

การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอฟาจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*
ที่แยกได้จากเศษอาหารในโรงอาหาร

Study on isolation of a bacteriophage of *Escherichia coli*
from food scraps in cafeterias



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on isolation of a bacteriophage of
Escherichia coli from food scraps in cafeterias



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*
ที่แยกได้จากเศษอาหารในโรงอาหาร

Study on isolation of a bacteriophage of *Escherichia coli* from
food scraps in cafeteria

ชื่อนักศึกษา นางสาวชนันฐดา จุลเหลา รหัสนักศึกษา 58050729
 นางสาวปาริยา เอิบโคกสูง รหัสนักศึกษา 58050782
 นายวรวิทย์ ดอเลาะ รหัสนักศึกษา 58050809

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> ที่แยกจากเศษอาหารในโรงอาหาร	
	Study on isolation of a bacteriophage of <i>Escherichia coli</i> from food scraps in cafeteria	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนัญดา จุลเหลา	รหัสนักศึกษา 58050729
	นางสาวปาริยา เอิบโคกสูง	รหัสนักศึกษา 58050782
	นายวรวุฒิ ดอเลาะ	รหัสนักศึกษา 58050809
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี	

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหาร แล้วจึงนำแบคทีเรียที่แยกได้ มาแยกแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue คัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลท นำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การวัดขนาด ศึกษาลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม และการวัดขนาดของเซลล์ ลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส การสังเคราะห์อินโดล methyl red – voges proskauer และ การใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 30 ไอโซเลท ต่อมาจึงทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ โดยไม่เพิ่มปริมาณ และ เพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจ ซึ่งใช้แบคทีเรียที่แยกมาได้จากโรงอาหารเก่า 1 ไอโซเลท ได้แก่ E.1 และจากโรงอาหาร L 2 ไอโซเลท ได้แก่ E.18 และ E.30 ตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธีการตรวจการเกิดพลาคว (Plaque assay) จากการทดลองการแยกแบคทีเรียโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณ พบว่า เกิดพลาควเดี่ยว (Single plaque) บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นของแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท คือ E.18 และเมื่อนำพลาควเดี่ยวที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ได้จำนวนแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์สุดท้ายจำนวน 2 ลำดับจากจำนวนพลาควใสทั้งหมด 60 ลำดับ คือ ลำดับที่ 17 และ 27 จากนั้นจึงนำแบคทีเรียโอเฟจทั้งสองลำดับมาทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สองลำดับมีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงอาหารเก่า 1 ไอโซเลท จากโรงอาหาร L 1 ไอโซเลท คือ E.3 และ E.18 ตามลำดับ

คำสำคัญ : การคัดแยก แบคทีเรียโอเฟจ แบคทีเรีย *Escherichia coli* การตรวจการเกิดพลาตเศษอาหาร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on isolation of a bacteriophage of <i>Escherichia coli</i> from food scraps in cafeterias		
Students	Miss Chanutda	Junlao	Student ID 58050729
	Miss Pareeya	Erbkoksoong	Student ID 58050782
	Mister Worrawut	Doloh	Student ID 58050809
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

This special project was to studied on the isolation of bacteria *E. coli* from food scraps. The fifty six colonies of the bacteria were isolated on Eosin methyl blue agar and were evaluated on morphology characterization such as shape, cell size, colony appearance; size, shape and color, gram staining as well as catalase enzyme production, indole production, methyl red - voges proskauer and citrate utilization the result showed thirty isolates of the bacteria were *E. coli*. After that the isolated bacteria were used as the bacterial host for the bacteriophage isolation. The bacteriophages were isolated from sewage collected from Rong Arhan Kaw 1 isolate was E.1 and 2 isolates were E.18 and E.30 were collected from Rong Arhan L. With and without enrichment of the bacteriophage isolation methods were done. The present of the bacteriophages were determined by plaque assay. The bacteriophage isolation from food scraps without enrichment 1 isolated was E.18 showed sixty single plaques on the top agar. The bacteriophages were purified into 2 bacteriophage particles were Bacteriophage number 17 and 27. This phages could be infected 2 bacterial isolates were E.3 and E.18 were collected from Rong Arhan Kaw and Rong Arhan L respectively.

Key word : isolation, bacteriophage, bacteria, *Escherichia coli*, plaque assay, food scraps

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชาโครงการพิเศษจัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในหัวข้อ เรื่อง การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากเศษอาหารในโรงอาหาร โครงการพิเศษนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้ความรู้คำปรึกษา คำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดการจัดทำโครงการพิเศษนี้ทำให้โครงการพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ ประธานกรรมการสอบ และ ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธการกรรมการสอบโครงการพิเศษนี้ ที่ได้สละเวลาในการเข้ารับฟังการนำเสนอรวมทั้งให้คำแนะนำคำปรึกษาจนโครงการพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อการเบิกอุปกรณ์สารเคมีต่าง ๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำการทดลองที่ใช้ในการศึกษาโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดา และขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยอยู่เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้กันตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนโครงการพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและต่อยอดต่อไปหากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ชนัญฐดา จุลเหลา

ปาริยา เอิบโคกสูง

วรวิทย์ ดอเลาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
--	---

2.1 เชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์.....	3
2.1.2 คุณสมบัติด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	6
2.3 การป้องกันและควบคุมเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	7
2.4 แบคทีเรียโอเฟจ.....	8
2.4.1 ประวัติการค้นพบแบคทีเรียโอเฟจ.....	8
2.4.2 คุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรียโอเฟจ.....	8
2.4.3 โครงสร้างของแบคทีเรียโอเฟจ.....	9
2.4.4 ชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ.....	10
2.4.5 การตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจ.....	14
2.4.6 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแบคทีเรียโอเฟจ.....	15
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียโอเฟล	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	19
3.1 อุปกรณ์	19
3.2 เครื่องมือ	20
3.3 สารเคมี	20
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	21
3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์	22
3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	22
3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียโอเฟลของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	23
3.6 วิธีการทดลอง	23
3.6.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> จากตัวอย่างเศษอาหารบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)	23
3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	23
3.6.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	24
3.6.4 การเก็บหัวเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	25
3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อ <i>Escherichia coli</i> เริ่มต้น	26
3.6.6 การแยกแบคทีเรียโอเฟลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็เชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	29
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> จากตัวอย่างเศษอาหาร	29
4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)	29
4.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	31
4.1.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	33
4.2 การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟลของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> แบบไม่เพิ่มปริมาณ.....	40
4.2.2 การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> แบบเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร.....	41
4.2.3 การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ picking.....	42
4.2.4 การศึกษาการทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อแบคทีเรีย เจ้าบ้าน <i>Escherichia coli</i> ด้วยวิธี Spot test.....	45
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	48
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	48
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	48
เอกสารอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	58



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1 ลักษณะทางชีวภาพที่สำคัญบางประการของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	5
3.1 รหัสตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	22
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> จากเศษตัวอย่างอาหาร.....	30
4.2 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	36
4.3 ผลการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> แบบเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจ.....	42
4.4 ผลการแยกแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ด้วยการเก็บบริเวณใสและความเข้มข้นของ แบคทีเรียโอเฟจ.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาพแบคทีเรียโอเฟจ.....	10
2.2 One step growth experiment.....	12
2.3 วงชีวิตแบบไลติกของแบคทีเรียโอเฟจ.....	13
2.4 วงชีวิตแบบไลโซเจนิคของแบคทีเรียโอเฟจ.....	14
4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ <i>Escherichia coli</i> เจริญบนจานอาหารแข็ง EMB.....	30
4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ <i>Escherichia coli</i> บนจานอาหารแข็ง LB.....	31
4.3 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ <i>Escherichia coli</i> ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า.....	32
4.4 ผลการทดสอบการสังเคราะห์อินโดลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ <i>Escherichia coli</i>	34
4.5 ผลการทดสอบที่เกิขึ้นบนอาหารวุ้นสองชั้น.....	41
4.6 ผลการทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> เจ้าบ้าน.....	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว (ประมาณ 20 นาที) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้ *E. coli* เหมาะที่จะนำมาศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (Tenailon et al., 2016) *E. coli* ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบในทางเดินอาหารส่วนล่างของสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงมนุษย์ และถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอุจจาระและระบบบำบัดน้ำเสีย (Berthe et al., 2013) *E. coli* บางสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ในมนุษย์ ทำให้มีผู้เสียชีวิตมากกว่า 2 ล้านคนในแต่ละปี (Kaper et al., 2004) จากการศึกษาทางระบาดวิทยาที่เกิดขึ้นในปี 1980 พบว่าระดับ *E. coli* ในแหล่งน้ำทางนันทนาการได้รับผลกระทบจากแหล่งสารปนเปื้อนที่รู้จัก (เช่น น้ำเน่า) แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์การเจ็บป่วยในทางเดินอาหาร (USEPA 1986; Edberg et al., 2000) จากการศึกษาล่าสุดพบว่าเมื่อแบคทีเรียนี้ถูกปล่อยออกมาสู่ธรรมชาติจะสามารถอยู่รอด และ เพิ่มจำนวนประชากรในบริเวณเขตร้อน กึ่งเขตร้อน และเขตอบอุ่น (Ishii et al., 2008) บางสายพันธุ์สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติ (เช่น กลายเป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ประจำท้องถิ่น) ในสภาพแวดล้อมเหล่านั้น (Ishii et al., 2006) เนื่องจาก *E. coli* สามารถอยู่รอดได้ในธรรมชาติ บางครั้งปนเปื้อนอยู่ในอาหารของมนุษย์ และ สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้แบคทีเรียโอเฟจที่มีวงจรชีวิตที่เป็นไลติคเฟจเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดจำนวนประชากร และทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อน.

แบคทีเรียโอเฟจ (Bacteriophages) หรือ เฟจ (phages) เป็นไวรัสซึ่งสามารถเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย ในระยะ lytic phages สามารถใช้ประโยชน์จากกลไก และ ทรัพยากรในโฮสต์ในการจำลองตัวเอง เพื่อทำลายเซลล์โฮสต์ในที่สุด (Calender, 2006) การใช้แบคทีเรียโอเฟจ รักษาโรคเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพซึ่งมีการพัฒนาเพื่อนำไปใช้รักษาทางคลินิกทั้งในยุโรปและอเมริกา (Pirisi, 2000) เฟจไวรัสที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูง การจำกัดของแบคทีเรียโอเฟจ นั้นถูกกำหนดโดยตัวรับจำเพาะอยู่บริเวณผิวผนังของแบคทีเรีย (Rakhuba et al., 2010) แบคทีเรียโอเฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้จะมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ และ สัตว์

ไวรัสนี้จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เพียงแค่ให้แบคทีเรียโอเฟจปริมาณเล็กน้อยก็มีผลเพียงพอต่อการรักษา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ (Sandeep, 2006; Weber-Dabrowska et al., 2003) มีรายงานการใช้เฟจในการรักษาและป้องกันโรคจากแบคทีเรียในสัตว์ทดลองตั้งแต่ปี 1980 ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella* spp., *Enterococcus faecium* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Matsuzaki et al., 2005) โดยแบคทีเรียโอเฟจ ไวรัสสามารถคัดเลือก และแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น น้ำเสีย ทางระบายน้ำเสีย อูจจาระ ดิน น้ำพุ เป็นต้น

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหารในโรงอาหาร และเพื่อศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากการเก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมันโรงอาหารอาคารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหารในโรงอาหาร
- 2) เพื่อศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากการเก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมันโรงอาหารอาคารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหารในโรงอาหาร โดยนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาแยกแบคทีเรียโอเฟจจากการเก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมันโรงอาหารอาคารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหารในโรงอาหาร
- 2) งานวิจัยนี้สามารถนำแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้มาช่วยทำลายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ
- 3) เพื่อได้แบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli โดยปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น และ มนุษย์ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และ ถูกใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขภาพของอาหาร และ น้ำ แม้ว่าเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่นั้นไม่เป็นอันตราย แต่ สายพันธุ์บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของโรคทำให้เกิดโรคเช่น ท้องร่วง, ถ่ายเป็นเลือด, ติดเชื้อทางเดิน ปัสสาวะ, เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (Sohyun et al., 2018) *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์เป็น facultative anaerobe เจริญได้ ทั้งที่มีออกซิเจน และ ไม่มีออกซิเจนสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 35-37 °C แต่ไม่เจริญที่ 45°C ผลิต Shiga-like toxins (SLT) หรือ Verotoxins (VT) โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB มีลักษณะสีน้ำตาลอมแดง และวาวต่อแสง (metallic sheen) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae (Jay J.M, 2000) และเป็น แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform *E. coli* มีเยื่อหุ้มสามชั้น ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์ไซโทพลาสซึม, peptidoglycan หรือ murein และเยื่อหุ้มชั้นนอก ชั้น peptidoglycan อยู่ ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ไซโทพลาสซึมและเยื่อหุ้มชั้นนอก (Weidel et al., 1960)

2.1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

1. Spread-Plate Technique (W.E. Inniss, 1978)

ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติเชื้อแบคทีเรียจะเติบโตอยู่ร่วมกันหลายๆสายพันธุ์ เพื่อการคัด แยก และจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยเทคนิคที่ทำได้ง่ายคือ spread plate technique ซึ่งเทคนิคนี้แบคทีเรียที่ถูกทำให้เจือจางให้มีจำนวน ประมาณ 100-200 เซลล์ หรือน้อยกว่าจะถูกนำไปวางตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อ (petri dish/plate) แล้วทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัว L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม และมีระยะเวลาเพียงพอ จะปรากฏโคโลนี (colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น โดยแต่ละโคโลนีจะมีจำนวน แบคทีเรียอยู่จำนวนมาก และแต่ละโคโลนีจะถือว่ามาจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ดังนั้นจะทำให้เกิดการ แยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขึ้น เมื่อมองด้วยตาเปล่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โคโลนีจะมีลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 1.1 นอกจากนั้นยังสามารถทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำโคโลนีที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Streak-Plate Technique

2. Pour Plate Technique (J.Vial et al., 1980)

เทคนิคการเพาะเชื้อแบบ pour-plate technique ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน โดยตัวอย่างเริ่มต้นจะถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นหลายๆ ระดับด้วยเทคนิค serial dilution เพื่อทำให้เชื้อถูกเจือจางมากพอที่จะทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยวๆ บนจานเพาะเชื้อ โดยนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเติมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วทำการเทอาหารวุ้นลง (Agar Medium) ไปในจานเพาะเชื้อ (โดยอุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อประมาณ 48-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตายได้) ผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้เกิดการกระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยการหมุนจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นเกิดการแข็งตัว เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ด้านในของอาหาร และจะเกิดโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อขึ้นมา

2.1.2 คุณสมบัติด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่หลากหลายดังนั้นจึงนิยมใช้คุณสมบัตินี้เป็นหลักในการจำแนกชนิดของเชื้อ *E. coli* โดยทั่วไปทั่วไปเชื้อ *E. coli* จะสามารถเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนอยู่น้อย (facultative anaerobe) ให้ผลการทดสอบ catalase เป็นบวก ให้ผลการทดสอบ oxidase เป็นลบ และให้ผลการทดสอบ IMViC test เป็น ++-- และ --++ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MacConkey agar (MAC) ซึ่งเป็น differential medium จะให้โคโลนีสีชมพูหรือแดงเนื่องจากการ ferment น้ำตาล lactose และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Eosin methylene blue (EMB) ซึ่งเป็น selective medium จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแวววาวที่เรียกว่า metallic sheen สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae เบื้องต้นนั้นนิยมใช้คุณสมบัติการ ferment น้ำตาลที่แตกต่างกันของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล lactose พร้อมทั้งอินดิเคเตอร์ เช่น phenol red, methyl red, bromthymol blue เป็นต้น เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของ pH การเกิด H₂S และการใช้น้ำตาล (Rowe et al., 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2.1 ลักษณะทางชีวภาพที่สำคัญบางประการของ *Escherichia coli* (Chris, 1998)

Characteristic	Reaction
Gram	Negative
Cell morphology	ไม่สร้างสปอร์, รูปท่อนตรง, เซลล์มีชีวิตมีขนาดกว้าง x ยาว = 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมครอน
Motility	เคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลา หรือไม่เคลื่อนที่
Aerobic growth	+
Anerobic growth	+
Optimum growth temperature	37°C
Catalase	+
Oxidase	-
D-mannitol fermentation	≥90% +
Lactose 37°C	≥90% +
Lactose 44°C	≥90% +
D-adonital	≥90% -
D-glucose	Acid produced
Indole 37°C	≥90% +
Indole 44°C	≥90% +
Methyl red reaction	≥90% +
Voges-Proskauer reaction	≥90% -
Growth in Simmons' citrate	≥90% -
Urease, Christensen's	≥90% -
Phenylalanine deamination	≥90% -
Lysine decarboxylase	76-89% strains positive
H ₂ S in TSI (triple sugar iron) medium	≥90% -
Growth in KCN medium	≥90% -
Gelatin liquefaction (at 22°C)	≥90% -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli ส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) แต่บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) หรือเรียกว่า Enterovirulent *Escherichia coli* group (EEC group) มี 4 ประเภท คือ (พิมพ์เพ็ญ และ เกียรติคุณ, 2016)

1) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็น *E. coli* ซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาการทั่วไป คือ ท้องร่วง ปวดท้อง ไข้ต่ำ คลื่นไส้ และ อ่อนเพลีย การติดเชื้อหรือแสดงอาการต่อเมื่อได้รับเชื้อเข้าไป ประมาณ 100 ล้าน ถึง 10 พันล้านเซลล์ โดยระหว่างการเจริญจะสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดการหลั่งของเหลว (fluid secretion) แหล่งที่พบคือน้ำที่ปนเปื้อนแล้วไปปนเปื้อนต่อในอาหาร หรือจากคนป่วยที่สัมผัสหรือปรุงอาหาร ถ้ารับเชื้อเข้าไปมากจะมีอาการภายใน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การระบาดมีไม่บ่อยนัก หากมีการปฏิบัติทางสุขลักษณะที่ดี ปัจจุบันการวิเคราะห์เชื้อตัวนี้ในอาหารทำได้โดยใช้ gene probe ซึ่งใช้เวลา 3 วัน หรือใช้วิธีทดสอบสารพิษโดยทั่วไป ซึ่งใช้เวลาอย่างน้อยที่สุด 7 วัน

2) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็น *E. coli* ชนิดที่ถือว่าเป็นเชื้อโรคที่ระบาดโดยมีความรุนแรงที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษทั่วไปของ EEC ชนิดอื่น EPEC แพร่ไปในคน และสัตว์หลายชนิด เช่น วัวควาย และหมู มักเป็นโรคที่เป็นกับเด็ก ทำให้อุจจาระร่วงเป็นน้ำหรือเป็นเลือด คล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Shigella* ซึ่งเรียกว่า ชิเกทอกซิน (shigatoxin) ด้วยเช่นกัน อาหารที่พบเชื้อนี้คือ เนื้อวัวและเนื้อไก่ดิบ และจากน้ำปนเปื้อนที่นำมาขงนมให้เด็ก และหากเด็กติดเชื้อนี้ อาจทำให้เกิดการขาดน้ำ และอัตราการเสียชีวิต อาจสูงถึงร้อยละ 50 ในประเทศโลกที่สาม

3) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ *E. coli* O157:H7 พิษที่สร้างโดย *E. coli* O157:H7 เป็นประเภท verotoxin ที่คล้ายกับ shigatoxin ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae* ทำให้เกิดความเสียหายให้แก่เยื่อของลำไส้ ความรุนแรงคือทำให้เกิดลำไส้ใหญ่อักเสบจนตกเลือด (hemorrhagic colitis) อาการคือ ปวดท้องรุนแรง อุจจาระร่วงเป็นตอนแรก แต่กลายเป็นมูกเลือดต่อมา อาจมีอาเจียนบ้าง และมีไข้ต่ำหรือไม่มี อาหารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เนื้อบดหรือแฮมเบอร์เกอร์ดิบหรือไม่ค่อยสุก นอกจากนี้ยังอาจพบในน้ำผลไม้ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไส้กรอกหมูปนเนื้อวัว (dry-cured salami) ผักกาดหอม เนื้อสัตว์ป่า (game meat) และ นำนมดิบ บางครั้งคนไข้มีอาการจากการมีสารในปัสสาวะปะปนในเลือด (hemolytic uremic syndrome: HUS) ที่มีลักษณะพิเศษคืออาจทำให้ไตวายถาวรได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ทำให้เกิดอาการคล้ายของโรคบิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae* หรือบิดมีตัว (bacillary dysentery) ทำให้ท้องร่วงโดยมีเลือดหรือมูกในอุจจาระของผู้ที่ติดเชื้อ ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดอาการ ประมาณ 10 เซลล์ (เท่ากับ *Shigella*) อาหารที่เกี่ยวข้อง ยังไม่ชัดเจน แต่มีรายงานว่าเกี่ยวกับเนื้อแฮมเบอร์เกอร์ และ น้ำนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เวลาฟักตัว ประมาณ 12 ถึง 72 ชั่วโมง

2.3 การป้องกันและควบคุมเชื้อแบคทีเรีย

การป้องกันและการควบคุมอันตรายจาก *E. coli* ในอาหารซึ่งปกติจะพบว่ามีกปนเปื้อนได้ในอาหารเกือบทุกชนิด ดังนั้นเราจึงต้องรู้จักเลือกรับประทานให้สะอาดปรุงสุกใหม่ และสามารถปฏิบัติได้ดังนี้เพื่อลดความเสี่ยงในการได้รับอันตรายจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (สมณฑา วัฒนสินธุ์, 2544)

1) รับประทานเนื้อสัตว์ และ เนื้อแฮมเบอร์เกอร์ที่ผ่านการให้ความร้อนจนแน่ใจว่าสุกแล้ว ซึ่งในการให้ความร้อนควรมีเทอร์โมมิเตอร์ใช้เพื่อวัดอุณหภูมิให้ถึงอย่างน้อยที่สุด 72 องศาเซลเซียส ผู้ประกอบอาหารที่ไม่ได้ใช้เทอร์โมมิเตอร์ ในการประกอบอาหารนั้น จะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงที่จะติดเชื้อชนิดนี้ (Machino, 1998)

2) ต้มน้ำผลไม้และเครื่องดื่มชนิดอื่นๆ ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วเท่านั้น รวมทั้งสังเกตวันหมดอายุของเครื่องดื่มทุกชนิด ล้างผักผลไม้ที่จะรับประทานให้สะอาดโดยเฉพาะผักผลไม้ที่มีการรับประทานสดและควรมีการเอาใจใส่เป็นพิเศษสำหรับเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ขวบในการที่จะรับประทานผักและผลไม้สด

3) เก็บเนื้อดิบแยกออกจากอาหารที่พร้อมจะรับประทาน ล้างมือ ล้างภาชนะที่ใส่และวัสดุที่ใช้สัมผัสกับเนื้อด้วยสบู่ร้อนๆ รวมทั้งไม่ใช้วัสดุอุปกรณ์พร้อมรับประทานร่วมกับวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้กับเนื้อดิบ

4) การสุขาภิบาลน้ำกินน้ำใช้ และสิ่งอำนวยความสะดวกภายในโรงงานเป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วยลดการปนเปื้อนของอุจจาระ นอกจากนั้นต้องควบคุม และกำจัดขยะเศษอาหาร แมลงวัน ตลอดจนสัตว์กัดแทะต่างๆ ไม่ให้เป็นสื่อแพร่เชื้อโรค ควบคุมการกำจัดบำบัดน้ำเสีย และจัดการสุขวิทยาส่วนบุคคล รวมทั้งระมัดระวังการปนเปื้อนข้ามในการเก็บรักษา และเคลื่อนย้ายอาหาร (สมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แบคทีเรียโอเฟจ

2.4.1 ประวัติการค้นพบแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถใช้แบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวน แบคทีเรียโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกโดย Twort ในปี 1915 พบว่ามีสารบางอย่างที่เปลี่ยนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus* ให้มีลักษณะใส ซึ่งเกิดจากการทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยสิ่งที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวคาดว่าจะไวรัส ต่อมา Felix (Herelle, 1917) รายงานว่าสิ่งที่สามารถทำให้เซลล์ของแบคทีเรีย *Shigella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (broth) แตกนั่นคือไวรัสของแบคทีเรีย และเรียกว่าแบคทีเรียโอเฟจ ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก และมีความจำเพาะสูงโดยพบว่าแบคทีเรียโอเฟจแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว หรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามชนิดเท่านั้น (Kuchment, 2012) และในปี 2554 มีการเปิดตัววารสารฉบับใหม่เกี่ยวกับแบคทีเรียโอเฟจโดย Alexander Sulakvelidze ได้นิยามแบคทีเรียโอเฟจว่าเป็น “สิ่งมีชีวิตที่แพร่หลายมากที่สุดในโลกโดยมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลจุลินทรีย์บนโลกใบนี้” (Xavier Wittebole, 2013)

2.4.2 คุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียโอเฟจสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมที่มีแบคทีเรียอยู่ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมจำนวนประชากร และการแพร่กระจายของแบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจสามารถพบได้ในแบคทีเรียกว่า 140 genera และยังพบในสิ่งมีชีวิตจำพวก Archaea และ Eubacteria และมีการศึกษามากมายกว่า 1,500 ชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบคทีเรียโอเฟจมีความจำเพาะกับโฮสต์ในระดับหนึ่ง โดยแบคทีเรียโอเฟจจะจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ teichoic acid, lipoteichoic acid, flagella, capsule, lipopolysaccharide และ porin เป็นต้น (Sandeep, 2006; Weber-Dabrowska, 2003) แบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายทั้งด้านลักษณะรูปร่าง และพันธุกรรม กล่าวคือจีโนมของมันอาจเป็น DNA หรือ RNA เป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่ เป็นวงกลมหรือเป็นเส้นตรงก็ได้ และทั่วไปจะปรากฏเพียงชุดเดียว (นิติ ชูเชิด, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 โครงสร้างของแบคทีเรียโอเฟจ

โครงสร้างของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ โปรตีนห่อหุ้มหรือแคปซิดเป็นโครงสร้างภายนอก และกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ภายในแคปซิด

2.4.3.1 แคปซิด

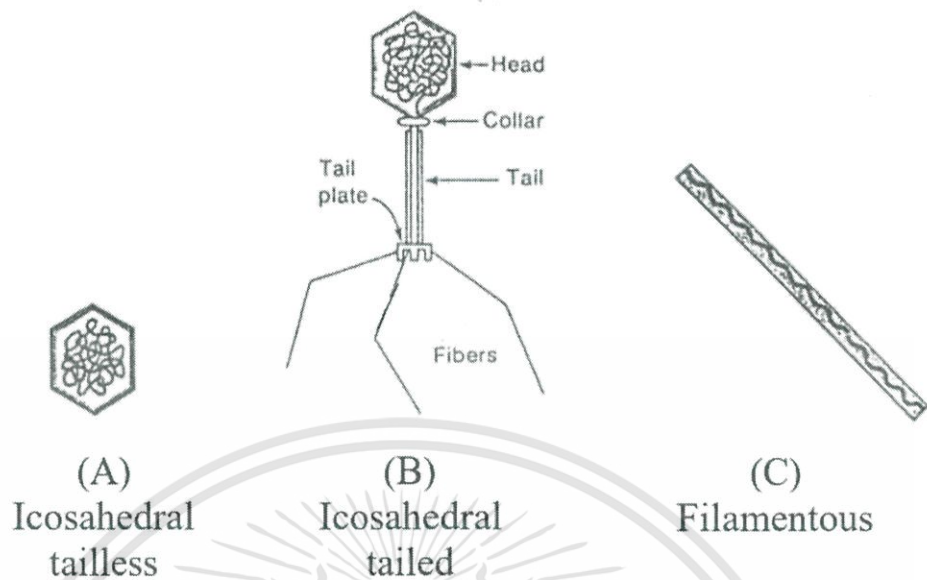
แคปซิดเป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจ ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกไว้ในช่วยป้องกันกรดนิวคลีอิกจากการถูกทำลายด้วยรังสี อุณหภูมิ สารเคมี แคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย เรียกว่า แคปโซเมอร์ (capsomer) เมื่อแคปโซเมอร์มาต่อกันทำให้เกิดโครงสร้างแบบต่างๆ ดังนี้ (Mckane, 1996; Maloy and Freifelder, 1994)

1) โครงสร้างรูปทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral structure) เช่น รูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral) โดยโครงสร้างบริเวณส่วนหัว มีมุมยอดทั้งหมด 12 มุม แต่ละมุมประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 5 หน่วย มารวมกันเรียกว่า เพนตอน (penton) นอกจากนี้มีหน้าสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้า เกิดจากแคปโซเมอร์ 6 หน่วย เรียก เฮกซอน (hexon) มาเรียงตัวรอบเพนตอน

2) โครงสร้างซับซ้อน (complex structure) จะมีส่วนหางที่เกิดจากการเรียงตัวของแคปโซเมอร์ต่อจากส่วนหัวลงมา ในลักษณะที่เรียงตัวแบบขดเป็นเกลียว และส่วนหางอาจประกอบด้วยซีทห่อหุ้มแกนกลาง (core) แผ่นฐาน (base plate) และใยหาง

3) โครงสร้างแบบสายยาว (filamentous structure) เกิดจากแคปโซเมอร์มา เรียงต่อกันในลักษณะแบบขดเป็นเกลียว มีกรดนิวคลีอิกเป็นแกนกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจ (A) โครงสร้างรูปทรงหลายเหลี่ยม (B) โครงสร้างซับซ้อน (C) โครงสร้างแบบสายยาว

ที่มา: Maloy; Cronan; & Freifelder. (1994). Microbial Genetics. p. 82.

2.4.3.2 กรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกที่พบเป็นองค์ประกอบของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจ อาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ แบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอนุภาคของเฟจส่วนมากมีกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายคู่ นอกจากนี้ อาจพบดีเอ็นเอสายเดี่ยว อาร์เอ็นเอสายคู่ และอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว โดยกรดนิวคลีอิกจะอัดตัวแน่นอยู่ภายในแคปซิด (Maloy and Freifelder, 1994)

2.4.4 ชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ

แบ่งตามวงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ (Phage life cycle) มี 2 ชนิด

2.4.3.1 วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle)

แบคทีเรียโอเฟจที่เพิ่มจำนวนโดยใช้วงจรชีวิตนี้ เรียกว่า ไวรัสเรนต์เฟจ หรือไลติกเฟจ โดยแบคทีเรียโอเฟจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่เรียกการติดเชื้อ ทำให้เซลล์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแตกสลาย และตาย เพื่อปล่อยเฟจรุ่นใหม่ออกมา ดังรูป 2.3 (Boyd, 1995; Maloy et al., 1994) วงชีวิตแบบไลติก ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1) การเกาะติด (adsorption) แบคทีเรียโอเฟจจะอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติด (attachment site) ของเฟจกับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) บนเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) แคปซูล (capsule) พิล (pili) แฟลเจลล (flagella) โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นต้น ตำแหน่งเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจและตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์ของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก ถ้าแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ จะทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเกิดการต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจเดิมที่เคยทำให้เกิดการติดเชื้อได้

2) การส่งกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (penetration) ขั้นตอนนี้แบคทีเรียโอเฟจจะปล่อยกรดนิวคลีอิกผ่านผนังเซลล์จนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย ส่วนของแคปซิด และองค์ประกอบอื่นยังคงอยู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

3) การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโครงสร้างของแบคทีเรียโอเฟจ (biosynthesis) เมื่อกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีนของแบคทีเรียโอเฟจ เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ หลังจากนั้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ของแบคทีเรียโอเฟจ และ mRNA ของแบคทีเรียโอเฟจ จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของแบคทีเรียโอเฟจ โดย mRNA ที่สร้างขึ้นในช่วงแรก (early mRNA) จะถูกแปลรหัส เป็นเอนไซม์และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ส่วน mRNA ที่สร้างขึ้น ช่วงหลัง (Late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของแบคทีเรียโอเฟจ เช่น แคปซิด หาง เป็นต้น หรือแปลรหัสเป็นโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา

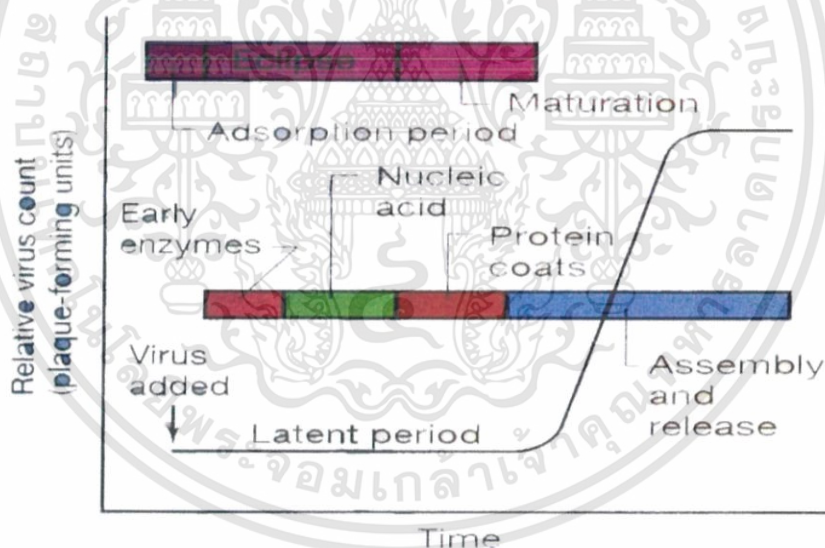
4) การประกอบตัวของแบคทีเรียโอเฟจ (assembly) ขั้นตอนนี้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจ เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคปซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคปซิดจะเชื่อมต่อกับซีทห่อหุ้ม และส่วนหาง แล้วประกอบกันเป็นอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจที่สมบูรณ์

5) การแตกสลายของแบคทีเรีย (lysis) ขั้นตอนนี้ออนุภาคแบคทีเรียโอเฟจรุ่นใหม่มจะถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการแตกสลาย และตาย เซลล์ของแบคทีเรียที่แตก

สลายนี้
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) และ โฮลิน (holin) ซึ่งหลังโดยแบคทีริโอเฟจ เพื่อย่อยผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียตามลำดับ

การศึกษาแบคทีริโอเฟจที่อยู่ในระยะนี้ทำได้โดยวิธีที่เรียกว่า One step growth experiment รูปที่ 2.2 ซึ่งวิธีนี้จะทำให้สามารถศึกษาการเจริญของแบคทีริโอเฟจอย่างต่อเนื่อง ทำให้ทราบถึงระยะพัก (latent period) (ระยะเวลาตั้งแต่แบคทีริโอเฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาที่แบคทีริโอเฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรก) ระยะเพิ่มจำนวน (rise period) (เวลาที่แบคทีริโอเฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็นต้นไป) ของแบคทีริโอเฟจ (Adams. 1959; Ellis; Delbruck. 1939) นอกจากนี้ยังสามารถหา burst size (จำนวนอนุภาคของแบคทีริโอเฟจหลังจากเพิ่มจำนวนต่อ โฮสต์ 1 เซลล์) ได้จากอัตราส่วนของจำนวนแบคทีริโอเฟจที่ถูกปล่อย ออกมาจากเซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของ latent period ต่อจำนวนแบคทีริโอเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรก (Adams, 1959)

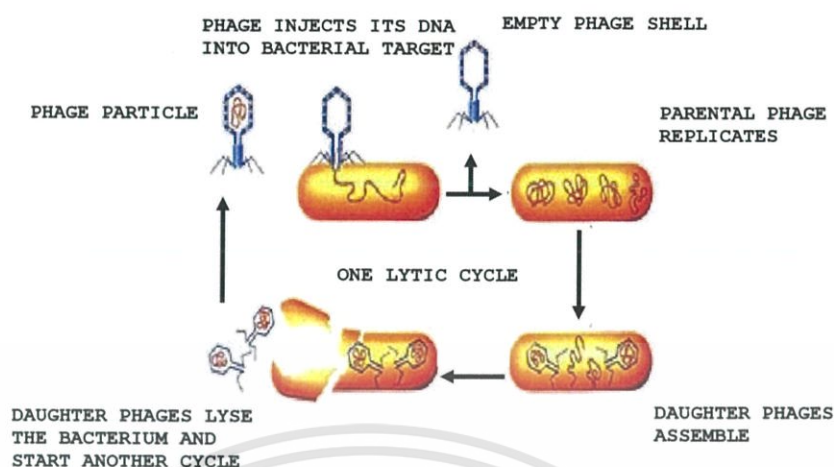


รูปที่ 2.2 One step growth experiment

ที่มา: Madigan; Martinko; & Parker. (2003). Brock Biology of Microorganism.

p. 241.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 วงชีวิตแบบไลติกของเฟจ

ที่มา: Leiman; et al. (2004). Cell. p. 29.

2.4.3.2 วงชีวิตแบบไลโซจินิก (lysogenic cycle)

แบคทีริโอเฟจที่มีวงชีวิตทั้งแบบไลโซจินิกและแบบไลติก เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) (Alcamo, 1996) ดังรูป 2.4 ตัวอย่าง เช่น แลมดา แบคทีริโอเฟจ (lambda phage) ที่มีความจำเพาะกับ *E. coli* วงชีวิตแบบไลโซจินิกประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1) การเกาะติด เกิดเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติก

2) การส่งกรดนิวคลีอิกของแบคทีริโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคทีริโอเฟจจะส่งกรดนิวคลีอิกของแบคทีริโอเฟจ ที่มีลักษณะเป็นสายตรงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย จากนั้น กรดนิวคลีอิกที่เป็นสายตรงจะเปลี่ยนเป็นรูปร่างวนเกลียวคู่ ซึ่งขั้นตอนที่ 1 และ 2 ของวงชีวิตแบบไลโซจินิกยังคงเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติก

3) การสอดแทรกดีเอ็นเอของแบคทีริโอเฟจในโครโมโซมของโฮสต์ (integration) โดยอาศัยเอนไซม์อินทีเกรส (integrase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของ กรดนิวคลีอิกของแบคทีริโอเฟจ เข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกแบคทีริโอเฟจระยะนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) และ เรียกแบคทีเรียที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ว่า ไลโซเจน (lysogen) ขั้นตอนนี้จะเริ่มจากการที่แบคทีริโอเฟจจำลองดีเอ็นเอ ถอดรหัส และแปลรหัส จนได้โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอในขั้นตอนการถอดรหัสดีเอ็นเอ (Transcription) แบคทีริโอเฟจจึงไม่สามารถ

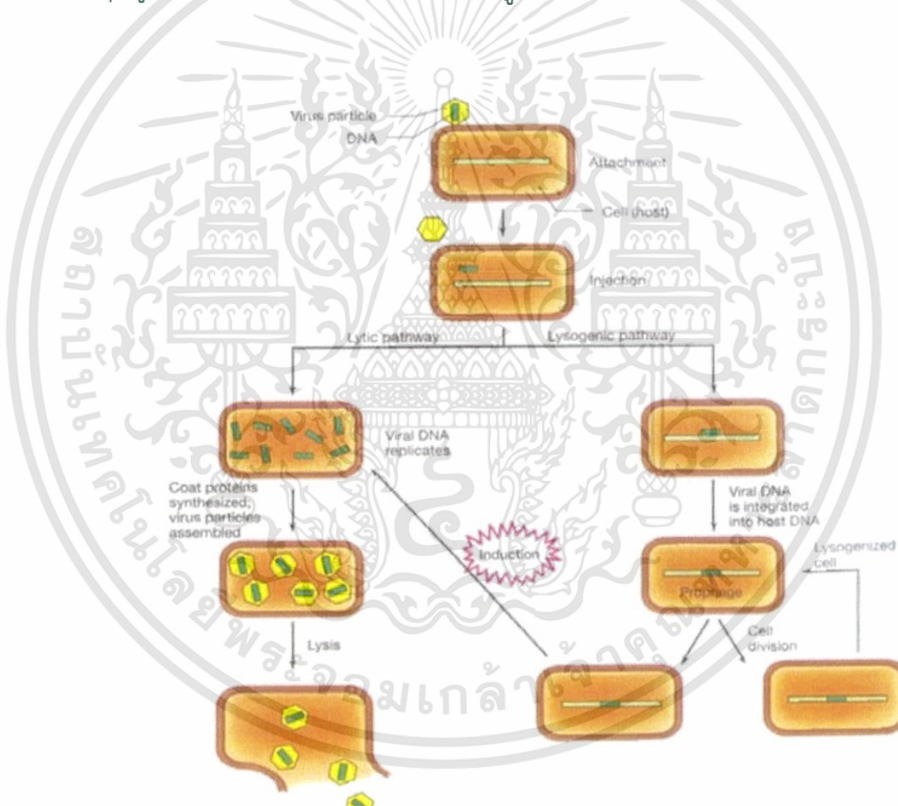
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ได้ เมื่อแบคทีริโอเฟจเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้วแบคทีริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมแบคทีเรีย

4) การชักนำสู่ชีวิตแบบไลติก (induction) การชักนำเข้าสู่ชีวิตแบบไลติกอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ดังนี้

- ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหาย โปรเฟจจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียเข้าสู่ชีวิตแบบไลติก

- ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอัลตราไวโอเลต (Voyles, 2002) หรือสารเคมี เช่น มิโตมายซิน ซี (mitomycin C) (Lim, 1998) เมื่อแบคทีเรียตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกเหล่านี้ทำให้โปรตีน ควบคุมถูกทำลาย แบคทีริโอเฟจจะเข้าสู่ชีวิตแบบไลติก



รูปที่ 2.4 วงชีวิตแบบไลโซจีนิคของแบคทีริโอเฟจ

ที่มา: Madigan; Martinko; & Parker (2003). Brock Biology of Microorganism. p. 250.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 การตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจ

การตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจซึ่งมีเทคนิคเรียกว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารชั้นสองชั้น (double agar layer method) โดยนำแบคทีเรียโอเฟจ และแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ ที่มีความจำเพาะกัน มาผสมกันในอาหารชั้นเหลว แล้วเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นชั้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 16–24 ชั่วโมง จะพบว่าโฮสต์ หรือแบคทีเรียที่ไม่ติดเชื้อสามารถเจริญปกคลุม ผิวหน้าอาหารชั้นบนสุด เรียกว่า ลอน (lawn) แต่ถ้าพบว่ามีบริเวณที่มีลักษณะใสขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย เรียกว่า ลักษณะนี้ว่า พลาคว (plaque) (Cappuccino and Sherman, 2001) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจ และแตกสลาย เกิดการปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา อนุภาคแบคทีเรียโอเฟจที่ปลดปล่อยออกมาสามารถเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณข้างเคียง จนเกิด เป็นวงใสสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในบริเวณนี้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย ลักษณะของ พลาคว มี 2 แบบ คือ

1) พลาควใส (clear plaque) พลาควที่ปรากฏจะมีลักษณะใส เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟจเพิ่มจำนวนได้ด้วยวงชีวิตแบบโลติค แบคทีเรียโอเฟจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลาย และตาย จึงเห็นเป็นวงใส แบคทีเรียโอเฟจที่ทำให้เกิดพลาควในลักษณะนี้ คือ ไวรัสบีแบคทีเรียโอเฟจ หรือโลติคเฟจ

2) พลาควขุ่น (turbid plaque) พลาควที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น แบคทีเรียโอเฟจที่ทำให้เกิดพลาควมีลักษณะขุ่น คือ เทมเพอเรตเฟจ โดยเริ่มแรกแบคทีเรียโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบโลติค จากนั้นเกิดการสร้างโปรตีนควบคุม ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่างๆได้ แบคทีเรียโอเฟจจึงแทรกตัวกับโครโมโซมของแบคทีเรีย มีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับโครโมโซมของแบคทีเรีย ทำให้ไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์ จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาคว ทำให้เห็นพลาควมี ลักษณะขุ่น

2.4.6 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแบคทีเรียโอเฟจ

1) ความต้องการอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte requirements) แบคทีเรียโอเฟจต้องการไควาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออน หรือแมกนีเซียมไอออน ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการติดเชื้อ (Watanabe et al., 2007) ซึ่งความต้องการไควาเลนท์ไอออนสำหรับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจนั้นถูกศึกษามาเป็นระยะเวลานาน พบว่า ไควาเลนท์ไอออนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแบคทีเรียโอเฟจ เพราะไควาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออนจะมีส่วนช่วยให้แบคทีเรียโอเฟจสามารถเข้าเกาะติดกับผนังเซลล์ของโฮสต์ซึ่งมีประจุเป็นลบได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ แคลเซียมไอออนยังมีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจส่วนใหญ่ด้วย โดยระดับของแคลเซียมไอออนที่แบคทีเรียโอเฟจต้องการเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนให้ได้มากที่สุดมีความแตกต่างกันเป็นเอกสารที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ และชนิดของโฮสต์ แต่โดยทั่วไปจะมีการเติมแคลเซียมไอออนลงไปในการศึกษาเกี่ยวกับเฟจประมาณ 5-10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมักจะมีการเติมแคลเซียมไอออนลงไปในรูปแบบของแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยเพิ่มขนาดของพลาไคให้ใหญ่ขึ้นได้ (Mullan, 2002)

2) อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ โดยทั่วไปแบคทีเรียโอเฟจส่วนใหญ่จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอเฟจบางตัวสามารถทนที่อุณหภูมิ ดังกล่าวได้ 5 นาทีในหางนม (skim milk; pH 6.0) บางชนิดทนต่อการทำแห้งที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียโอเฟจบางตัวยังสามารถอยู่ได้ แม้ว่าจะผ่านการทำพาสเจอร์ไรซ์แบบใช้อุณหภูมิสูงแต่ใช้เวลานาน (High Temperature-Short Time; HTST pasteurization; อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนสูงเพื่อทำลายแบคทีเรียโอเฟจ โดยส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียโอเฟจจะถูกทำลายหมดไปในกระบวนการผลิตนม (Mullan, 2002) แต่ในอุตสาหกรรมนมหลายชนิดพบว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักไม่สามารถที่จะผ่านความร้อนสูงเป็นระยะเวลานานได้ เพราะจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นั้นได้ ดังนั้นในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแบคทีเรียโอเฟจในปัจจุบันจะเน้นศึกษาถึงอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ทำให้แบคทีเรียโอเฟจเหลือน้อยที่สุด พอที่จะทำให้การหมักได้ผลดี และไม่ส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการศึกษามูลของอุณหภูมิที่มีต่อแบคทีเรียโอเฟจนั้นจะช่วยทำให้ทราบถึงวิธีที่จะควบคุมแบคทีเรียโอเฟจต่อไปในอนาคต

3) ความเป็นกรดต่าง (pH) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียโอเฟจจะถูกทำลายในภาวะที่มีความเป็นกรดต่าง โดยเมื่อมีการเติมกรดแลคติกร้อยละ 2.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไปในนมเป็นเวลา 5 นาที แบคทีเรียโอเฟจจะถูกทำลายหมด อย่างไรก็ตามการเติมกรดแลคติกลงไปในนมน้อยกว่าร้อยละ 1 จะมีผลต่อแบคทีเรียโอเฟจน้อยมาก แม้ว่าจะบ่มไว้นานถึง 24 ชั่วโมงก็ตาม ซึ่งจากการทดลองต่อมาพบ ว่าแบคทีเรียโอเฟจจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว เมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.5 และมากกว่าหรือเท่ากับ 11.8 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 2.5-11.8 จะเห็นผลได้ช้า ส่วนที่ความเป็นกรดต่าง 4.0-7.0 จะต้องใช้เวลามากกว่า 5 วัน แบคทีเรียโอเฟจถึงจะถูกทำลายได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันพบว่า แบคทีเรียโอเฟจจะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วที่ความเป็น กรดต่างต่ำกว่า 5 โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mullan, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

Francesca Dell'Orco et al. (2019) ได้ศึกษาปัจจัยความรุนแรง และการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากถัสนมขนาดใหญ่ และตัวกรองนํ้านมดิบ ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จาก 149 ตัวอย่าง ทั้งหมด 53 ไอโซเลท พบว่ามี 23 ไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CoEC และ 30 ไอโซเลทเป็น enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ enteroaggregative *E. coli* (EAEC) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียท้องร่วง และเกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่ โดยทั้ง EIEC และ EAEC พบได้ในนํ้านมดิบ จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CoEC สามารถต้านทานยาต้านจุลินทรีย์แอมพิซิลิน และไอซิปิลได้

Catherine Ngaywa et al. (2018) ได้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อยาด้านจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในนํ้านมดิบของปศุสัตว์ในพื้นที่ทางตอนเหนือของเคนยา ทำการเก็บตัวอย่างนํ้านมดิบ 304 ตัวอย่าง จาก 30 ครัวเรือน โดยทำการแยกเชื้อในอาหาร Eosin Methylene Blue Agar (EMB) และทดสอบทางชีวเคมีเพื่อหาสายพันธุ์โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ sequencing ยาต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ beta-lactams, tetracycline และ streptomycin พบว่าร้อยละ 81 ของไอโซเลทที่แยกได้ดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ beta-lactams ร้อยละ 37, tetracycline ร้อยละ 55 และ streptomycin ร้อยละ 29 จากการศึกษาพบว่านํ้านมดิบที่บริโภคในเมือง Isiolo County ปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อยาด้านจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีการเพิ่มมาตรการในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ในห่วงโซ่การผลิตนํ้านมดิบ และเพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

Doaa El-Hadedy et al. (2012) ได้ศึกษาการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ที่แยกจากอาหารของชาวอียิปต์โดยวิธีดั้งเดิม และวิธีระดับโมเลกุล ได้ทำการสุ่มเลือกตัวอย่างจากนม ผักสลัด และอาหารกลางวันที่มีเนื้อสัตว์ โดยการศึกษาด้วยวิธีแบบดั้งเดิมได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาเป็นเวลา 6 วัน และการศึกษาด้วยวิธีระดับโมเลกุลศึกษาโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้เวลา 48 ชั่วโมง และนำไปเก็บในฐานข้อมูล Genbank ดังนั้นจากการศึกษาพบว่าการศึกษาด้วยวิธีระดับโมเลกุลใช้ระยะเวลาน้อยกว่าการศึกษาด้วยวิธีแบบดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียโอเฟจ

Carla Pereira et al. (2017) ได้ศึกษาแบคทีเรียโอเฟจชนิด phT4A และ ECA2 เพื่อลดความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในระหว่างการลดขนาดของหอยแครง พบว่าการใช้สารแขวนลอยที่มีโอเฟจชนิดเดียวของ phT4A และ ECA2 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลดลงประมาณ $2.0 \log \text{CFU} / \text{g}$ หลังจาก 4 ชั่วโมง และการใช้สารแขวนลอยที่มีโอเฟจหลายชนิดสามารถลดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลดลงประมาณ $0.7 \log \text{CFU} / \text{g}$ แต่จะใช้เวลานานกว่าการใช้สารแขวนลอยที่มีโอเฟจชนิดเดียว

Mohammad Mehdi Soltan Dallal et al. (2016) ได้ศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกจากน้ำเสีย และทำการเปรียบเทียบผลกระทบของสารต้านเชื้อแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะ Ceftriaxone โดยทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย จากนั้นนำไปทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Ceftriaxone พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำและโรงบำบัดน้ำเสียได้

J.A. Hudson et al. (2013) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอเฟจเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157: H7 บนเนื้อวัว มีรายงานการระบาดของเชื้อ *E. coli* O157: H7 ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อวัวเป็นจำนวนมาก ตัวเลือกสำหรับการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในอาหารดิบก็คือการใช้แบคทีเรียโอเฟจ โดยใช้แบคทีเรียโอเฟจชนิด FAHEc1 พบว่า ชิ้นเนื้อที่หั่นบาง ๆ บ่มที่ 37°C มีการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* $2.7 - 3.2 \log \text{CFU} / \text{g}$ และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจที่เหมาะสมคือ $3.2 \times 10^7 \text{PFU} / 4 \text{cm}^2$ ของชิ้นเนื้อ

H.Liu et al. (2015) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจ ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157 ในตัวอย่างเนื้อที่เก็บไว้ที่ 4, 22 และ 37°C โดยตัวอย่าง ($3 \times 3 \times 1 \text{ cm}$) ปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157 ($104 \text{CFU} / \text{cm}^2$) พบว่าแบคทีเรียโอเฟจสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157 ได้ประสิทธิภาพมากที่สุดที่อุณหภูมิ 4 และ 22°C

Abigail B. Snyder et al. (2016) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้ในสิ่งแวดล้อม เพื่อต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนผักผลไม้สด โดยในการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่แยกจากสิ่งแวดล้อม ได้ทำการแยกจากน้ำเสียในเทศบาลเพราะมีแนวโน้มจะพบแบคทีเรียโอเฟจมากที่สุด การใช้ปริมาณโอเฟจที่เหมาะสมช่วยลดจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคพบว่าสามารถลดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ $2.4-3.0 \log \text{CFU} / \text{g}$ บนพริกไทย และ $3.4-3.5 \log \text{CFU} / \text{g}$ บนใบผักขม การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียโอเฟจในการควบคุมเชื้อโรคในผลิตภัณฑ์สด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish, HYCON, USA)
2. หลอดทดลอง (Test Tube, PYREX[®], Maxico)
3. ปิเปตต์แก้ว (Pipette, PRECICOLOR HBG, Germany) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette, GILSON, France) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
5. ทิป (Tip, ExtraGene Inc., Taiwan) ขนาด 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
6. ปีกเกอร์ (Beaker, PYREX[®], Germany)
7. ขวดแก้ว (Duran Bottle, SCHOTT DURAN, GERMANY)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask, PYREX[®], USA)
9. กระบอกตวง (Cylinder, NELGENE[®], USA)
10. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
11. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
12. ช้อนตักสาร (Spatula)
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
14. สไลด์ (Slide, SAIL, China)
15. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass, HAD, Union Science)
16. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube, Becton Dickinson, USA)
17. ตัวกรองขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร (Syringe filter, MINISART[®], Germany)
18. ตัวกรองขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร (Syringe filter, Membrane Solution)
19. หลอดฉีดยา (Syringe, NIPRO, Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20. ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่าง (Bottle)

3.2 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator, mermert, The Novacel[®] Solution for LASER Fiber & LASER CO₂)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker, Lab. Companion, USA)
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow, HOLTEN, HOLTEN LAMINER AIR A/S)
4. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, TOMY, JAPAN)
5. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, BP 221S, sartorius, Germany)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Z383K, HERMLE, Germany)
7. พีเอชมิเตอร์ (pH meter)
8. ตู้เย็น (Refrigerator, NR-BT264, Panasonic, Japan)
9. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, BINDER, SCIENTIFIC PROMOTION)
10. เครื่องผสม (Vortex Mixer, G560E, Scientific Industries, USA)
11. กล้องจุลทรรศน์ (Optical Microscopes, OLYMPUS, OLYMPUS POTICAL)
12. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper, SONIC, Thailand)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, MERCK, Germany)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder Type I, TM Media, India)
3. ทริปโตเน (Tryptone Powder, Sisco, India)
4. สารละลาย Saline-Magnesium (SM solution)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (KH₂PO₄, AjaxFinechem Pty Ltd., Australia)
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (Na₂HPO₄, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
9. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (40% KOH)
10. สารละลายอัลฟานาฟтол (Alpha Naphthol Solution)
11. โคแควรีเอเจนท์ (Kovac's Reagent)
12. สารละลายเมทิลเรด (Methyl Red Solution)
13. น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram Iodine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
14. สีซาฟรานิน (Safranin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
15. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 , ศิริปัญญา, ประเทศไทย)
16. วาสลีน (Vaseline, Vaseline® Jelly, Univercity)
17. สีนีโกรซิน (Nigrosin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
18. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethyl alcohol, (องค์การสุรากรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
19. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Ethyl Alcohol)
20. กลีเซอรอล 80 เปอร์เซ็นต์ (80% Glycerol)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar, Himedia, India) (ภาคผนวก ก)
2. อาหาร Methyle Red-Voges Proskauer (MR-VP Broth, Himedia, India) (ภาคผนวก ก)
3. อาหาร Simmon Citrate Agar (Simmom Citrate Agar, Himedia, India) (ภาคผนวก ก)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (ภาคผนวก ก)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani Agar (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

เก็บตัวอย่างเศษอาหารโรงอาหารละ 2 ตัวอย่าง จากโรงอาหารเก่า โรงอาหารใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ และโรงอาหาร L โรงอาหาร A คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์แรกเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาเช้า และสัปดาห์ที่ 2 เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาบ่าย จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 80 ตัวอย่าง โดยกำหนดรหัสตัวอย่างดังตารางที่ 3.1

เก็บตัวอย่างโดยใช้หลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตูดตัวอย่างที่เป็นของเหลวจากถังเศษอาหาร แล้วนำมาใส่ในขวดแก้วเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตาราง 3.1 รหัสตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

	สัปดาห์ที่ 1					สัปดาห์ที่ 2				
วัน / โรงอาหาร	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
โรงอาหาร เก่า	11O-1	12O-1	13O-1	14O-1	15O-1	21O-1	22O-1	23O-1	24O-1	25O-1
	11O-2	12O-2	13O-2	14O-2	15O-2	21O-2	22O-2	23O-2	24O-2	25O-2
โรงอาหาร ใหม่	11N-1	12N-1	13N-1	14N-1	15N-1	21N-1	22N-1	23N-1	24N-1	25N-1
	11N-2	12N-2	13N-2	14N-2	15N-2	21N-2	22N-2	23N-2	24N-2	25N-2
โรงอาหาร A	11A-1	12A-1	13A-1	14A-1	15A-1	21A-1	22A-1	23A-1	24A-1	25A-1
	11A-2	12A-2	13A-2	14A-2	15A-2	21A-2	22A-2	23A-2	24A-2	25A-2
โรงอาหาร L	11L-1	12L-1	13L-1	14L-1	15L-1	21L-1	22L-1	23L-1	24L-1	25L-1
	11L-2	12L-2	13L-2	14L-2	15L-2	21L-2	22L-2	23L-2	24L-2	25L-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียโอฟาจของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

เก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารอาคารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 2 จุด รวมตัวอย่างทั้งหมด 2 ตัวอย่าง โดยใช้หลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างน้ำสกปรกจำนวน 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บขวดตัวอย่างข้างต้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำการทดลอง

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเศษอาหาร บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)

นำหลอดเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง มาแตะน้ำเศษอาหารในขวดเก็บตัวอย่างจากข้อ 3.5.1 จากนั้นขีดลงบนอาหารแข็ง EMB (cross streak) (Kumari et al., 2013) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* โดยเลือกโคโลนีที่มีสีดําเหลือบเขียว (Green metallic sheen) (Leininger, 2001) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.2.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนี

เลือกโคโลนีจากอาหารแข็ง EMB ที่มีสีดําเหลือบเขียว (Green metallic sheen) จากข้อ 3.6.1 ใช้หลอดเชื้อที่เผาไฟแล้วนำมาลากลงบนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA (Agar slant) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ซึ่งมีลักษณะเปียกชื้น มันวาว สีขาว หรือสีขาวอมเหลือง กระจายเต็มผิวหน้าอาหาร (Castellani, 1957) จากนั้นใช้หลอดเชื้อเผาไฟจนร้อนแดงเชื้อแล้วนำมาลากลงบนจานอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ หรือเป็นคลื่น สีขาว หรือสีขาวอมเหลือง (Castellani, 1957) วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Prakash, 2014)

3.6.2.2 การทดสอบการติดสีแกรม

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ

3.6.2.1 มาย้อมสีแบบ gram stain โดยหยดน้ำปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดใช้หลอดเชื้อที่เอกลำเป็นเอกสารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เผาไฟจนร้อนแดง เชื้อเชื้อแบคทีเรียจากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA มาเกลี่ย (smear) ลงบนหยดน้ำ รอนจนแห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2 – 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลทลงบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนลงบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างเอทิลแอลกอฮอล์ด้วยน้ำอีกครั้งจึงหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีซาฟรานินด้วยน้ำ รอนจนแห้งแล้วนำไปส่องดูการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (กนกรัตน์ และคณะ, 2558)

3.6.2.3 การวัดขนาดเซลล์

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ 3.6.2.1 มาย้อมสีแบบ negative strain โดยใช้สินิโกรซิน (nigrosin) หยดลงบริเวณปลายด้านหนึ่งของสไลด์ แล้วนำหลอดเชื้อหยดน้ำลงข้างหยดสี จากนั้นนำหลอดเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เชื้อเชื้อแบคทีเรียจาก หลอดอาหารลาดเอียง NA ลงในหยดน้ำ ใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นมาวางแตะหยดทั้งสองจากนั้น ลากสไลด์ช้า ๆ ตามแนวยาวให้ส่วนผสมแผ่ออก รอนจนแห้ง แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (กัญญา และคณะ, 2544)

3.6.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.3.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ 3.6.2.1 มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้หลอดเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เชื้อเชื้อแบคทีเรียจากหลอด อาหารแข็งลาดเอียง NA มาแตะลงบนหยดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง เอนไซม์คะตะเลสได้ (ผลบวก) จะเกิดฟองแก๊สขึ้นในบริเวณที่แตะลงไป

3.6.3.2 การทดสอบการสังเคราะห์อินโดล (Indole ring)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ 3.6.2.1 มาทดสอบการสังเคราะห์อินโดล โดยใช้หลอดเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เชื้อเชื้อแบคทีเรียจากหลอด อาหารแข็งลาดเอียง NA ใส่ลงในหลอดสารละลายทริปโตน (Tryptone water) 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยดโคแควรีเอเจนท์ (Kovac's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reagent) 5 – 6 หยด เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (ผลบวก) จะเกิดเป็นวงแหวนสีชมพูแดง หรือม่วง

3.6.3.3 การทดสอบ Methyl red และ Voges – Proskauere

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ 3.6.2.1 มาทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskauere โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว MR-VP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 หลอด หลอดละเท่าๆกัน

หลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยหยดสารเมทิลเรด (Methyl red) 2 – 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน เชื้อแบคทีเรียที่มาสารถย่อยคาร์โบไฮเดรตและมีแก๊สเกิดขึ้น (ผลบวก) จะเกิดสีแดง

หลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges - Proskauere โดยหยดสารละลายอัลฟาแนปทอล (Alpha naphthol) 5 – 6 หยด และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ 2 – 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ acetoin (ผลบวก) จะเกิดสีชมพู หรือแดง

3.6.3.4 การทดสอบการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ 3.6.2.1 มาทดสอบการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ใส่ลงในหลอดอาหารแข็ง Simmon's citrate agar นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน (ผลบวก) อาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

3.6.4 การเก็บหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าเป็น *E. coli* บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ในข้อ 3.6.2.1 มาเก็บแบบแช่เยือกแข็งในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ โดยนำลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากหลอดอาหารแข็ง NA ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพูปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรสารละลายรวม 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (นิรนาม , 2544)

3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อ *Escherichia coli* เริ่มต้น

เชื้อโคไลนีเดียวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 1 โคไลนี จากจานอาหารแข็ง LB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.6.6 การแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.6.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียโอเฟจ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ E.1, E.18 และ E.30

3.6.6.2 การแยกแบคทีเรียโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ

นำของเหลวจากตัวอย่างข้อ 3.5.2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ ไปกรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Beaudoin et al., 2007) ตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

3.6.6.3 การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจแบบไม่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เจ้าบ้าน 3 ไอโซเลท จากข้อ 3.6.6.1 มาเตรียมดังข้อ 3.6.5 จากนั้นตูดมา 300 ไมโครลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากข้อ 3.6.6.2 ใส่ลงไป 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำส่วนใสไปกรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

3.6.6.4 วิธีการตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) โดยนำส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจอบาน *E. coli* ที่เตรียมดังข้อ 3.6.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้น รอยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิตร (อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบน ผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาคว (plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.6.5 วิธีการทำแบคทีเรียโอเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยการ Picking

ใช้ทูปสี่เหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยบริเวณพลาควใสจากจานอาหารวุ้นสองชั้น ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจ ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงฆ่าเชื้อแล้ว ทำการ picking โดยทำวิธีการเดียวกันนี้ จำนวนทั้งหมด 3 รอบ เพื่อให้ได้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์

3.6.6.6 การชะตัวอย่างแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี phage lysate จากจานอาหารวุ้นสองชั้น

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวนจานอาหารวุ้นสองชั้นทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากจานอาหารวุ้นสองชั้น ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อนำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อ ที่มีเอกสารเป็นเอกสารที่ส่งมาไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานาน เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอฟาลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6.6.7 วิธีการทำ Spot test

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เข้าบ้านเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่ม 18 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (Top agar) ที่ประกอบด้วย วุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB แข็งตัว นำส่วนใสที่มีแบคทีเรียโอฟาลปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดหรือจุด (spot) ลงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (Control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาความจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาลที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกกับแบคทีเรียจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน เพื่อศึกษาขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอฟาล โดยหากมีการยับยั้ง บริเวณที่หยดจะเกิดเป็นบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเศษอาหาร

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ทำการเก็บตัวอย่างจากเศษอาหาร จากงานวิจัยของ Berth et al. (2013) พบว่า *E. coli* ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบในทางเดินอาหารส่วนล่างของสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงมนุษย์ และถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอุจจาระ และระบบบำบัดน้ำเสีย และจากวิจัยของ Biswas et al. (2002) พบว่าแบคทีเรีย *E. coli* มักปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นในการศึกษครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *E. coli* จากเศษอาหารในโรงอาหาร 4 แห่ง ได้แก่ โรงอาหารเก่า โรงอาหารใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ โรงอาหาร L และโรงอาหาร A คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อนำมาแยกแบคทีเรีย โดยจำนวนตัวอย่างที่นำมาแยกแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง

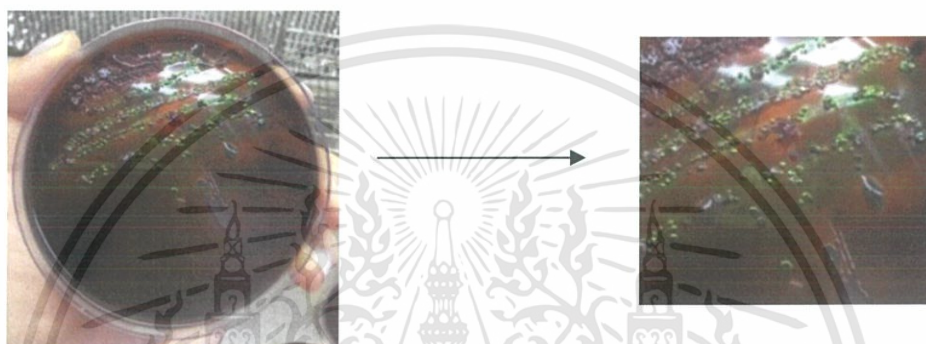
นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar (EMB agar) และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะ เป็น *E. coli* จากนั้นนำมาทดสอบทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การวัดขนาดโคโลนี, การย้อมแกรม และการวัดขนาดเซลล์แบคทีเรีย การทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ Methyl red และ Voges – Proskauer, การสังเคราะห์อินโดล (Indole), การใช้ซิเตรท (Citrate) และการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) (Priyanka, 2008)

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

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหารจำนวน 80 ตัวอย่าง นำมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยโคโลนีของเชื้อที่คาดว่าจะ เป็น *E. coli* คือ ลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ หรือเป็นคลื่น (Castellani, 1957) สีดำ เหลือบเขียว (Green metallic sheen) ดังรูปที่ 4.1 พบว่าจากเศษอาหาร 18 ตัวอย่าง คัดเลือกโคโลนีลักษณะดังกล่าวได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลท (1 โคโลนี คือ 1 ไอโซเลท) ซึ่งได้จากโรงอาหารเก่า 6 ตัวอย่าง จำนวน 18 ไอโซเลท , โรงอาหาร A 12 ไอโซเลท จากเศษอาหาร 5 ตัวอย่าง และจากโรงอาหาร L 26 ไอโซเลท จากเศษอาหาร 7 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* มีลักษณะเป็นโคโลนีกลม สีดำเหลือบเขียว (Green metallic sheen) บนอาหาร EMB เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสในอาหาร EMB ได้อย่างรุนแรง ทำให้บริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เกิดกรดและทำให้ค่าพีเอชของอาหารในบริเวณนั้นลดลงอย่างมาก อินดิเคเตอร์ eosin Y และ methylene blue จึงรวมกันทำให้บริเวณนั้นเป็นสีดำเหลือบเขียว (Green metallic sheen) ซึ่งโดยปกติหากเกิดการหมักไม่รุนแรง จะเกิดเป็นโคโลนีสีชมพู ลักษณะเป็นเมือก หากไม่เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตส โคโลนีจะไม่มีสี (Leininger, 2001)



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* เจริญบนจานอาหารแข็ง EMB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเศษอาหาร

โรงอาหารเก่า		โรงอาหาร A		โรงอาหาร L	
รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลท	รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลท	รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลท
12O-1	I ₃	14A-2	I ₉ , I ₁₀	11L-1	I ₁ , I ₂
12O-2	I ₄ , I ₅	23A-1	I ₃₉ , I ₄₀	14L-2	I ₁₁ , I ₁₂ , I ₁₃ , I ₁₄
13O-1	I ₆ , I ₇ , I ₈	23A-2	I ₄₁ , I ₄₂ , I ₄₃	15L-1	I ₁₉ , I ₂₀ , I ₂₁
15O-2	I ₁₅ , I ₁₆ , I ₁₇ , I ₁₈	24A-2	I ₄₄ , I ₄₅	21L-2	I ₂₆ , I ₂₇ , I ₂₈ , I ₂₉
21O-1	I ₂₂ , I ₂₃ , I ₂₄ , I ₂₅	25A-1	I ₄₆ , I ₄₇ , I ₄₈	22L-1	I ₃₀ , I ₃₁ , I ₃₂ , I ₃₃ , I ₃₄
23O-2	I ₃₅ , I ₃₆ , I ₃₇ , I ₃₈			25L-1	I ₄₉ , I ₅₀ , I ₅₁
				25L-2	I ₅₂ , I ₅₃ , I ₅₄ , I ₅₅ , I ₅₆

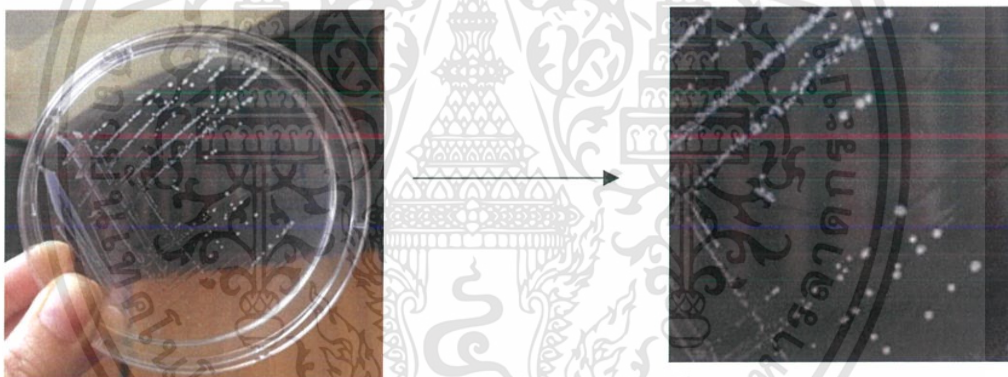
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา

4.1.2.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ในการตรวจดูลักษณะของโคโลนี และการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* บนจานอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จำนวนทั้งหมด 56 ไอโซเลท ซึ่งโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารแข็งมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ หรือเป็นคลื่น สีขาว หรือสีขาวอมเหลือง (Castellani, 1957) จากการตรวจสอบทั้ง 56 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี ดังที่กล่าวมาข้างต้น

ในการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* จำนวน 56 ไอโซเลท ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ บนจานอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* ทั้ง 56 ไอโซเลท มีขนาดโคโลนี 0.45 – 1.85 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *Escherichia coli* บนจานอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.1.2.2 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *Escherichia coli*

ในการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 56 ไอโซเลท ที่เจริญบนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็ *E. coli* ทั้ง 56 ไอโซเลท ย้อมติดสีแดงของซาฟรานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อนำไปย้อมแกรม และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟรานิน (safranin) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มักอยู่เป็นกลุ่ม หรืออยู่อย่างอิสระ การติดสีแกรมจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย Gram-negative bacteria นั้นมีชั้น lipopolysaccharide (LPS) หนาหุ้มอยู่ภายนอกสุด และมีชั้น peptidoglycan บาง เมื่อย้อมติดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) เช่นเดียวกับ Gram-positive bacteria แล้วสีคริสตัลไวโอเลตจะถูกชะล้างออกได้ด้วย alcohol พร้อมกับ LPS เมื่อย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน จึงติดสีแดง (Castellani, 1957) ดังรูป 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าคือ *Escherichia coli* ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ย้อมติดสีแดงของ Safranin

4.1.2.3 การวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าคือ *Escherichia coli*

ในการวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย จำนวนทั้งหมด 56 ไอโซเลท บนหลอดอาหารแข็ง ลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยการย้อมสีพื้นหลังด้วยนิโกรซิน (nigrosin) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 56 ไอโซเลท มีขนาดกว้าง 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร ยาว 1.2 - 2.4 ไมโครเมตร ดังตารางที่ 4.2

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีขนาดกว้าง 1.1 - 1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร ในเซลล์มีชีวิต หรือกว้าง 0.4 - 0.7 ไมโครเมตร ยาว 1.0 - 3.0 ไมโครเมตร ในเซลล์ตาย (Castellani, 1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

4.1.3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสโดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแตะเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 56 ไอโซเลท จากหลอดอาหารแช่เย็น NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองอากาศ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 56 ไอโซเลท มีฟองอากาศเกิดขึ้น ดังตารางที่ 4.2

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ (Chris Bell, 1998) โดยเอนไซม์คะตะเลสจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างคงที่ ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ และแก๊สออกซิเจน จึงสังเกตเห็นฟองของแก๊สออกซิเจน

4.1.3.2 การทดสอบการสังเคราะห์อินโดล (Indole ring) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อินโดล โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 56 ไอโซเลท จากหลอดอาหารแช่เย็น NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในหลอดสารละลายทริปโตน (Tryptone water) 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยดโคแควรีเอเจนท์ (Kovac's reagent) 5-6 หยด พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 42 ไอโซเลท เกิดเป็นวงแหวนสีชมพู ดังตารางที่ 4.2

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (Chris Bell, 1998) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ทริปโตฟานเนส (Tryptophanase) ซึ่งสามารถดีเอมีเนชัน (Deamination) กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) ได้ สารผลิตภัณฑ์เป็นอินโดล, กรดไพรวูวิก และ แอมโมเนียม (Botsford, 1972) เมื่อหยดโคแควรีเอเจนท์ ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ (dimethylaminobenzaldehyde) ในโคแควรีเอเจนท์จะทำปฏิกิริยากับอินโดล เกิดการสร้างสีแดงของเรซินโดล (red rasindole dye) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในโคแควรีเอเจนท์จะสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับเรซินโดล เกิดการเป็นตะกอน แอลกอฮอล์ที่เหลือและตะกอนจะลอยอยู่บริเวณผิวหน้า ทำให้บริเวณผิวหน้าของสารละลายเกิดวงแหวนสีแดงเซอร์รี่ (Powers, 1977) ดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบการสังเคราะห์อินโดลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*
 ด้านซ้าย: เชื้อแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (ผลบวก), ด้านขวา: เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (ผลลบ)

4.1.3.3 การทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskauer ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskauer โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 56 ไอโซเลท จากหลอดอาหารลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว MR-VP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 หลอด หลอดละเท่า ๆ กัน หลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยหยดอินดิเคเตอร์เมทิลเรด (Methyl red) พบว่าเกิดเป็นสีแดง จำนวน 36 ไอโซเลท หลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges-Proskauer โดยหยดสารละลายอัลฟาแนปทอล (Alpha naphthol) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเกิดเป็นสีเหลือง จำนวน 41 ไอโซเลท ดังตาราง 4.2

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้ผลเป็นบวก ในการทดสอบ Methyl red และให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบ Voges-Proskauer เนื่องจากความสามารถในการผลิตกรดไพรูวิก จากการหมักน้ำตาลเดกซ์โทรสของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำให้พีเอชของอาหารลดลง เมื่อหยดอินดิเคเตอร์เมทิลเรดจึงเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง (Clark, 1915) แต่ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ที่เกิดขึ้นให้อยู่ในรูปของอะซิโทอิน (acetoin) ได้ พีเอชของอาหารจึงไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้เมื่อทดสอบด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้การเร่งปฏิกิริยาของสารละลายอัลฟาแนปทอล (Koneman, n.d.) จึงยังคงเป็นสีเหลือง ไม่เปลี่ยนเป็นสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3.4 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 56 ไอโซเลท จากหลอดอาหารลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดอาหารแข็งลาดเอียง simmon's citrate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง จำนวน 30 ไอโซเลท ดังตาราง 4.2

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท เนื่องจากไม่สามารถผลิตเอนไซม์ซิเตรส (citrase enzyme) ซึ่งใช้สลายสารโซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียวในอาหาร simmon's citrate (Simmons, 1926) ทำให้อินดิเคเตอร์โบรโมไทมอลบลูในอาหารไม่เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.2 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

ตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา					การทดสอบทางชีวเคมี					รหัสเชื้อ
		ลักษณะบนอาหาร LB		ลักษณะของเซลล์			กะตะเลส	อินโดล	MR	VP	Simmon's citrate	แบคทีเรีย <i>E. coli</i>
		รูปร่าง ลักษณะ	ขนาด (mm)	รูปร่าง	การติดสี	ขนาดของเซลล์ กว้าง (μm) × ยาว (μm)						
11L-1	I ₁	*	0.65	ท่อน	แดง	0.5 × 1.3	+	-	-	+	+	-
11L-1	I ₂	*	0.80	ท่อน	แดง	0.5 × 1.2	+	-	-	+	+	-
12O-1	I ₃	*	0.95	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	+	+	+	-
12O-2	I ₄	*	0.65	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	+	-	-	E.1
12O-2	I ₅	*	0.65	ท่อน	แดง	0.7 × 1.2	+	+	+	-	-	E.2
13O-1	I ₆	*	1.00	ท่อน	แดง	1.0 × 1.4	+	+	+	-	-	E.3
13O-1	I ₇	*	0.85	ท่อน	แดง	0.8 × 1.2	+	-	-	-	+	-
13O-1	I ₈	*	0.85	ท่อน	แดง	0.7 × 1.5	+	+	+	-	-	E.4
14A-2	I ₉	*	1.20	ท่อน	แดง	1.0 × 1.8	+	+	+	-	-	E.5
14A-2	I ₁₀	*	0.85	ท่อน	แดง	0.7 × 1.2	+	+	-	-	+	-
14L-2	I ₁₁	*	0.75	ท่อน	แดง	1.0 × 1.2	+	+	+	-	-	E.6
14L-2	I ₁₂	*	0.90	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	-	+	+	-
14L-2	I ₁₃	*	0.90	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	+	-	-	E.7
14L-2	I ₁₄	*	0.80	ท่อน	แดง	0.7 × 1.0	+	+	+	-	-	E.8

ตาราง 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

ตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา					การทดสอบทางชีวเคมี					รหัสเชื้อ
		ลักษณะบนอาหาร LB		ลักษณะของเซลล์			กะตะเลส	อินโดล	MR	VP	Simmon's citrate	แบคทีเรีย <i>E. coli</i>
		รูปร่าง ลักษณะ	ขนาด (mm)	รูปร่าง	การติดสี	ขนาดของเซลล์ กว้าง (μm) × ยาว (μm)						
15O-2	I ₁₅	*	1.20	ท่อน	แดง	1.2 × 2.4	+	-	-	+	+	-
15O-2	I ₁₆	*	0.90	ท่อน	แดง	1.0 × 1.8	+	-	-	-	+	-
15O-2	I ₁₇	*	0.90	ท่อน	แดง	0.9 × 1.6	+	+	+	-	-	E.9
15O-2	I ₁₈	*	1.30	ท่อน	แดง	0.8 × 1.4	+	+	+	-	-	E.10
15L-1	I ₁₉	*	1.60	ท่อน	แดง	1.0 × 1.8	+	-	-	-	+	-
15L-1	I ₂₀	*	0.90	ท่อน	แดง	0.5 × 1.3	+	+	+	-	-	E.11
15L-1	I ₂₁	*	0.75	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	+	+	+	-
21O-1	I ₂₂	*	0.80	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	+	-	-	E.12
21O-1	I ₂₃	*	0.95	ท่อน	แดง	0.8 × 1.4	+	+	+	-	-	E.13
21O-1	I ₂₄	*	1.25	ท่อน	แดง	0.8 × 1.8	+	+	-	-	+	-
21O-1	I ₂₅	*	1.55	ท่อน	แดง	0.8 × 1.6	+	+	-	-	+	-
21L-2	I ₂₆	*	1.40	ท่อน	แดง	0.6 × 1.4	+	-	-	+	+	-
21L-2	I ₂₇	*	0.95	ท่อน	แดง	0.5 × 1.2	+	-	-	-	+	-
21L-2	I ₂₈	*	0.85	ท่อน	แดง	0.7 × 1.0	+	-	-	+	+	-

ตาราง 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

ตัวอย่าง	ไอโซลเท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา					การทดสอบทางชีวเคมี					รหัสเชื้อ
		ลักษณะบนอาหาร LB		ลักษณะของเซลล์			กะตะเลส	อินโดล	MR	VP	Simmon's citrate	แบคทีเรีย <i>E. coli</i>
		รูปร่าง ลักษณะ	ขนาด (mm)	รูปร่าง	การติดสี	ขนาดของเซลล์ กว้าง (μm) × ยาว (μm)						
21L-2	I ₂₉	*	1.20	ท่อน	แดง	0.9 × 1.4	+	+	+	-	-	E.14
22L-1	I ₃₀	*	1.80	ท่อน	แดง	1.0 × 2.1	+	+	-	+	+	-
22L-1	I ₃₁	*	1.40	ท่อน	แดง	0.8 × 1.6	+	+	+	-	-	E.15
22L-1	I ₃₂	*	1.20	ท่อน	แดง	0.8 × 1.4	+	+	+	-	-	E.16
22L-1	I ₃₃	*	1.20	ท่อน	แดง	0.8 × 1.6	+	+	+	-	-	E.17
22L-1	I ₃₄	*	1.40	ท่อน	แดง	0.8 × 1.8	+	+	+	-	-	E.18
23O-2	I ₃₅	*	0.45	ท่อน	แดง	0.5 × 1.2	+	+	+	+	+	-
23O-2	I ₃₆	*	0.60	ท่อน	แดง	0.5 × 1.2	+	+	+	-	-	E.19
23O-2	I ₃₇	*	0.85	ท่อน	แดง	0.4 × 1.2	+	+	+	-	-	E.20
23O-2	I ₃₈	*	0.45	ท่อน	แดง	0.6 × 1.5	+	-	-	+	+	-
23A-1	I ₃₉	*	1.20	ท่อน	แดง	0.8 × 1.9	+	-	-	+	+	-
23A-1	I ₄₀	*	1.15	ท่อน	แดง	0.8 × 1.6	+	+	+	-	-	E.21
23A-2	I ₄₁	*	1.40	ท่อน	แดง	0.7 × 1.4	+	+	+	-	-	E.22
23A-2	I ₄₂	*	1.30	ท่อน	แดง	0.8 × 1.4	+	+	-	+	+	-

ตาราง 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

ตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา					การทดสอบทางชีวเคมี					รหัสเชื้อ
		ลักษณะบนอาหาร LB		ลักษณะของเซลล์			กะตะเลส	อินโดล	MR	VP	Simmon's citrate	แบคทีเรีย <i>E. coli</i>
		รูปร่าง ลักษณะ	ขนาด (mm)	รูปร่าง	การติดสี	ขนาดของเซลล์ กว้าง (μm) × ยาว (μm)						
23A-2	I ₄₃	*	1.25	ท่อน	แดง	0.6 × 1.2	+	+	+	-	-	E.23
24A-2	I ₄₄	*	1.40	ท่อน	แดง	0.6 × 1.4	+	+	+	-	-	E.24
24A-2	I ₄₅	*	1.25	ท่อน	แดง	0.8 × 1.4	+	+	+	-	+	-
25A-1	I ₄₆	*	0.85	ท่อน	แดง	0.6 × 1.5	+	+	-	-	+	-
25A-1	I ₄₇	*	0.80	ท่อน	แดง	0.6 × 1.4	+	+	+	-	-	E.25
25A-1	I ₄₈	*	0.65	ท่อน	แดง	0.6 × 1.4	+	-	-	+	+	-
25L-1	I ₄₉	*	0.75	ท่อน	แดง	0.7 × 1.6	+	+	+	-	-	E.26
25L-1	I ₅₀	*	1.20	ท่อน	แดง	0.9 × 1.8	+	+	+	-	+	-
25L-1	I ₅₁	*	0.90	ท่อน	แดง	0.8 × 1.8	+	+	+	-	-	E.27
25L-2	I ₅₂	*	1.00	ท่อน	แดง	0.7 × 1.6	+	+	+	-	-	E.28
25L-2	I ₅₃	*	0.85	ท่อน	แดง	0.7 × 1.8	+	-	-	+	+	-
25L-2	I ₅₄	*	1.20	ท่อน	แดง	0.7 × 1.6	+	+	+	-	-	E.29
25L-2	I ₅₅	*	1.25	ท่อน	แดง	0.8 × 1.6	+	+	+	-	-	E.30
25L-2	I ₅₆	*	1.00	ท่อน	แดง	0.8 × 1.7	+	-	-	-	+	-

การอ่านผล *โคโลนีมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ หรือเป็นคลื่น สีขาว หรือสีขาวอมเหลือง

4.2 การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

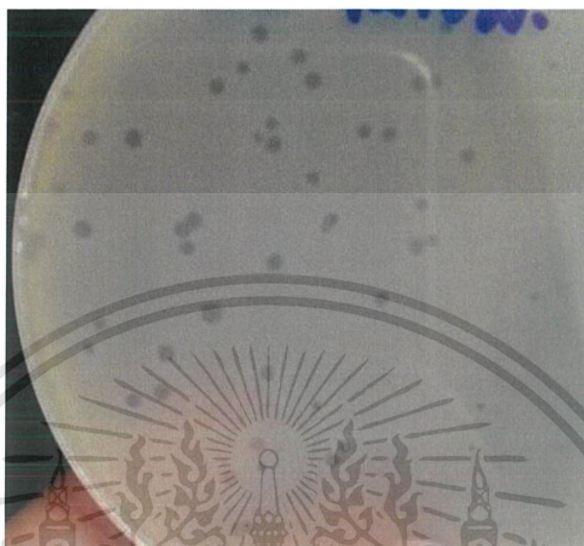
ในงานวิจัยของ Sandeep (2006) และ Weder-Dabrowska et al. (2003) กล่าวว่า แบคทีเรียโอเฟจมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน (host) สูง และในงานวิจัยของ Harley et al. (2002) พบว่า บริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จะมีโอกาสในการแยกแบคทีเรียโอเฟจได้น้อย ดังนั้นการศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารอาคารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการสะสมของน้ำสกปรกและสิ่งปฏิกูลต่างๆที่ไหลลงมาจากโรงอาหาร ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สูง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abigail B. Snyder et al. (2016) ซึ่งแยกแบคทีเรียโอเฟจจากตัวอย่างน้ำสกปรกของเทศบาล โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ตัวอย่างจากบ่อดักไขมันที่ 1 และ 2 โดยใช้หลอดชนิดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างน้ำสกปรกจำนวนตัวอย่างละ 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเศษอาหาร รหัส E.1 ซึ่งแยกได้จากโรงอาหารเก่า, E.18 และ E.30 ซึ่งแยกได้จากโรงอาหาร L เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณ และแบบเพิ่มปริมาณโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร

4.2.1 การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบไม่เพิ่มปริมาณ

การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกโรงอาหารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ จากข้อ 4.2 นำตัวอย่างไปเตรียมตามข้อ 3.6.6.2 โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองสารละลายส่วนใสด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำไป ตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี plaque assay โดยใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน E.1, E.18 และ E.30 พบว่าเกิดพลากกกลมใส บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น ซึ่งมีลักษณะเป็นพลาควเดี่ยว (Single plaque) จำนวน 60 พลาคว บนผิวหน้าอาหาร 2 ชั้นของแบคทีเรียเจ้าบ้าน E.18 ดังรูปที่ 4.5 จากนั้นจึงนำจานอาหารวุ้นสองชั้นของเชื้อแบคทีเรียโอโซเลทที่ E.18 ไปทำให้ได้แบคทีเรียโอเฟจที่บริสุทธิ์ด้วยการทำเทคนิค picking (ข้อ 3.6.6.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจที่เหลือไปทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจแบบเพิ่มปริมาณโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร



รูปที่ 4.5 พลาเคเดียวที่เกิดขึ้นบนอาหารวันสองชั้น

4.2.2 การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร

นำส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไปเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจตามวิธีการในหัวข้อ 3.6.6.3 โดยใช้ส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจจากข้อ 3.6.6.2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียโอเฟจเจ้าบ้าน E.1, E.18 และ E. 30 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิตร บ่มที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที 18 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที 10 นาที แล้วกรองส่วนใสด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี plaque assay พบว่าเกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวัน 2 ชั้น จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ E.18 และ E.30 แต่ไม่พบพลาเคเดียว ดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
E.1	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง
E.18	เกิดบริเวณใส
E.30	เกิดบริเวณใส

4.2.3 การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ picking

การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์โดยทำการเก็บพลาคใส (picking) จากพลาคเดี่ยวจำนวน 60 พลาคที่เกิดขึ้นบนจานอาหารวุ้น 2 ชั้น ของแบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลทที่ E.18 โดยทำตามวิธีทำในข้อ 3.6.6.5 โดยใช้ทูปเขี่ยบริเวณพลาคใสจากจานอาหารวุ้นสองชั้น ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่านตัวกรองปลอดเชื้อ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจ ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงฆ่าเชื้อแล้ว ทำทั้งหมด 3 พบว่าพลาคเดี่ยวที่ขึ้นบนจานอาหารของไอโซเลทที่ E.18 มีทั้งหมด 60 พลาค สามารถแยกเป็นแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ได้ 2 พลาค คือลำดับที่ 17 และ 27 นำมาเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ โดยวิธี phage lysate ตามวิธีทำในข้อ 3.6.6.6 โดยนำส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจมาเจือจางแบบ 10 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคด้วยวิธี plaque assay นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้น พร้อมรายงานผลในหน่วย PFU/ml สะเก็ดบริเวณที่แบคทีเรียไลซิสด้วยบัฟเฟอร์ SM พบว่า แบคทีเรียโอเฟจลำดับที่ 17 และ 27 มีความเข้มข้น 1.055×10^7 PFU/ml และ 1.4925×10^7 PFU/ml ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4 จากนั้นนำแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารทั้งหมด 20 ไอโซเลท ด้วยวิธี spot test

จากพลาคเดี่ยวที่แยกได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ E.18 จำนวน 60 พลาค พบว่ามีพลาคจำนวน 58 พลาค หายไปหลังจากการทำ picking ครั้งที่ 1, 2 และ 3 เนื่องจากพลาคที่เก็บได้ในแต่ละครั้งมีความเข้มข้นไม่มากพอที่จะไลซิสแบคทีเรียเจ้าบ้าน ละบางพลาคกลายเป็นพลาคขุ่น เนื่องจากเกิดวงจรชีวิตแบบไลโซจีนิค จึงทำให้ไม่เกิดพลาคเดี่ยวใสขึ้นบนผิวหน้าอาหารสองชั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการแยกแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ด้วยการเก็บพลาไคไส และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ PFU/ml

ลำดับพลาไคไคเดี่ยว	Picking 1 st	Picking 2 nd	Picking 3 rd	ความเข้มข้น PFU/ml
1	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
2	พบจุดคล้ายพลาไคไค	-	-	-
3	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
4	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
5	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
6	เกิดพลาไคไค	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
7	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
8	เกิดพลาไคไค	เกิดพลาไคไค	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
9	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
10	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
11	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
12	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
13	เกิดพลาไคไค	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
14	เกิดพลาไคไค	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
15	พบจุดคล้ายพลาไคไค	-	-	-
16	เกิดพลาไคไค	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
17	เกิดพลาไคไค	เกิดพลาไคไค	เกิดพลาไคไค	1.055x10 ⁷
18	พบจุดคล้ายพลาไคไค	-	-	-
19	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
20	เกิดพลาไคไค	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
21	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
22	เกิดพลาไคไค	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
23	เกิดพลาไคไค	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
24	เกิดพลาไคไค	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
25	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการแยกแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ด้วยการเก็บพลาไคไล และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ PFU/ml

ลำดับพลาไคไล	Picking 1 st	Picking 2 nd	Picking 3 rd	ความเข้มข้น PFU/ml
26	เกิดพลาไคไล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
27	เกิดพลาไคไล	เกิดพลาไคไล	เกิดพลาไคไล	1.4925x10 ⁷
28	เกิดพลาไคไล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
29	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
30	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
31	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
32	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
33	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
34	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
35	เกิดพลาไคไล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
36	พบจุดคล้ายพลาไคไล	-	-	-
37	เกิดพลาไคไล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
38	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
39	พบจุดคล้ายพลาไคไล	-	-	-
40	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
41	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
42	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
43	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
44	พบจุดคล้ายพลาไคไล	-	-	-
45	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
46	เกิดพลาไคไล	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
47	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
48	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
49	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
50	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการแยกแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ด้วยการเก็บพลาไคไล และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ PFU/ml

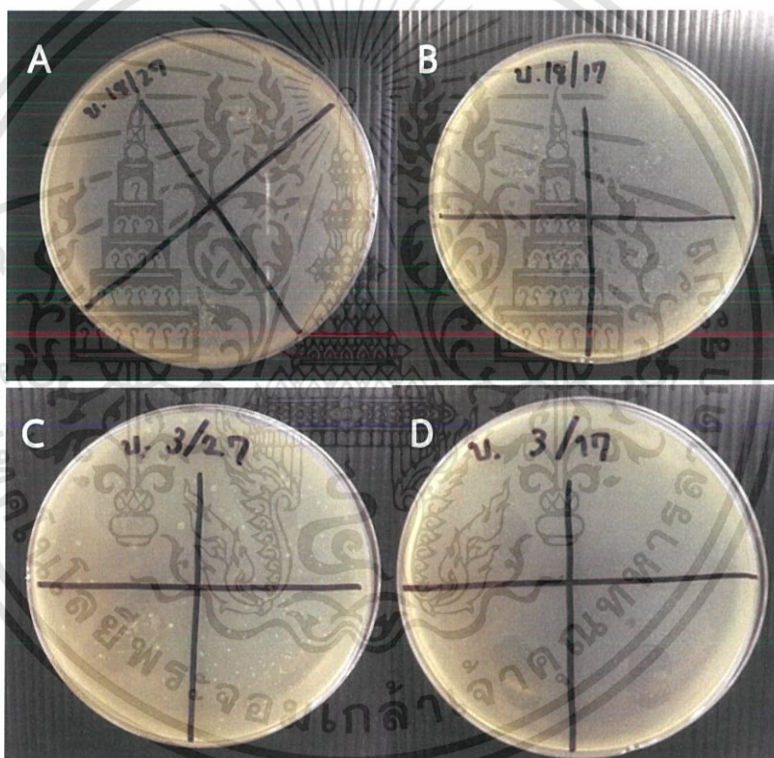
ลำดับพลาไคไล	Picking 1 st	Picking 2 nd	Picking 3 rd	ความเข้มข้น PFU/ml
51	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
52	เกิดพลาไคไล	เกิดพลาไคไล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
53	เกิดพลาไคไล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-
54	เกิดพลาไคไล	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-
55	เกิดบริเวณใส	-	-	-
56	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
57	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
58	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
59	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-	-
60	เกิดบริเวณใส	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	-	-

*หมายเหตุ : ส่วนใสที่นำมาใช้ในการแยกแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ไม่ได้ทำการเจือจาง เนื่องจากเมื่อนำมาทำการเจือจางและตรวจหาอนุภาคด้วยวิธี plaque assay พบว่าไม่เกิดพลาไคไล จึงทำการ picking โดยไม่มีการเจือจางส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจ, จานอาหารที่เกิดบริเวณใสเมื่อเชบบริเวณดังกล่าวแล้วนำมาเจือจาง และทำ plaque assay พบเกิดพลาไคไลหรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ จึงไม่เลือกผลจานอาหารที่มีลักษณะดังกล่าวมา picking ต่อ

4.2.4 การศึกษาการทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* ด้วยวิธี Spot test

การศึกษาการทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ด้วยวิธี Spot test โดยนำแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ทั้งลำดับที่ 17 และ 27 จากข้อ 4.2.3 มาทำการ Spot test ด้วยวิธีในข้อ 3.6.6.7 เทคนิคนี้ทำเพื่อทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำสกปรกกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่มาจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน เพื่อศึกษาขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอเฟจ โดยใช้แบคทีเรียโอเฟจปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารสองชั้นที่ผสมแบคทีเรียเจ้าบ้านปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทั้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 24 ชั่วโมง โดยการศึกษาในครั้งนี้ใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* 20 ไอโซเลท ได้แก่ E.1, E.2, E.3, E.4, E.5, E.9, E.10, E.11, E.12, E.13, E.14, E.15, E.16, E.18, E.20, E.26, E.27, E.28, E.29 และ E.30 ที่แยกได้จากเศษอาหารมาทดสอบ พบว่า แบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ทั้งลำดับที่ 17 และ 27 มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* 2 ไอโซเลท คือ E.3 และ E.18 แสดงให้เห็นว่าผิวหน้าของวุ้นอาหารสองชั้นของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ทั้ง 2 ไอโซเลท เกิดไลซิสโซน (lysis zone) ณ ตำแหน่งที่มีการหยดแบคทีเรียโอเฟจ ดังรูปที่ 4.6 แบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้มีขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แคบ ส่งผลให้ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลทอื่นๆที่แตกต่างกันได้



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli*

- A : แบคทีเรียโอเฟจลำดับที่ 27, แบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลท E.18
- B : แบคทีเรียโอเฟจลำดับที่ 17, แบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลท E.18
- C : แบคทีเรียโอเฟจลำดับที่ 27, แบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลท E.3
- D : แบคทีเรียโอเฟจลำดับที่ 17, แบคทีเรียเจ้าบ้านไอโซเลท E.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจลำดับที่ 17 และ 27 พบว่าจำเพาะกับแบคทีเรีย *E. coli* ไอโซเลทที่ E.3 และ E.18 จึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย *E. coli* ทั้ง 2 ไอโซเลทต่างชนิดกัน เนื่องจากแยกได้จากคนละแหล่งที่มา โดยไอโซเลทที่ E.3 แยกได้จากโรงอาหารเก่า และไอโซเลทที่ E.18 แยกได้จากโรงอาหาร L และแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้ทั้ง 2 ถึงแม้จะให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน แต่ก็มีโอกาสเป็นไปได้ว่าจะต่างชนิดกัน เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟจสามารถจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผนังเซลล์ได้หลายชนิด ได้แก่ teichoic acid, lipoteichoic acid, flagella, capsule, lipopolysaccharide และ porin เป็นต้น (Sandeep, 2006; Weber-Dabrowska, 2003) ดังนั้นถึงแม้จะไลซิสแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้ แต่จับกับโมเลกุลได้ต่างชนิดกัน ก็อาจเป็นแบคทีเรียโอเฟจคนละชนิดกัน ในการศึกษาสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจให้มีความเข้มข้นสูงสุดได้ไม่ถึง 10^8 PFU/ml เนื่องจากไม่เกิดผลาคเดียวบนจานอาหารที่ระดับการเจือจางมากกว่า 10^{-6} ซึ่งอาจมีความเข้มข้นไม่มากพอที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆที่แยกได้ จากงานวิจัยของ Mohammadali et. al (2015) ใช้แบคทีเรียโอเฟจที่ความเข้มข้น 10^9 PFU/ml มาใช้ในการ spot test จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ และผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจที่สูงขึ้น เกิดไลซิโซนที่ชัดเจนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จากตัวอย่างเศษอาหาร โดยใช้อาหารแข็ง Eosin methylene blue แล้วนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าจากตัวอย่างเศษอาหารทั้งหมด 80 ตัวอย่าง แยกได้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากเศษอาหาร จำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลท โดยแยกได้จากโรงอาหารเก่าจำนวน 10 ไอโซเลท, โรงอาหาร A จำนวน 6 ไอโซเลท และโรงอาหาร L จำนวน 14 ไอโซเลท เลือกมา 3 ไอโซเลท ได้แก่ E.1 แยกได้จากโรงอาหารเก่า, E.18 และ E.30 แยกได้จากโรงอาหาร L เพื่อใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคทีเรียโอฟาจจากการแยกแบคทีเรียโอฟาจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำสกปรกศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณเฟจ และเพิ่มปริมาณเฟจแบบไม่เปลี่ยนอาหาร นำมาตรวจหาอนุภาคของแบคทีเรียโอฟาจด้วยวิธี plaque assay พบว่าเกิดพลาไคเดี่ยว (Single plaque) จำนวน 60 พลาไค บนจานอาหารวุ้นสองชั้นของไอโซเลทที่ E.18 จากการแยกแบคทีเรียโอฟาจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณและนำมาทำให้เป็นแบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์ได้ 2 แบคทีเรียโอฟาจ คือลำดับที่ 17 และ 27 มีความเข้มข้น 1.055×10^7 PFU/ml และ 1.4925×10^7 PFU/ml ตามลำดับ นำแบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์ทั้งสองมาทดสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรียด้วยวิธี spot test โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเศษอาหารจำนวน 20 ไอโซเลท พบว่าเกิดบริเวณใสขึ้นบนผิวหน้าอาหารสองชั้นของแบคทีเรีย *E. coli* ไอโซเลทที่ E.3 แยกได้จากโรงอาหารเก่า และ E.18 แยกได้จากโรงอาหาร L

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจแบบเพิ่มปริมาณเฟจ ควรใช้เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในระยะ log phase และคำนวณความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ให้อยู่ในช่วง 0.05 - 0.1 เพื่อให้แบคทีเรียโอฟาจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านอย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใส่เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน และส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียโอฟเฆ ในอาหาร Top agar ที่อุณหภูมิประมาณ 45 - 50 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และแบคทีเรียโอฟเฆ

3. แบคทีเรียโอฟเฆที่นำมาใช้ในการตรวจหาความจำเพาะต่อแบคทีเรียด้วยวิธี spot test ควรมีความเข้มข้นมากกว่า 10^9 PFU/ml



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกัน, ชาญชุตี จรรยาสิทธิ์, พรพรรณ ตีรพัฒน์, พิพัฒน์ ลักษณะมีจรัชกุล, เฟื่องฟ้า อุตราชรัชกิจ, สิริรา กิตติกุล, อรษา สุดเจียรกุล และอัญชลี ตันท์ศุภศิริ.

2548. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บุญศิริการพิมพ์ จำกัด.

กัญญา ธีระกุล, เกษตร ทวีเศษ, พชร สุนทรนันท์ และพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2544. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด.

นิติ ชูเชิด. 2558. ไวรัสวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : เมจิพับบลิชชั่น จำกัด.

รศ. สมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ผศ. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : Noble Print.

Abigail B. Snyder, Jennifer J. Perry and Ahmed E. 2016. “Developing and optimizing bacteriophage treatment to control enterohemorrhagic *Escherichia coli* on fresh produce.” Food Microbiology. 8 : 90-97.

ADAMS, M. H. 1953. Criteria for a biological classification of bacterial viruses. Ann. N.Y. Acad. Sci. 56:442-447.

Adi Budipriyantoa, Budisantoso Wirjodirdjobl, Nyoman Pujawanb and Saut Gurningc. 2017. “A Simulation Study of Collaborative Approach to Berth Allocation Problem under Uncertainty.” The Asian Journal of Shipping and Logistics. 3 : 127-139.

Andrzej Gorski, Krystyna Dabrowska, Kinga Switala-Jelen, Maria Nowaczyk, Beata Weber-Dabrowska, Janusz Boratynski, Joanna Wietrzyk and Adam Opolski. 2003. “New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease.” Medical Immunology.

Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E. and Petit, F. 2013. “Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

environments and their survival in estuary water.” *Appl Environ Microbiol.* 79 : 4684 – 4693.

Biswas B, Adhya S, Washart P and Pual B. 2002. “ Bacteriophage therapy rescues mice bacterimic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity.*” *infection immunology.* 7 : 204-210.

Blood, D.C., Radostits, O.M., and Henderson. 1983. *Melioidosis. Veterinary Medicine : A Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses.* 6th ed. England : Bailliere Tindall.

Boyd R.F. 1995. *Basic Medical Microbiology.* 5th ed. United States of America : Little Brown.

Botafor, J.L. and Demoss R.D. (1972). “*Escherichia coli* Tryptophanase in the Enteric Environment.” *JOURNAL OF BACTERIOLOGY.* 7 : 74-80.

Brusso H. 2005. *Phage therapy : the Escherichia coli experience.* *Microbiology ;* 151 : 2133–2140.

Boyd R.F. 1995. *Basic Medical Microbiology.* 5th ed. United States of America : Little Brown.

Cappuccino J. G. and Sherman N. 2001. *Microbiology: A Laboratory Manual.* San Francisco : Benjamin Cummings.

Calender, R. 2006. “*The Bacteriophages, Second Edition.*” New York : Oxford University Press.

Carla Pereira, Catarina Moreirinha, Luís Teles a, Rui J.M. Rocha, Ricardo Calado, Jesús L. Romalde, Maria L. Nunes and Adelaide Almeida. 2017. “ Applicati of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination.” *Food Microbiology.* 11 : 102-112.

Carla Pereira, Catarina Moreirinha, Magdalena Lewicka, Paulo Almeida, Carla Clementa, Angela Cunha, Ivonne Delgadillo, Jesús L, Romalde, Maria L.Nunese and Adelaide Almeidaa. 2016. “ Bacteriophages with potential to inactivate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Salmonella Typhimurium* : Use of single phage suspensions and phage cocktails.” *Virus Research*. 14 : 179-192.
- Castellani. And Chalmers. 1919. *Escherichia : Escherichia coli*, *Bergey's manual of determinative bacteriology* (335-337). Md., U.S.A. : Wavery Press
- Catherine Ngaywa, Gabriel O. Aboge, George Obiero, Isaac Omwenga, Nicholas Ngwili, George Wamwere, Martin Wainaina and Bernard Bett. 2019. “ Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates detected in raw milk of livestock in pastoral areas of northern Kenya.” *Food Control*. 6 : 173-178.
- Chris, B. and Alac, K. 1998. *E. Coli* : a practical approach to the organism and its control in foods. London.
- Clark, W.M. and Lubs, H.A. 1915. *J. Infect. Dis.*; 17 : 160-173.
- Denis Augusto Spricigo, Carlota Bardina, Pilar Cortés and Montserrat Llagostera. 2013. “ Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry.” *International Journal of Food Microbiology*. 6 : 169-174.
- Doaa El-Hadedy and Salwa Abu El-Nour. 2012. “ Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia*.” *Genetic Engineering and Biotechnology*. 10 :139-135.
- Duckworth DH and Gulig PA. 2002. “ Bacteriophages : potential treatment for bacteria infections.” *BioDrugs*. 16 : 57-62.
- Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J. and Allen, M.J. 2000. “*Escherichia coli* : the best biological drinking water indicator for public health protection.” *J Appl Microbiol*. 88 : 106S–116S.
- Emory L. Ellis and Max Delbrück. 1939. “ The Growth of Bacteriophage.” *Journal of General Physiology*. 22 (3) : 365–384.
- Felix D’Herelle. 1917. “Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West.” *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 18 (1) : 19–26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fokine A, Chipman PR, Leiman PG, Mesyanzhinov W, Rao VB and Rossmann MG. 2004. "Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4." *Medicine*. 101 (16) : 6003-8.
- Francesca Dell' Orco, Claudia Gusmara, Monica Loiacaono, Theo Gugliotta, Francesca Albonico, Michele Mortarino and Alfonso Zecconi. 2019. "Evaluation of virulence factors profiles and antimicrobials resistance of *Escherichia coli* isolated from bulk tank milk and raw milk filters." *Veterinary Science*. 7 : 77-83.
- Frédérique Pasquali, Alex Lucchi, Simonetta Braggio, Davide Giovanardi, Achille Franchini, Maurizio Stonfer and Gerardo Manfreda. 2015. "Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain." *Veterinary Microbiology*. 8 : 230-237.
- Hansen VM, Rosenquist H, Baggesen DL, Brown S and Chistensen BB. 2007. "Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter* Penner serotypes." *BMC Microbiology*. 7 : 90.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M. 2002. "Molecular Characterization of Extended Spectrum β -Lactamase Genes in Clinical *E. coli* Isolate." *Journal of Biomedical Science and Engineering*.
- H.Liu, Y.D.Niu, R.Meng, J.Wang, J.Li, R.P.Johnson, T.A.McAllister and K.Stanford. 2015. "Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4 °C by T5-, T1-, T4- and O1-like bacteriophages." *Food Microbiology*. 5 : 69-73.
- Hoang Minh Duc, Hoang Minh Son, Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto. 2018. "Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat." *Food Science and Technology*. 8 : 353-360.
- Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM and Donoghue AM. 2003. "Bacteriophage Treatment of a Severe *Escherichia coli* Respiratory Infection in Broiler Chickens." *Avian Diseases*. 7 : 1399– 1405.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Humberto Moreira Hungaro, Regina Célia Santos Mendonça, Delaine Meireles Gouvêa, Maria Cristina Dantas Vanetti and Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto. 2013. "Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with a chemical agents." *Food Research International*. 7 : 75-81.
- Ishii, S. and Sadowsky, M.J. 2008. "*Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health." *Microbes Environ*. 23 : 101–108.
- Ishii, S., Ksoll, W.B., Hicks, R.E. and Sadowsky, M.J. 2006. "Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds." *Appl Environ Microbiol*. 72 : 612–621.
- J.A. Hudson, C. Billington, A.J. Cornelius, T. Wilson, S.L.W. On, A. Premaratne and N.J. King. 2013. "Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef." *Food Microbiology*. 8 : 14-21.
- J. Vial and Ch. Geoffray. 1980. "Study of a Pour Plate Technique for the Enumeration of Coliform Organisms in Surface Water." *Water Pollution Research and Development*. 13 : 837-849.
- Kamila Soares, Irene Oliveira, Alexandra Esteves, Maria C. Fontes and Cristina Saraiva. 2016. "Knowledge Level and Self-Reported Attitudes of Food Handlers: Case Study of a University Campus." *Modern Food Microbiology*.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L.T. 2004. "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol*. 2 : 123–140.
- Koneman, E.W., et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.
- Kumari M, Myagmarjav B, Prasad B and Choudhary M. (2013). Identification and characterisation of antibiotic producing Actinomycetes isolates. *American Journal of Microbiology*. 4 : 24-31.
- Leininger, D.J., Roberson, J.R. and Elvinger F.O. 2001. "Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens." *J Vet Diagn Invest*. 13 : 273–275.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Machino and L. Fürede. 1998. “Freshwater crayfish in South Tyrol (Italy): Distribution and protection measures of endangered *Austropotamobius pallipes*.” 367(367) : 651-662.

Maloy, S.R., Cronan, J.F. and Freifelder, D.J. 1994. **Microbial Genetics**. 2nd Ed. Boston : Jones and Bartlett.

Mark H. Adams. 1959. “**Bacteriophage Ecology Group**.” Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York.

Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski. 2009. **Bacteriophages : Methods and Protocols**, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Public Health Agency of Canada.

Matsuzaki S., Rashel M., Uchiyama J., Sakurai S and Ujihara T. 2005. “ Bacteriophage therapy : a revitalized therapy against bacterial infectious diseases.” J Infect Chemother. 11(5) : 211- 9.

Mckane. L and Kendal. J. 1996. **Microbiology**. United Sttates of America : McGraw-Hill.

Mohammadali Khan Mirzaei and Anders S. Nilsson. 2015. “Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy.” Phage Therapy.

Pirisi A. 2000. “Phage therapy—advance over antibiotic.” Lancet. 356 (9239) : 1418.

Powers, E.M. and Latt, T.G. 1977. “Simplified 48-Hour IMVic Test: an Agar Plate Method.” APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 6 : 274-279.

Prakash, S. B. 2014. Laboratory Protocols in Applied Life Sciences. India. Taylor and Fransic Group.

Priyanka Singh and Alka Prakash. 2008. “ Isolation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from milk products sold under market conditions at AGRA region.” Environmental Biotechnology. 6 : 83-88.

Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Dey, E.S., and Novik, G.I. 2010. “Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell.” Pol. J. Microbiol. 59 : 145–155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rene N. Beaudoin, Danielle R. DeCesaro, Debrah L. Durkee, and Susan E. Barbaro, Ph. D. 2007. “Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of its bacterial host cell.” RIVIER ACADEMIC JOURNAL. 3 :1–8.
- Ruchi Tiwari, Kuldeep Dhama, Sandip Chakraborty, Amit Kumar, Anu Rahal and Sanjay Kapoor. 2014. “Bacteriophage Therapy for Safeguarding Animal and Human Health.” Pakistan Journal of Biological Sciences. 15 : 301-315.
- Sandeep K. 2006. “Bacteriophage precision drug against bacteria infection.” Current Science. 3 : 631-633.
- S Biswas, M A K Parvez, M Shafiquzzaman, S Nahar and M N Rahman. 2010. “Isolation and Characterization of *Escherichia coli* in ready-to-eat foods vended in Islamic university, kushtia.” Biotechnology and Genetic Engineering. 18 : 99-103.
- Simmons, J.S. 1926. “A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colonaerogenes groups and for isolation of certain fungi.” J. Infect. Dis., 39 : 209.
- Sinchan Biswas, Nabasree Dasgupta and Bratati De. 2010. “Antioxidant activity of some Indian medicinal plants used for the treatment of Diabetes of mellitus.” Pharmacology. 15 : 7-21.
- Sohyun Cho, Lari M. Hiott, Elizabeth A. McMillan and John B. Barrett. 2018. “Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia.” PLOS. 13(5).
- Tenaillon O, Barrick J.E., Ribeck, N., Deatherage, D.E., Blanchard, J.L., Dasgupta, A., Wu, G.C. and Wielgoss S. 2016. “Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment.” Nature. 6 : 165-170.
- Tze Young Thung, Jayasekara Mudiyansele, Krishanthi Jayarukshi Kumari, Premarathne, Wei San Chang, Yuet Ying Loo, Yih Zhet Chin, Chee Hao Kuan, Chia Wanq Tan, Dayang Fredalina Basri, Che Wan Jasimah Wan Mohamed Radzi and Son Radu. 2017. “Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella Enteritidis* in retail food.” Food Science and Technology. 4 : 222-225.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tze Young Thunga, Epeng Leeb, Nor Ainy Mahyudinc, Karunakaramoorthy Anuradhad, Nurzafirah Mazlane, Chee Hao Kuanf, Chai Fung Puig, Farinazleen Mohamad Ghazalia, Nor-Khaizura Mahmud Ab Rashida, Wendy Dayang Rollonb, Chia Wanq Tana and Son Radua. 2019. "Evaluation of a lytic bacteriophage for bio-control of *Salmonella Typhimurium* in different food matrices." Food Science and Technology. 4 : 211-124.
- Uli Schwarz, Anneleen Asmus and HermannFrank. 1969. "Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*." Journal of Molecular Biology. 11: 419-429.
- USEPA. 1986. "Ambient Water Quality Criteria for Bacteria." Washington, DC : USEPA.
- Voyles PM and Muller DA. 2002. "Fluctuation microscopy in the STEM." Medicine. 93 (2) : 147-59.
- Vuddhakul, V., Tharavichitkul, P., Na-ngam, N., Jitsurong, S., Kunthawa, B., Noimay, P., Noimay, P.P., Binla, A. and Thamalikitkul, 1999. "Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand." Am. J. Trop. Med. Hyg. 4 : 458-461.
- Watanabe R, Matsumoto T, Sano G and Ishii Y. 2007. "Efficacy of Bacteriophage therapy against gut- derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice." Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 7 : 446-452.
- Weber-Dabrowska B, Mulczyk M and Gorski A. 2003. "Bacteriophage as an efficient therapy for antibiotic- resistant septicemia in man." Transplantation Proceeding. 1 : 1385-1386.
- W.E. Inniss and C.I. Mayfield. 1978. "Psychotropics Bacteria in sediments from the great lakes." Water Research. 5: 237-241.
- Williams and Wilkins. 1994. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** USA : Library of congress cataloging-in-publication data.
- Withey S, Cartmell E, Avery LM and Stephenson T. 2005. "Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes." Science of the Total Environment. 18 : 1-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xavier Wittebole, Sophie De Roock and Steven M Opal. 2013. “ A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. ” Bacteriophage therapy. 5 (1) : 226–235.

.นรินนาม. 2544. การเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีแช่แข็ง, น. 2. ใน หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะทาง ศช. (ผู้รวบรวม). คู่มือการเก็บรักษาและตรวจสอบคุณภาพจุลินทรีย์ของหน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะทาง ศช.. มปท..



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.2±0.2		

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.2±0.2		

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3) อาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
Eosin(yellowish)	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม

Agar 15 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

4) Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2.9	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

5) Simmon's citrate Agar

Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
Di-potassium phosphate	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Bromothymol blue	0.08	กรัม
Agar	13.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่ง Simmon Citrate Agar จำนวน 22.5 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 11 นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเอียงหลอดเพื่อทำ slant ทิ้งไว้ให้เย็นแข็งตัว

6) Nutrient agar, Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม (ถ้าเตรียม Nutrient broth)

ไม่ต้องใส่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 6.8-7.0		

7) Tryptone broth (peptone water)

Peptone from casein (tryptone)	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

8) MR-VP Medium (Glucose Phosphate Broth)

HM infusion powder	12.5	กรัม
BHI powder	5	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Dextrose (Glucose)	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
pH สุดท้าย (ที่ 25 ° C) 7.4 ± 0.2		

9) SM buffer

NaCl	5.8	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	2	กรัม
Tris-Cl (1 M, pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้