การศึกษาการคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากน้ำเสียของโรงอาหาร

Study on isolation of a bacteriophage of *Escherichia coli from* canteen waste water.

พรนภัส เกตุอุบล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF *ESCHERICHIA COLI* FROM CANTEEN WASTE WATER.

PORNNAPAT KET-UBON

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากน้ำเสียของของโรงอาหาร Study on isolation of a bacteriophage of *Escherichia coli* from canteen waste water
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรนภัส เกตุอุบล 58050935
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2561

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากน้ำเสียของของโรงอาหาร

ชื่อนักศึกษา นางสาวพรนภัส เกตุอุบล รหัสนักศึกษา 58050935

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุสาหกรรม)

ภาควิชา จุลชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เพื่อนำมาแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar คัดเลือกจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 60 ไอโซเลท แล้วนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การวัดขนาดและศึกษาลักษณะของโคโลนี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม และการวัดขนาดของเซลล์ ลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสังเคราะห์อินโดล Methyl red – Voges Proskauer และการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ให้ผลเป็นแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 59 ไอโซเลท จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร และคัดเลือกเหลือ 20 ไอโซเลท ต่อมาจึงทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ โดยใช้แบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ P19, P20 และ P21 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน เพื่อแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ และมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีการตรวจการเกิดพลาค (Plaque assay) จากการทดลองพบว่า ไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อโดยใช้แบคเทอริโอเฟจจากงานวิจัยของชณัฐดา และคณะ (2562) ซึ่งใช้แบคทีเรีย *E.coli* ที่แยกได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน จำนวน 2 หมายเลข คือ หมายเลข 17 และหมายเลข 27 มาทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *E. coli* ไอโซเลทอื่นที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียข้างต้น ด้วยวิธี spot test จากการทดลองพบว่า เซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* จำนวน 18 ไอโซเลท และเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* จำนวน 15 ไอโซเลท

คำสำคัญ : การคัดแยกแบคเทอริโอเฟจ แบคทีเรีย *Escherichia coli* น้ำเสีย plaque assay host range

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on isolation of a bacteriophage of *Escherichia coli* from canteen waste water.
Students	Miss.Pornnapat Ket-ubon Student ID 58050935
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Dr. Wimonmat Boonmee

ABSTRACT

The aim of this special project was to study on the isolation of bacteriophage of *Escherichia coli* from Prathep canteen's sewage. The sixty colonies of bacteria were isolated on Eosin Methylene Blue Agar and were evaluated on biochemical test such as catalase production, indole test, MR-VP test and citrate utilization test and for morphology characterization such as colony appearance; size, shape and color, motility, Gram staining, spore staining, cell arrangement and oxygen requirement. The result showed 59 isolated of *E. coli* from Prathep canteen's sewage were measured the absorbance at 440 nm. And selected 20 isolates. Then the 3 isolates with the highest absorbance which were P19, P20 and P21 were used as the bacterial hosts to investigate on isolation with and without enrichment of bacteriophages from Prathep canteen's Grease trap samples. Plaque assay was used to determine bacteriophage in samples. The result showed that bacteria which was isolated from food waste were unable to isolated the bacteriophage. However, this study was interested to determined host range of bacteriophages from Chanutda et al. (2019); bacteriophage number 17 and 27 by using spot test and isolated bacteria from Prathep canteen's sewage were used as bacterial host. The result showed that bacteriophages number 17 was able to be infected to 18 isolates of *E. coli* and bacteriophage number 27 was able to be infected to 15 isolates of *E.coli.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่องการศึกษาการคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากน้ำเสียของโรงอาหาร โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้ คำปรึกษาคำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการสอบโครงงานพิเศษนี้ที่ได้สละเวลาในการเข้ารับฟังการนำเสนอ รวมทั้งให้คำแนะนำคำปรึกษาจนโครงงานพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา และพี่สมศักดิ์ที่เอื้อเฟื้อการเบิกอุปกรณ์สารเคมีต่าง ๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำการทดลองที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดาและขอบคุณเพื่อนๆที่คอยอยู่เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้กันตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนโครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในศึกษาและต่อยอดต่อไป

พรนภัส เกตุอุบล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก
Abstract.....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*.....3
2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ *Escherichia coli*.....3
2.1.2 การทำให้เกิดโรคของ *Escherichia coli*.....4
2.2 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages).....5
2.2.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ.....5
2.2.2 คุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ.....5
2.2.3 ชนิดของแบคเทอริโอเฟจ.....6
2.2.4 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการบุกรุกเข้าเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน ของแบคเทอริโอเฟจ (Assay of Viral Infectivity).....7
2.2.5. การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (Purification).....9
2.2.6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) ในด้านต่าง ๆ.....9
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 อุปกรณ์ 12
3.2 เครื่องมือ 13
3.3 สารเคมี 13
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 14
3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ 15
3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 15
3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* 15
3.6 วิธีการทดลอง 15
3.6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar (EMB) 15
3.6.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 15
3.6.3 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 16
3.6.4 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 18
3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เริ่มต้น 18
3.6.6 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 22
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย 22
4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) 22
4.1.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Escherichia coli* 24
4.1.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 29
4.1.4 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 29
4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 38
4.2.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียแบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ....39
4.2.3 การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ picking....39
4.2.4 การศึกษาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range)....40
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ....45
5.1 สรุปผลวิจัย....45
5.2 ข้อเสนอแนะ....46
เอกสารอ้างอิง....47
ภาคผนวก....51
ภาคผนวก ก....52
ภาคผนวก ข....57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย.....23
4.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*.....33
4.3 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*.....36
4.4 ผลการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบ
ไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ.....39
4.5 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17.....41
4.6 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27.....43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 4

2.2 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ....7

2.3 วิธี double layer หรือ overlay agar method....8

4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue Agar (EMB)....23

4.2 ลักษณะการเกิด Indole ring....25

4.3 แสดงผลการทดสอบ Methyl red....26

4.4 แสดงผลการทดสอบ Voges - Proskaure....27

4.5 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นลบ (+)....28

4.6 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นบวก (-)....28

4.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA....30

4.8 การติดสีซาฟรานิน (safranin) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เมื่อย้อมสีแบบแกรม....31

4.9 การจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Escherichia coli (*E. coli*) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียสาเหตุสำคัญที่เป็นปัญหาทางการแพทย์ และสาธารณสุข ปัจจุบันเชื้อจะมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นเพราะเชื้อสามารถเจริญเติบโตและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) หากเชื้อลุกล้ำเข้าสู่ ระบบต่าง ๆ สามารถสร้างสารพิษ (toxin) และก่อความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไป ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ที่มักพบในผู้ป่วย เรียก diarrheagenic *E. coli* (DEC) ได้แก่ enteroaggregrative *E. coli* (EAEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) การติดเชื้อสามารถเกิดได้หลายระบบ ของร่างกาย เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (pyelonephritis) กรวยไตอักเสบ (cystitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ไส้ติ่งอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ แผลติดเชื้อ แผลกดทับ ไตติดเชื้อ (ดารณี นุตาลัย, 2561) *E. coli* O157:H7 เป็นเชื้อที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ โดยอันตรายนั้นไม่ใช่เพียงแค่อาการท้องร่วงธรรมดา แต่อาจทำให้ไตวาย ไตพิการ หรือ อาจพรากชีวิตของผู้ป่วยได้ด้วย สาเหตุสำคัญที่ทำให้ *E. coli* O157:H7 มีอันตรายต่อมนุษย์เนื่องจากสามารถสร้างโปรตีนที่เป็นสารพิษ เรียกว่า shiga-liked toxin (วฤษณี ปรีชานฤชิตกุล, 2554) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดจำนวนประชากรและทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อน

โดยแนวทางหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากคือ การรักษาโรคติดเชื้อด้วย แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟจ (phage) โดยการค้นหาแบคเทอริโอเฟจที่มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคชนิดนั้นเพื่อนามาใช้แทนยาปฏิชีวนะ เรียกวิธีการรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคเทอริโอเฟจนี้ว่า phage therapy ซึ่งมีข้อดีเหนือกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอยู่หลายประการ คือ การหาแบคเทอริโอเฟจจากธรรมชาติ หาได้ง่าย ใช้เวลาไม่นานเมื่อเทียบกับการคิดค้นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์ (host) หรือแบคทีเรียค่อนข้างสูง จึงทำลายเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น ไม่ออกฤทธิ์กว้างเช่นที่พบในยาปฏิชีวนะซึ่งอาจมีผลข้างเคียงกับ normal flora ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายคนและสัตว์ และการใช้ แบคเทอริโอเฟจค่อนข้างปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อแบคทีเรียเป้าหมายถูกกำจัดหรือทำลายให้หมดไป แบคเทอริโอเฟจนั้นก็จะกลายเป็น inert particles ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อมใดๆ (นริศรา ปัดภัย, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหาร และเพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ

2. เพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารตึกพระเทพฯ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ แล้วนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาแยกแบคเทอริโอเฟจ จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย

2.งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อที่คาดว่า *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง และมีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารหรือน้ำดื่ม โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* จะอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและยังอาศัยอยู่ในสัตว์ เช่น สุกร โค กระบือ เป็นต้น ดังนั้น เชื้อจะถูกขับผ่านออกมากับอุจจาระสัตว์ได้ ถ้าสัตว์ถ่ายอุจจาระลงดินหรือแหล่งน้ำซึ่งใช้เป็นแหล่งเพาะปลูกหรืออุปโภค บริโภค เชื้อที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตและน้ำดื่มจะเข้าสู่ร่างกายคนโดยการรับประทาน นอกจากนี้ เชื้อยังสามารถติดต่อจากผู้ป่วยสู่คนอื่นได้โดยตรง (ดารณี นุตาลัย, 2561)

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ *Escherichia coli*

จีนัส *Escherichia* เป็นจีนัสที่อยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซี (Family Enterobacteriaceae) เชื้อ *E. coli* เป็น type species ของจีนัสนี้ ลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อน ขนาด 1.1 - 1.5 x 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาหรือไม่เคลื่อนที่ เป็นพวก facultatively anaerobic บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 - 3 มิลลิเมตร ในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MacConkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพูขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการหมักแลกโตส และ โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะเมื่อเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือดบางสายพันธุ์เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบบีตาฮีโมไลซิส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15 - 45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญ ได้แก่ การทดสอบ IMViC ได้ผล + + - - คือ สามารถใช้ทริปโทเฟนให้อินโดล และให้ผลบวกกับเมทิลเรด แต่ไม่สร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินัล (acetyl methyl carbinol) และไม่ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังมีไลซีนดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) และสามารถใช้อะซีเตต (acetate) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (นงลักษณ์, 2544 : Brenner, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 เชื้อแบคทีเรีย E. coli

ที่มา: https://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/top-10-germs-smartphone2.htm

(สืบค้นวันที่ 23 พฤษภาคม 2562)

2.1.2 การทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Escherichia coli*

โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* จะอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและยังอาศัยอยู่ในสัตว์ เช่น สุกร โค กระบือ เป็นต้นดังนั้น เชื้อจะถูกขับผ่านออกมากับอุจจาระสัตว์ได้ ถ้าสัตว์ถ่ายอุจจาระลงดินหรือแหล่งน้ำ ซึ่งใช้เป็นแหล่งเพาะปลูกหรืออุปโภค บริโภค เชื้อที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตและน้ำดื่มจะเข้าสู่ร่างกายคน โดยการรับประทาน นอกจากนี้ เชื้อยังสามารถติดต่อจากผู้ป่วย สู่คนอื่นได้โดยตรง (person to person contact) อาการรุนแรงต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายของแต่ละคนที่ได้รับเชื้อ ปัจจัยในการก่อโรคและปริมาณของเชื้อที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย

2.1.2.1 ท้องร่วง (Gastroenteritis)

- กลุ่ม Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร
- กลุ่ม Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร
- กลุ่ม Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร
- กลุ่ม Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร
- กลุ่ม Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) ทำให้เกิดการรวมตัวของเยื่อบุเซลล์ลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 ทางเดินปัสสาวะอักเสบเนื่องจาก *Escherichia coli*

กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ ซีโรไทป์ 1, 2, 4, 6, 7, 9, 15, 16, 18 และ 75 สร้าง ฮีโมไลซิน เกาะติดเยื่อบุผิวทางเดินปัสสาวะ ผู้หญิงมีโอกาสเป็นมากกว่าผู้ชาย ทำให้เกิดโรคกระเพาปัสสาวะอักเสบ ภาวะไตและกรวยไตอักเสบ

2.1.2.3 เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก

สาเหตุของโรคในเด็กทารกอายุ 1 เดือนแรก เกิดมากที่สุดจากเชื้อ *E. coli* เกิดจากสายพันธุ์ K1 มากที่สุด และ streptococci group B โดยรับมาจากมารดา

2.2 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophages)

2.2.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรีย ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Frederick W. Twort นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษในปี ค.ศ. 1915 โดยได้อธิบายการติดเชื้อของแบคทีเรีย *Staphylococcus* ว่า ตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรียสามารถผ่านกระดาษกรองได้เหมือนกับไวรัสของสัตว์และไวรัสของพืชแต่ไม่ได้รับการยอมรับจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1917 Felix d'Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนนาดา ซึ่งทำงานอยู่ใน Pasteur Institute ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับเชื้อ *Shigella aysenteriae* ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคบิด พบว่าเกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Twort โดย d'Herelle ได้ทำการแยกเชื้อ *S. dysenteriae* จากอุจจาระและนำอุจาระไปกรอง แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวที่กรองได้ผสมกับอาหารที่มีเชื้อ *S. dysenteriae* จากนั้นบ่มไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อ จึงได้สรุปว่าส่วนที่ผ่านกระดาษกรองได้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และให้ความหมายของ แบคเทอริโอเฟจ ว่า "ตัวกินแบคทีเรีย" (Adams, 1958)

2.2.2 คุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจเป็นอนุภาคที่มีโปรตีนแคปซิดห่อหุ้มสารพันธุกรรม โดยสารพันธุกรรมเป็นได้ทั้ง double-stranded DNA, single-stranded DNA, double-stranded RNA หรือ single - stranded RNA ซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และวงกลม (circular) แคปซิดของแบคเทอริโอเฟจมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น hexagonal ขนาดเล็ก filamentous หรือรูปร่างซับซ้อนที่ประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง แบคเทอริโอเฟจจะไม่สามารถเพิ่มจานวณได้เมื่ออยู่เป็นอิสระจึงจัดเป็นอินตราเซลลูล่าพาราไซต์ (intracellular parasites) จะเพิ่มจำนวนได้ต้องอาศัยเจ้าบ้านในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ เพื่อประกอบเป็นอนุภาคใหม่ แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูง เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้โดยไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อของโฮสต์และแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในโฮสต์ (Sandeep, 2006) สามารถคัดเลือกและแยกแบคเทอริโอเฟจได้จากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น น้ำเสีย (Weber - Dabrowska et al., 2003)

2.2.3 ชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ อาศัยลักษณะรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และชนิดของกรดนิวคลีอิก โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามวิธีของ Bradley ซึ่งใช้เป็นพื้นฐานของการจัดหมวดหมู่ของแบคเทอริโอเฟจในปัจจุบัน (Bradley, 1967) ดังนี้ คือ

กลุ่ม A ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีส่วนหาง (tail) ที่มีชีทที่ยืดหดได้ห่อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่พบระยางค์ (appendage) เป็นโครงสร้างส่วนปลาย เช่น ใยหาง (tail fiber) มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ อาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยต่อไปอีกตามลักษณะรูปร่าง

กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีชีทห่อหุ้มจึงไม่สามารถหดตัวได้ แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีระยางค์ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีชีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีระยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคพโซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคพซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

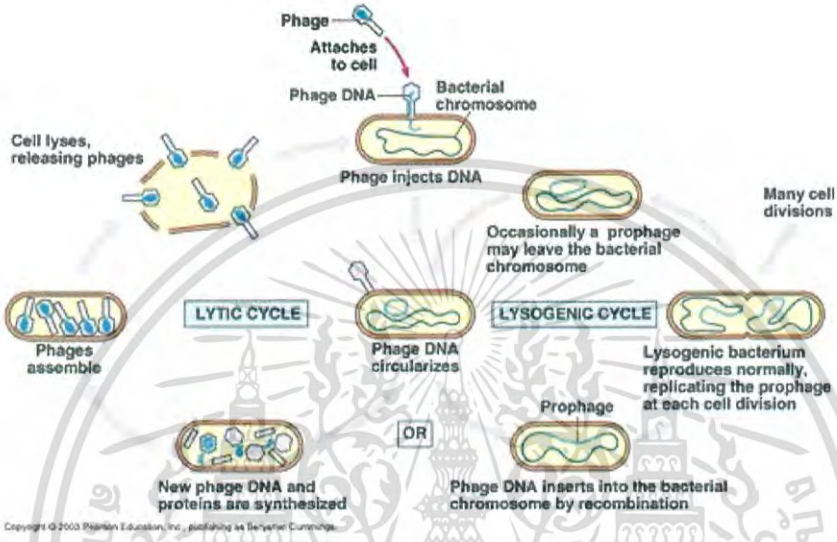
กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคพโซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวที่มีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้ยังพบแบคเทอริโอเฟจ กลุ่ม G ลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน มี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ แต่ไม่พบส่วนของแคพซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เช่น แบคเทอริโอเฟจ MV-L2 โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจที่พบมีรูปร่างอยู่ในกลุ่ม A, B และ C ในการจัดหมวดหมู่ (classification) ของไวรัสมีการอธิบายน้อยกว่าในแบคทีเรีย เพราะขาดความรู้เบื้องต้น เช่น แหล่งกำเนิด วิวัฒนาการ โดยทั่วไปแบ่งไวรัสออกเป็นกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ไวรัสสัตว์ ไวรัสพืช และไวรัสแบคทีเรีย ซึ่งใช้ความแตกต่างของแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแบ่งกลุ่ม อย่างไรก็ตามไม่สามารถจัดหมวดหมู่และตั้งชื่อ (nomenclature) ให้เป็นระบบเดียวกันได้จนกระทั่งคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัส (International committee fortaxonomy of viruses, ICTV) ได้พัฒนารูปแบบการจัดหมวดหมู่และแบ่งไวรัสเป็น 122 Families สำหรับชื่อ Family ให้ลงท้ายด้วยคำว่า – viridae เช่น Family Poxviridae ชื่อ Subfamily ให้ลงท้ายด้วยคำว่า - virinae เช่น Subfamily Chorodopoxvirinae และชื่อ Genus ให้ลงท้ายด้วยคำว่า -*virus* เช่น Genus *Orthopoxvirus* (Harley and Klein, 1993)



ภาพที่ 2.2 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจแบบ lytic (ซ้าย) และ lysogenic (ขวา)

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

(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)

2.2.4 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการบุกรุกเข้าเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านของแบคเทอริโอเฟจ (Assay of Viral Infectivity)

สามารถตรวจสอบได้จากการติดเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านซึ่งมักจะใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น 2 ชั้น (double agar layer method) หรือ plaque assay เพื่อดูการเกิดพลาค โดยลักษณะพลาคที่เกิดขึ้นมี 2 ลักษณะ (Cappuccino and Sherman, 2001) ได้แก่

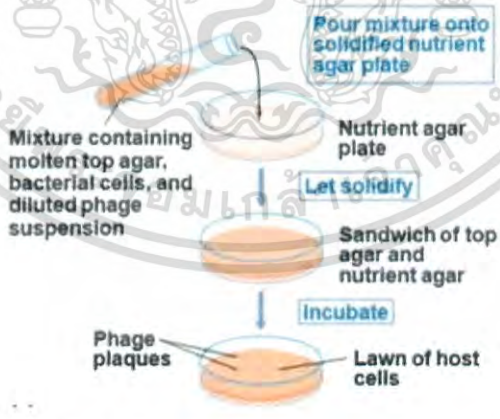
1) พลาคใส (clear plaque) พลาคที่ปรากฏจะมีลักษณะใส เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลติค แบคเทอริโอเฟจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลาย และตายจึงเห็นเป็นวงใส แบคเทอริโอเฟจที่ทำให้เกิดพลาคในลักษณะนี้ คือ ไวรูเรนท์เฟจหรือไลติคเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) พลาคขุ่น (turbid plaque) พลาคที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น แบคเทอริโอเฟจที่ทำให้ พลาคมีลักษณะขุ่น คือ เทมเพอเรตเฟจ โดยเริ่มแรกแบคเทอริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบไลติคจนถึงระยะหนึ่ง แบคเทอริโอเฟจบางส่วนจะเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลโสเจนิค ซึ่งแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อโดยแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้ จะไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาค ทำให้เห็นพลาคมีลักษณะขุ่น

2.2.4.1 การทำ plaque assay

แบคเทอริโอเฟจสามารถสังเกตได้จากบริเวณใสหรือพลาค (plaque) ที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า การทำ plaque assay ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ 2 วิธี คือวิธี double agar layer จะนิยมใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจมากกว่าวิธี spot test โดยวิธีนี้มีการผสมแบคเทอริโอเฟจ แบคทีเรียเจ้าบ้าน และ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (top agar) ในหลอดทดลอง ต่อมาเทส่วนผสมที่ได้นี้ทับซ้อนบนอาหารวุ้นที่เป็นฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้ววนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วรอจนวุ้นแข็งตัวแล้ว บ่มโดยคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้ามคืน สังเกตพลาคที่เกิดขึ้น ข้อดีของวิธีนี้จะทำให้เกิดการผสมได้ดีกว่า มีความสม่ำเสมอมากกว่าการใช้วิธีที่ไม่ได้ซ้อนทับของวุ้น ขนาดของพลาคจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีอัตราของการแพร่กระจายของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่มากขึ้น ในชั้นบนของอาหารชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว การแพร่กระจายของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากวุ้นที่เทซ้อนทับมีความเข้มข้นต่ำกว่าวุ้นที่เป็นฐาน ในการตรวจนับและคำนวณจำนวนของแบคเทอริโอเฟจที่มีอยู่ในตัวอย่างแสดงในหน่วย PFU ต่อมิลลิลิตร วิธีนี้มีประโยชน์อย่างมากในการทำให้แบคเทอริโอเฟจมีความบริสุทธิ์



รูปที่ 2.3 วิธี double layer หรือ overlay agar method

ที่มา: https://image.slidesharecdn.com/chapter52537-141218104348-conversion-gate01/95/chapter52537-microbiology-8th-edition-22-638.jpg?cb=1418899700 (สืบค้นวันที่ 23 พฤษภาคม 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.2 วิธี spot test

จะเป็นการทดสอบว่า ตัวอย่างนั้นมีแบคเทอริโอเฟจ ที่สามารถบุกรุกแบคทีเรียที่มีอยู่ได้หรือไม่ โดยนำแบคทีเรียเจ้าบ้านใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.6 ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวแข็งตัว นำตัวอย่างของเหลวที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจมาหยด หรือจุดลงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถตรวจสอบได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง เป็นการประหยัดเวลาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.5. การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (Purification)

ทำให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากการปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกสารอื่นๆออกจากแบคเทอริโอเฟจได้ และนำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจมาทำการกรอง โดยใช้เข็มฉีดยาที่ฆ่าเชื้อแล้วและกระดาษกรองรูขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถผ่านกระดาษกรองได้

2.2.6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) ในด้านต่าง ๆ

ปัจจุบันได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านพันธุวิศวกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรม การเกษตรและการแพทย์ ดังต่อไปนี้

1. Bacteria typing / detection detection เป็นการใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในจีนัส (Genus) และสปีชีส์ (Species) เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจเป็นประโยชน์ทางด้านตรวจวินิจฉัยทางระบาดวิทยา
2. Phage biocontrol / bioprocessing ด้านการเกษตร มีการนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ควบคุมแบคทีเรียหรือเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อลดการใช้สารเคมี ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ลดปริมาณจุลินทรีย์ในผักผลไม้ และในอาหารที่ผ่านกระบวนการปรุงสุกน้อย เพื่อไม่ให้เสียรสชาติและกลิ่นของอาหาร
3. Phage therapy เป็นการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อประโยชน์ ด้านการรักษามีทั้งการใช้แบคเทอริโอเฟจทั้งตัว (Whole phage) หรือ การใช้ผลิตภัณฑ์จากแบคเทอริโอเฟจที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Endolysin) ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันนี้ยังไม่มีการอนุมัติใช้แบคเทอริโอเฟจทั้งตัว และ endolysin สำหรับการรักษามนุษย์ในยุโรปหรือสหรัฐอเมริกา

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีการติดเชื้อและเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียอย่างจำเพาะเท่านั้น เมื่อเข้าสู่วงจรชีวิตช่วง Lytic phage แบคเทอริโอเฟจจะสร้าง endolysin ขึ้นเพื่อทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียตาย ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจสำหรับการรักษา (Phage therapy) เพื่อการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ นอกจากนี้นับตั้งแต่มีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจมากกว่า 100 ปี รวมทั้งความก้าวหน้าทางด้านชีววิทยาโมเลกุลและการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจช่วยให้ปัจจุบัน สามารถนำ แบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ประโยชน์มากขึ้นทั้งงานด้านพันธุวิศวกรรม ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านอุตสาหกรรมการเกษตร และทางการแพทย์ (อภิญญา นามสาย, 2560)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Claydong et al. (2001) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำเสียในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งแบคเทอริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ Bacteriophage B, Bacteriophage C และ B-specific Bacteriophages และใช้ *Escherichia coli* K12 เป็นโอสต์

Bartłomiej et al. (2017) ได้ทำการศึกษาแบคเทอรีโอเฟจ โดยใช้ Bacteriophage sall_v01 เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovars หลายชนิดที่แยกได้จากน้ำเสีย การย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียของ bacteriophage sall_v01 พบว่าประสิทธิภาพในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ในค่าmultiplicity of infection= 1 โดยมี latent periods = 25 นาที และ burst size approx 107 ± 8 virion ใหม่ต่อเซลล์หลังจาก 45 นาทีที่ 37°C การรักษาด้วย bacteriophage sall_v01 ในการทดลองทำให้ปริมาณ *Salmonella* Enteritidis ในของเสียจากหมูลดลง 3.8 log CFU / mL ผลการศึกษาวิจัยนี้ อาจถือได้ว่า bacteriophage sall_v01 เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการลดการปนเปื้อน *Salmonella* Enteritidis ในการเกษตรและการผลิตสัตว์

Feng et al. (1991) ออกแบบตัวตรวจจับขนาด 18 ลำดับเบส ที่มีความจำเพาะกับยีน *uidA* ของเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งสามารถตรวจจับไอโซเลทเชื้อ *Escherichia coli* ได้ 112 ไอโซเลท จาก 116 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วยเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ GUD 31 ไอโซเลท และ Enterohemorrhagic *Escherichia coli* ซีโรไทป์ O157:H7 12 ไอโซเลท การใช้เทคนิคSouthern hybridization กับทุกไอโซเลทที่นำมาตรวจสอบพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส ที่ได้จากการตัดยีน *uidA* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI แสดงว่า *เชื้อ Escherichia coli* ส่วนใหญ่ รวมทั้ง *Escherichia coli* ซีโรไทป์ O157:H7 มีลำดับเบสของยีน *uidA*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fricker et al. (1994) ใช้วิธีพีซีอาร์ในการระบุชนิด (identification) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเชื้อโคลิฟอร์ม หลังจากการปล่อยให้เชื้อเจริญข้ามคืนด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด (multiplex PCR) ปัจจุบันไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ใช้ตรวจโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญอยู่บนเมมเบรน (membranes) ทำให้ประหยัดเวลาและเป็นประโยชน์ในการควบคุมโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตน้ำ และปกป้องผู้บริโภคจากการปนเปื้อนของเชื้อฟีคอลโคลิฟอร์มที่สามารถทำให้เกิดโรคได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish, HYCON Plastics)
2. หลอดทดลอง (Test Tube, PYREX®, Maxico)
3. ปิเปตแก้ว (Pipette, PRECICOLOR HBG, Germany) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปต (Micropipette, GILSON, France) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
5. ทิป (Tip, ExtraGene Inc., Taiwan) ขนาด 10, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
6. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube, Becton Dickinson, USA)
7. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube, ExtraGene Inc., Taiwan)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask, PYREX, USA)
9. บีกเกอร์ (Beaker, PYREX, Germany)
10. ขวดแก้ว (Duran Bottle, SCHOTT DURAN, Germany)
11. ตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร (Minisart®, Sartorius, Germany)
12. หลอดฉีดยา (Syringe, NIPRO, Thailand)
13. สไลด์ (Slide, SAIL, China)
14. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass, HAD, Union Science)
15. กระบอกตวง (Cylinder, NALGENE®,USA)
16. ไมโครมิเตอร์ (Micrometer, Nikon, Japan)
17. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
18. แท่งแก้วงอ (Spreader)
19. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
20. ช้อนตักสาร (Spatula)
21. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator, memmert, The Novacel® Solution for LASER Fiber & LASER CO_2)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker, Lab. Companion, USA)
3. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, TOMY, Japan)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge, Eppendorf, Germany)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow, HOLTEN, HOLTEN LAMINAR AIR A/S)
6. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, ARC120, Adventurer, USA)
7. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance, BP 2215, Sartorius, Germany)
8. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, UB-10, Denver Instrument, Sartorius, Germany)
9. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, Contherm, Scientific Ltd., New Zealand)
10. ตู้เย็น (Refrigerator, NP-BT264, Panasonic, Japan)
11. เครื่องผสม (Vortex Mixer, G560E, Scientific Industries, USA)
12. กล้องจุลทรรศน์ (Optical Microscopes, CH30RF200, OLYMPUS OPTICAL Co., Ltd, Japan)
13. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper, SONIC, Thailand)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, Fisher Chemical, USA)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder, HIMEDIA, India)
3. ทริปโตน (Tryptone Type-1, HIMEDIA, India)
4. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
5. สารละลาย Saline-Magnesium (SM Solution)
6. ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl, Vivantis, USA)
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (KH_2PO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (Na_2HPO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. เจลาติน (Gelatine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
11. สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
12. น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram Iodine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
13. สีซาฟรานิน (Safranin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
14. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2, ศิริบัญชา, ประเทศไทย)
15. วาสลีน (Vaseline, Vaseline® Jelly, Univernity)
16. สีนิโกรซิน (Nigrosin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
17. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (40% KOH)
18. Alpha Naphthol Solution
19. Kovac's Reagent
20. Methyl Red Solution
21. กลีเซอรอล (Glycerol, CARLO ERBA reagents, France)
22. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุรากรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
23. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar, HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Methyl red และ Voges-Proskaure Medium (MR-VP Medium, HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB, HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar (HIMEDIA, India) (ภาคผนวก ก)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB) (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำเสียหลังโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10 ตัวอย่างได้แก่ WP1 , WP2 , WP3 , WP4 , WP5 , WP6 , WP7 ,WP8 ,WP9 ,WP10

3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาลาดกระบัง โดยใช้หลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดตัวอย่างน้ำสกปรกจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 วิธีการทดลอง

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

นำตัวอย่างน้ำเสียมา cross streak ลงบนผิวหน้าของอาหาร EMB agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีสีเข้ม ตรงกลางสีเกือบดำ ที่ผิวมีสีเขียวเหลือบแสงคล้ายรอยตัดของชิ้นโลหะ เรียกว่า เงาโลหะ (metallic Sheen) (ชุติรัตน์ อัศวเทพ,2546) และเลือกโคโลนีที่มีลักษณะข้างต้นมา streak บนอาหารแข็ง Nutrient agar slant (วิธี subculture) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางเคมี

3.6.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.2.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant มาผสมกับหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น ร้อยละ 3 บนสไลด์หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จะเกิดฟองอากาศ (Buchanan et al. ; Holt et al., 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.2 การทดสอบการสร้าง Indole (Indole Test)

ทดสอบอินโดล (Indole test) โดยหยดน้ำยา Kovac's regent 2 - 3 หยด ลงไปในอาหาร tryptone broth ที่เพาะเชื้อไว้นาน 24 ชั่วโมง เขย่าหลอดทดลองเบาๆ2-3ครั้ง สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของอาหาร ถ้าเกิดชั้นสีแดงลอยอยู่ที่ผิวของอาหาร แสดงว่าผลเป็นบวกเชื้อนั้นมีความสามารถสร้างสารอินโดลได้ถ้าไม่เกิดวงแหวนสีแดง อ่านผลเป็นลบ (Holt et al, 2546)

3.6.2.3 การทดสอบ methyl red (MR test) และ Voges-Proskaure

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากอาหารแข็ง NA slant ลงในหลอดที่มี MR-VP broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่า 2 หลอด หลอดละเท่าๆ กัน หลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยหยดสารทดสอบ Methyl red 2 - 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ถ้าสารทดสอบ Methyl red ยังคงมีสีแดงเหมือนเดิม อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าสีของสารทดสอบMethyl red เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นลบ หลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges-Proskaure โดยหยดสาร Alpha naphthol ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ40 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงอ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีอ่านผลเป็นลบ

3.6.2.4 การทดสอบ citrate test

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาStreakบนผิว Simmons Citrate agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37องสเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่า เชื้อนั้นสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีอ่านผลเป็นลบ (Holt et al, 2546)

3.6.3 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.3.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนี

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* จากอาหารแข็ง EMB ที่มีลักษณะโคโลนี กลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีและไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ ลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar หรือ NA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E.coli บนอาหารแข็ง NA จะเป็นโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีครีมหรือ สีขาวขุ่น นูนต่ำ วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Prakash, 2014)

3.6.3.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ในอาหารเหลว NB ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลงบริเวณตรงกลางของแผ่นปิดสไลด์นำวาสลีนทาบริเวณมุมของแผ่นปิดสไลด์ 4 มุมจากนั้นนำสไลด์หลุมมาปิดแผ่นปิดสไลด์ที่มีหยดน้ำที่มีเชื้อ *E.coli* โดยให้บริเวณที่เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ตรงกลางระหว่างหลุมตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (กัญจนา และคณะ, 2544)

3.6.3.3 การทดสอบการติดสีแกรม

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ gram strain โดยหยดน้ำปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากอาหารแข็ง NA มาเกลี่ย (smear) ลงบนหยดน้ำ รอจนแห้งแล้วนำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนซ้ำอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ 1 นาที หยดเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงบนรอยเกลี่ยเชื้อทิ้งไว้ 10 - 15 วินาที ล้างเอทานอลออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ยเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีซาฟรานินออกด้วยน้ำรอจนแห้งส่องดูการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (กนกรัตน์ และคณะ, 2558)

3.6.3.4 การวัดขนาดเซลล์

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ negative strain โดยใช้สีนิโกรซิน (nigrosin) การย้อมแบคทีเรียลักษณะนี้ แบคทีเรียจะไม่ติดสี แต่ส่วนพื้นที่รอบเซลล์หรือพื้นภาพจะติดสี โดยหยดสีและน้ำลงบริเวณปลายด้านหนึ่งของสไลด์แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อใส่หยดน้ำ ใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นมาวางแตะหยดทั้งสองจากนั้นลากสไลด์ช้า ๆ ตามแนวยาวให้ส่วนผสมแผ่ออกรอจนแห้งส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.5 การทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant มาย้อมสีสปอร์ การย้อมสปอร์ทำได้โดยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของสีเข้าไปในสปอร์ ซึ่งอาจใช้ความร้อนช่วย เริ่มจากเขี่ยเชื้อมาสเมียร์ลงบนสไลด์ นำไปผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ ย้อมสีโดยใช้สี malachite green ลนไฟประมาณ 5 นาที ทิ้งไว้จนเย็นแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสี safranin ลงไป 30 - 60 วินาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นรอให้แห้งส่องดูการติดสีของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (Holt et al, 2546)

3.6.3.6 การทดสอบความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อดูความขุ่นของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.6.4 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหาร NB ที่เลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับกลีเซอรอลที่นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้ว ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายกลีเซอรอลเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ และปริมาตรสารละลายรวม 1 มิลลิลิตร เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ชุติรัตน์ อัศวเทพ, 2546)

3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เริ่มต้น

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* จำนวน 1 โคโลนี จากอาหารแข็ง LB ที่บ่มไว้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Luria - Bertani (LB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.6 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.6.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ P19, P20 และ P21 เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดจากทั้งหมด 20 ไอโซเลท ความขุ่นบ่งบอกถึงความหนาแน่นทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว โดยการวัดใช้หลักการฉายแสงผ่าน suspension ของแบคทีเรีย แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียดูดเอาไว้ ปริมาณแสงที่ดูดเอาไว้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (ดวงพร, 2545)

3.6.6.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ

ดูดตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงหลอดละเท่า ๆ กัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

3.6.6.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียโดยมีการเพิ่มปริมาณ

นำส่วนใสที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจตามข้อ 3.6.6.2 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ลงไปปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

3.6.6.4 วิธีการตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่เตรียมดังข้อ 3.6.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) และทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ วนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผสมกันอีกครั้ง จากนั้นรอให้วุ้นแข็งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (plaque) บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.6.5 วิธีการทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยการ Picking

ใช้ทิปสีเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยบริเวณพลาคใสจากจานอาหารวุ้นสองชั้น ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการ picking โดยทำวิธีการเดียวกันนี้ จำนวนทั้งหมด 3 รอบ เพื่อให้ได้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์

3.6.6.6 วิธีการชะและเพิ่มปริมาณของตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี phage lysate จากจานอาหารวุ้นสองชั้น

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวนจานอาหารวุ้นสองชั้นทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อนำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ ลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่า (10 - fold serial dilution) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS แล้วนำไปทำ plaque assay ที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ นับจำนวนแบคเทอริโอเฟจและรายงานผลในหน่วย plaque forming unit (PFU) /ml ทำการชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SM โดยทำตามวิธีเดียวกันนี้ เก็บส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจรวมกันในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.6.7 วิธีการทำ spot test

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* เจ้าบ้าน 20 ไอโซเลท ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 ที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่ม 18 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB แข็งตัว นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดหรือจุด (spot) ลงบนผิวหน้าอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียเจ้าบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำเสีย เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เนื่องจาก เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารหรือน้ำดื่ม (ดารณี นุตาลัย, 2561) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *E. coli* จากน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อนำมาแยกแบคทีเรีย จำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้าง indole ring การทดสอบ MR-VP และการใช้ซิเทรต จำนวน 60 ไอโซเลท จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร คัดเลือกไอโซเลทที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูง มาจำนวน 20 ไอโซเลท และนำมาดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะและขนาดของโคโลนี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ความต้องการออกซิเจน

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

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย ทั้ง 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง ได้แก่ WP1 , WP2 , WP3 , WP4 , WP5 , WP6 , WP7 ,WP8 ,WP9 และ WP10 มีลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* คือ โคโลนีที่มีสีเข้ม ตรงกลางสีเกือบดำ ที่ผิวมีสีเขียวเหลือบแสงคล้ายรอยตัดของชิ้นโลหะ เรียกว่า เงาโลหะ (metallic Sheen) (ชุติรัตน์ อัศวเทพ, 2546) ดังรูปที่ 4.1 จากการคัดแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย ได้คัดเลือกโคโลนีมาจำนวนทั้งหมด 60 ไอโซเลท (1 โคโลนี คือ 1 ไอโซเลท) แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองข้างต้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีลักษณะโคโลนีที่มีสีเข้มตรงกลางสีเกือบดำ ที่ผิวมีสีเขียวเหลือบแสงคล้ายรอยตัดของชิ้นโลหะ เรียกว่า เงาโลหะ (metallic Sheen) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae นิยมใช้คุณสมบัติการ หมักน้ำตาล ที่แตกต่างกันของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ น้ำตาล lactose (Gross and Rowe, 1976)

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* เจริญบนอาหารแข็ง EMB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP1	P1, P2, P30, P4
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP2	P5, P6, P7, P8
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP3	P9, P10, P11, P12
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP4	P13, P14, P15, P16, P17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP5	P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP6	P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP7	P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP8	P40, P41, P42, P43, P44, P45, P46
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP9	P47, P48, P49, P50, P51, P52
ท่อน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ	WP10	P53, P54, P55, P56, P57, P58, P59, P60

4.1.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Escherichia coli*

4.1.2.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant เมื่อนำมาผสมกับหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น ร้อยละ 3 พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจำนวน 59 ไอโซเลท เกิดฟองแก๊สได้ ยกเว้นไอโซเลทที่ 10 ซึ่งแก๊สที่เกิดขึ้น คือ แก๊สออกซิเจน (O_2) เร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ผลผลิต คือ น้ำ (H_2O) และ แก๊สออกซิเจน (O_2) (Buchanan et al, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.2 การทดสอบการสังเคราะห์อินโดล (indole ring) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

จากการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อินโดล โดยนำเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *E.coli* จำนวน 60 ไอโซเลท จากหลอดอาหารลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในหลอดสารละลาย Tryptone water ร้อยละ 1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยด Kovac's reagent 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียบนอาหารแข็ง EMB รหัสไอโซเลท ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29,P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43, P44, P45,P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54, P55, P56, P57, P58, P59 และ P60 เกิดวงแหวนสีแดงบนผิวหน้าสารละลาย ดังรูปที่ 4.2 (A) ซึ่งแปลผลเป็น ผลบวก (+) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* รหัสไอโซเลท P10 เกิดวงแหวนสีเหลืองบนผิวหน้าสารละลาย ดังรูปที่ 4.2 (B) ซึ่งแปลผลเป็น ผลลบ (-)

จากผลการทดลองการทดสอบความสามารถในการสร้างวงแหวนอินโดลของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* ข้างต้น ไอโซเลทรหัสที่เกิดวงแหวนสีแดง คือเชื้อแบคทีเรียนั้น มีความสามารถในการสร้าง Indole ได้ ส่วนไอโซเลทรหัสที่เกิดวงแหวนสีเหลือง คือ เชื้อแบคทีเรียไม่มีความสามารถในการสร้าง Indoleได้ (Buchanan et al., 2546)

A B

รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบการสังเคราะห์อินโดลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* A : เชื้อแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (ผลบวก) , B : เชื้อแบคทีเรียไม่ สามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (ผลลบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.3 การทดสอบ Methyl red และ Voges - Proskaure ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

จากการทดสอบ Methyl red และ Voges - Proskaure ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* จำนวน 60 ไอโซเลท โดยการใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อจาก NA slant ใส่ลงในหลอดที่มี MR - VP broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำมาแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่า 2 หลอด หลอดละเท่า ๆ กัน โดยหลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยหยดสารทดสอบ Methyl red 2 - 3 หยดเขย่าให้เข้ากัน พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียบนอาหารแข็งEMB รหัสไอโซเลท P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54, P55, P56, P57, P58, P59 และ P60 เปลี่ยนเป็นสีแดง ดังรูปที่ 4.3 (A) ซึ่งแปลผล เป็นบวก (+) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* รหัสไอโซเลท P10 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี ดังรูปที่ 4.3 (B) ซึ่งแปลผลเป็นลบ (-) การทดสอบ Methyl red คือการดูว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นมีความสามารถสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณที่มากหรือน้อย เชื้อที่สร้างกรดได้มากจะทำให้พีเอชลดลง ต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ ของ Methyl red เป็นสีแดงได้ และหลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges - Proskaure พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทุกรหัสไอโซเลท ไม่เปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งแปลผล เป็นลบ (-) การทดสอบ Voges - Proskaure เพื่อดูว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นมีความสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสแล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นสาร acetyl methyl carbinol ได้ (Buchanan et al., 2546)

A B

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

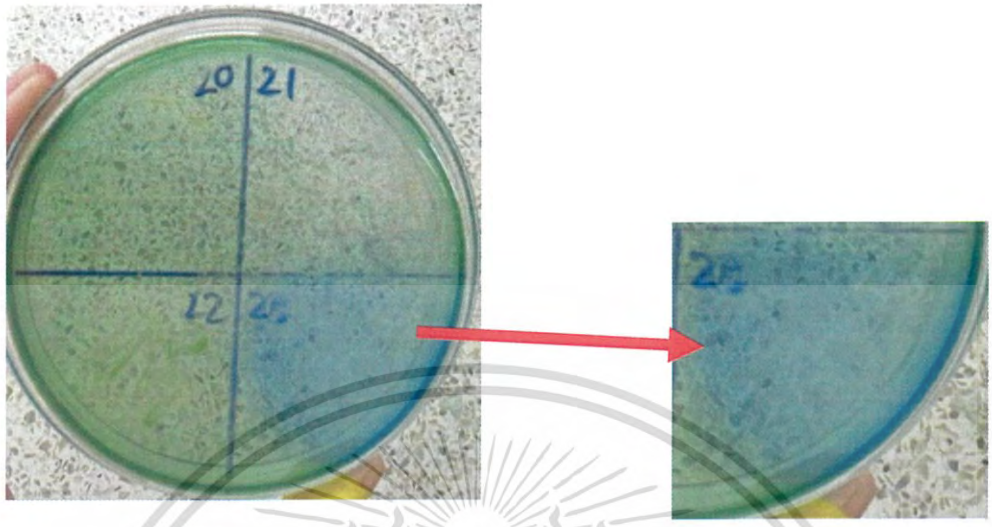
รูปที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบ Voges - Proskaure ให้ผลเป็นลบ (-)

4.1.2.4 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเทรตของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Escherichia coli*

จากการทดสอบการใช้ซิเทรตของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* จำนวน 60 ไอโซเลท โดยการใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อจาก NA slant ไป streak บนอาหาร Simmons citrate agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียบนอาหารแข็ง EMB รหัสไอโซเลท P10 มีเชื้อเกิดขึ้นตามรอยขีดบนจานอาหาร Simmons citrate agar และ เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร Simmons citrate agar เป็นสีน้ำเงิน ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งแปลผลเป็นบวก (+) และ เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* รหัสไอโซเลท P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54, P55, P56, P57, P58, P59 และ P60 มีเชื้อเกิดขึ้นตามรอยขีดบนจานอาหาร Simmons citrate agar และ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร Simmons citrate agar ดังรูปที่ 4.6 ซึ่งแปลผลเป็นลบ (-)

การทดสอบการใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนได้หรือไม่ (Buchanan et al., 2546) จากผลการทดลอง พบว่า ไอโซเลทที่อาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียว เป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากอาหารมีสภาพกลายเป็นด่าง แสดงว่า เชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Holt et al., 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นลบ (+)

รูปที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบการใช้ซิเทรต ให้ผลเป็นบวก (-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

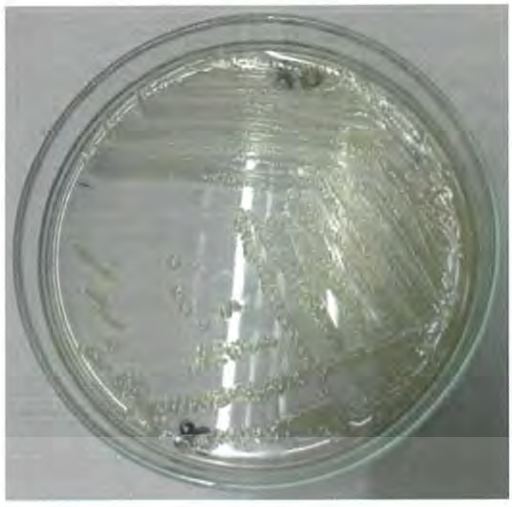
ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จำนวน 20 ไอโซเลท จากจำนวน 59 ไอโซเลท เพื่อนำไปทำการทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ทั้ง 59 ไอโซเลท ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เพื่อคัดเลือกโลนีที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด ดังตารางที่ 1 (ภาคผนวก ข) เนื่องจากความขุ่นบ่งบอกถึงความหนาแน่นทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว โดยการวัดใช้หลักการฉายแสงผ่าน suspension ของแบคทีเรีย แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียดูดเอาไว้ ปริมาณแสงที่ดูดเอาไว้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (ดวงพร, 2545) ได้ 20 ไอโซเลท

4.1.4 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

4.1.4.1 การตรวจดูลักษณะโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 20 ไอโซเลท พบว่าทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีลักษณะเป็นโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีครีมหรือ สีขาวขุ่น นูนต่ำ ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 การวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *E.coli* จำนวน 20 ไอโซเลท ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย 20 ไอโซเลท มีขนาดโคโลนี 1.25 – 1.95 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.4 โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 2 – 3 มิลลิเมตร (นงลักษณ์, 2544) ดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

4.1.4.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว NB ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 20 ไอโซเลท การทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียทั้ง 20 ไอโซเลท สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 ดังตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเคลื่อนที่ได้ เพราะว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีเพอริทริคัสแฟลกเจลลา (peritrichous flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (Brenner, 1984)

4.1.4.3 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ในการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จำนวน 20 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสีย ย้อมติดสีแดงของซาฟรานินทั้ง 20 ไอโซเลท ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 ดังตารางที่ 4.3 จากผลการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ข้างต้น พบว่าเซลล์ติดสีแดงของซาฟรานิน ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อน ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันเกาะที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีชั้นนอกผนังเซลล์บางกว่าด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการย้อมสี เมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์จะไปละลายไขมันทำให้รูเปิดที่ผนังเซลล์กว้างขึ้น ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสี Crystal violet – Iodine Complex หลุดออกมา จึงติดสีแดงของสี Safranin O

รูปที่ 4.8 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เมื่อย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.1.4.4 การทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 ไม่พบการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้ง 20 ไอโซเลท เนื่องจากแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ หรือเอนโดสปอร์ได้ซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์ที่มีความทนทานสูงต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น การขาดแคลนอาหารและน้ำ เป็นการช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะดังกล่าว เมื่อสภาวะเหมาะสมสปอร์จะงอก และเจริญใหม่ (out growth)

4.1.4.5 การวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อ *Escherichia coli*

จากการวัดขนาดเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA slant เมื่อนำมาย้อมสีแบบ negative stain แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้ จากตัวอย่างน้ำเสียจำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 มีขนาดเซลล์กว้าง 1.00 – 1.50 ไมโครเมตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาว 2.00 – 5.00 ไมโครเมตร และมีรูปร่างเป็นท่อน โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีขนาดเซลล์กว้าง 1.1 – 1.5 ไมโครเมตร และยาว 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร มีรูปร่างเป็นท่อน (นงลักษณ์, 2544)

รูปที่ 4.9 การจัดเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เมื่อย้อมสีพื้นหลังด้วยสีนิโกรซิน (nigrosin) แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.1.4.6 การทดสอบความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จากการผลการทดลองความต้องการออกซิเจนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว NB ดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละหลอด พบว่าหลอดอาหารเหลว NB ทั้ง 20 ไอโซเลท ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 ขุ่นทั่วหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และ ไม่มีออกซิเจน หรือเป็นชนิด facultative anaerobe (นงลักษณ์, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท
P1	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P2	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P3	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P4	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P5	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P6	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P7	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P8	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P9	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P10	E	ไม่เกิดฟอง O_2	-	-	-	+
P11	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P12	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P13	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P14	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P15	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P16	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P17	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P18	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P19	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P20	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P21	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท
P22	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P23	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P24	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P25	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P26	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P27	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P28	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P29	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P30	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P31	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P32	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P33	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P34	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P35	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P36	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P37	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P38	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P39	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P40	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P41	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P42	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P43	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P44	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท
P45	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P46	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P47	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P48	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P49	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P50	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P51	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P52	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P53	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P54	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P55	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P56	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P57	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P58	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P59	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P60	E	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-

*การอ่านผล E เกิดโคโลนีลักษณะกลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีและไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB (1)	ขนาด (mm.) และ ลักษณะโคโลนี	การเคลื่อนที่	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ขนาด กxย(μm.) และการจัดเรียงตัวของเซลล์ (2)	ความต้องการออกซิเจน	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท
P1	E	12.5*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P2	E	1.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x3.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P3	E	1.25*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x3.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P4	E	1.45*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P5	E	1.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x2.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P6	E	1.75*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x3.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P7	E	1.75*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.40x2.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P8	E	1.45*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x2.00***	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P9	E	1.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x3.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P11	E	1.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x3.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P12	E	1.45*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.50***	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P13	E	1.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.50x2.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P14	E	1.55*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x2.00***	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P15	E	1.25*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.50***	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

รหัสไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร EMB (1)	ขนาด (mm.) และ ลักษณะโคโลนี	การเคลื่อนที่	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ขนาด กxย(μm.) และการจัดเรียงตัวของเซลล์ (2)	ความต้องการออกซิเจน	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	Indole Test	MR Test	VP Test	การใช้ซิเตรท
P16	E	1.75*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x3.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P17	E	1.95*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.40x2.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P18	E	1.25*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.00x2.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P19	E	1.65*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x3.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P20	E	1.85*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.30x4.00**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-
P21	E	1.65*	เคลื่อนที่	แกรมลบ	ไม่สร้าง	1.20x3.50**	ต้องการ	เกิดฟอง O_2	+	+	-	-

การอ่านผล

(1) การเจริญบนอาหาร EMB Agar
E เกิดโคโลนีลักษณะกลม สีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ มีและไม่มีลักษณะมันวาวสีเขียวคล้ายโลหะ

(2) การเจริญบนอาหารแข็ง NA
* เกิดโคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีครีมหรือ สีขาวขุ่น นูนต่ำ

(3) การจัดเรียงตัวของเซลล์
** อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

*** เซลล์จับกันเป็นคู่

4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงานวิจัยของ Levin and Bull (1996) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความจำเพาะกับแบคเทอริโอเฟจในบริเวณเดียวกัน บริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จะมีโอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจได้น้อย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากน้ำเสียจากโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ และแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมันจากโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจให้มากขึ้น

การศึกษาครั้งนี้ใช้แบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ จำนวนตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจมีจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ P19, P20, และ P21 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดจากทั้งหมด 20 ไอโซเลท ความขุ่นบ่งบอกถึงความหนาแน่นทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว โดยการวัดใช้หลักการฉายแสงผ่าน suspension ของแบคทีเรีย แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียดูดเอาไว้ ปริมาณแสงที่ดูดเอาไว้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (ดวงพร, 2545) โดยทำการแยกแบคเทอริโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณและเพิ่มปริมาณมาจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการรวมสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ จากโรงอาหาร ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ในปริมาณสูง โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ตัวอย่าง โดยใช้หลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดน้ำเสียจำนวน 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี plaque assay

4.2.1. การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ จากข้อ 4.2 นำตัวอย่างน้ำเสียไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนใสผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้การกรองไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E.coli* ด้วยวิธี plaque assay โดยใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน P19, P20 และ P21 ผลการทดลองดังตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 4.4 จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท

ตารางที่ 4.4 ผลการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	ลำดับไอโซเลท	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
P19	A1	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
P20	A2	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
P21	A3	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร

4.2.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียแบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ นำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจของเชื้อ *E.coli* มาทำการเพิ่มปริมาณตามวิธีการในหัวข้อ 3.6.6.3 โดยใช้ส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจจากข้อ 3.6.6.2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับแบคเทอริโอเฟจเจ้าบ้าน P19, P20 และ P21 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที 18 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที 10 นาที แล้วกรองส่วนใสด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay พบว่าตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจแบบเพิ่มปริมาณไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น ทั้ง 3 ไอโซเลท

4.2.3 การทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ picking

จากการในทดลองข้อ 4.2.1 และข้อ 4.2.2 ไม่ตรวจพบอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ เนื่องจากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ที่นำมาใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจมาจากคนละแหล่งกับตัวอย่างน้ำที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จึงอาจจะไม่จำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียรหัสไอโซเลท P19, P20 และ P21 ที่นำมาเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน จึงไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ (Jamal et al., 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงใช้แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยการทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์คือทำการเก็บพลาคใส (picking) จากพลาคเดี่ยวจานวน 60 พลาคที่เกิดขึ้นบนจานอาหารวุ้น 2 ชั้น ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* จากเศษอาหาร โดยทำตามวิธีทำในข้อ 3.6.6.5 โดยใช้ทิปเขี่ยบริเวณพลาคใสจากจานอาหารวุ้นสองชั้น ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่านตัวกรองปลอดเชื้อ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงฆ่าเชื้อแล้ว ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ พบว่า พลาคเดี่ยวที่ขึ้นบนจานอาหารของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* จากเศษอาหาร มีทั้งหมด 60 พลาค สามารถแยกเป็นแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ได้ 2 พลาค คือลาดับที่ 17 และ 27 นำมาเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ โดยวิธี phage lysate ตามวิธีทำในข้อ 3.6.6.6 โดยนำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจมาเจือจางแบบ 10 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วนาไปตรวจหาอนุภาคด้วยวิธี plaque assay นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้น พร้อมรายงานผลในหน่วย PFU/ml ชะเก็บบริเวณที่แบคทีเรียไลซิสด้วยบัฟเฟอร์ SM พบว่า แบคเทอริโอเฟจลำดับที่ 17 และ 27 มีความเข้มข้น 1.055×10^7 PFU/ml และ 1.4925×10^7 PFU/ml ตามลำดับ จากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่แยกได้จากน้ำเสียทั้งหมด 20 ไอโซเลท ด้วยวิธี spot test

4.2.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range)

ทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ ต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยวิธีการ spot test (Raya and Hébert, 2009) โดยใช้เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ 2 หมายเลขคือ หมายเลข 17 และ หมายเลข 27 ที่แยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน มาศึกษาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากน้ำบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ กับแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ จำนวน 20 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 โดยนำแบคทีเรียเจ้าบ้านทุกไอโซเลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่บ่ม 18 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหาร LB แข็งตัว จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 2 หมายเลข ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท P1, P2, P3, P5, P6, P7, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน และไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท P4 และ P8 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ดังตารางที่ 4.5 และพบว่า เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 27 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นจำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P11, P13, P16, P17, P19, P20 และ P21 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน และ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท P6, P12, P14, P15 และ P18 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน ดังตารางที่ 4.6

การทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) ด้วยวิธี spot Test โดยแบคเทอริโอเฟจที่สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านได้จะมีไลซิสโซนเกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น ไอโซเลทแบคทีเรียที่เกิดไลซิสโซนขึ้นบนผิวหน้าอาหารสองชั้น มีความจำเพาะต่อแบคเทอริโอเฟจแต่มีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการทำลายเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านได้ จึงไม่เกิดพลาคใส โดยหากเกิดพลาคลักษณะใส (Clear zone) แสดงว่า แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์เจ้าบ้านชนิดนั้น และ สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านชนิดนั้นได้

ตารางที่ 4.5 Host range ของเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข 17

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	P1	1,2,3	เกิดพลาคขุ่น
17	P2	4,5,6	เกิดพลาคขุ่น
17	P3	7,8,9	เกิดพลาคขุ่น
17	P4	10,11,12	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	P5	13,14,15	เกิดพลาคขุ่น
17	P6	16,17,18	เกิดพลาคขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) Host range เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ หมายเลข 17

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	P7	19,20,21	เกิดพลาคขุ่น
17	P8	22,23,24	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
17	P9	25,26,27	เกิดพลาคขุ่น
17	P11	28,29,30	เกิดพลาคขุ่น
17	P12	31,32,33	เกิดพลาคขุ่น
17	P13	34,35,36	เกิดพลาคขุ่น
17	P14	37,38,39	เกิดพลาคขุ่น
17	P15	40,41,42	เกิดพลาคขุ่น
17	P16	43,44,45	เกิดพลาคขุ่น
17	P17	46,47,48	เกิดพลาคขุ่น
17	P18	49,50,51	เกิดพลาคขุ่น
17	P19	52,53,54	เกิดพลาคขุ่น
17	P20	55,56,57	เกิดพลาคขุ่น
17	P21	58,59,60	เกิดพลาคขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 Host range เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ หมายเลข 27

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	P1	1,2,3	เกิดพลาคขุ่น
27	P2	4,5,6	เกิดพลาคขุ่น
27	P3	7,8,9	เกิดพลาคขุ่น
27	P4	10,11,12	เกิดพลาคขุ่น
27	P5	13,14,15	เกิดพลาคขุ่น
27	P6	16,17,18	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	P7	19,20,21	เกิดพลาคขุ่น
27	P8	22,23,24	เกิดพลาคขุ่น
27	P9	25,26,27	เกิดพลาคขุ่น
27	P11	28,29,30	เกิดพลาคขุ่น
27	P12	31,32,33	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	P13	34,35,36	เกิดพลาคขุ่น
27	P14	37,38,39	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) Host range เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ หมายเลข 27

เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจหมายเลข	รหัสไอโซเลท	ลำดับจุด spot	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	P15	40,41,42	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	P16	43,44,45	เกิดพลาคขุ่น
27	P17	46,47,48	เกิดพลาคขุ่น
27	P18	49,50,51	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
27	P19	52,53,54	เกิดพลาคขุ่น
27	P20	55,56,57	เกิดพลาคขุ่น
27	P21	58,59,60	เกิดพลาคขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ โดยใช้อาหารแข็ง Eosin Methylene Blue นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้าง indole ring การทดสอบ MR-VP และการใช้ซิเทรต จากนั้นนำมาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาดและลักษณะของโคโลนี ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์ การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ ความต้องการออกซิเจน ผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารอาคารเรียนรวมพระเทพฯ จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลท เนื่องจากไอโซเลท P19, P20 และ P21 มีการเจริญได้ดีมากที่สุด จึงนำมาใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ จากการแยกแบคเทอริโอเฟจ ทั้งแบบไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจและแบบมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอ-เฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำบ่อดักไขมันของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ด้วยวิธี plaque assay ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร จึงไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ จึงใช้แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากเศษอาหารเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน พบว่าเกิดพลาคเดี่ยว (Single plaque) จำนวน 60 พลาค ที่ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ และนำมาทำให้เป็น แบคเทอริเฟจมีความบริสุทธิ์ ได้จำนวน 2 หมายเลข คือ 17 และ 27 มีความเข้มข้น 1.055×10^7 PFU/ml และ 1.4925×10^7 PFU/ml ตามลำดับ นำแบคเทอริโอเฟจเฟจบริสุทธิ์ทั้งสองมาทดสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรียด้วยวิธี spot test โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียจำนวน 20 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากการทดลองพบว่า เซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ หมายเลข 17 ทำให้เกิดไลซิสโซนขึ้นบนผิวหน้าอาหารสองชั้นของแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ P1, P2, P3, P5, P6, P7, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 และ P21 และเซลล์แขวนลอยของแบคเทอริโอเฟจ หมายเลข 27 ทำให้เกิดไลซิสโซนขึ้นบนผิวหน้าอาหารสองชั้นของแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P11, P13, P16, P17, P19, P20 และ P21 สรุปผลว่า ไอโซเลทแบคทีเรียที่เกิดไลซิสโซนขึ้นบนผิวหน้าอาหารสองชั้น มีความจำเพาะต่อแบคเทอริโอเฟจแต่มีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการยับยั้งแบคทีเรีย จึงไม่เกิดพลาคใส จากงานวิจัยของ Mohammadali

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et. al (2015) ใช้แบคเทอริโอเฟจที่ความเข้มข้น 10^9 PFU/ml มาใช้ในการ spot test จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี plaque assay ควรใช้เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในระยะ log phase เพื่อให้แบคเทอริโอเฟจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bartłomiej et al., 2017)

2. ในการเก็บตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจควรเก็บในที่ไม่มีแสง หรือ มีเสียงรบกวนน้อย เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจมีความไวต่อแสง (Bartlomiej et al., 2017)

3. ควรมีการผสมแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรีย *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน 5 นาที ก่อนจะนำไปผสมกับ LB top agar ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 แล้วเทลงบนจานอาหารแข็ง LB เพื่อเพิ่มโอกาสให้แบคเทอริโอเฟจเกาะติดกับ *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

[2] กนกรัตน์ ศิริพานิชกน, ชาญชุติ จรรยาสัณห์, พรพรรณ ดีรพัฒน์, พิพัฒน์ ลักษมีจรัชกุล, เฟื่องฟ้า อุตรารัชต์กิจ, ลีรา กิตติกุล, อรษา สุตเธียรกุล และอัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ, 2548. **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บุญศิริการพิมพ์ จำกัด.

[3] กัญจนา ธีระกุล และคณะ, 2542. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 330 น.

[4] ชุติรัตน์ อัศวเทพ, 2546. การตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* จากตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค ผักสดและ ผลไม้ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยวิธี MPN Technique และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน. หน้า 3 -16

[5] ดารณี นุตาลัย, นริศรา มังกรแก้ว, จิราภรณ์ ญาณสมบัติ, เสกสรร สโมสรสุข และ วรดา สโมสรสุข, 2560. การศึกษา diarrheagenic *Escherichia coli* แยกจาก rectal swab ของผู้ป่วยในโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ. TUH Journal online Volume 3.

[6] ดวงพร คันธโชติ, 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ:โอเดียนสโตร์

[7] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. Noble Print, กรุงเทพฯ. 400น.

[8] นริศรา ปัดภัย, ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, 2560. การแยกและศึกษาลักษณะของไลติกเฟจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ฉบับพิเศษ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[9] วฤษณี ปรีชานฤชิตกุล, 2554. สิ่งเล็กๆที่เรียกว่าอีโคไล. กสิกร. น.77

[10] สุรีย์ นานาสมบัติ, 2553. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[11] อภิญญา นามสาย, 2560. **Bacteriophage: Phage application**. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 ประจำเดือน เมษายน - มิถุนายน 2560.

[12] Adams, M.H. 1958. **Bacteriophages.** New York : Interscience publishers, Inc.
Anany, H. Chen, W. Pelton, R. and Griffiths, M.W. 2011. "Biocontrol of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes" Applied And Environmental Microbiology. 77 : 6379-6387

[13] Bartłomiej, G. Michał, G. Agata, W. Adrian, A. Arkadiusz, P. and Paweł, N. **2017.** "Bacteriophage-mediated reduction of Salmonella Enteritidis in swine slurry." Applied Soil Ecology. 119 : 179-182.

[14] Bradley, D.E. 1967. "Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins." Bacteriological Reviews. 31 : 230-314.

[15] Brenner, D.J..1984. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. Willians and Wilkins,London.

[16] Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. Williams and Wilkins company, Baltimer.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

[19] Feng, P., R. Lum and G. W. Chang. 1991. Identification of *uidA* Gene Sequences in β-DGlucuronidase - Negative *Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology, 57 :320-323.

[20] Fricker, E. J. and C. R. Fricker. 1994. Application of the Polymerase Chain Reaction to the Identification of Escherichia coli and Coliforms in Water. Letters in Applied Microbiology. 19 : 44-46.

[21] Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. Enterotoxin testing of Escherichia coli causing epidemic infantile enteritis in the U.K. Lancet. 1976. Mar 20;1 (7960) : 629–631.

[22] Harley, O.P. and Klein, D. A. 1993. **Microbiology.** 2nd ed. Oxford : Wm. C. Brown.

[23] Holt, J.G. and N.R. krieg. 1993. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. Williams and Wilkins company, Baltimer.

[24] 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.

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

[26] Raya, R.R. and Hébert, E.M., 2009. Isolation of phage via induction of lysogens. In: Clokie, M.R.J. and Kropinski, A.M. (eds.). *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions*. United Kingdom: Humana Press, pp. 23 - 32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[27] Sandeep K. 2006. "Bacteriophage precision drug against bacteria infection." Current Science. 3 : 631-633.

[28] 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

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

pH 7.4 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

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

pH 7.3 ± 0.1

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (Levine)

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 37.50 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

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

pH 7.2 ± 0.2

ชั่งอาหารปริมาณ 37.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15นาที

4. Tryptone Water 1 %

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP Medium

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 17.00 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

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

pH 6.9 ± 0.2

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

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 24.28 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

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

pH 6.8 ± 0.2

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB)

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

pH 7.2 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone	10.00 กรัม
Yeast Extract	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 M (1 M Tris-HCl) pH7.5

Tris-HCl	7.882 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. สารละลายบัฟเฟอร์ Storage Medium (SM Buffer)

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

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. สารละลายบัฟฟเฟอร์ Phosphate-buffered saline (PBS)

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

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นน้ำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงอาหารศูนย์เรียนรวมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ

รหัสไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร	
	ระดับการเจือจาง 1 เท่า	ระดับการเจือจาง 10 เท่า
1	1.453	0.587
2	1.444	0.558
3	1.435	0.560
4	1.425	0.502
5	1.422	0.498
6	1.433	0.523
7	1.428	0.516
8	1.424	0.543
9	1.430	0.527
11	1.490	0.553
12	1.486	0.569
13	1.484	0.501
14	1.458	0.519
15	1.416	0.524
16	1.408	0.490
17	1.496	0.548
18	1.498	0.574
19	1.638	0.670

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

รหัสไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร	
	ระดับการเจือจาง 1 เท่า	ระดับการเจือจาง 10 เท่า
20	1.666	0.638
21	1.697	0.696
22	1.381	0.465
23	1.390	0.478
24	1.204	0.361
25	1.278	0.423
26	1.352	0.481
27	1.239	0.321
28	1.405	0.425
29	1.324	0.441
30	1.406	0.469
31	1.396	0.498
32	1.381	0.495
33	1.352	0.481
34	1.358	0.490
35	1.362	0.426
36	1.398	0.501
37	1.406	0.471
38	1.331	0.463
39	1.402	0.451
40	1.203	0.359

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

รหัสไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร	
	ระดับการเจือจาง 1 เท่า	ระดับการเจือจาง 10 เท่า
41	1.197	0.334
42	1.268	0.402
43	1.352	0.481
44	1.139	0.316
45	1.374	0.493
46	1.240	0.382
47	1.328	0.463
48	1.381	0.495
49	1.390	0.478
50	1.368	0.395
51	1.352	0.374
52	1.410	0.402
53	1.396	0.482
54	1.312	0.416
55	1.356	0.452
56	1.296	0.412
57	1.268	0.402
58	1.316	0.461
59	1.396	0.478
60	1.372	0.451

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้