, 2012) เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส วัดค่าความขุ่นของเซลล์ทุกๆ 20 นาที (Campbell, 1957) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการเจริญ (ภาคผนวก ข) ให้ได้กราฟการเจริญของเซลล์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CFU ต่อมิลลิลิตรกับเวลา

3.5.2 การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

3.5.2.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างที่เป็นของเหลวจากแหล่งน้ำต่างๆ ตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร โดยแยกใส่ในขวดพลาสติกที่มีฝาปิด นำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ทำการเก็บตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น มูลไก่ มูลนก ตะกอนดิน โดยแต่ละตัวอย่างเก็บมาประมาณ 10 กรัม แยกใส่ในถุงพลาสติก (ถุงร้อนใสสำหรับใส่อาหาร) มัดปากถุงให้แน่นด้วยหนังยาง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่างที่นำมาแยกไวรัสของแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่นำมาคัดแยกไวรัสของแบคทีเรีย

ตัวอย่าง	วิธีการแยกไวรัสของแบคทีเรีย	
	Extraction	Enrichment
น้ำจากบ่อภาคพืชสวน		✓
น้ำล้างเล้าไก่จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร		✓
น้ำข้างทางรถไฟสถานีพระจอมเกล้า		✓
น้ำหน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์		✓
น้ำบ่อปลา 1 (จ.สมุทรปราการ)		✓
น้ำบ่อปลา 2 (จ.สมุทรปราการ)		✓
น้ำทิ้งครัวเรือน (จ.สมุทรปราการ)		✓
น้ำจากโรงอาหารใหม่คณะวิทยาศาสตร์		✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่นำมาคัดแยกไวรัสของแบคทีเรีย (ต่อ)

ตัวอย่าง	วิธีการแยกไวรัสของแบคทีเรีย	
	Extraction	Enrichment
มูลไก่ 1	✓	
มูลไก่ 2	✓	
มูลไก่ 3	✓	
มูลไก่ 4	✓	
มูลไก่ 5	✓	
มูลไก่ 6	✓	
มูลไก่ 7	✓	
มูลไก่ 8	✓	
มูลไก่ 9	✓	
ตะกอนจากร้านอาหารทางรถไฟ	✓	
ตะกอนจากบ่อหอพักซอยเกกีงาม 1	✓	
ตะกอนจากร้านก๋วยเตี๋ยว	✓	
มูลนก 1	✓	
มูลนก 2	✓	
มูลนก 3	✓	
มูลนก 4	✓	
มูลนก 5	✓	
มูลนก 6	✓	
มูลนก 7	✓	
มูลนก 8	✓	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 ขั้นตอนการแยกไวรัสของแบคทีเรียสำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว

นำตัวอย่างใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000×g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ให้ตกตะกอน (Center for phage technology Texas A&M University, 2011) ดูดส่วนใส (supernatant) ด้วยหลอดฉีดยา นำไปกรองผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Beaudoin และคณะ, 2007) เก็บตัวอย่างส่วนใสตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อ

การ enrichment phage โดยการนำส่วนใสของตัวอย่าง (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 2X LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านระยะ log phase ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ที่ได้เตรียมตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1.1 นำไปเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (overnight) ต่อมานำสารละลายที่ผ่านการ enrichment ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000×g เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เก็บส่วนที่กรองได้ในภาชนะปลอดเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการแยกไวรัสของแบคทีเรียต่อไป

3.5.2.3 ขั้นตอนการแยกไวรัสของแบคทีเรียสำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

ใช้วิธีดัดแปลงของ Williamson และคณะ (2013) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตามด้วยสารชะที่แช่เย็น (สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน (glycine buffer) ที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8) (Williamson, Wommack และ Radosevich, 2003) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที ต่อมานำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่อง ผสมเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะความเร็วรอบ 8,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เก็บส่วนที่กรองได้ในภาชนะปลอดเชื้อ สำหรับนำไปใช้ในการแยกไวรัสของแบคทีเรียต่อไป

3.5.2.4 การทำ plaque assay

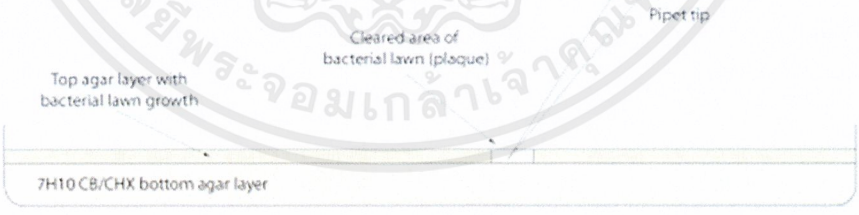
ใช้เทคนิค agar overlay method ซึ่งประกอบด้วยอาหารวุ้น 2 ชั้น โดยชั้นล่างคือสูตรอาหารที่มีวุ้นเป็นองค์ประกอบ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (bottom agar) ส่วนชั้นบนคือสูตรอาหารที่มีวุ้นเป็นองค์ประกอบ 0.6 เปอร์เซ็นต์ (top agar) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ใส่หัวเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(overnight culture) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายที่ผ่านการกรอง (filtrate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB บรรจุอยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมโดยปั่นมือเบาๆ แล้วเทลงบนอาหารแข็งที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างรวดเร็ว วนส่วนผสมให้กระจายทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำจานควบคุม (control) ซึ่งไม่ใส่สารละลายที่ผ่านการกรอง ทิ้งไว้ให้แข็ง บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับจานควบคุม

3.5.2.5 การทำให้ไวรัสของแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ (Sambrook และ Russell, 2001)

ถ่ายสารละลายบัฟเฟอร์ SM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก แล้วใช้ทิปที่ปราศจากเชื้อขนาด 100 ไมโครลิตร เก็บพลาคเดี่ยวที่เกิดขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 3.1 ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม หลังจากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บสารแขวนลอยไวรัสของแบคทีเรีย (bacteriophage suspension) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยไวรัสของแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยง แล้วนำมากรองผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นทำ plaque assay ตามข้อ 3.5.2.4 โดยใช้ส่วนใสที่กรองได้ (Akhtar, Viazis และ Diez-Gonzalez, 2014) และทำซ้ำตามวิธีการข้างต้น อีกเป็นจำนวน 4 ครั้ง เพื่อให้ได้พลาคที่บริสุทธิ์สำหรับนำไปเตรียมสารละลายไวรัสของแบคทีเรียเข้มข้น



รูปที่ 3.1 การเก็บ plaque

ที่มา: http://bio.classes.ucsc.edu/bio121l/protocols%20ForBio121L2011/Picking_a_Plaque_PDF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.6 การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารแขวนลอยไวรัสของแบคทีเรีย

(Sambrook และ Russell, 2001)

ใช้ทิปเขี่ยพลาคเดี่ยวบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.5.2.5 ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ SM ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยตัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำสารแขวนลอยไวรัสของแบคทีเรียที่กรองได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเชื้อเจ้าบ้านปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยมือ แล้วเทลงในอาหารแข็ง LB ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างรวดเร็ว วนให้ส่วนผสมทั้งหมดกระจายจนทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็ง ทำลักษณะเดียวกันนี้เป็นจำนวน 7 ซ้ำ (จานอาหาร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เมื่อบ่มครบเวลาแล้ว ทำการตรวจหาจานอาหารที่มีลักษณะเรียกว่า plate lysate (มีโซนย่อยสลายเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย) ต่อมาถ่ายสารละลายบัฟเฟอร์ SM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ทิปดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้มากที่สุด ถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SM อีก 1 มิลลิลิตร ลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM ไปรวมกับที่เก็บไว้ก่อนหน้า หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะความเร็วรอบ 4,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4องศาเซลเซียส ของเหลวที่กรองได้ เรียกว่า สารแขวนลอยไวรัสของแบคทีเรียเข้มข้น (bacteriophage stock) จากนั้นนำไปหาจำนวนอนุภาคไวรัสของแบคทีเรียโดยการทำ plaque assay เช่นเดียวกับข้อ 3.5.2.4 และคำนวณอนุภาคไวรัสในหน่วย pfu ต่อมิลลิลิตร

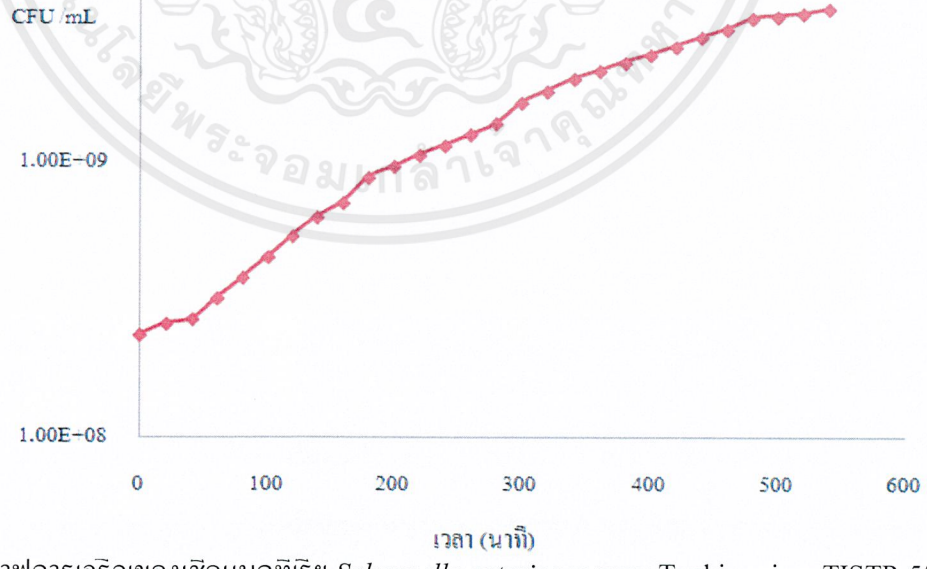
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 เพื่อใช้ข้อมูลการเจริญของเชื้อดังกล่าว เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของไวรัสของแบคทีเรีย ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว LB ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.2 และใช้เวลาในการทดลองทั้งหมด 9 ชั่วโมง โดยนำค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเซลล์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CFU ต่อมิลลิลิตรกับเวลา โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีระยะ lag phase ไม่เกิน 40 นาที หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ log phase กระทั่งครบเวลาในการทดลองคือ 9 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.1 มีค่าอัตราการเจริญ (growth rate) เท่ากับ 0.3031 ต่อชั่วโมง และระยะเวลาในการแบ่งตัว 2.2864 นาที



รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 ในช่วงแรกของงานวิจัยนี้ได้แยกจากตัวอย่างประเภทของเหลว ได้แก่ น้ำจากบ่อภาคพืชสวน, น้ำล้างเล้าไก่จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร, น้ำข้างทางรถไฟสถานีพระจอมเกล้า, น้ำหน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์, น้ำบ่อปลา 1 (จ.สมุทรปราการ), น้ำบ่อปลา 2 (จ.สมุทรปราการ), น้ำทิ้งครัวเรือน (จ.สมุทรปราการ) และน้ำจากโรงอาหารใหม่คณะวิทยาศาสตร์ ด้วยวิธีการส่งเสริมการเจริญของไวรัสแบคทีเรีย ต่อมาได้ทดลองแยกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ได้แก่ มูลไก่ 1-9, ตะกอนจากร้านอาหารทางรถไฟ, ตะกอนจากบ่อหอพักซอยเกกีงาม 1, ตะกอนจากร้านก๋วยเตี๋ยว และมูลนก 1-8 ด้วยวิธีการสกัด เพื่อให้อนุภาคไวรัสของแบคทีเรียหลุดจากอนุภาคที่ไวรัสยึดเกาะ

ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.1 พบว่า จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมที่ทำการทดลองสามารถแยกไวรัสของแบคทีเรียได้ 1 ตัวอย่าง (รูปที่ 4.2) คือ มูลนก จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.1 ผลของตัวอย่างที่นำมาคัดแยกไวรัสของแบคทีเรีย

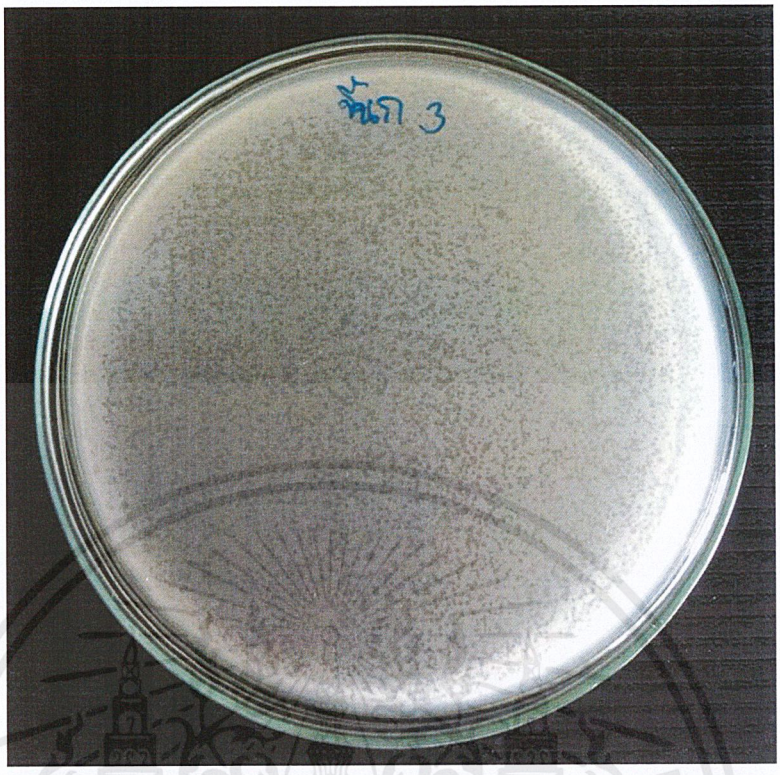
ตัวอย่าง	วิธีการแยกไวรัสของแบคทีเรีย		พบ/ไม่พบ
	Extraction	Enrichment	
น้ำจากบ่อภาคพืชสวน		✓	ไม่พบ
น้ำล้างเล้าไก่จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร		✓	ไม่พบ
น้ำข้างทางรถไฟสถานีพระจอมเกล้า		✓	ไม่พบ
น้ำหน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์		✓	ไม่พบ
น้ำบ่อปลา 1 (จ.สมุทรปราการ)		✓	ไม่พบ
น้ำบ่อปลา 2 (จ.สมุทรปราการ)		✓	ไม่พบ
น้ำทิ้งครัวเรือน (จ.สมุทรปราการ)		✓	ไม่พบ
น้ำจากโรงอาหารใหม่คณะวิทยาศาสตร์		✓	ไม่พบ
มูลไก่ 1	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 2	✓		ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลของตัวอย่างที่นำมาคัดแยกไวรัสของแบคทีเรีย (ต่อ)

ตัวอย่าง	วิธีการแยกไวรัสของแบคทีเรีย		พบ/ไม่พบ
	Extraction	Enrichment	
มูลไก่ 3	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 4	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 5	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 6	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 7	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 8	✓		ไม่พบ
มูลไก่ 9	✓		ไม่พบ
ตะกอนจากร้านอาหารทางรถไฟ	✓		ไม่พบ
ตะกอนจากบ่อหอพักซอยเกกีงาม 1	✓		ไม่พบ
ตะกอนจากร้านก๋วยเตี๋ยว	✓		ไม่พบ
มูลนก 1	✓		ไม่พบ
มูลนก 2	✓		ไม่พบ
มูลนก 3	✓		พบ
มูลนก 4	✓		ไม่พบ
มูลนก 5	✓		ไม่พบ
มูลนก 6	✓		ไม่พบ
มูลนก 7	✓		ไม่พบ
มูลนก 8	✓		ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



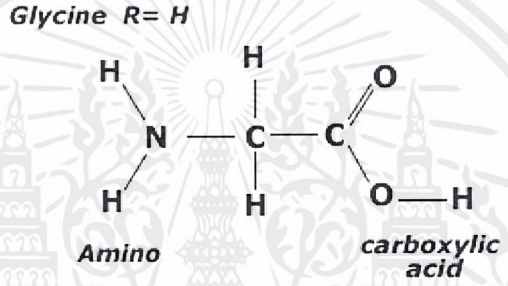
รูปที่ 4.2 ลักษณะของพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากรูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของพลาคใสที่เกิดขึ้นในจานอาหารสองชั้นที่ได้จากการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 ด้วยวิธีการสกัดไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างประเภทของแข็ง คือ มูลนก พบพลาค (plaque) มีลักษณะกลมใส ขนาด 0.83 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำพลาคที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และเตรียมให้ได้สารละลายของไวรัสของแบคทีเรียที่เข้มข้น ซึ่งมีจำนวนอนุภาคไวรัสของแบคทีเรียเท่ากับ 1.2×10^{11} pfu ต่อมิลลิลิตร

วิธีที่สองทำให้ตรวจพบไวรัสของแบคทีเรีย ได้ใช้วิธีการสกัดด้วยสารชะที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูง คือ ไกลซีน (glycine) ที่เป็นกรดอะมิโนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ลักษณะโครงสร้างแบบ amphiphatic (มีด้าน hydrophilic และ hydrophobic อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน) (รูปที่ 4.3) ซึ่งจากการปรับค่าความเป็นกรดด่างสารละลายไกลซีนให้เป็นด่าง (ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8) จะทำให้ไกลซีนมีคุณสมบัติในการละลายที่ดีขึ้น เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่าง (pH) มากกว่าค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) และทำให้สารละลายไกลซีนมีประจุสุทธิที่เป็นลบ นอกจากนี้ยังทำให้มีแนวโน้มใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มแรงผลักทางประจุไฟฟ้า (electrostatic repulsion) ระหว่างอนุภาคไวรัสของแบคทีเรียกับอนุภาคของตะกอนโดยผ่านปรากฏการณ์ de-protonation เป็นการดึงประจุบวกทั้งที่อยู่กับอนุภาคของตะกอนและอนุภาคไวรัสของแบคทีเรียออกมา (Gerba, 1984) จากการศึกษาประจุไฟฟ้าของอนุภาคไวรัสของแบคทีเรียโดย Krueger, Ritter และ Smith (1929) ได้ยกตัวอย่างไวรัสแบคทีเรีย anti-coli ระบุว่าในค่าความเป็นกรดด่างช่วง 3.4-9.0 ไวรัสแบคทีเรียจะแสดงประจุไปทางบวก และในช่วงต่ำกว่า 3.4 จะแสดงประจุไปทางลบ จึงสันนิษฐานว่าอนุภาคไวรัสของแบคทีเรียสามารถแปรผันตามค่าความเป็นกรดด่างของสภาพแวดล้อม



รูปที่ 4.3 โครงสร้างกรดอะมิโนไกลซีน (glycine)

ที่มา : http://click4biology.info/c4b/3/chem3.2.htm

การสกัด (extraction) ไวรัสของแบคทีเรียออกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็ง สามารถทำได้โดยอาศัยสภาวะทางประจุไฟฟ้าอย่างเหมาะสม (Primrose และ Day, 1977) ซึ่งจะใช้วิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมีใช้สารชะ (eluant) ที่มีความสามารถในการเข้าไปแทนที่อนุภาคไวรัสของแบคทีเรียซึ่งยึดเกาะอยู่กับอนุภาคของตัวอย่างโดยรบกวนผ่านทางประจุไฟฟ้าระหว่างอนุภาคและปฏิกิริยา hydrophobic (Gerba, 1984) สารชะส่วนใหญ่มักใช้สารที่มีพีเอชเป็นกลางหรือเป็นด่าง ได้แก่ potassium citrate, sodium pyrophosphate, sodium deoxycholate, deionized water, สารสกัดจากเนื้อ และไกลซีน ร่วมกับการใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่น (sonication), การปั่นผสม (blending), การตีด้วยเม็ดบีดส์ (bead-beating) และการปั่นผสมแบบวน (vortexing) (Williamson และคณะ, 2013) โดยทั่วไปสารละลาย glycine buffer และสารสกัดจากเนื้อมักจะใช้เป็นสารชะ (Hurst, 1997) เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และเหมาะสมสำหรับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจหาไวรัสของแบคทีเรียและการนับจำนวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์จากหลายๆ ตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม (Hu, 1998) ประกอบกับการใช้วิธีทางกายภาพเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้การสกัดไวรัสของแบคทีเรียได้ผลที่ดี (Araujo และคณะ, 1993) ขั้นตอนการสกัดจะทำการเติมสารชะที่เย็นลงไปในตัวอย่างตะกอน แล้วใช้วิธีทางกายภาพ เพื่อทำให้ไวรัสของแบคทีเรียที่ยึดเกาะกับอนุภาคของตะกอนหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย (Williamson, Wommack และ Redosovich, 2003)

จากการทดลองพบว่าการใช้ไกลซีนในวิธีสกัดไวรัสของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 จากตัวอย่างมูลนกซึ่งเป็นตัวอย่างประเภทของแข็ง ให้ผลที่ดีกว่าการใช้วิธีการส่งเสริมการเจริญของไวรัสของแบคทีเรีย (enrichment) จากตัวอย่างประเภทของเหลว เพราะโดยธรรมชาติไวรัสของแบคทีเรียมักจะยึดเกาะกับอนุภาคของแข็ง (solid substrates) มากกว่าที่จะอยู่เป็นอิสระในของเหลว เนื่องจากช่วยลดการเคลื่อนที่ และยังสามารถป้องกันการถูกทำลายจากสภาพแวดล้อมได้ จึงทำให้ไวรัสของแบคทีเรียมีความคงตัวและเพิ่มโอกาสในการอยู่รอด (Kleczkowska, 1957) ในช่วงแรกของงานวิจัยได้ใช้วิธีการส่งเสริมการเจริญของไวรัสของแบคทีเรีย โดยทำการปั่นเหวี่ยงให้เกิดการตกตะกอน ซึ่งจากการตกตะกอนอาจมีอนุภาคของไวรัสแบคทีเรียรวมอยู่ด้วย ทำให้จากการทดลองตัวอย่างที่เป็นของเหลวที่มีเพียงวิธีส่งเสริมการเจริญไวรัสของแบคทีเรียไม่ได้ผล เพราะฉะนั้นถ้าเพิ่มวิธีการสกัดในตัวอย่างประเภทของเหลวก็คาดว่าจะมีโอกาสพบไวรัสของแบคทีเรียได้เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองแยกไวรัสของแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมที่เป็นของแข็งและของเหลว พบ 1 ตัวอย่าง คือ มูลนก จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ด้วยการใช้วิธีการสกัดไวรัสของแบคทีเรียออกจากตัวอย่างโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ตัวอย่างที่ไม่ได้สกัด แต่มีการส่งเสริมการเจริญ ไม่สามารถแยกไวรัสของแบคทีเรียได้ แต่ตัวอย่างที่มีการสกัดก่อนนำไปแยกไวรัสของแบคทีเรีย พบว่า สามารถแยกไวรัสของแบคทีเรียได้ ดังนั้นสรุปได้ว่า การสกัดเป็นขั้นตอนสำคัญในการแยกไวรัสของแบคทีเรียจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการแยกไวรัสของแบคทีเรียในตัวอย่างประเภทของเหลว หากนำวิธีการสกัดไวรัสของแบคทีเรียมาใช้ร่วมด้วย จะเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบไวรัสของแบคทีเรียได้มากขึ้น

2. ในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับไวรัสของแบคทีเรีย ควรศึกษาทางด้านรูปร่างลักษณะไวรัสของแบคทีเรีย และความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไวรัสของแบคทีเรีย ด้วยการศึกษา One-step growth curve และพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Adsorption rate, Eclipse period, Latent period, Rise period และ Burst size

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 . แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : noble print

บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2552 . จุลชีววิทยาทางอาหาร = Food microbiology. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545 . จุลชีววิทยาทางอาหาร = Food microbiology. นนทบุรี : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

อัญชุลี เลิศสงคราม. 2555 . แบคเทอริโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม, 19(3) หน้า 16-23

Ackermann, H. W. 1997 . Felix d'Herelle-decouvreur des bacteriophages. Med. Sci., Vol.8 page 3–6.

Ackermann, H. W. 2003 . Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol., Vol.154 page 245–251.

Adams, M. H. and et al. 1990 . Retail survey of salmonellae incidence, levels, and serotypes on commercial broiler carcasses. Poult. Sci., Vol.69(Suppl.1) page 3.

Ahiwale, S. and et al. 2011 . In vitro management of hospital *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using indigenous T7-like lytic phage. Curr Microbiol, Vol.62 page 335-340.

Ahiwale, S. and et al. 2013 . Isolation and characterization of a rare waterborne lytic phage of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B. Canadian Journal of Microbiology, Vol.59(5) page 318-323.

Akhtar, M. , Viazis, S. and Diez-Gonzalez, F. 2014 . Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. Food Control, Vol.38 page 67-74.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Araujo, R. M. and et al. 1993 . Methodological improvements for the recovery of *B.fvagilis* phages and coliphages from environmental samples. Wat. Sci. Technol., Vol.27(3-4) page 119-122.

Atterbury R.J. and et al. 2007 . Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol., Vol.73 page 4543-4549.

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

Bell, C. and Kyriakides, A. 2002 . *Salmonella* : A practical approach to the organism and its control in foods. Oxford : Blackwell Science

Blackburn, C. D. W. and McClure, P. J. 2009 . Foodborne pathogens hazards, risk analysis and control. 2nd ed. Oxford : CRC press

Brenner, D. J. and et al. 2005 . Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York : Springer

Blaser, M. J. and Newman, L. S. 1982 . A review of human salmonellosis : I. Infective dose. Rev. Inf. Dis., Vol.4 page 1096-1106.

Campbell, A. 1957 . Synchronization of cell division. Bacteriol Rev., Vol.21(4) page 263-272.

Carey-Smith, G. V. and et al. 2006 . Isolation and characterization of bacteriophage infecting *Salmonella* spp. Fems Microbiol Lett., Vol.258(2) page 182-186.

Cavallaro, E. and et al. 2011 . *Salmonella* Typhimurium infections associated with peanut products. N Engl J Med., Vol.365 page 601-610.

Center for Phage Technology Texas A&M University, Protocol: Phage enrichments . [Online]. Available : https://cpt.tamu.edu/.../Phage-enrichments-07-12-2011.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Clokie, M. R. J. and Kropinski, A. M. 2009 . Bacteriophage Methods and Protocols Volume 1 : isolation, characterization, and interactions. New York : Humana Press

D'Aoust, J. Y. 1989 . *Salmonella* in foodborne bacterial pathogens. New York : Marcel Dekker

Fischetti, V. A. 2005 . Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. Trends in Microbiology, Vol.13 page 491-496.

Gerba, C. P. 1984 . Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Adv. Appl. Microbiol., Vol.30 page 133-68.

Green, S. and et al. 1982 . The incidence of *Salmonella* species and serotypes in young whole chicken carcasses in 1979 as compared with 1967. Poult. Sci., Vol.61 page 288-293.

Guenther, S., and et al. 2012 . Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. International Journal of Food Microbiology, Vol.154(1-2) page 66-72.

Harley, J. P. and Prescott, L. M. 1993 . Laboratory Exercises in Microbiology. 2nd ed. New York : McGraw-hill

Higgins, S. E. and et al. 2007 . Selection and application of bacteriophages for treating *Salmonella enteritidis* infections in poultry. International Journal of Poultry Science, Vol.6(3) page 163-168.

Hooton, P. T. S., Atterbury J. R. and Connerton F. I. 2011 . Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. International Journal of Food Microbiology, Vol.151 page 157-163.

Hu, T. L. 1998 . A comparison of two methods to recover phage from soil samples. Bioresource Technology, Vol.65(1-2) page 167-169.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hungaro, H. M., and et al. 2013 . Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. Food Research International, Vol.52 page 75–81.

Hurst, C. J. 1997 . Sampling viruses from soil, In Manual of Environmental Microbiology. eds C. J. Hurst, G. R.Kundsen, M. J., McInerney, L. D., Stetzenbach and M.V. Walter, Washington, DC : ASM Press

Jensen, A. N., and et al. 2006 . Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. Applied and Environmental Microbiology, Vol.72(3) page 1833-1842.

Juneja, V. K. and Marks, H. M. 2006 . Growth kinetics of *Salmonella* spp. pre- and post-thermal treatment. International Journal of Food Microbiology, Vol.109 page 54–59.

Kleczkowska, J. 1957 . A study of the distribution and effects of bacteriophages of root-nodule bacteria in the soil. Can. J. Microbiol., Vol.3 page 171-180.

Krueger, A. P., Ritter, R. C. and Smith, S. P. 1929 . The electrical charge of bacteriophage. J Exp Med, Vol.50(6) page 739-746.

Loessner, M. J. 2005 . Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. Curr Opin Microbiol., Vol.8 page 480-487.

Parys, A. V. and et al. 2012 . *Salmonella* Typhimurium induces SPI-1 and SPI-2 regulated and strain dependent down regulation of MHC II expression on porcine alveolar macrophages. Veterinary Research, Vol.43(52) page 1-14.

Primrose, S. B. and Day, M. 1977 . Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats, Journal of Applied bacteriology, Vol.42(3) page 417-421.

Roberts, D. and Greenwood, M. 2003 . Practical Food Microbiology. 3rd ed. Oxford : Blackwell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rolfe, M. D. and et al. 2012 . Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. J. Bacteriol., Vol.194(3) page 686-701.

Rowe, B. H. and et al. 1987 . *Salmonella* ealing infections associated with consumption of infant dried milk. Lancet, Vol.2(8564) page 900-903.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual Vol.1. 3rd ed. New York : Cold spring harbor laboratory

Steele, J. H. and Galton, M. M. 1967 . Epidermiology of foodborne salmonellosis. Health Lab. Sci., Vol.4 page 207-212.

Tiwari, B. R., Kim, S. and Kim J. 2013 . A virulent *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage SE2 with a strong bacteriolytic activity of planktonic and biofilmed cells. Journal of Bacteriology and Virology, Vol.43(3) page 186-194.

Topley, W. W. and Wilson, G. S. 1929 . The principles of bacteriology and immunity Vol.2. London : Arnold

Topley, W. W. C., and Wilson, G. S. 1936 . Principles of bacteriology and immunity. 2nd ed. Maryland : The Williams & Wilkins

U.S. Food and Drug Administration, 2007. Agency response letter GRAS notice no.GRN 000218. [Online]. Available : http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g218.htmlN

Verma, H. and et al. 2013 . Isolation and partial characterization of lytic phage against *Salmonella* Abortusequi. Vet World, Vol.6(2) page 72-75.

Williamson K. E. , Wommack K. E. and Radosevich M. 2003 . Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. Applied and Environmental Microbiology, Vol.69(11) page 6628-6633.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Williamson K. E. , Radosevich M. and Wommack K. E. 2005 . Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. Applied and Environmental Microbiology, Vol.71(6) page 3119-3125.

Williamson K. E. and et al. 2013 . Estimates of viral abundance in soils are strongly influenced by extraction and enumeration methods. Biol Fertil Solils, Vol.49 page 857-869.

[Online]. Available : http://groups.molbiosci.northwestern.edu/morimoto/research/Protocols /I.%20Prokaryotes/B.%20Phage%20Preparation/1.Bacteriophage%20Prep.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

อาหาร LB broth

Tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ด้วยสารละลาย NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเตรียมเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้นลงไป 15.0 กรัม

อาหาร 2x LB broth

Tryptone	20.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ด้วยสารละลาย NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร TSA agar slant

Tryptone	15.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3 ± 0.2 ด้วยสารละลาย NaOH เติมวุ้น นำไปหลอมวุ้นให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองไปวางเอียงรอให้วุ้นแข็ง

อาหาร LB top agar

Tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
วุ้น	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ด้วยสารละลาย NaOH หลังจากนั้นเติมวุ้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมานำอาหารเลี้ยงเชื้อไปหลอมให้วุ้นละลาย แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลองขนาดสั้นหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย Normal saline (0.85% w/v)

NaCl	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย glycine buffer (ความเข้มข้น 250 mM)

Glycine	18.7675	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย glycine ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลาย NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย SM buffer

NaCl	5.8	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	กรัม
1M Tris-HCl (pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
2%(w/v) gelatin	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

ตารางที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับเวลา

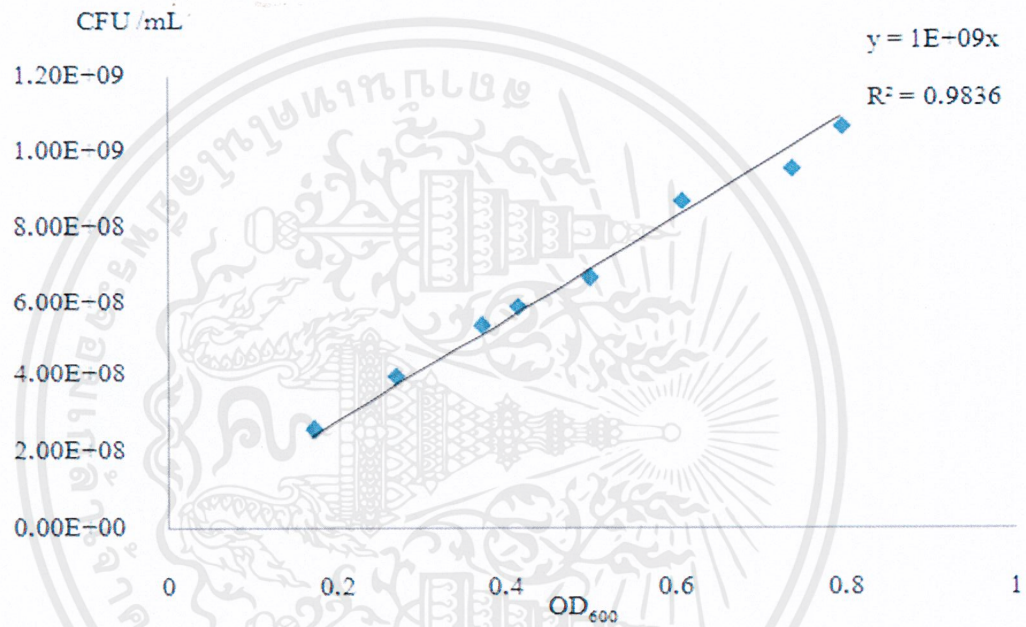
เวลา (นาที)	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ค่าเฉลี่ย log ± S.D.
	OD	log OD	OD	log OD	OD	log OD	
0	0.239	-0.6216	0.236	-0.6271	0.238	-0.6234	-0.6240 ± 0.0028
20	0.261	-0.5834	0.260	-0.5850	0.261	-0.5834	-0.5839 ± 0.0010
40	0.272	-0.5654	0.270	-0.5686	0.271	-0.5670	-0.5670 ± 0.0016
60	0.311	-0.5072	0.332	-0.4789	0.322	-0.4921	-0.4927 ± 0.0142
80	0.373	-0.4283	0.377	-0.4237	0.399	-0.3990	-0.4170 ± 0.0157
100	0.429	-0.3675	0.481	-0.3179	0.455	-0.3420	-0.3425 ± 0.0248
120	0.520	-0.2840	0.545	-0.2636	0.568	-0.2457	-0.2644 ± 0.0192
140	0.609	-0.2154	0.665	-0.1772	0.637	-0.1959	-0.1961 ± 0.0191
160	0.703	-0.1530	0.744	-0.1284	0.724	-0.1403	-0.1406 ± 0.0123

ตารางที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ Salmonella enterica serovar Typhimurium TISTR 5562 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับเวลา (ต่อ)

เวลา (นาที)	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ค่าเฉลี่ย log ±S.D.
	OD	log OD	OD	log OD	OD	log OD	
180	0.848	-0.0716	0.930	-0.0315	0.888	-0.0516	-0.0516 ± 0.0200
200	0.934	-0.0297	1.010	0.0043	0.972	-0.0123	-0.0126 ± 0.0170
220	1.020	0.0086	1.128	0.0523	1.074	0.0310	0.0306 ± 0.0219
240	1.144	0.0584	1.180	0.0719	1.162	0.0652	0.0652 ± 0.0067
260	1.290	0.1106	1.246	0.0955	1.268	0.1031	0.1031 ± 0.0075
280	1.412	0.1498	1.378	0.1392	1.394	0.1443	0.1444 ± 0.0053
300	1.704	0.2315	1.736	0.2395	1.554	0.1915	0.2208 ± 0.0258
320	1.856	0.2686	1.812	0.2582	1.834	0.2634	0.2634 ± 0.0052
340	2.032	0.3079	2.020	0.3054	2.026	0.3066	0.3066 ± 0.0013
360	2.152	0.3328	2.176	0.3377	2.164	0.3353	0.3353 ± 0.0024
380	2.348	0.3707	2.324	0.3662	2.336	0.3685	0.3685 ± 0.0022
400	2.484	0.3952	2.456	0.3902	2.480	0.3945	0.3933 ± 0.0027

ตารางที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ Salmonella enterica serovar Typhimurium TISTR 5562 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับเวลา (ต่อ)

เวลา (นาที)	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ค่าเฉลี่ย log ±S.D.
	OD	log OD	OD	log OD	OD	log OD	
420	2.640	0.4216	2.686	0.4291	2.664	0.4255	0.4254 ± 0.0038
440	2.880	0.4594	2.848	0.4545	2.864	0.4570	0.4570 ± 0.0024
460	3.072	0.4874	3.060	0.4857	3.066	0.4866	0.4866 ± 0.0008
480	3.336	0.5232	3.376	0.5284	3.356	0.5258	0.5258 ± 0.0026
500	3.416	0.5335	3.442	0.5368	3.430	0.5353	0.5352 ± 0.0016
520	3.496	0.5436	3.488	0.5426	3.492	0.5431	0.5431 ± 0.0005
540	3.656	0.5630	3.616	0.5582	3.636	0.5606	0.5606 ± 0.0024



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR 5562