การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

STUDY ON ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FACULTY OF SCIENCE CANTEEN'S SEWAGE

ณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์

ยุวดี ศิลปาจารย์

สุกฤษฎิ์ ชมสมใจ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FACULTY OF SCIENCE CANTEEN'S SEWAGE

NATTIKA RUNGPRATEEPPAIBOON

YUWADEE SINLAPAJAN

SUKRIT CHOMSOMJAI

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

Study on Isolation of Bacteriophages of *Escherichia coli* Isolated from Faculty of Science Canteen's Sewage

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์ รหัสนักศึกษา 58050749

นางสาวยุวดี ศิลปาจารย์ รหัสนักศึกษา 58050802

นายสุกฤษฎิ์ ชมสมใจ รหัสนักศึกษา 58050831

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์ รหัสนักศึกษา 58050749
	นางสาวยุวดี ศิลปาจารย์ รหัสนักศึกษา 58050802
	นายสุกฤษฎิ์ ชมสมใจ รหัสนักศึกษา 58050831
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์เพื่อนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue จำนวนทั้งหมด 84 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาดและลักษณะโคโลนี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์ และความต้องการออกซิเจน คุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้างวงแหวนอินโดล การทดสอบ MR-VP และการใช้ซิเทรต ผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวนทั้งหมด 32 ไอโซเลท แล้วทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร มากที่สุด จำนวน 20 ไอโซเลท จากนั้นทำการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยคัดเลือกแบคทีเรีย จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด ได้แก่ N50 N72 และ N81 มาเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยมีวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจทั้งแบบไม่มีการเพิ่มและแบบมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ และตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ด้วยวิธี plaque assay จากการทดลองไม่พบการเกิดพลาคบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น จึงไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้จึงสนใจนำแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกข้างต้นมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากงานวิจัยของชณัฐดา และคณะ (2562) ด้วยวิธี spot test โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่คัดแยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน และแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 และ 27 ซึ่งได้มาจากงานวิจัยของชณัฐดา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ (2562) จากการทดลองพบว่า แบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* รหัสไอโซเลท N33, N53, N58, N69, N72, N74, N81, N82 และ N84 และแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* รหัสไอโซเลท N33, N50, N69, N70, N72 และ N81 แสดงให้เห็นว่า แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : การแยกแบคเทอริโอเฟจ แบคทีเรีย *Escherichia coli*, น้ำสกปรก, plaque assay, host range, spot test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on Isolation of Bacteriophages of *Escherichia coli* Isolated from Faculty of Science Canteen's Sewage			
Students	Miss Nattika	Rungprateeppaiboon	Student ID	58050749
	Miss Yuwadee	Sinlapajan	Student ID	58050802
	Mr. Sukrit	Chomsomjai	Student ID	58050831
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)			
Department	Biology			
Faculty	Science			
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)			
Academic Year	2018			
Advisor	Dr. Wimonmat Boonmee			

Abstract

The aim of this special project was to study on the isolation of bacteriophages of *Escherichia coli* isolated from faculty of science canteen's sewage. The eighty four colonies of bacteria were isolated on Eosin Methylene Blue Agar and were evaluated on morphology characterization such as colony appearance; size, shape and color, motility, Gram staining, spore staining, cell arrangement and oxygen requirement and for biochemical test such as catalase production, indole ring test, MR-VP test and citrate utilization test. The result showed 32 isolated of *E. coli* from faculty of science canteen's sewage, then 20 isolates were selected with the highest absorbance at 440 nm and the highest 3 isolates which were N50, N72 and N81, were used as the bacterial host to investigate on isolation with and without enrichment of bacteriophages from Prathep building canteen's sewage samples. Plaque assay was used to determine bacteriophages in samples. The result showed that bacteria which was isolated from faculty of science canteen's sewage were enable to isolated the bacteriophages. However, this study was continued to determine host range of bacteriophages from Chanutda et al. (2019) (bacteriophage number 17 and 27) by using spot test and 20 isolated bacteria from faculty of science canteen's sewage were used as the bacterial host. The result showed that bacteriophage number 17 was able to be infected *E. coli* code N33, N53, N58, N69, N72, N74, N81, N82 and N84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and bacteriophage number 27 was able to be infected *E. coli* code N33, N50, N69, N70, N72 and N81. Finally the result showed that bacteriophages from Prathep building canteen's sewage were specific to *E. coli* isolated from faculty of science canteen's sewage

Keywords : bacteriophages, *Escherichia coli*, host range, isolation of bacteriophages, plaque assay, sewage, spot test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่องการศึกษาการแยกแบคเทอริโอ-เฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ประธานกรรมการสอบ และกรรมการสอบโครงงานพิเศษนี้ ที่ได้สละเวลาในการเข้ารับฟังการนำเสนอ รวมทั้งให้คำแนะนำ คำปรึกษาจนโครงงานพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา และพี่สมศักดิ์ ที่เอื้อเฟื้อการเบิกอุปกรณ์สารเคมีต่าง ๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำการทดลองที่ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดาและขอบคุณเพื่อน ๆ ที่คอยอยู่เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้กันตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนโครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและต่อยอดต่อไป

ณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์
ยุวดี ศิลปาจารย์
สุกฤษฎิ์ ขมสมใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ .....ก
Abstract .....ค
กิตติกรรมประกาศ .....จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตการศึกษา 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 3
2.1.1 การจำแนกกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 4
2.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย 4
2.1.3 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 7
2.2 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages) 9
2.2.1 บทบาทของแบคเทอริโอเฟจ (Role of Bacteriophages) 9
2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) 9
2.2.3 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages life cycle) 10
2.2.4 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการบุกรุกเข้าเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน 11
ของแบคเทอริโอเฟจ (Assay of Viral Infectivity)
2.2.5 การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (Purification) 13
2.2.6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages Applications) 13
ในด้านต่าง ๆ
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 16
3.1 อุปกรณ์ 16
3.2 เครื่องมือ 17
3.3 สารเคมี 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 18
3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ 19
3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 19
3.6 วิธีการทดลอง 19
3.6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก 19
3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 19
3.6.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 21
3.6.4 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 22
3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 22
3.6.6 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 22
3.6.7 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) โดยวิธี Spot Test 24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 25
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก 25
4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) 25
4.1.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 27
4.1.3 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 31
4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 38
4.2.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรก แบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ 38
4.2.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรก แบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ 38
4.2.3 การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ 39
4.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) 40
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 44
5.1 สรุปผลวิจัย 44
5.2 ข้อเสนอแนะ 45
เอกสารอ้างอิง 46
ภาคผนวก 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ก 52
ภาคผนวก ข 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก 26
4.2 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 36
4.3 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 41
4.4 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 3
2.2 Bacteriophage T4 10
2.3 พลาคที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น 13
4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง EMB 26
4.2 ลักษณะการเกิดวงแหวนอินโดล 27
4.3 แสดงผลการทดสอบ Methyl red 29
4.4 แสดงผลการทดสอบ Voges-Proskaure 29
4.5 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นบวก (+) 30
4.6 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นลบ (-) 30
4.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA 32
4.8 การติดสีซาฟรานิน (safranin) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 33
เมื่อย้อมสีแบบแกรม
4.9 การติดสีซาฟรานิน (safranin) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 34
เมื่อย้อมสีสปอร์
4.10 การจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 35
เมื่อย้อมสีพื้นหลังด้วยสีนิโกรซิน (nigrosin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น จึงพบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้ จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (index of fecal contamination) เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุดทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ และยังสามารถพบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ โดยเฉพาะน้ำสกปรกหรือน้ำเสีย จึงควรมีการบำบัด หรือกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม (วฤษณี, 2554) ในภาวะร่างกายปกติเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่รับประทานเข้าไป แต่ถ้าหากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ของร่างกายจะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น และมีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557) ก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และไตวายเฉียบพลัน ในการรักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ทำได้ยากเนื่องจากไม่มียาที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียนี้ได้โดยตรง ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะในการรักษากลับกระตุ้นให้เกิดโรคแทรกซ้อนมากยิ่งขึ้น (พิสนธิ์, 2554)

ในปัจจุบันมียาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้โดยตรง เช่น ampicillin และ kanamycin แต่พบว่า เด็กส่วนใหญ่จะมีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้ (ธีรพล, 2550) เพื่อแก้ไขปัญหาเหล่านี้จึงใช้แบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกมาเป็นทางเลือกในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง หรือใช้แทนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเพื่อลดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านสูง จึงไม่ทำลายเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เมื่อแบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านจะเพิ่มจำนวนตัวเองภายในเซลล์เจ้าบ้าน และทำให้เซลล์จ้าบ้านแตก แบคทีเรียจึงตาย ซึ่งสามารถพบแบคเทอริโอเฟจได้ทั่วไปบนโลกตามแหล่งต่าง ๆ จึงสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้จากสิ่งแวดล้อม น้ำ หรืออาหารสด แต่การใช้ยาปฏิชีวนะไม่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียจึงอาจกำจัดเชื้อแบคทีเรียอื่นที่เป็นประโยชน์ และการใช้ยาปฏิชีวนะที่ผิดวิธีก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย จึงอาจต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์แรงขึ้นซึ่งมีราคาสูง (Perera et al., 2015)

Malik et al. (2017) รายงานถึงการนำแบคเทอริโอเฟจไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อ *E. coli* ที่ระบบทางเดินปัสสาวะ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง Lee and Park (2015) ได้ศึกษาคุณลักษณะ และประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BECP2 และ BECP6 ที่แยกได้มาจากน้ำสกปรกทั้ง 2 ชนิดมาผสมกัน เพื่อใช้ลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ในไบโอฟิล์ม Berchieri Jr. et al. (1991) ได้แยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* จากระบบน้ำทิ้งของมนุษย์ และอาหารไก่ที่มีเชื้อปริมาณมาก โดยแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากระบบน้ำทิ้งของมนุษย์สามารถลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ได้ Liu et al. (2017) ได้พัฒนาวิธีการใหม่ และมีประสิทธิภาพสูงในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำโดยวิธี ESPs พบว่า ประสิทธิภาพในการแยกตัวอย่าง และประสิทธิภาพในการแยกแบคทีเรียด้วยวิธี ESPs สูงกว่าวิธีการแบบเดิม 3.28 และ 2.13 เท่า Tomat et al. (2013) ได้แยกแบคเทอริโอเฟจจากอุจจาระ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย EPEC และ STEC ในนมหมัก ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย EPEC และ STEC ในนมหมักได้ และไม่ทำลายประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียอื่นในนมหมัก

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหาร และเพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากน้ำสกปรกของโรงอาหาร
2. เพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหาร

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากน้ำสกปรกของโรงอาหารใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ และทำการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำสกปรก
2. สามารถนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกในการบำบัดน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

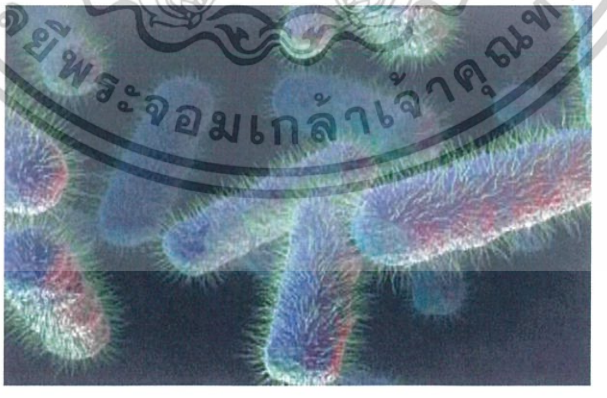
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระเด็กที่ป่วยท้องร่วง ในปี ค.ศ. 1885 โดยนักจุลชีววิทยา ชาวเยอรมัน ชื่อว่า Theodor Escherich (วฤษณี, 2554) เขาได้ตั้งชื่อมันว่า *Bacterium coli commune* ต่อมาได้เปลี่ยนตามชื่อของเขาเป็น *Escherichia coli* (Kumar, 2012)

แบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae เผ่า (Tribe) Escherichieae สกุล (genus) Escherichia ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-Negative bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (straight rod) ขนาดกว้าง 1 – 3 ไมโครเมตร และยาว 0.4 - 0.7 ไมโครเมตร เซลล์จัดเรียงกันเป็นคู่ (pairs) หรืออยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ (singly) มันสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล แต่ในบางสายพันธุ์พบว่า มีพิไลและแคปซูล ดังรูปที่ 2.1 มันเป็นทั้งพวกที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (aerobe) และเป็นพวกที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) เจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 10 - 40 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส (Kumar, 2012) การแบ่งเซลล์เป็นแบบทวิภาค (binary fission) ซึ่งใช้เวลาอย่างน้อยในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) คือ 20 นาที (Singleton, 1999)



รูปที่ 2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา: https://cosmosmagazine.com/chemistry/a-quick-easy-test-for-e-coli-contamination **(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เป็นเชื้อที่สำคัญมากทางคลินิกและพบได้ทั่วไป ซึ่งมีมากมายในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น พบได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น พื้นผิวต่าง ๆ รวมถึงแหล่งน้ำอุปโภคบริโภค (Kumar, 2012) โดยส่วนมากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะไม่ก่อโรคเมื่ออาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ แต่มีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บางกลุ่มที่ก่อโรคทำให้มีอาการท้องร่วง (Feng et al., 2017)

2.1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การคัดแยกเชื้อโดยการใช้อาหารแข็ง Eosin methylene blue ซึ่งเป็นอาหารที่สามารถแยกกลุ่มของจุลินทรีย์ โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ซึ่งสารประกอบทางเคมีมีผลต่อการเพาะเลี้ยง และการบ่ม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และ/หรือ ล้อมรอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แลคโตส, สีย้อม eosin Y และ methylene blue ช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ และเชื้อแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้อย่างดี เนื่องจากแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลแลคโตสได้อย่างดีจะเกิดกรดปริมาณมาก ทำให้พีเอชต่ำกว่า 4.2 และยังเป็นตัวบ่งชี้ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งโคโลนีสีน้ำเงินดำที่มีเงาสีเขียวมันวาว เกิดจากกรดปริมาณมากที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้น และตกตะกอนสีย้อมบนพื้นผิวอาหาร ดังนั้น โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จึงมีลักษณะโคโลนีกลม มีสีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีหรือไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ (Capuccino and Sherman, 2014)

2.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย เป็นศึกษาเกี่ยวกับ รูปร่าง ลักษณะ และโครงสร้าง ของเชื้อแบคทีเรีย

2.1.2.1 การตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

เป็นการตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลักษณะที่แสดงออกของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งดูที่รูปร่าง ขนาด สี ระดับและผิวหน้าของโคโลนี ขอบ และการยอมให้แสงผ่านได้ เช่น ทึบ ใส โปร่งแสง ขุ่น สะท้อนเงาวาว เป็นต้น โดยที่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีลักษณะของโคโลนี คือ กลม ขอบเรียบ มันวาว สีขาว ครีม นูนต่ำ (Capuccino and Sherman, 2014) และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 1 – 3 มิลลิเมตร (Singleton and Sainsbury, 2001)

2.1.2.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่

เชื้อแบคทีเรียมีขนาดที่เล็ก และมีดัชนีการหักเหที่ใกล้เคียงกับน้ำที่อาศัยอยู่ ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการดำรงชีวิตของพวกมันด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ วิธี hanging drop และ wet mounts จึงเป็นวิธีที่นำมาใช้สังเกตการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากง่ายต่อการมองเห็น เพราะ วิธีดังกล่าวจะชะลอการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำ (Capuccino and Sherman, 2014) โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากมีเพอริทริคัสแฟลกเจลลา (peritrichous flagella) ใช้ในการเคลื่อนที่ (Scheutz and Strockbine, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.3 การย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

วิธีนี้เป็นการย้อมสีแบคทีเรียที่นิยมใช้มาก และสามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 พวกใหญ่ คือ แกรมบวกและแกรมลบ โดยใช้คุณสมบัติของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้ แบคทีเรียแกรมบวกจะมีผนังเซลล์ที่เป็นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่หนากว่า และกรดไทโคอิค (teichoic acid) ซึ่งมีประจุลบอยู่ในชั้นผนังเซลล์ ทำให้ย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ซึ่งเป็นสีย้อมแรก (primary dye) และล้างไม่ออกเมื่อเติมสารชะสี เช่น อะซิโตน หรือเอทานอล ขณะที่แบคทีเรียแกรมลบนั้นมีชั้นในผนังเซลล์เปปติโดไกลแคนบางกว่า และมีผนังชั้นนอกที่มีส่วนประกอบเป็นไขมัน (lipopolysaccharide) ทำให้สีคริสตัลไวโอเลต ที่ย้อมครั้งแรกนี้หลุดออกไป เมื่อชะสีด้วยอะซิโตน เซลล์จึงติดสีแดงของซาฟรานิน (safranin) ที่ย้อมเป็นสีที่ 2 (secondary dye) แบคทีเรียแกรมบวกที่มีอายุมาก หรือถูกยาปฏิชีวนะทำลาย ผนังเซลล์การย้อมสีแกรมอาจติดสีที่ต่างไปได้ (gram variable) แต่พวกแกรมลบจะติดสีแดงเสมอ แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถจำแนกตามการติดสีแกรมได้เนื่องจากการย้อมติดสียากหรือไม่มีผนังเซลล์ (กัญจนา และคณะ, 2547) ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน (Morello, Granato and Mizer, 2002) โดยขั้นตอนในการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย มีดังต่อไปนี้

1. ย้อมเชื้อด้วยคริสตัลไวโอเลตสีแรกแบคทีเรียทุกชนิดจะติดสีม่วงนี้

2. เติมน้ำยาแกรมไอโอดีนลงไป ไอโอดีนจะไปจับกับเม็ดสีม่วงที่ซึมเข้าไปในผนังเซลล์ ทำให้เป็นโมเลกุลของสารประกอบไอโอดีนกับเม็ดสีที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และไม่สามารถผ่านออกจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ไอโอดีนจึงช่วยตึงเม็ดสีม่วงไว้กับที่ผนังเซลล์

3. ชะสีย้อมแรกออกด้วยอะซิโตนหรือเอทานอล ขั้นตอนนี้เอทานอลจะไปละลายชั้นไขมันที่ผนังเซลล์เนื่องจากพวกแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นไขมันที่ผนังชั้นนอกจึงถูกทำลายไป และมีชั้นเปปติโดไกลแคนที่บางกว่าพวกแกรมบวก ทำให้โมเลกุลของเม็ดสีม่วงและไอโอดีนหลุดออกจากผนังเซลล์ได้ง่าย ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีผนังชั้นนอกที่เป็นไขมันและมีเปปติโดไกลแคนที่หนากว่า โมเลกุลของเม็ดสีม่วงและไอโอดีนจึงหลุดออกผนังเซลล์แกรมบวกได้ยาก และยังคงติดสีม่วงสีย้อมแรกอยู่

4. เติมสีย้อมที่ 2 คือ ซาฟรานินเมื่อชะสีย้อมสีแรกออกแล้ว เซลล์ของแกรมลบที่สีม่วงถูกชะออกหมดจะย้อมติดสีแดงของซาฟรานินแทน ขณะที่แกรมบวกไม่ถูกชะสีออกจึงยังคงติดสีม่วงอยู่ (กัญจนา และคณะ, 2547)

2.1.2.4 การย้อมสีสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย

เอนโดสปอร์ (endospore) เป็นโครงสร้างที่พบในแบคทีเรียบางชนิดซึ่งจะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ การสร้างเอนโดสปอร์ไม่ใช่เพื่อการสืบพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่จะสร้างขึ้นเพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย เนื่องจากเอนโดสปอร์มีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน ความเย็น ความแห้งแล้ง หรือแม้แต่สารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียทั่วไป (vegetative cell)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนโดสปอร์ทนได้ในระดับที่ดีกว่าเซลล์ทั่วไป และสามารถทนอยู่ได้ในระยะเวลานานเป็นปีในสภาพที่ไม่เหมาะสม การย้อมสีสปอร์จึงเป็นการตรวจดูการติดสีของเอนโดสปอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ และเอนโดสปอร์ที่หลุดอยู่ภายนอกเซลล์ (free endospore) จะติดสีเขียวของสี malachite green ส่วนเซลล์ทั่วไป และเซลล์ส่วนที่มีเอนโดสปอร์อยู่ภายใน (sporangium) จะติดสีแดง (บุษกร, 2552) โดยที่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไม่ติดสี malachite green เนื่องจากไม่สร้างสปอร์ (Kumar, 2012)

2.1.2.5 การวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย

การวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำโดยการย้อมสีแบบ negative stain ซึ่งต่างจากการย้อมสีทั่ว ๆ ไป โดยที่หลังจากการย้อมด้วยวิธีนี้แล้วเซลล์แบคทีเรียจะไม่ติดสี แต่พื้นสไลด์จะมีสีเข้มหรือดำ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ใสไม่มีสีที่พื้นสีดำสีที่นิยมใช้ในการย้อม negative stain ได้แก่ สีนิโกรซิน (nigrosin) วิธีนี้ใช้ในการศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และขนาดของเซลล์ นอกจากนี้การย้อมสีแบบนี้ยังสามารถตรวจสอบแคปซูลของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ย้อมร่วมกับวิธีย้อมแบบง่าย (simple stain) ที่ทำให้เฉพาะส่วนภายในของเซลล์ติดสี และพื้นหลังมีสีดำ ส่วนบริเวณแคปซูลจะไม่ติดสี จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก ซึ่งส่วนใหญ่สามารถมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงธรรมดา (light microscope) โดยขนาดของจุลินทรีย์สามารถวัดได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เครื่องมือที่ เรียกว่า ไมโครมิเตอร์ (micrometer) อุปกรณ์นี้ประกอบด้วย ocular micrometer และ stage micrometer สำหรับ ocular micrometer เป็นแผ่นแก้ววงกลมที่บริเวณกลางแผ่นมีสเกลแบ่งเป็นช่องที่มีความกว้างเท่ากัน คล้ายสเกลบนไม้บรรทัด แต่ไม่ทราบความกว้างของแต่ละช่อง ส่วน stage micrometer นั้นเป็นแผ่นสไลด์ เฉพาะตำแหน่งตรงกลางมีสเกลแบ่งออกเป็นช่อง โดยแต่ละช่องมีความกว้างเท่ากับ 0.01 มิลลิเมตร (10 ไมโครเมตร) สเกลจะเห็นได้ชัดเจน เมื่อนำ stage micrometer วางบนแท่นรองสไลด์และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การนับจำนวนช่องของ ocular micrometer ที่ซ้อนทับกับระยะที่ทราบแน่ชัดบนสเกลของ stage micrometer คำนวณหา 1 ช่องของ ocular micrometer โดยจุลินทรีย์รูปแท่งมักจะวัดที่ความกว้าง และความยาว (บุษกร, 2552) โดยที่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีขนาดเซลล์กว้าง 1.1 – 1.5 ไมโครเมตร และยาว 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร และจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ (Scheutz and Strockbine, 2005)

2.1.2.6 การทดสอบความต้องการอากาศ

จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีความสามารถในการใช้ออกซิเจนอิสระสำหรับการหายใจของเซลล์ ซึ่งในการทดลองความต้องการอากาศ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เจริญได้ทั่วทั้งหลอดอาหารเหลว NB จึงจัดเป็นเชื้อในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Capuccino and Sherman, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การทดสอบทางชีวเคมีเป็นการวินิจฉัยแยกตระกูล (genus) และสายพันธุ์ (species) ของแบคทีเรียให้ชัดเจน โดยอาศัยคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ และเมตาบอลิซึมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีการทดสอบตามคุณสมบัติของการเจริญเติบโต ดังต่อไปนี้

2.1.3.1 การทดสอบการใช้แป้งหรือน้ำตาลในการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตของจุลชีพต้องการสารอาหารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ซึ่งจุลชีพจะนำไปประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิว-คลีอิค ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มาประกอบเป็นส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ต่อไป จุลชีพสามารถจำแนกได้ตามคุณสมบัติ หรือความสามารถในการใช้สารอาหารประเภทต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ การทดสอบการใช้น้ำตาล หรือสารอินทรีย์อื่น ๆ เพื่อการเจริญเติบโตจึงเป็นคุณสมบัติของจุลชีพแต่ละชนิดที่นำมาพิสูจน์เชื้อได้

2.1.3.1.1 การทดสอบผลผลิตจากการหมักย่อยน้ำตาล

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีเอนไซม์ในการย่อยน้ำตาล หรือคาร์โบไฮเดรตต่างกัน ทำให้ผลผลิตสุดท้ายจากการย่อยแตกต่างกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียที่นำมาวินิจฉัยเชื้อได้

2.1.3.1.1.1 Methyl red test (MR)

เป็นการทดสอบการหมักย่อยกลูโคสแล้วได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรด และทำให้มีพีเอชต่ำกว่า 4.2 ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ methyl red ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในอาหารที่ใช้ทดสอบ

$$2\ \text{glucose} + H_2O \longrightarrow 2\ \text{lactic acid} + \text{acetic acid} + \text{ethanol} + 2CO_2 + 2H_2$$

อาหารที่ใช้ MR broth เป็นอาหารเหลว (broth) ที่มีน้ำตาลกลูโคสผสมอยู่ มีสีเหลืองใส

การอ่านผล ผลบวก สภาวะที่เป็นกรด สีของ methyl red ยังคงเป็นสีแดงหรือสีชมพู

ผลลบ สภาวะที่พีเอชมากกว่า 6 สีของ methyl red เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ประโยชน์ ใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (ผลบวก) จาก *Enterobacter* (ผลลบ)

2.1.3.1.1.2 Voges-Proskauer test (VP)

เป็นการทดสอบการหมักย่อยกลูโคส แล้วให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นอะเซโทอิน (acetoin หรือ acetyl methyl carbinol) ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีพีเอชเป็นกลาง การตรวจ VP test นิยมตรวจร่วมกับ MR test จึงเรียกว่า MR-VP test

$$\text{glucose} \longrightarrow \text{pyruvic acid} \longrightarrow \text{acetoin}$$

$$\text{acetoin} + \text{alpha-napthol} + KOH + O_2 \longrightarrow \text{diacetyl} + \text{guanidine group} \longrightarrow \text{pinkish red product}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่ใช้ VP medium เป็นอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่มีน้ำตาลกลูโคสผสมอยู่ มีสีเหลืองใส

การอ่านผล ผลบวก เปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีชมพู

ผลลบ มีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล

2.1.3.1.1.3 การทดสอบการใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน (Simmons citrate test)

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมตาบอลิซึม หากเชื้อแบคทีเรียเกิดการใช้ซิเทรตจะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) ทำให้เกิดการย่อยสลายเกลือแอมโมเนียมกลายเป็นแอมโมเนีย ซึ่งจะทำให้พีเอชของอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดสภาวะเป็นด่าง ส่งผลให้อินดิเคเตอร์ที่ผสมในอาหาร คือ bromthymol blue เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินในสภาวะที่เป็นด่าง

$$4\ \text{citrate} \longrightarrow 7\ \text{acetate} + 5CO_2 + \text{formate} + \text{succinate}$$

อาหารที่ใช้ อาหารแข็ง Simmons citrate เป็นอาหารวุ้นแข็งที่มีซิเทรตผสมอยู่ และมี bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ อาหารมีสีเขียว

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน เพราะเชื้อสามารถใช้ซิเทรตเพื่อการเจริญเติบโตได้ ทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเขียวเหมือนเดิม

ประโยชน์ ใช้วินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter*, *Citrobacter* และ *Serratia* spp. (ให้ผลบวก) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไม่สามารถใช้ซิเทรตได้ (ให้ผลลบ)

2.1.3.2.1 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยกรดอะมิโนทริปโตแฟน (tryptophan) เชื้อแบคทีเรียที่ย่อยได้จะมีเอนไซม์ tryptophanase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยกรดอะมิโนทริปโตแฟนเกิดผลิตภัณฑ์เป็นอินโดล (indole), กรดไพรูวิก (pyruvic acid) และแอมโมเนีย (ammonia) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

$$\text{L-tryptophan} \xrightarrow{\text{tryptophanase}} \text{Indole} + \text{pyruvic acid} + \text{ammonia}$$

$$\text{Indole} + \text{p-dimethylaminobenzaldehyde} \xrightarrow{\text{HCl, alcohol}} \text{red-violet color}$$

อาหารที่ใช้ tryptone broth เป็นอาหารเหลวที่มีกรดอะมิโนทริปโตแฟนเป็นส่วนผสม มีสีเหลืองใส

สารเคมีที่ใช้ Kovac's reagent

การอ่านผล ผลบวก เกิดวงแหวนสีม่วงหรือสีแดงเป็นชั้นเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ เกิดวงแหวนสีเหลืองอ่อนเป็นชั้นเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ

ประโยชน์ ใช้พิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งให้ผลเป็นบวก (กัญจนา และคณะ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบทางชีวเคมีที่กล่าวมาข้างต้นใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae เรียกการทดสอบนี้ว่า IMViC Test ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบ การสร้างอินโดล (Indole test) การหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส (MR-VP Test) และการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน (Simmons citrate test) ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แสดงผลเป็น +, +, -, - ตามลำดับ (Capuccino and Sherman, 2014)

2.1.3.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

เป็นการตรวจหาเอนไซม์คะตะเลสที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น โดยเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียจะสลายพันธะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เป็นน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) เกิดเป็นฟองอย่างเห็นได้ชัด เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

สารทดสอบ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3

การอ่านผล ผลบวก เกิดฟองก๊าซ (O_2) แบคทีเรียสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ผลลบ ไม่เกิดฟองก๊าซ แบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

ประโยชน์ ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (กัญจนา และคณะ, 2547)

2.2 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages)

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophages) คือ ไวรัสที่บุกรุกเข้าเซลล์แบคทีเรีย ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1915 โดย Twort เขาพบว่า มีสารบางอย่างที่ไปเปลี่ยนโคโลนีของเชื้อ *staphylococcal* ให้มีลักษณะใส จากนั้นเขาได้กรองเก็บเป็นของเหลวที่ได้จากการกรอง (filtrate) ต่อมาในปี ค.ศ. 1917 d'Hérelle ได้รายงานว่าสิ่งที่ทำลายเซลล์ของ *Shigella spp.* คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และได้ตั้งชื่อเรียกว่า "แบคเทอริโอเฟจ" โดยแบคเทอริโอเฟจสามารถแยกได้จากสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น อุจจาระ สิ่งปฏิกูล และแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ ที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Kumar, 2012)

2.2.1 บทบาทของแบคเทอริโอเฟจ (Role of Bacteriophages)

1. มีบทบาทสำคัญในการถ่ายโอนข้อมูลทางพันธุกรรมจากเซลล์แบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง

2. มีบทบาทในการพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียและความรุนแรงในการแพร่กระจาย

3. มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียรวมถึงสิ่งต่าง ๆ ที่เกิดจากแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

4. ใช้เป็นเวกเตอร์สำหรับการดัดแปลงพันธุกรรม

5. มีบทบาทในการควบคุมประชากรแบคทีเรีย (Kumar, 2012)

2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

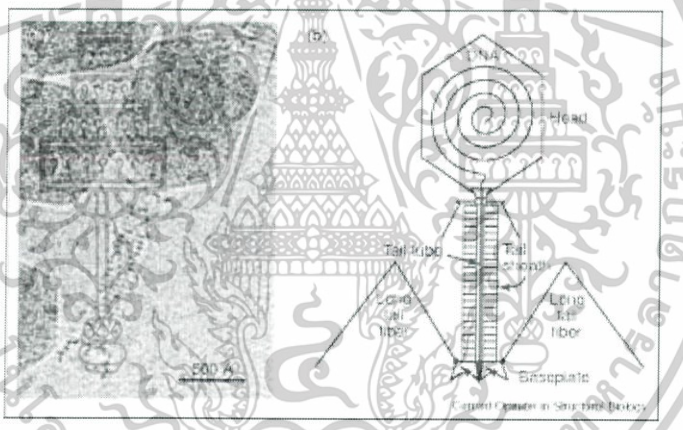
2.2.2.1 ส่วนประกอบของไวรัสหรือแบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.1.1 ส่วนหัว (Head) ประกอบด้วย แกนที่มีกรดนิวคลีอิคหนาแน่น ล้อมรอบแคพสิด (capsid) ซึ่งแคพสิด หมายถึง ส่วนที่เป็นโปรตีนที่หุ้มล้อมรอบกรดนิวคลีอิคที่เป็นจีโนมของไวรัส ส่วนแคพสิดและกรดนิวคลีอิค ที่ถูกหุ้มไว้รวมเรียกว่า นิวคลีโอแคพสิด (nucleocapsid) ปกติแคพสิดจะประกอบขึ้นจากโปรโตเมอร์ (protomer) หรือแคพโซเมอร์ (capsomer) ซึ่งเป็นโมเลกุลย่อยที่เหมือนกัน (สมศักดิ์, 2527)

เมื่อศึกษาส่วนหัวของไวรัสจากลักษณะของแบคเทอริโอเฟจที่บุกรุกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เรียกว่า T even phages (T2, T4, T6) ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีขนาดหัวที่แตกต่างกันมีขนาดตั้งแต่ 28 นาโนเมตร ถึง 100 นาโนเมตร ขนาดหัวของแบคเทอริโอเฟจ T4 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 65 นาโนเมตร และยาว 100 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.2 (Kumar, 2012)

2.2.2.1.2 ขา (Tail) เป็นอวัยวะที่คล้ายกับขาของไวรัสนี้ มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกแกนกลางกลวง หรือเป็นท่อกลวง (Kumar, 2012) อวัยวะที่คล้ายขานี้มีโปรตีนชนิดพิเศษที่สามารถก่อพันธะกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มันเข้าไปเกาะ จากนั้นไวรัสหรือแบคเทอริโอเฟจ จะทำการฉีดสารพันธุกรรมเข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้าน เพื่อทำการเพิ่มจำนวนของตัวมันในเซลล์ของแบคทีเรียนั้น ๆ จนส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด (สมศักดิ์, 2527)



รูปที่ 2.2 Bacteriophage T4

ที่มา : www.semanticscholar.org/paper/Thebacteriophage-T4-DNA-injection-machine.RossmannMesyanzhinov/78707f0248f29e92ffc635d3678bac1aeb9a2e12 **(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)**

2.2.3 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages life cycle)

แบคเทอริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามวงจรชีวิตในแบคทีเรีย คือ 1. ไลติกเฟจ (Lytic phages หรือ virulent phages) 2. ไลโซจีนิกเฟจ (Lysogenic phages หรือ temperate phages) รายละเอียดมีต่อไปดังนี้

2.2.3.1 ไลติกเฟจ (Lytic phages หรือ virulent phages) คือ แบคเทอริโอเฟจที่เมื่อเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่จำเพาะเจาะจง โดยจะไปทำการเพิ่มจำนวนตัวเองภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้สารต่าง ๆ จากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนและจีโนม จากนั้นจะประกอบส่วนต่าง ๆ เข้าด้วยกัน เกิดเป็นแบคเทอริโอเฟจรุ่นลูก (phage progeny) แล้วทำให้เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านแตกออก เพื่อให้แบคเทอริโอเฟจรุ่นลูกออกมาภายนอก และบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเซลล์อื่นที่จำเพาะเจาะจงต่อไป เมื่อทำการตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยการเลี้ยงแบคเทอริโอเฟจร่วมกับแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากนั้นนำมาผสมวุ้นราดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่า เซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านถูกทำลายเป็นลักษณะวงใส (Clear zone) เรียกว่า พลาค (plaque)

2.2.3.2 ไลโซจีนิกเฟจ (Lysogenic phages หรือ temperate phages) คือ แบคเทอริโอเฟจที่เมื่อเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแล้วไม่มีการสร้างแบคเทอริโอเฟจรุ่นลูก แต่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจจะสอดแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรีย โดยการรวมกลุ่มใหม่ของยีน (genetic recombination) เรียกจีโนมของแบคเทอริโอเฟจระยะนี้ว่า prophage เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี prophage แฝงอยู่ด้วย กระบวนการนี้เรียกว่า lysogenization แบคทีเรียที่มี prophage แฝงอยู่เรียกว่า lysogen หรือ lysogenic bacteria แต่ก็มี prophage ชนิดที่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจไม่ได้อยู่ในสภาพสอดแทรกรวมกับโครโมโซมของแบคทีเรีย แต่อยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึม การอยู่ร่วมกันระหว่างโฮสต์ และ lysogenic phages สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตผ่านทาง lateral หรือ horizontal gene transfer ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย เช่น เปลี่ยนแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (nonpathogenic strain) เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* ซึ่งสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดโรคคอตีบนั้นพบว่า แบคทีเรียสร้างสารพิษได้ เพราะมี β phage เข้าไป lysogenize อยู่ สายพันธุ์ของ *C. diphtheriae* ที่ไม่ถูก lysogenize ด้วย β phage จะไม่สร้างสารพิษ และไม่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้ยังพบว่า การสร้างสารพิษจาก *Clostridium botulinum* ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (botulism) และสารพิษจาก β-*hemolytic Streptococcus* group A ซึ่งทำให้เกิดผื่นในโรคไข้อีดำอีแดง (scarlet fever) ถูกควบคุมโดยยีนของแบคเทอริโอเฟจชนิดไลโซจีนิกเช่นกัน นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจยังช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเจ้าบ้านถูกทำลายจากแบคเทอริโอเฟจอื่นได้อีกด้วย (นิตยา และคณะ, 2553)

2.2.4 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการบุกรุกเข้าเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจ (Assay of Viral Infectivity)

2.2.4.1 Plaque assay

Plaque assay อาศัยหลักการ คือ เมื่อแบคเทอริโอเฟจเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านจะทำให้เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านตาย เมื่อทำการเจือจางเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ และผสมร่วมกับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

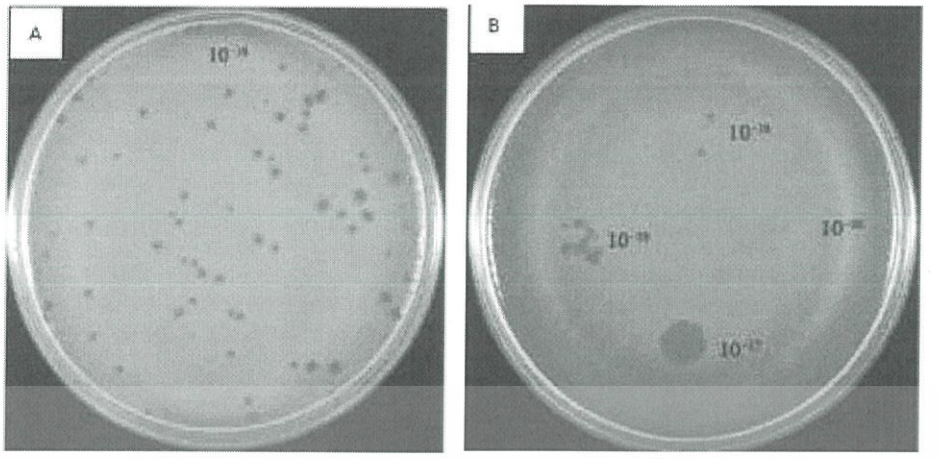
นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแบคทีเรียเจ้าบ้าน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลหากเกิดวงใส เรียกว่า พลาค (plaque) ซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านตายจากการบุกรุกของแบคเทอริโอเฟจที่มีความจำเพาะ นับจำนวน พลาค (plaque) และคำนวณโดยมีหน่วยเป็น plaque forming unit (PFU) ต่อมิลลิลิตร

2.2.4.2 Spot Test

Spot Test เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจว่าสามารถบุกรุกได้หรือไม่ โดยจะต้องทราบความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ วิธีการทดสอบ คือ ผสมเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านอายุอยู่ในช่วง log phase ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว จากนั้นเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งรอหน้าอาหารแห้งและแข็ง จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนผิวหน้าอาหารข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้าน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลหากเกิดพลาคหรือเกิดบริเวณที่เรียกว่า Lysis zone ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านแตกสลายเนื่องจากแบคเทอริโอเฟจทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านเพื่อปลดปล่อยอนุภาคลูกหลานของแบคเทอริโอเฟจออกมา แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้มีความจำเพาะจงเจาะ และสามารถบุกรุกเข้าเซลล์เจ้าบ้านชนิดนั้นได้ (สมศักดิ์, 2527)

ทั้งวิธีการ plaque assay และ spot test เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยอาศัยความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจ แต่ในวิธีการทดสอบทั้ง 2 วิธี นี้ ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ และสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นำมาเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจ ในการหาปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธีการ plaque assay จะต้องทำการเจือจางเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมเพื่อทำให้ได้จำนวนพลาคที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนพลาค เพื่อคำนวณปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจในเซลล์แขวนลอย ดังนั้นในการตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจจึงต้องหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมเพื่อทำให้ทราบความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจที่เหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้ ดังรูปที่ 2.3 (Yang et al., 2016) และวิธีการ spot test ก็เป็นอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่ายในการนำมาใช้คำนวณปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจได้เช่นกัน และนอกจากนี้ spot test ยังสามารถใช้ตรวจหาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) ได้อีกด้วย (Kutter, 2009) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ หรือเพื่อหาสายพันธุ์แบคทีเรียที่จะนำใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 พลาคที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี plaque assay (A) และวิธี spot test (B) (Yang et al., 2016)

2.2.5 การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (Purification)

2.2.5.1 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้แรงปั่นเหวี่ยง (Centrifugative force)

เป็นการเร่งการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำโดยอาศัยแรงหนีศูนย์กลางซึ่งสามารถใช้ในการแยกสิ่งแปลกปลอมออกจากแบคเทอริโอเฟจได้ โดยที่สิ่งแปลกปลอมจะตกตะกอนรวมกันอยู่ที่ก้นหลอดปั่นเหวี่ยง และแบคเทอริโอเฟจจะแขวนลอยอยู่ในส่วนใสด้านบน (supernatant)

2.2.5.2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการกรอง

การใช้กระดาษกรองแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากแบคเทอริโอเฟจ กระดาษกรองต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูเล็กกว่า หรือเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เนื่องจากแบคทีเรียทั่วไปมีขนาดเซลล์ที่ใหญ่กว่า 0.45 ไมโครเมตร จึงไม่สามารถผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์รู 0.45 ไมโครเมตร ได้ (สมศักดิ์, 2527)

2.2.6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages Applications) ในด้านต่าง ๆ

เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจมีความสามารถในการนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นทางด้านการแพทย์และการเภสัชกรรม ด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรมด้านอาหาร เป็นต้น ตัวอย่างการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ประโยชน์ มีดังต่อไปนี้

2.2.6.1 ใช้แบคเทอริโอเฟจในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย (Bacteria typing หรือ detection) เป็นการใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในจีนัส (Genus) และสปีชีส์ (Species) เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อกับแบคเทอริโอเฟจ เป็นประโยชน์ทางด้านการตรวจวินิจฉัยทางระบาดวิทยา

2.2.6.2 ใช้แบคเทอริโอเฟจเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (Phage biocontrol/bioprocessing) ทางด้านการเกษตรได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ควบคุมแบคทีเรีย หรือเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อลดการใช้สารเคมีทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ลดปริมาณจุลินทรีย์ในผักผลไม้ และในอาหารที่ผ่านกระบวนการปรุงสุกน้อย เพื่อไม่ให้เสียรสชาติและกลิ่นของอาหาร

2.2.6.3 ใช้แบคเทอริโอเฟจในการบำบัด (Phage therapy) เป็นการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อประโยชน์ทางด้านการรักษามีทั้งการใช้แบคเทอริโอเฟจทั้งตัว (Whole phage) หรือการใช้ผลิตภัณฑ์จากแบคเทอริโอเฟจที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Endolysin) ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ ถึงแม้ว่าการบำบัดด้วยแบคเทอริโอเฟจจะมีการศึกษาทางคลินิกมานานในแถบยุโรปตะวันออก ทั้งการศึกษาในหลอดทดลอง (In vitro) และการทดสอบในสิ่งมีชีวิต (In vivo) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันนี้ยังไม่มีการอนุมัติให้ใช้แบคเทอริโอเฟจทั้งตัว และ endolysin สำหรับการรักษามนุษย์ในยุโรปหรือสหรัฐอเมริกา

2.2.6.4 Phage display เป็นการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการบนผิวแบคเทอริโอเฟจ โดยอาศัยความรู้ทางพันธุวิศวกรรม และจุลชีววิทยาโปรตีนที่แสดงบนผิวแบคเทอริโอเฟจมีได้หลายประเภท ตั้งแต่เปปไทด์สายสั้น (6 - 8 กรดอะมิโน) จนถึงโปรตีนขนาดใหญ่ (1,024 กรดอะมิโน) โปรตีนที่สามารถแสดงบนผิวแบคเทอริโอเฟจ ได้แก่ แอนติบอดีเอนไซม์และโปรตีนโครงสร้างต่าง ๆ ซึ่ง Phage display ถือเป็นการพัฒนาก้าวสำคัญในการค้นคว้าวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้งานทางเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านการเกษตร ด้านการแพทย์ ด้านยา และด้านวัคซีน (Phage based vaccine) โดยด้านวัคซีน มีการใช้แบคเทอริโอเฟจเป็นตัวนำพาแอนติเจนเข้าไปเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งข้อดีของแบคเทอริโอเฟจในการใช้เป็นตัวนำพาแอนติเจน คือ แบคเทอริโอเฟจไม่ติดเชื้อในยูคาริโอติกเซลล์ (eukaryotic cell) ทำให้ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอเฟจมาก่อน (Pre-exist immunity) จึงสามารถใช้แบคเทอริโอเฟจเป็นตัวพาแอนติเจนเข้าไปโดยไม่ถูกภูมิคุ้มกันทำลายก่อน สามารถใช้เป็นแอนติเจนของเชื้อที่ไม่สมารถเพาะเลี้ยงได้ หรือเชื้อที่อันตรายสูง เพื่อลดความเสี่ยงในการติดเชื้อ อีกทั้งแบคเทอริโอเฟจมีความคงตัวสูงในสภาพเครียด เช่น ทนต่อเอนไซม์ (Nucleolytic และ proteolytic) อุณหภูมิสูง และช่วงพีเอชกว้าง นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจยังมีคุณสมบัติเป็น สารเสริมฤทธิ์ในวัคซีน (adjuvant) โดยแบคเทอริโอเฟจที่แสดงแอนติเจนบนผิวเมื่อเข้าสู่ร่างกาย และถูกจับกินด้วยกระบวนการ (อภิญญา, 2560)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Begum et al. (2010) Viazis et al. (2011) Lee and Park (2015) และ Ertürk and Lood (2018) ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างที่เป็นของเหลว และใช้วิธี plaque assay ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ในงานวิจัยของ Begum et al. (2010) ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำหลายแห่งในสิ่งแวดล้อมมาฆ่าเชื้อแล้วกรองผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.22 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่ได้จากการกรองมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีอยู่ด้วยวิธี spot test เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แล้วจึงทำการเลือกพลาคเดี่ยวที่เกิดขึ้นมาทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มจำนวนแบคเทอ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ริโอเฟจ โดยการเก็บบริเวณใส (picking) แล้วทำ plaque assay ซ้ำ 3 ครั้ง จากการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อมแต่ละแห่งสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ 49 ชนิด ในงานวิจัยของ Viazis et al. (2011) ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากปุ๋ยคอก และทำการแยกแบคเทอริโอเฟจแบบเพิ่มปริมาณโดยใช้น้ำสกปรกที่ได้จากการหมักปุ๋ยคอกมาผสมกับอาหารเหลว trypticase soy บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วจึงนำไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากการทดลองสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ 8 ชนิด ในงานวิจัยของ Lee and Park (2015) ได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงงาน โดยมีการนำตัวอย่างน้ำสกปรกไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วนใสไปบ่มร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ก่อนนำไปทำการแยกแบคเทอริโอเฟจโดยการเก็บบริเวณใส แล้วทำซ้ำเพื่อให้ได้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ จากการทดลองสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ 2 ชนิด คือ BECP2 และ BECP6 และในงานวิจัยของ Ertürk and Lood (2018) ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกในถังหมักแบบกะ (batch) ด้วยวิธี plaque assay เพื่อนำแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มาทำเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) ในการตรวจหาแบคทีเรียที่จำเพาะเจาะจงกัน ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การรักษาด้วยแบคเทอริโอเฟจแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย และการนำแบคเทอริโอเฟจมาทำเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เป็นต้น

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจสามารถใช้งานได้อย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น การใช้แบคเทอริโอเฟจเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดย Gwak et al. (2018) สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ คือ KFS-YE และ Perera et al. (2015) ได้ใช้แบคเทอริโอเฟจที่มีชื่อทางการค้าว่า ListShield™ ซึ่งมีความสามารถในการลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Y. enterocolitica* และ *L. monocytogenes* ตามลำดับ นอกจากนี้ Anany et al. (2011) ได้ทำการตรึงแบคเทอริโอเฟจด้วยเซลลูโลส เพื่อรักษาประสิทธิภาพในการทำงานเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เป็นต้น การใช้แบคเทอริโอเฟจในการบำบัดการติดเชื้อแบคทีเรีย โดย Taha et al. (2018) ได้ใช้แบคเทอริโอเฟจ ZCKP1 ในการบำบัดการติดเชื้อแบคทีเรีย *K. pneumoniae.* และ Oliveira et al. (2018) ได้ใช้แบคเทอริโอเฟจร่วมกับน้ำผึ้งเกาลัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดการติดเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *E. coli* เป็นต้น และการใช้แบคเทอริโอเฟจเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพ โดย Chen et al. (2017) และ Ertürk and Lood (2018) ได้ใช้แบคเทอริโอเฟจในการตรวจจับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish, HYCON Plastics)

2. หลอดทดลอง (Test Tube, PYREX®, Maxico)

3. ปิเปตแก้ว (Pipette, PRECICOLOR HBG, Germany) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

4. ไมโครปิเปต (Micropipette, GILSON, France) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร

5. ทิป (Tip, ExtraGene Inc., Taiwan) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร

6. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube, Becton Dickinson, USA)

7. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube, ExtraGene Inc., Taiwan)

8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask, PYREX, USA)

9. บีกเกอร์ (Beaker, PYREX, Germany)

10. ขวดแก้ว (Duran Bottle, SCHOTT DURAN, Germany)

11. ตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร (Minisart®, Sartorius, Germany)

12. หลอดฉีดยา (Syringe, NIPRO, Thailand)

13. สไลด์ (Slide, SAIL, China)

14. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass, HAD, Union Science)

15. กระบอกตวง (Cylinder, NALGENE®,USA)

16. ไมโครมิเตอร์ (Micrometer, Nikon, Japan)

17. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

18. แท่งแก้วงอ (Spreader)

19. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20. ช้อนตักสาร (Spatula)

21. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.2 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator, memmert, The Novacel® Solution for LASER Fiber & LASER CO_2)

2. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker, Lab. Companion, USA)

3. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, TOMY, Japan)

4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge, Eppendorf, Germany)

5. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow, HOLTEN, HOLTEN LAMINAR AIR A/S)

6. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, ARC120, Adventurer, USA)

7. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance, BP 2215, Sartorius, Germany)

8. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, UB-10, Denver Instrument, Sartorius, Germany)

9. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, Contherm, Scientific Ltd., New Zealand)

10. ตู้เย็น (Refrigerator, NP-BT264, Panasonic, Japan)

11. เครื่องผสม (Vortex Mixer, G560E, Scientific Industries, USA)

12. กล้องจุลทรรศน์ (Optical Microscopes, OLYMPUS OPTICAL Co., Ltd, Japan)

13. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper, SONIC, Thailand)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, Fisher Chemical, USA)

2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder, HIMEDIA, India)

3. ทริปโตน (Tryptone Type-1, HIMEDIA, India)

4. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

5. สารละลาย Saline-Magnesium (SM Solution)

6. ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl, Vivantis, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (KH_2PO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (Na_2HPO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

10. เจลาติน (Gelatine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

11. สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

12. น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram Iodine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

13. สีซาฟรานิน (Safranin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

14. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2, ศิริบัญชา, ประเทศไทย)

15. วาสลีน (Vaseline, Vaseline® Jelly, Univernity)

16. สีนิโกรซิน (Nigrosin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

17. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (40% KOH)

18. Alpha Naphthol Solution

19. Kovac's Reagent

20. Methyl Red Solution

21. กลีเซอรอล (Glycerol, CARLO ERBA reagents, France)

22. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุรากรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

23. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar, HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Methyl red และ Voges-Proskaure Medium (MR-VP Medium, HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB, HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar (HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB Agar) (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากโรงอาหารใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ครั้งละ จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร ใช้หลอดฉีดยาดูดตัวอย่างใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก

3.6.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB)

การแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง EMB ทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำสกปรกปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาขีดเชื้อแบบตัดกัน (cross streak) บนผิวหน้าของอาหารแข็ง EMB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนี มีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมา streak บนอาหารแข็ง Nutrient agar ที่มีผิวหน้าเอียง (NA slant) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางเคมี (Capuccino and Sherman, 2014)

3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.2.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำได้โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากอาหารแข็ง EMB มาขีดเชื้อแบบตัดกันบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ มันวาว สีขาว ครีม นูนต่ำ วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Capuccino and Sherman, 2014)

3.6.2.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยเทคนิคหยดแขวน (Hanging drop) โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ลงบริเวณตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ แล้วทาวาสลีน (vaseline) บริเวณมุมทั้ง 4 ของกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำสไลด์หลุมมาปิดทับกระจกปิดสไลด์ให้หยดน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* อยู่ตรงกลางของหลุมตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (Morello et al., 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.3 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant มาย้อมสีแบบแกรม โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ที่สะอาดแล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาเกลี่ย (smear) ผสมกับหยดน้ำบนสไลด์จากนั้นรอให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำกลั่น หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนลงบนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างน้ำกลั่นซ้ำอีกรอบ จากนั้นหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ยเชื้อ และทิ้งไว้ 30 – 60 วินาที ล้างสีซาฟรานินออกด้วยน้ำกลั่นรอจนแห้งส่องดูการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (Morello et al., 2002)

3.6.2.4 การทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant มาย้อมสีสปอร์ โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ที่สะอาดแล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาเกลี่ย (smear) ผสมกับหยดน้ำบนสไลด์จากนั้นรอให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง จากนั้นนำสไลด์ไปวางบนตะแกรงให้โดนไอน้ำเดือดแล้วหยดสี malachite green ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที พร้อมคอยเติมสีเพื่อไม่ให้สีแห้ง จากนั้นล้างออกด้วยน้ำและย้อมทับด้วยสีซาฟรานินเป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นแล้วรอให้แห้งส่องดูการติดสีของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (Morello et al., 2002)

3.6.2.5 การวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การวัดขนาดเซลล์และดูการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant มาย้อมสีพื้นหลังแบบ negative โดยหยดสีนิโกรซิน (nigrosin) ลงบนปลายด้านหนึ่งของสไลด์แล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาผสมกับหยดสีนิโกรซิน แล้วใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นวางแตะลงบนหยดสีแล้วลากสไลด์ตามแนวยาวให้ส่วนผสมแผ่ออกรอจนแห้งส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า และวัดขนาดของเซลล์ด้วย micrometer (Capuccino and Sherman, 2014)

3.6.2.6 การทดสอบความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การทดสอบความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำได้โดยการใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว NB ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (Capuccino and Sherman, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.3.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำได้โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant มาผสมกับหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 บนสไลด์ หากเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จะเกิดฟองอากาศ (Morello et al., 2002)

3.6.3.2 การทดสอบการสร้างวงแหวนอินโดล (Indole ring)

การสร้างวงแหวนอินโดลของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทดสอบได้โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant ใส่ลงในหลอดที่มี Tryptone water ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยด Kovac's reagent 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร หากเกิดวงแหวนสีชมพูแดงหรือม่วง แสดงว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างวงแหวนอินโดลได้ อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดวงแหวนสีชมพูหรือม่วงอ่านผลเป็นลบ (สุรีย์, 2557)

3.6.3.3 การทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskaure

การทดสอบ MR-VP ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเหลว MR-VP (MR-VP broth) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำไปแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่า 2 หลอด หลอดละเท่า ๆ กัน หลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยหยดสารทดสอบ Methyl red 2 - 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ถ้าสารทดสอบ Methyl red ยังคงมีสีแดงเหมือนเดิมอ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าสีของสารทดสอบ Methyl red เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นลบ ส่วนหลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges-Proskaure โดยหยดสาร Alpha naphthol ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงอ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีอ่านผลเป็นลบ (สุรีย์, 2557)

3.6.3.4 การทดสอบการใช้ซิเทรต

การใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทดสอบได้โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant ไป streak บนอาหารแข็ง Simmons citrate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินอ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีอ่านผลเป็นลบ (สุรีย์, 2557)

เอกสารนี้ [illegible] ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.4 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มในอาหารเหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 30 ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายกลีเซอรอลเป็นร้อยละ 15 และปริมาตรสารละลายรวมเป็น 1 มิลลิลิตร เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส (Sprouffske et al., 2016)

3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำได้โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA มาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.6.6 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.6.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation without Enrichment)

ทำการดูดตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารตึกพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงหลอดละเท่า ๆ กัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่าจะมีอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

3.6.6.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกโดยมีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation with Enrichment)

ทำการนำส่วนใสที่ได้จากการกรองตามข้อ 3.6.6.1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ลงไปปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่าจะมีอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.6.3 วิธีการทำ plaque assay

การทำ plaque assay ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่าจะมีอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่ได้จากการกรอง วนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผสมกันอีกครั้ง จากนั้นรอให้วุ้นแข็งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.6.4 วิธีการเก็บบริเวณใส (picking) และการทำให้บริสุทธิ์

การเก็บบริเวณใสทำโดยใช้ปลายทิปสีเหลือง (tip) ที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยพลาคเดี่ยว (single plaque) บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ PBS (Phosphate Buffered Saline) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนใสที่ได้จากการกรองนี้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เกิดพลาคเดี่ยวด้วยวิธี plaque assay นี้ โดยทำเช่นนี้ อีกจำนวน 2 ครั้ง ซึ่งจะพิจารณาพลาคที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพลาคเดี่ยวที่มีขนาดเท่ากัน สำหรับการเก็บพลาคในครั้งที่ 3 (ทำการเก็บบริเวณใสครั้งสุดท้าย) จะเก็บส่วนใสที่มีอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่ได้ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ SM แทนสารละลายบัฟเฟอร์ PBS

3.6.6.5 วิธีการชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจจากจานอาหารวุ้นสองชั้น

การชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจทำโดยการนำเพลทที่มีการเกิดพลาคหรือมีบริเวณที่เกิดการไลซิสของแบคทีเรียมาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารวุ้นสองชั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทำการวนจานอาหารวุ้นสองชั้นทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่มีอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่กรองได้ลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.7 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) โดยวิธี Spot Test

3.6.7.1 วิธีการทำ spot test

การทำ spot test ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB แข็งตัวนำเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกโรงอาหารตึกพระเทพฯ จากงานวิจัยของชณัฐดา และคณะ (2562) ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก

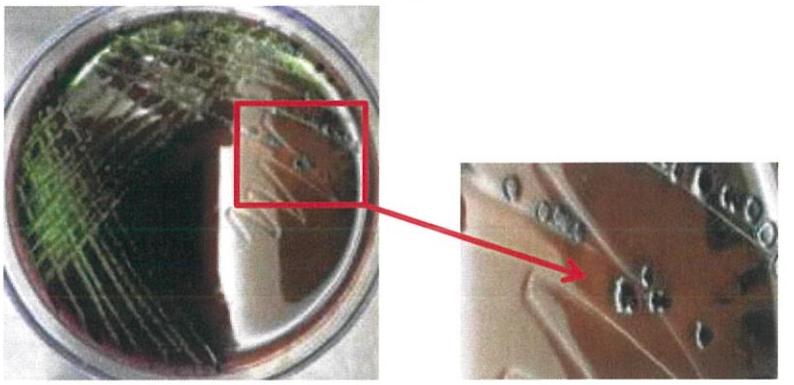
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำสกปรก เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เนื่องจาก Kumar (2012) กล่าวว่าแบคทีเรีย *E. coli* มีอยู่ทั่วไปทั้งในอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ โดยเฉพาะน้ำสกปรก ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอาการอุจจาระร่วง โดยปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่ไม่สะอาด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *E. coli* จากน้ำสกปรกของโรงอาหารใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) (Capuccino and Sherman, 2014) และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาทดสอบทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะและขนาดของโคโลนี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ความต้องการออกซิเจน (Morello et al., 2002) และคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้างวงแหวนอินโดล การทดสอบ MR-VP และการใช้ซิเทรต (สุรีย์, 2557)

4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB)

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ ทั้ง 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง ได้แก่ CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, GT1, GT2, GT3 และ GT4 มีลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* คือ โคโลนี กลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีและไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ (Capuccino and Sherman, 2014) ดังรูปที่ 4.1 จากการคัดแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์บนอาหารแข็ง EMB ได้คัดเลือกโคโลนี จำนวนทั้งหมด 84 ไอโซเลท (1 โคโลนี คือ 1 ไอโซเลท) ดังตารางที่ 4.1

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีลักษณะโคโลนีกลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีและไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ เนื่องจากในอาหารแข็ง EMB ประกอบด้วยสีย้อม eosin Y และ methylene blue ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และยังประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสเพื่อคัดแยกความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสของแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสในอาหารแล้วผลิตกรดได้พีเอชจึงลดลง ทำให้สีย้อม eosin Y และ methylene blue ที่ประกอบอยู่ในอาหารผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จึงเห็นสีของโคโลนีมีสีม่วงหรือดำ (Capuccino and Sherman, 2014)

เอกสารนี้ [illegible] ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง EMB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
รางน้ำโรงอาหารใหม่	CT1	N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 และ N8
รางน้ำโรงอาหารใหม่	CT2	N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15 และ N16
รางน้ำโรงอาหารใหม่	CT3	N17, N18, N19, N20, N21, N22 และ N23
รางน้ำโรงอาหารใหม่	CT4	N24, N25, N26, N27, N28, N29 และ N30
รางน้ำโรงอาหารใหม่	CT5	N31, N32, N33, N34, N35, N36, N37, N38, N39 และ N40
รางน้ำโรงอาหารใหม่	CT6	N41, N42, N43, N44, N45, N46, N47, N48, N49, N50, N51, N52, N53, N54 และ N55
บ่อดักไขมันโรงอาหารใหม่	GT1	N56, N57, N58, N59, N60, N61, N62, N63, N64, N65 และ N66
บ่อดักไขมันโรงอาหารใหม่	GT2	N67, N68, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N75 และ N76
บ่อดักไขมันโรงอาหารใหม่	GT3	N77, N78, N79 และ N80
บ่อดักไขมันโรงอาหารใหม่	GT4	N81, N82, N83 และ N84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

4.1.2.1 การทดสอบการสร้างวงแหวนอินโดลของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างวงแหวนอินโดลของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 84 ไอโซเลท ในสารละลาย Tryptone water เข้มข้นร้อยละ 1 หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหยด Kovac's reagent 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์บนอาหารแข็ง EMB จำนวน 32 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N16, N17, N18, N19, N21, N33, N34, N35, N36, N40, N41, N42, N44, N45, N50, N53, N57, N58, N65 N67, N68, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N75, N81, N82, N83 และ N84 เกิดวงแหวนสีแดงบนผิวหน้าสารละลาย ดังรูปที่ 4.2 (A) ซึ่งแปลผลเป็นบวก (+) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 52 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N20, N22, N23, N24, N25, N26, N27, N28, N29, N30, N31, N32, N37, N38, N39, N43, N46, N47, N48, N49, N51, N52, N54, N55, N56, N59, N60, N61, N62, N63, N64, N66, N76, N77, N78, N79 และ N80 เกิดวงแหวนสีเหลืองบนผิวหน้าสารละลาย ดังรูปที่ 4.2 (B) ซึ่งแปลผลเป็นลบ (-)

จากผลการทดลองการทดสอบความสามารถในการสร้างวงแหวนอินโดลของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ข้างต้น ไอโซเลทรหัสที่เกิดวงแหวนสีแดง (วงแหวนอินโดล) เป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทรหัสนั้น ๆ สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตแฟนเป็นอินโดลได้ ส่วนไอโซเลทรหัสที่เกิดวงแหวนสีเหลือง หรือสีเดียวกับสารละลาย เป็นผลมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตแฟนเป็นอินโดลได้ (สุรีย์, 2557)

A B

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการเกิดวงแหวนอินโดล (A) และลักษณะที่ไม่เกิดวงแหวนอินโดล (B)

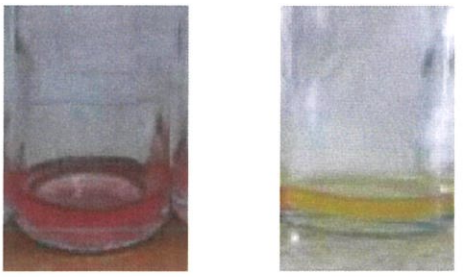
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.2 การทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskaure ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskaure ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 84 ไอโซเลท โดยการใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อจาก NA slant ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเหลว MR-VP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำมาแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่า 2 หลอด หลอดละเท่า ๆ กัน โดยส่วนที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยหยดสารทดสอบ Methyl red 2 - 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์บนอาหารแข็ง EMB จำนวน 61 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N1, N2, N3, N4, N5, N7, N8, N9, N13, N16, N17, N19, N20, N21, N24, N27, N28, N32, N33, N34, N35, N36, N37, N40, N41, N43, N44, N45, N47, N48, N49, N50, N51, N52, N53, N54, N55, N56, N59, N60, N61, N62, N63, N66, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N75, N76, N77, N78, N79, N80, N81, N82, N83 และ N84 เปลี่ยนเป็นสีแดง ดังรูปที่ 4.3 (A) ซึ่งแปลผลเป็นบวก (+) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 23 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N6, N10, N11, N12, N14, N15, N18, N22, N23, N25, N26, N29, N30, N31, N38, N39, N42, N46, N57, N58, N64, N65 และ N68 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี ดังรูปที่ 4.3 (B) ซึ่งแปลผลเป็นลบ (-) ส่วนที่ 2 นำมาทดสอบ Voges-Proskaure โดยหยดสาร Alpha naphthol ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 84 ไอโซเลท ไม่เปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งแปลผลเป็นลบ (-)

จากการทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskaure ข้างต้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้แล้วสร้างกรดขึ้น แต่ไม่สร้างสารอะเซโทอินที่เป็นเบส ดังนั้น ในส่วนที่ 1 คือ การทดสอบ Methyl red ที่สามารถใช้คัดแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นกลุ่มย่อย 'coli' หรือเป็น 'aerogenes' โดยเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ทั้งหมด แต่จะแตกต่างกันที่พีเอชของสารละลาย หากเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดได้มากจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีแดง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากสารละลายที่มีน้ำตาลกลูโคสได้ ซึ่งสีของอินดิเคเตอร์ methyl red จะเปลี่ยนเป็นสีแดงก็ต่อเมื่อมีพีเอชต่ำกว่า 4.4 แสดงว่า ไอโซเลทเหล่านั้นเป็นกลุ่ม coli และในส่วนที่ 2 คือ การทดสอบ Voges-Proskaure ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นหลัก หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่า มีการสร้างสารอะเซโทอินขึ้น (สุรีย์, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



A B

รูปที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบ Methyl red (A) แสดงผลบวก และ (B) แสดงผลลบ

รูปที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบ Voges-Proskaure ให้ผลเป็นลบ (-)

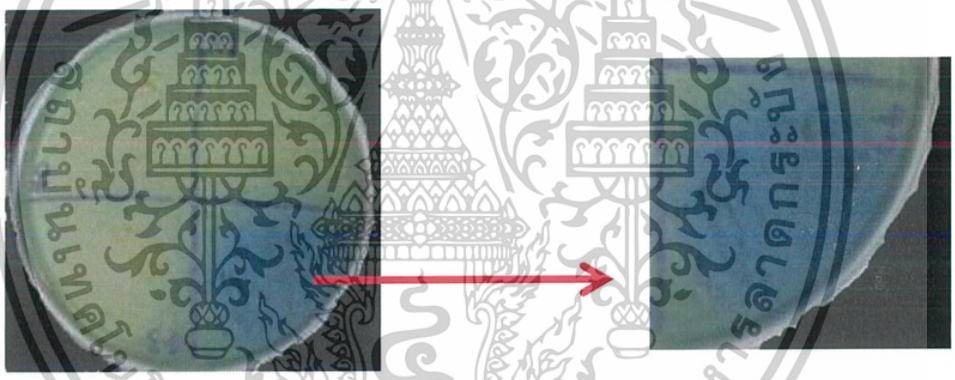
4.1.2.3 การทดสอบการใช้ซิเทรตของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Escherichia coli*

จากการทดสอบการใช้ซิเทรตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 84 ไอโซเลท โดยการใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อจาก NA slant ไป streak บนอาหารแข็ง Simmons citrate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์บนอาหารแข็ง EMB จำนวน 40 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N18, N19, N23, N24, N25, N26, N28, N32, N37, N38, N39, N42, N45, N46, N47, N48, N49, N50, N51, N53, N54, N55, N63, N64 และ N68 มีเชื้อเกิดขึ้นตามรอยขีดบนอาหารแข็ง Simmons citrate และเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง Simmons citrate เป็นสีน้ำเงิน ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งแปลผลเป็นบวก (+) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 38 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N16, N17, N20, N21, N22, N27, N29, N30, N31, N33, N34, N35, N36, N40, N41, N43, N44, N52, N57, N58, N66, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N75, N76, N77, N78, N79, N80, N81, N82, N83 และ N84 มีเชื้อเกิดขึ้นตามรอยขีดบนอาหารแข็ง Simmons citrate และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง Simmons citrate ดังรูปที่ 4.6 ซึ่งแปลผลเป็นลบ (-) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N56, N59, N60, N61,

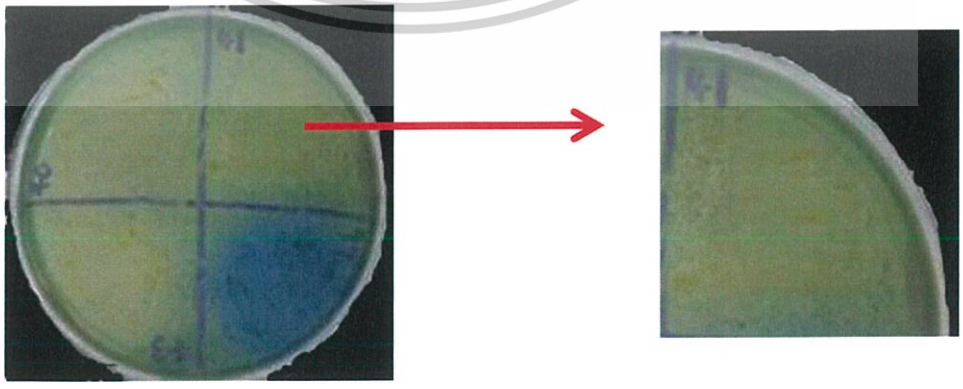
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N62 และ N65 ไม่เกิดเชื้อขึ้นตามรอยขีดบนอาหารแข็ง Simmons citrate และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง Simmons citrate

การทดสอบการใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไม่สามารถใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน จึงใช้การทดสอบนี้ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน โดยเฉพาะแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae หลักการของการทดสอบนี้อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนเกลือของกรดอินทรีย์ไปเป็น alkaline carbonates ซึ่งจะทำให้เกิด alkaline reaction จากการทดสอบข้างต้น อาหารแข็ง Simmons citrate ที่มีเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นตามรอยขีด และเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง Simmons citrate เป็นสีน้ำเงิน แสดงว่า มีเชื้อแบคทีเรียเจริญเกิดขึ้น และเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญขึ้นตามรอยขีด แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง Simmons citrate ได้ แสดงว่า เชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นไม่สามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (สุรีย์, 2557)



รูปที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นบวก (+)



รูปที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นลบ (-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งหมด 84 ไอโซเลท ข้างต้น พบว่า มีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 32 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จึงนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้ง 32 ไอโซเลท ไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และทดสอบทางสัณฐานวิทยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียรหัสไอโซเลทที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร มากที่สุด และมาจากทั้ง 2 บริเวณที่ทำการตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท (ภาคผนวก ข) มารายงานผล

4.1.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant เมื่อนำมาผสมกับหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 สามารถเกิดฟองแก๊สได้ ซึ่งแก๊สที่เกิดขึ้น คือ แก๊สออกซิเจน (O_2) ฟองแก๊สออกซิเจนนี้เกิดขึ้นจากการที่เซลล์แบคทีเรียสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่สามารถสลายพันธะทางเคมีของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ผลผลิต คือ น้ำ (H_2O) และแก๊สออกซิเจน (Wood et al., 2009)

4.1.3 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

4.1.3.1 การตรวจดูลักษณะโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ในการตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียมาทำการศึกษาในขั้นต่อจากนี้ จำนวน 20 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีลักษณะกลม ขอบเรียบ มันวาว สีขาว ครีม นูนต่ำ (Capuccino and Sherman, 2014) ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84

ในการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *E. coli* จำนวน 20 ไอโซเลท ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ ทั้ง 20 ไอโซเลท มีขนาดโคโลนี 0.8 – 2.2 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.2 โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 1 – 3 มิลลิเมตร (Singleton and Sainsbury, 2001) ดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.3.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว NB ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีเพอริทริคัสแฟลกเจลลา (peritrichous flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (Scheutz and Strockbine, 2005)

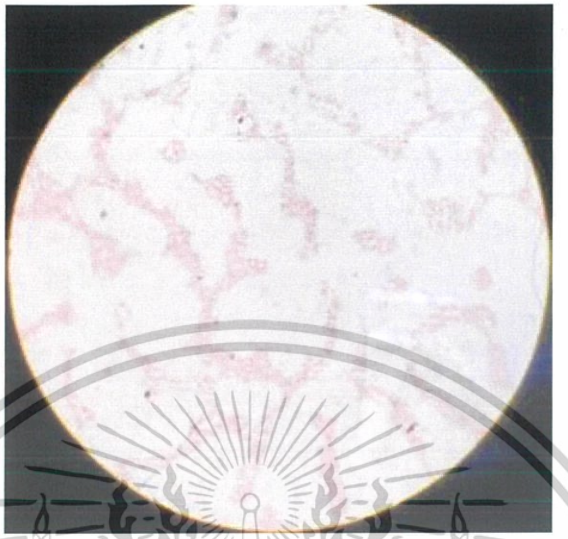
4.1.3.3 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ในการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จำนวน 20 ไอโซเลท พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ติดสีแดงของซาฟรานิน จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 ดังตารางที่ 4.2

จากผลการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ข้างต้นพบว่า เซลล์มีรูปร่างท่อน และเซลล์ติดสีแดงของซาฟรานิน แสดงว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) บาง และมีลิปิด (lipid) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งละลายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลกอฮอล์ที่เป็นสารชะสี คริสตัลไวโอเลตที่ติดอยู่บนผนังเซลล์จึงถูกชะออกไปด้วย ทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบไม่ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (Morello et al., 2002) ดังรูปที่ 4.8

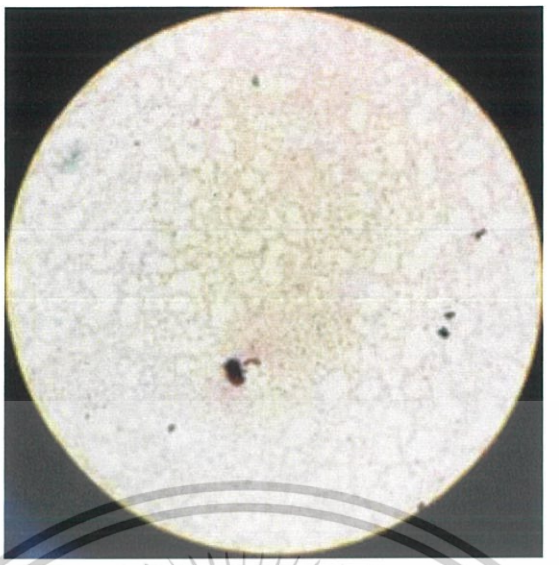


รูปที่ 4.8 การติดสีซาฟรานิน (safranin) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เมื่อย้อมสีแบบแกรม แล้วส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.1.3.4 การทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 ไม่พบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้ง 20 ไอโซเลท เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไม่สร้างสปอร์ ส่วนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ สปอร์จะมีผนังหนาที่ป้องกันสปอร์จากความร้อนหรือสารเคมีต่าง ๆ เมื่อย้อมด้วยสี malachite green จึงต้องใช้ความร้อนเพื่อให้สีสามารถซึมเข้าสู่สปอร์ได้ แล้วเมื่อล้างออกด้วยน้ำสี malachite green ที่ติดอยู่กับเซลล์แบคทีเรีย (vegetative cell) จะถูกชะออกได้ง่าย แต่เนื่องจากสปอร์มีผนังหนาสี malachite green จึงไม่หลุดออกเมื่อล้างด้วยน้ำ จากนั้นเมื่อย้อมด้วยสีซาฟรานินเซลล์ที่ไม่ติดสี malachite green จึงติดสีแดงของซาฟรานิน (Capuccino and Sherman, 2014) ดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

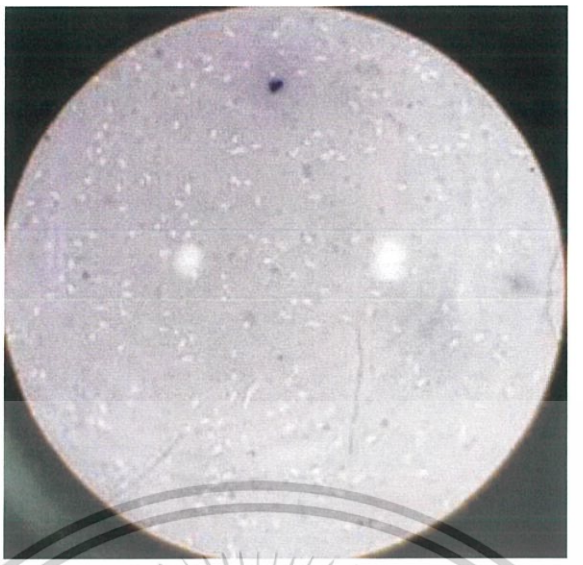


รูปที่ 4.9 การติดสีซาฟรานิน (safranin) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เมื่อย้อมสีสปอร์แล้ว ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.1.3.5 การวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant เมื่อนำมาย้อมสีแบบ negative แล้ววัดขนาดเซลล์ด้วย micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 มีขนาดเซลล์กว้าง 1.00 – 1.50 ไมโครเมตร และยาว 1.80 – 3.00 ไมโครเมตร และมีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ ดังรูปที่ 4.10 โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีขนาดเซลล์กว้าง 1.1 – 1.5 ไมโครเมตร และยาว 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร และจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ (Scheutz and Strockbine, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เมื่อย้อมสีพื้นหลังด้วยสีนิโกรซิน (nigrosin) แล้วส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.1.3.6 การทดสอบความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการทดสอบความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่าหลอดอาหารเหลว NB ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 ขุ่นทั่วทั้งหลอดทดลอง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จึงเจริญได้ทั่วทั้งหลอดอาหารเหลว NB (Capuccino and Sherman, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB (1)	ขนาด (mm.) และลักษณะโคโลนี	การเคลื่อนที่	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ขนาด กxย (µm.) และ การจัดเรียงตัวของเซลล์(2)	ความต้องการออกซิเจน	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส
N16	G	0.90*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x3.00**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N17	G	2.30*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x2.00***	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N20	G	1.25*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x2.00**	ต้องการ	-	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N21	G	2.00*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x1.90**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N33	G	0.82*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.50**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N45	G	0.30*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x1.90**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N50	G	1.30*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x2.10**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N53	G	1.25*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x1.80***	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N58	G	1.00*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x3.00**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N67	G	1.90*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.70**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N69	G	0.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.00**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N70	G	1.50*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.50x3.00**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB (1)	ขนาด (mm.) และลักษณะโคโลนี	การเคลื่อนที่	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ขนาด กxย (µm.) และ การจัดเรียงตัวของเซลล์(2)	ความต้องการออกซิเจน	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส
N71	G	1.40*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.50x3.00**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N73	G	0.80*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.50x2.50***	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N74	G	1.90*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x1.80**	ต้องการ	+	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N81	G	1.10*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.10**	ต้องการ	-	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N82	G	1.00*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.20***	ต้องการ	-	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N83	G	0.90*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x2.20**	ต้องการ	-	+	-	-	เกิดฟอง O_2
N84	G	1.90*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x2.30**	ต้องการ	-	+	-	-	เกิดฟอง O_2

การอ่านผล

(1) การเจริญบนอาหาร EMB Agar
- G เกิดโคโลนีลักษณะกลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีและไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ

(2) การเจริญบนอาหารแข็ง NA
- * เกิดโคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ มันวาว สีขาว ครีม นูนต่ำ

(3) การจัดเรียงตัวของเซลล์
- ** อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว
- *** เซลล์จับกันเป็นคู่

4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารตึกพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า-เจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงานวิจัยของ Lee and Park (2015) กล่าวว่า แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) ในบริเวณเดียวกันสูง และต้องอาศัยแบคทีเรียเจ้าบ้านในการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นในสิ่งแวดล้อมที่สามารถพบแบคทีเรียเจ้าบ้านได้มาก จึงมีโอกาสในการพบแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านนั้นสูง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกแบคเทอ-ริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกของบ่อดักไขมันโรงอาหาร เนื่องจากน้ำสกปรกของบ่อดักไขมันมีความสกปรกมากจึงอาจมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มากกว่าบริเวณอื่น ซึ่งเพิ่มโอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรก

การศึกษาครั้งนี้ใช้แบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจมีจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ N50, N72, และ N81 โดยคัดเลือกจากเชื้อแบคทีเรียรหัสไอโซเลทที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร มากที่สุดจากทั้งหมด 20 ไอโซ-เลท สำหรับการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารตึกพระเทพฯ นั้น นำมาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วย 2 วิธีการ คือ การแยกแบคเทอริโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณและเพิ่มปริมาณของอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างที่เก็บมา โดยทำการตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ด้วยวิธี plaque assay

4.2.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกแบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ โดยเก็บจากบ่อดักไขมัน เมื่อนำตัวอย่างน้ำสกปรกไปปั่นเหวี่ยงแล้วกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณไม่ทำให้เกิดพลาคบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ N50, N72 และ N81 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

4.2.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกแบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพะเทพฯ แบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ นำส่วนใสที่ได้จากการกรองตามข้อ 3.6.6.1 มาทำการเพิ่มปริมาณตามข้อ 3.6.6.2 ตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจแบบเพิ่มปริมาณไม่ทำให้เกิดพลาคบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรียรหัสไอโซเลท N50, N72 และ N81 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

จากการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณและแบบที่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจไม่พบการเกิดพลาคเดี่ยว (single plaque) ที่มีลักษณะเป็นจุดใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น เนื่องจากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ที่นำมาใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจมาจากต่างแหล่งกับตัวอย่างน้ำสกปรกที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จึงไม่สามารถบุกรุกเข้าสู่แบคทีเรียรหัสไอโซเลท N50, N72 และ N81 ที่นำมาเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ จึงไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ เพราะแบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน หรือสิ่งแวดล้อมเดียวกันสูง (Jamal et al., 2017)

จากการแยกแบคเทอริโอเฟจข้างต้นพบว่า ไม่เกิดพลาคบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N50, N72 และ N81 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน แต่จากงานวิจัยของชณัฐดา และคณะ (2562) ที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ พบว่า เกิดพลาคเดี่ยวที่มีลักษณะใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น จึงได้ทำการเก็บพลาคใสที่เกิดขึ้นและนำไปทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่นที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ต่อไป

4.2.3 การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์

การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์เป็นการทำให้แบคเทอริโอเฟจปราศจากสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ซึ่งแบคเทอริโอเฟจชนิดเดียวกันจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพลาคอยู่ในช่วงเดียวกัน (Jamal et al., 2017) เนื่องจากไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ได้ จึงได้ใช้แบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารจากงานวิจัยของชณัฐดา และคณะ (2562) มาทำการทดลองต่อ โดยหลังจากการเก็บพลาคใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน จำนวน 60 พลาค และทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ พบว่า เหลือแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ จำนวน 2 หมายเลข ได้แก่ เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 และ 27 ซึ่งมีความเข้มข้น 1.055×10^{7} PFU/mL และ 1.493×10^{7} PFU/mL ตามลำดับ เนื่องจากขั้นตอนการเก็บบริเวณใสใช้ปลายทิปในการเขี่ยพลาคใสอาจทำให้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจบางส่วนติดอยู่ในปลายทิป เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจจึงมีปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจน้อย และพลาคใสที่เกิดขึ้นอาจมีปริมาณอนุภาคแบคเทอริโอเฟจน้อย ทำให้เมื่อนำไปทำ plaque assay ในครั้งถัดไปจึงไม่เกิดพลาคใสขึ้น (Mullan, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range)

การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) เป็นการศึกษาความสามารถในการบุกรุกเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจ โดยแบคทีเรียเจ้าบ้านที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแบคเทอริโอเฟจชนิดนั้น จะมีส่วนประกอบบนผนังเซลล์ที่สามารถสร้างพันธะกับส่วนขาของแบคเทอริโอเฟจได้ แบคเทอริโอเฟจจึงสามารถเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรียได้ (Kumar, 2012) เมื่อแบคเทอริโอเฟจปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน และเกิดการสร้างแบคเทอริโอเฟจตัวใหม่ที่มีส่วนประกอบครบสมบูรณ์ในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านจะทำลายเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเพื่อบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียอื่น (Hyman, 2019) ซึ่งบริเวณที่แบคทีเรียถูกทำลายจะเกิดลักษณะที่เรียกว่า lysis zone โดยในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ใช้เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 และเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 ที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน มาดำเนินการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ ต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 โดยการนำแบคทีเรียเจ้าบ้านแต่ละไอโซเลทที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB แข็งตัว นำเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจแต่ละหมายเลข ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB นำจานอาหารวุ้นสองชั้นไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N33, N53, N58, N69, N72, N74, N81, N82 และ N84 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน มีลักษณะขุ่นเกิดขึ้นตามรอยหยดของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ แต่ไม่ใช่ลักษณะการเกิดบริเวณใส (lysis zone) ที่ต้องการ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N16, N17, N20, N21, N45, N50, N67, N70, N71, N73, และ N83 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ดังตารางที่ 4.3 และพบว่า เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N33, N50, N69, N70, N72 และ N81 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน มีลักษณะขุ่นเกิดขึ้นตามรอยหยดของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ แต่ไม่ใช่ลักษณะบริเวณใสที่ต้องการ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N16,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N17, N20, N21, N45, N53, N58, N67, N71, N73, N74, N82, N83 และ N84 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ดังตารางที่ 4.4

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านด้วยวิธี spot test โดยสังเกตจากความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งจะพบบริเวณที่แบคทีเรียเจ้าบ้านถูกแบคเทอริโอเฟจทำลาย (lysis zone) เกิดขึ้น จากการทดลองในครั้งนี้พบทั้งการเกิดและไม่เกิด lysis zone บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น ลักษณะของ lysis zone ที่เกิดขึ้นมีลักษณะขุ่น ผิวหน้าอาหารวุ้นสองขรุขระและไม่เรียบบริเวณตำแหน่งที่หยดเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจเมื่อเทียบกับจานควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้นไม่มากพอที่จะทำให้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าไปทำลายแบคทีเรียเจ้าบ้านได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะใสตรงตำแหน่งที่หยดเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ จากงานวิจัยของ Wei et al. (2017) พบว่า เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจที่นำมาทำ spot test ควรมีความเข้มข้นมากกว่า $1x10^{10}$ PFU/mL เพื่อเพิ่มโอกาสในการเกิด lysis zone ที่เป็นลักษณะใส ส่วนแบคทีเรียรหัสไอโซเลทที่ไม่ทำให้เกิด lysis zone บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นเป็นเพราะว่า แบคเทอริโอเฟจไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียรหัสไอโซเลทนั้น จึงไม่สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ เมื่อแบคทีเรียไม่ตายจึงไม่เกิด lysis zone ขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละรหัสไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์เก็บมาจากรางน้ำของโรงอาหารและบ่อดักไขมัน แบคทีเรียจึงอาจมีความแตกต่างกันไปตามบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง (Begum et al., 2010) ทำให้ประสิทธิภาพ และความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านต่างกัน

ตารางที่ 4.3 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ หมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N16	1, 2, 3	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N17	4, 5, 6	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N20	7, 8, 9	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N21	10, 11, 12	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N33	13, 14, 15	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N45	16, 17, 18	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N50	19, 20, 21	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N53	22, 23, 24	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N58	25, 26, 27	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N67	28, 29, 30	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N69	31, 32, 33	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N70	34, 35, 36	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N71	37, 38, 39	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N72	40, 41, 42	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N73	43, 44, 45	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N74	46, 47, 48	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N81	49, 50, 51	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N82	52, 53, 54	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
17	N83	55, 56, 57	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	N84	58, 59, 60	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด

ตารางที่ 4.4 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N16	1, 2, 3	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N17	4, 5, 6	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N20	7, 8, 9	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N21	10, 11, 12	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N33	13, 14, 15	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
27	N45	16, 17, 18	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N50	19, 20, 21	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
27	N53	22, 23, 24	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N58	25, 26, 27	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N67	28, 29, 30	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N69	31, 32, 33	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
27	N70	34, 35, 36	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
27	N71	37, 38, 39	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N72	40, 41, 42	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
27	N73	43, 44, 45	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N74	46, 47, 48	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N81	49, 50, 51	พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารทั้ง 3 จุด
27	N82	52, 53, 54	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N83	55, 56, 57	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	N84	58, 59, 60	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยกแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ โดยใช้อาหารแข็ง Eosin Methylene Blue แล้วนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาดและลักษณะของโคโลนี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ความต้องการออกซิเจน และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้างวงแหวนอินโดล การทดสอบ MR-VP และการใช้ซิเทรต ผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวนทั้งหมด 32 ไอโซเลท และคัดเลือกเหลือ 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 เนื่องจากไอโซเลท N50, N72 และ N81 มีการเจริญได้ดีมากที่สุด จึงนำมาใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

จากการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งแบบไม่มีการเพิ่มและแบบมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ นำมาตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์รหัสไอโซเลท N50, N72 และ N81 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน พบว่าไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ จึงใช้แบคเทอริโอเฟจที่สามารถแยกได้โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านมาทำให้แบคเทอริเฟจบริสุทธิ์ และเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจแล้ว จึงได้เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ จำนวน 2 หมายเลข ได้แก่ เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 และ 27 ซึ่งมีความเข้มข้น 1.055×10^{7} PFU/mL และ 1.493×10^{7} PFU/mL ตามลำดับ จากนั้นนำมาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ N16, N17, N20, N21, N33, N45, N50, N53, N58, N67, N69, N70, N71, N72, N73, N74, N81, N82, N83 และ N84 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N33, N53, N58, N69, N72, N74, N81, N82 และ N84 และแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท N33, N50, N69, N70, N72 และ N81 ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกปรกของโรงอาหารตึกพระเทพฯ จึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการเก็บตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจควรเก็บในที่ไม่มีแสง หรือมีเสียงรบกวนน้อย เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจมีความไวต่อแสง (Dirckze et al., 1979)

2. ในขั้นตอนการทำ plaque assay ควรมีการผสมแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรีย *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน 5 นาที ก่อนจะนำไปผสมกับ LB top agar ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 แล้วเทลงบนจานอาหารแข็ง LB เพื่อเพิ่มโอกาสให้แบคเทอริโอเฟจเกาะติดกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Alves et al., 2014)

3. ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของวุ้นใน LB top agar จากร้อยละ 0.7 เป็นร้อยละ 0.5 หรือ 0.4 เพื่อเพิ่มโอกาสให้แบคเทอริโอเฟจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

4. ในขั้นตอนการเก็บบริเวณใสควรใช้ลวดเขี่ยเชื้อในการเก็บพลาคใสจากผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นแทนปลายทิปเพื่อลดปัญหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจติดในปลายทิป (Mullan, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา ธีระกุล, เกษตร ทวีเศษ, พัชรี สุนทรนันท และพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2547. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ**. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2557. ***Esherichia coli***. สืบค้นจาก http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/12_57.pdf

ธีรพล สุวรรณสะอาด. 2550. ***Esherichia coli***. สืบค้นจาก http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/3053/8/277537_ch1.pdf

นิตยา ค้าคุ้ม, อุมาพร ยอดประทุม และรศนา วงศ์รัตนชีวิน. 2553. "แบคเทอริโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์." *ศรีนครินทร์เวชศาสตร์*. 25(1)

บุษกร อุตรภิชาติ. 2552. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. สงขลา : นำศิลป์โฆษณา จำกัด

พิสนธิ์ จงตระกูล. 2554. **เชื้ออีโคไลมรณะ**. สืบค้นจาก http://www.thaidrugwatch.org/download/ecoli.pdf

วฤษณี ปรีชานฤชิตกุล. 2554. 4 กรกฎาคม. "สิ่งเล็ก ๆ ที่เรียกว่าอีโคไล". **กสิกร**. หน้า 77.

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา. 2527. **ไวรัสวิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2557. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร**. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อภิญญา นามสาย. 2560. "Bacteriophage: Phage application." *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม*. 2 : 11-17

Alves, D.R. Gaudion, A. Bean, J.E. Perez Esteban, P. Arnot, T.C. Harper, D.R. Kot, W. Hansen, L.H. Enright, M.C. Tobias, A. and Jenkinsa, A. 2014. "Combined Use of Bacteriophage K and a Novel Bacteriophage To Reduce *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation." *Applied and Environmental Microbiology*. 80 : 6694-6703

Anany, H. Chen, W. Pelton, R. and Griffiths, M.W. 2011. "Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes" *Applied And Environmental Microbiology*. 77 : 6379–6387

Begum, Y.A. Chakraborty, S. Chowdhury, A. Ghosh, A.N. Nair, G.B. Sack, P.B. Svennerholm, A.-M. and Qadri F. 2010. "Isolation of bacteriophage specific for CS7-expressing strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Journal of Medical Microbiology*. 59 : 266-272

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Berchieri Jr. Lovell, M.A. and Barrow, P.A. 1991. "The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium.*" *Research in Microbiology.* 142 : 541-549

Capuccino J.G. and Sherman N. 2014. **Microbiology : A Laboratory Manual.** 10th ed. New York : PEARSON

Chen, J. Picard, R.A. Wang, D. and Nugen, S.R. 2017. "Lyophilized Engineered Phages for *Escherichia coli* Detection in Food Matrices" *ACS Sensors.* 2 : 1573-1577

Clokie, M.R.J. and Kropinski, A.M. 2009. **Bacteriophages Methods and Protocols Volume 1 : Isolation, Characterization and Interactions.** New York : Humana Press.

Cornax, R. Morinigo, M.A. Paez, I.G. Munoz, M.A. and Borrego, J.J. 1990. "Application of Direct Plaque Assay for Detection and Enumeration of Bacteriophages of Bacteroides fragilis from Contaminated-Water Samples." *Applied And Environmental Microbiology.* 56 : 3170-3173

Dirckze, C.D. Lehrbach, P.R. and Lee, B.T.O. 1979. "Effect of Bacteriophage C5 on Ultraviolet Light Survival in *Pseudomonas aeruginosa.*" *Journal of General Microbiology.* 112 : 297-300

Ertürk, G. and Lood, R. "Bacteriophages as biorecognition elements in capacitive biosensors : Phage and host bacteria detection." *Sensors and Actuators B: Chemical.* 258 : 535-543

Feng, P. Weagant, S.D. and Jinneman, K. 2017. **Bacteriological Analytical Manual Chapter 4A Diarrheagenic *Escherichia coli.*** [online]. Available : https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli

Ghosh. Persad, E. Shiue, T. Lam, C. Islam, A. Mascibroda, L.G. Sherman, M.B. Smith, T. and Cheeptham, N. 2018. "Explorative Study on Isolation and Characterization of a Microviridae G4 Bacteriophage, EMCL318, against Multi-Drug-resistant *Escherichia coli* 15-318." *Antibiotics.* 7 : 92

Gwak, K. Choi, I. Lee, J. Oh, J. and Park, M. 2018. "Isolation and Characterization of a Lytic and Highly Specific Phage against Yersinia enterocolitica as a Novel Biocontrol Agent" *J. Microbiol. Biotechnol .* 28(11) : 1946–1954

Hyman, P. 2019. "Phages for Phage Therapy : Isolation Characterization, and Host Range Breadth." *Pharmaceuticals.* 12(35)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jamal, M. Andleeb, S. Jalil, F. Imran, M. Nawaz, M.A. Hussain, T. Ali, M. and Das, C.R. 2017. "Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995." *Life Sciences.* 190 : 21-28

Kumar, S. 2012. **Textbook of Microbiology.** New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publishers

Lee, L.A. Puhr, N.D. Maloney, K.E. Bean, N.H. and Tauxe, R.V. 1989. "Increase in Antimicrobial Resistant *Salmonella* Infections in the United States, 1989-1990." *The Journal of Infectious Diseases.* 170 : 128-134

Lee, Y.-D and Park, J.-H. 2015. "Characterization and Application of Phages Isolated From Sewage for Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in Biofilm." *LWT - Food Science and Technology.* 60 : 571-577

Liana, A.E. Marquis, C.P. Gunawan, C.J. Gooding, J. and Amal, R. 2017. "T4 bacteriophage conjugated magnetic particles for *E. coli* capturing : Influence of bacteriophage loading, temperature and tryptone." *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces.* 151 : 47-57

Liu, W. Li, C. Qiu, Z. Jin, M. Wang, J. Yanga, D. Xiao, Z. Yuan, Z. Li, J. Xu, Q. and Shen, Z. 2017. "Development of a novel and highly efficient method of isolating bacteriophages from water." *Journal of Microbiological Methods.* 139 : 143-149

Malik, D.J. Sokolov, I.J. Vinner, G.K. Mancuso, F. Cinquerrui, S. Vladisavljevic, G.T. Clokie, M.R.J. Garton, N.J. Stapley, A.G.F. and Kirpichnikova, A. 2017. "Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy." *Advances in Colloid and Interface Science.* 249 : 100-133

Mirzaei, M.K. and Nilsson, A.S. 2015. "Isolation of Phages for Phage Therapy : A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy." *PLOS ONE.* 10(3)

Morello, J.A. Granato, P.A. and Mizer, H.E. 2002. **Laboratory Manual and Workbook in Microbiology : Applications to Patient Care.** 7th ed. New York : McGraw-Hill.

Mostafa, M.M. Nassef, M. and Badr, A. 2016. "Computational determination of the effects of virulent *Escherichia coli* and salmonella bacteriophages on human gut" *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 135 : 27-35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mullan, W.M.A. 2001. **Isolation and purification of bacteriophages**. [Online]. Available : https://www.dairyscience.info/index.php/isolation-and-purification-of-bacteriophages.

Oliveira, A. Sousa, J.C. Silva, A.C. Melo, L.D.R. and Sillankorva, S. 2018. "Chestnut Honey and Bacteriophage Application to Control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilms: Evaluation in an ex vivo Wound Model." *Frontiers in microbiology*. 9 : 1725

Perera, M.N. Abuladze, T. Li, M. Woolston, J. and Sulakvelidze, A. 2015. "Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods." *Food Microbiology*. 52 : 42-48

Scheutz, F. and Strockbine, N.A. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2.** 2nd ed. New York : Springer.

Singleton, P. 1999. **Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine**. New York : John Wiley and Sons Ltd.

Singleton, P. and Sainsbury, D. 2001. **Dictionary of Microbiology and Molecular Biology.** 3rd ed. New York : John Wiley & Sons Ltd.

Sprouffske, K. Rodríguez, J.A. and Wagner, A. 2016. "How Archiving by Freezing Affects the Genome-Scale Diversity of *Escherichia coli* Populations." *Genome Biol. Evol.* 8(5) : 1290-1298

Tomat, D. Mercanti, D. Balagué, C. and Quiberoni, A. 2013. "Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation." *Letters in Applied Microbiology*. 57 : 3-10

Taha, O.A. Connerton, I.F. Connerton, P.L. and El-Shibiny, A. 2018. "Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Diabetic Foot Patients." *Frontiers in microbiology*. 9 : 2127

Viazis, S. Akhtar, M. Feirtag, J. Brabban, A.D. and Diez-Gonzalez, F. 2011. "Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." *Journal of Applied Microbiology*. 110 : 1323-1331

Wei, C. Liu, J. Maina, A.N. Mwaura, F.B. Yu, J. Yan, C. Zhang, R. and Wei, H. 2017. "Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt." *Virologica Sinica*. 32(6) : 476-484

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wood, J.M. Decker, H. Hartmann, H. Chavan, B. Rokos, H. Spencer, J.D. Hasse, S. Thornton, M.J. Shalbaf, M. Paus, R. and Schallreuter, K.U. 2009. "Senile hair graying: H_2O_2-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair." *The FASEB Journal.* 23 : 7

Yang, L. Li, C. Zhai, S. Zheng, H. Fu, L. and Li, D. 2016. "An improved plating assay for determination of phage titer." *African Journal of Biotechnology.* 15(23) : 1078-1082

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Peptone	5.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
HM peptone B#	1.50	กรัม
Yeast extract	1.50	กรัม
Agar Powder	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.4 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

Peptone	10.00	กรัม
Beef extract	10.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.3 ± 0.1

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (Levine)

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 37.50 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Peptic digest of animal tissue	10.00	กรัม
Dipotassium phosphate	2.00	กรัม
Lactose	5.00	กรัม
Sucrose	5.00	กรัม
Eosin – Y	0.40	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	13.50	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช 7.2 ± 0.2		

ชั่งอาหารปริมาณ 37.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Tryptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 1 (Tryptone Water 1 %)

Tryptone Type-1	2.00	กรัม
Sodium Chloride	0.50	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP Medium

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 17.00 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Buffered peptone	7.00	กรัม
Dextrose	5.00	กรัม
Dipotassium phosphate	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 6.9 ± 0.2

ชั่งอาหารปริมาณ 17.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 24.28 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Magnesium sulphate	0.20	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.00	กรัม
Dipotassium phosphate	1.00	กรัม
Sodium citrate	2.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
Bromothymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 6.8 ± 0.2

ชั่ง Simmons Citrate Agar 24.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB)

Tryptone	10.00 กรัม
Yeast Extract	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม
Agar Powder	15.00 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
พีเอช 7.2 ± 0.2	

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone	10.00 กรัม
Yeast Extract	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
พีเอช 7.2 ± 0.2	

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 M (1 M Tris-HCl) พีเอช 7.5

Tris-HCl	7.882 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.5 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. สารละลายบัฟเฟอร์ Storage Medium (SM Buffer)

NaCl	5.844 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.460 กรัม
1 M Tris-HCl (พีเอช 7.5)	50 มิลลิลิตร
Gelatine	0.100 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. สารละลายบัฟฟเฟอร์ Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	8.00 กรัม
KCl	0.20 กรัม
Na_2HPO_4	1.15 กรัม
KH_2PO_4	0.20 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

รหัสไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร	
	ระดับการเจือจาง 1 เท่า	ระดับการเจือจาง 10 เท่า
16	1.832	0.363
17	0.705	0.288
20	1.655	0.291
21	1.624	0.305
24	1.906	0.364
31	1.752	0.377
33	0.008	0.009
36	0.086	0.001
40	0.281	0.014
41	0.290	0.053
43	0.145	0.012
44	0.868	0.167
45	0.106	0.044
50	1.954	0.528
53	1.112	0.327
66	1.680	0.423
67	0.930	0.392
69	0.279	0.015
70	1.570	0.337
71	1.805	0.474
72	2.065	0.502
73	0.264	0.427
74	1.769	0.330
75	0.084	0.018
76	1.949	0.448
77	2.001	0.475
78	1.937	0.460
79	1.950	0.468
80	0.844	0.450

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

รหัสไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร	
	ระดับการเจือจาง 1 เท่า	ระดับการเจือจาง 10 เท่า
81	2.071	0.550
82	1.932	0.480
83	1.969	0.110
84	0.167	0.366

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้