การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเครื่องปรุงรส

Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria *Escherichia coli* from Seasoning.

พิชญา พัชรมงคลสกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria *Escherichia coli* from Seasoning.

PITCHAYA PATCHARAMONGKOLSAKUN

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเครื่องปรุงรส Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria *Escherichia coli* from Seasoning.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพิชญา พัชรมงคลสกุล รหัสนักศึกษา 58050943
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

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

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเครื่องปรุงรส Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria *Escherichia coli* from Seasoning.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพิชญา พัชรมงคลสกุล รหัสนักศึกษา 58050943
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่แยกได้มาแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin methyl blue คัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 108 ไอโซเลท แล้วนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การวัดขนาด และศึกษาลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม และการวัดขนาดของเซลล์ ลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอมไซม์คะตะเลท การสังเคราะห์อินโดล Methyl red-Voges proskauer และการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมาจึงทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียโรงอาหารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ แยกแบค-เทอริโอเฟจ โดยไม่เพิ่มปริมาณและเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีการตรวจการเกิดพลาค (Plaque assay) จากการทดลองการแยกแบคเทอริโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณอาหารและแบบเพิ่มปริมาณอาหาร ยังไม่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจที่มีวงชีวิตชนิดไลติกได้ แต่อย่างไรก็ตามจึงนำแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้ข้างต้นไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากงานวิจัยของชณัฐดา และคณะ (2561) ด้วยวิธี spot test พบว่าแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียที่แยกได้จากเครื่องปรุงรส

คำสำคัญ : แบคเทอริโอเฟจ แบคทีเรีย *Escherichia coli* การตรวจการเกิดพลาค เครื่องปรุงรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on Isolation of Bacteriophages of Bacteria *Escherichia coli* from Seasoning.
Students	Miss Pitchaya Patcharamongkolsakun Student ID 58050943
Degree	Bachelor of Science (Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Dr. Wimonmat Boonmee

Abstract

This special project was to study on the isolation of bacteria *Escherichia coli* from seasoning. After that the isolated bacteria were used as the bacterial host for the bacteriophage isolation. The one hundred eight colonies of the bacteria were isolated on Eosin methyl blue agar and were evaluated on morphology characterization such as shape, cell size, colony appearance; size, shape and color, gram staining as well as catalase enzyme production, indole production, methyl red - voges proskauer and citrate utilization The bacteriophages were isolated from swage from cafeteria. With and without enrichment of the bacteriophage isolation methods were done. The present of the bacteriophages were determined by plaque assay. The result showed that the bacteria isolated from the seasoning were unable to isolate the bacteriophages. However, this study was continued to investigate host range of bacteriophages from Chanutda et al. (2019) (bacteriophages number 17 and 27) by using spot test and 20 isolated bacteria from seasoning were used as the bacterial host. The result showed that both of the bacteriophages number 17 and 27 were unable to infect the bacteria *E. coli* isolated from the seasoning. This means that the two bacteriophages were non specific with the isolated bacteria *E. coli*.

Keywords : isolation, bacteriophage, bacteria, *Escherichia coli*, plaque assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชาโครงงานพิเศษจัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในหัวข้อเรื่อง การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเครื่องปรุงรส โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้คำปรึกษาคำชี้แนะต่างๆ ตลอดการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ประธานกรรมการสอบ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการสอบโครงงานพิเศษนี้ที่ได้สละเวลาในการเข้ารับฟังการนำเสนอรวมทั้งให้คำแนะนำคำปรึกษาจนโครงงานพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อการเบิกอุปกรณ์สารเคมีต่างๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำการทดลองที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณคุณสงขลา มุ่งพยาบาล เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย ที่ได้มอบอุปกรณ์วิทยาศาสตร์สำหรับการทำการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและเพื่อนๆ ที่คอยอยู่เคียงข้างและคอยให้กำลังใจ ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในศึกษาและต่อยอดต่อไปหากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

พิชญา พัชรมงคลสกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย (TH SarabunPSK 16) ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญรูป ..... ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์ (ถ้ามี) ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 3
2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของ *Escherichia coli* 3
2.1.2 คุณสมบัติทางแอนติเจนของ *Escherichia coli* 3
2.1.3 คุณสมบัติด้านชีวเคมีและการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* 4
2.1.4 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่สามารถก่อโรคได้ 5
2.2 แบคเทอริโอเฟจ 7
2.2.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ 7
2.2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบพื้นฐานของแบคเทอริโอเฟจ 8
2.2.3 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคเทอริโอเฟจ 9
2.2.4 วงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ 11
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13
2.3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 13
2.3.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ 14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17
3.1 อุปกรณ์ 17
3.2 เครื่องมือ 18
3.3 สารเคมี 18
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 19
3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ 19
3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* 19
3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* . 19
3.6 วิธีการทดลอง 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหาร EMB Agar 20
3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 20
3.6.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 21
3.6.4 การเก็บหัวเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 22
3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อ *E. coli* 22
3.6.6 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 26
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส 26
4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB 26
4.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา 28
4.1.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี 29
4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 34
4.2.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* 34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37
5.1 สรุปผลการวิจัย 37
5.2 ข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง 38
ภาคผนวก 43
ภาคผนวก ก 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* 5

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส 27

4.2 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*	4
2.2	โครงสร้างทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ	8
2.3	ลักษณะทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ	10
2.4	วงชีวิตแบบไลติคและไลโสเจนิคของแบคเทอริโอเฟจ	13
4.1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* เมื่อเจริญบนจานอาหารแข็ง EMB	27
4.2	ลักษณะของเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*	29
4.3	ผลการทดสอบการสังเคราะห์อินโดลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*	30
4.4	ผลการทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*	32
4.5	ภาพการเกิดบริเวณใสจากการแยกแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ	35
4.6	ภาพการเกิดบริเวณใสจากการแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยการเพิ่มปริมาณ	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
*	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีสีขาวนวล
**	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และสีเหลืองนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Escherichia coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ท่อนตรง มีแฟลกเจลลาแบบ Peritrichous flagella มักอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในมนุษย์ สามารถติดเชื้อได้ทั้งในระบบทางเดินปัสสาวะ ไต ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ ผู้ติดเชื้อจะมีอาการตั้งแต่ท้องเสียไปจนถึงถ่ายเป็นเลือด เชื้อ *E. coli* บางชนิดก่อโรครุนแรงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มักปนเปื้อนในน้ำดื่ม น้ำใช้ และอาหาร เชื้อ *E. coli* จัดเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ (Indicator organism) สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (อรอนงค์, 2555)

จากงานวิจัยของ Biswas et al. (2010) พบเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium botulinum, E. coli , Salmonella spp.* และ *Staphylococcus aureus* ปนเปื้อนในอาหารที่ผ่านการปรุงแบบไม่ถูกสุขลักษณะ โดยพบเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในปริมาณที่มากกว่า 1000 cfu/g ในอาหารและเครื่องปรุงรสที่ถูกเปิดใช้ แต่ไม่ได้รับการเก็บรักษาที่ถูกต้อง นอกจากนี้ยังพบว่าในประเทศเขตร้อนนิยมบรรจุเครื่องปรุงโดยการเปิดฝาภาชนะ เพื่อให้ง่ายต่อการปรุงรสตามความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งมีความเสี่ยงสูงในปนเปื้อน *E. coli* และยีส (Parveen et al., 2014)

เครื่องปรุงรสเป็นวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการปรุงอาหารและเพิ่มรสชาติอาหาร ให้มีความอร่อย กลมกล่อม รวมถึง สี กลิ่น และรสสัมผัสที่ดี เครื่องปรุงรสมีมากมายหลากหลายชนิด แต่ต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคและอารยธรรม ตัวอย่างเช่น ประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้โชยุหรือวาซาบิเป็นเครื่องปรุงรสในการเพิ่มรสชาติอาหาร ในขณะที่ประเทศทางแถบยุโรปนิยมใช้ ออริกาโน มัสตาร์ด และซอสในการปรุงรส ส่วนประเทศไทยนิยมใช้เครื่องปรุงหลากหลายชนิด เช่น เกลือ น้ำตาล พริกป่น น้ำปลา น้ำส้มสายชู รวมถึงการนำเครื่องปรุงรสเหล่านี้ไปผสมกับน้ำและวัตถุดิบอื่นๆ เพื่อสร้างสรรค์เป็นน้ำจิ้มและน้ำพริกชนิดต่างๆ มากมาย (นิรมล, 2550)

ประเทศไทยนิยมใช้เครื่องปรุงรสเพื่อเพิ่มรสชาติอาหารในขณะรับประทาน เช่น พริกป่น น้ำตาลและน้ำส้มพริก พบมากในร้านอาหารประเภทก๋วยเตี๋ยว ส่วนใหญ่มักจะบรรจุเครื่องปรุงเหล่านี้ทิ้งค้างไว้นาน และมักเปิดฝาภาชนะทิ้งไว้ รวมถึงน้ำพริกและน้ำจิ้มที่ถูกปรุงขึ้นและเก็บรักษาอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ ทำให้มีโอกาสเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนเชื้อโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli*

ปัจจุบันพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เป็นเชื่อก่อโรคอุจจาระร่วง และเป็นเชื้อดื้อยาหรือซุปเปอร์บัก (Superbug) ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้มากมาย รวมถึงยา Colistin ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์รุนแรงที่สุดและเป็นยาปฏิชีวนะชนิดสุดท้ายที่แพทย์จะใช้ในการรักษา หากยาปฏิชีวนะอื่นๆ ใช้ไม่ได้ผลแล้ว อย่างไรก็ตามยา Colistin ก็ยังไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะได้ในปัจจุบัน (Mashkoor et al., 2016)

จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นทำให้ต้องหาทางเลือกอื่นๆ ที่จะควบคุมการติดเชื้อของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* หนึ่งในทางเลือกที่น่าสนใจอีกหนึ่งทางก็คือการใช้ แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือ เฟจ (Phage) ซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในหลายๆ ด้าน ยกตัวอย่างเช่น แบคเทอริโอเฟจมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความจำเพาะต่อแบคทีเรียมากกว่ายาปฏิชีวนะ เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะทำลายเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นโฮสของตัวเองเท่านั้น ในขณะที่ยาปฏิชีวนะมีโอกาสที่จะทำลายแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ในขณะออกฤทธิ์ด้วย และอีกหนึ่งข้อได้เปรียบก็คือ เมื่อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ผู้ป่วยต้องเปลี่ยนไปใช้ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อตัวของผู้ป่วย ในขณะที่แบคเทอริโอเฟจสามารถวิวัฒนาการตัวเองเพื่อทำลายแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะได้ด้วย (Michael and Janice, 2008)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรสและศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างน้ำเสียโรงอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากเครื่องปรุงรส
2. เพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากน้ำเสียโรงอาหาร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากเครื่องปรุงรส และแยกเชื้อแบคเทอริโอเฟจจากน้ำเสียโรงอาหาร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาวิธีการแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จากเครื่องปรุงรส

2. งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จากน้ำเสียโรงอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

*Escherichia coli*เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น แยกเชื้อได้ครั้งแรกจากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วงในปี ค.ศ. 1885 โดยนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันชื่อทีโอดอร์ เอสเชอริช (Theodor Escherich) ต่อมาได้รับการตั้งชื่อเป็น *E. coli* ในช่วงก่อนปี ค.ศ. 1982 ยังไม่ถือว่าเป็นแบคทีเรียชนิดนี้มีอันตราย แม้ว่าจะเป็นที่เข้าใจกันว่า แบคทีเรียนี้มักจะทำให้เด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนาเกิดอาการท้องเดิน เหตุที่เป็นแบคทีเรียในลำไส้ จึงพบบ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้ จึงใช้แบคทีเรียชนิดนี้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (Index of faecal contamination)

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 เป็นต้นมา *E. coli* ได้รับการจัดไว้ในประเภทจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สืบเนื่องจากการระบาดที่มาจากเนยแข็งนำเข้าสหรัฐฯ ทำให้ผู้บริโภคเกือบ 400 คน ในมลรัฐป่วย แม้ว่าก่อนหน้านี้ *E. coli* เคยมีประวัติว่าทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศอื่นมาแล้วอย่างน้อย 5 ครั้ง โดยครั้งล่าสุดเกิดในประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1947 การระบาดครั้งสำคัญของ *E. coli* เกิดขึ้นในสหรัฐฯ ปี ค.ศ. 1982 และ ค.ศ. 1993 ทำให้มั่นใจได้ว่า *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (สุมณฑา, 2545)

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

จีนัส *Escherichia* ประกอบด้วยสมาชิกอย่างน้อย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *E. coli* , *Escherichia hermannii, Escherichia vulneris, Escherichia fergusonnii* และ *Escherichia blattae* เชื้อ *E. coli* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุด พบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ และเป็นสปีชีส์ที่ก่อโรคในคนมากที่สุดในจีนัสนี้ รวมถึงพบก่อโรคได้บ่อยกว่าเชื้ออื่นๆ ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ส่วนใหญ่ก่อโรคติดเชื้อในทาง เดินอาหาร แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารได้ เช่น โรคติดเชื้อในระบบทาง เดินปัสสาวะ โรคเยื้อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด (ภัทรชัย, 2549)

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของ *Escherichia coli*

E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (Rod shape) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Motile) โดยอาศัย Flagella (Non-spore forming) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobe) และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) มี Capsule หุ้มอยู่รอบตัวทำให้เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

2.1.2 คุณสมบัติทางแอนติเจนของ *Escherichia coli*

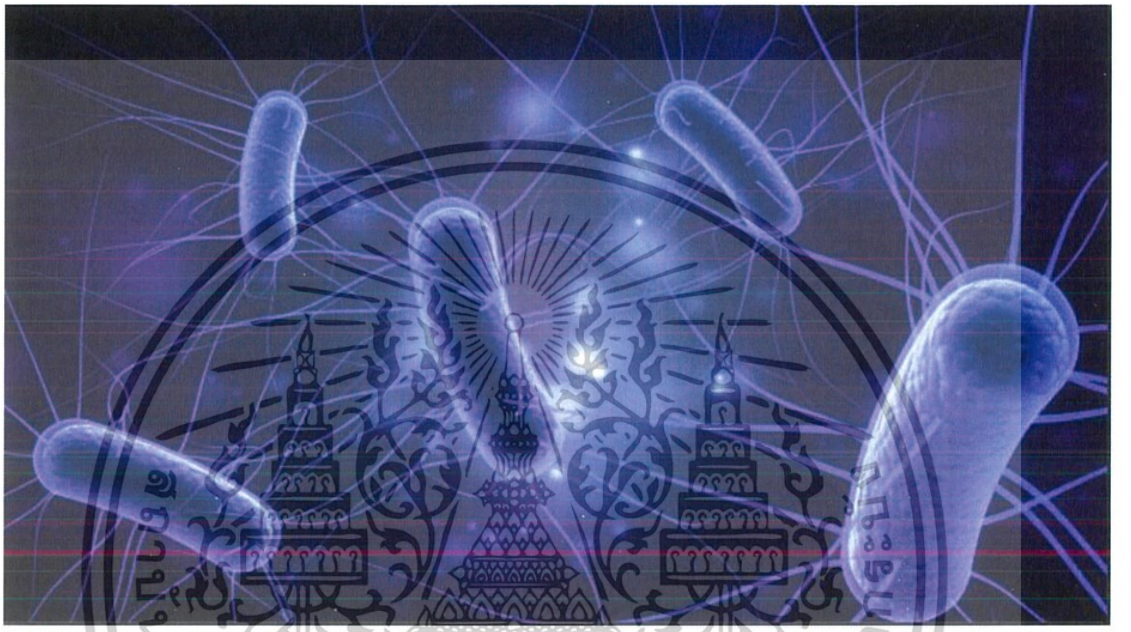
แอนติเจนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีอยู่หลายชนิด คือ

1. Somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติต่อทนกรดอ่อนและแอลกอฮอล์ รวมถึงทนต่อความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส (Andrei et al., 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ Polysaccharide มักพบในสารห่อหุ้มเซลล์ เช่น Capsule, Envelope หรือ Fimbriae ที่หุ้มตัวแบคทีเรียและห่อหุ้ม O-antigen ด้วย (Bharathi et al., 2016)

3. Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนประกอบของ Flagella ประกอบด้วย Protein ที่เรียกว่า Flagellin สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะไม่พบ H-antigen (Lei et al., 2003)



รูปที่ 2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*
ที่มา: https://www.livescience.com/64436-e-coli.html
(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)

2.1.3 คุณสมบัติด้านชีวเคมีและการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli*

E. coli สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนอยู่น้อย (Facultative anaerobe) ให้ผลการทดสอบ Catalase เป็นบวก ให้ผลการทดสอบ Oxidase เป็นลบ และให้ผลการทดสอบ IMViC test เป็น + + - - คือสามารถใช้ทริปโทเฟนแล้วให้อินโดล และให้ผลบวกกับเมทิลเรด แต่ไม่สร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินัล (acetyl methyl carbinol) และไม่ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน และให้ผลการทดสอบ IMViC test เป็นแบบ - + - - คือไม่สามารถใช้ทริปโทเฟนแล้วให้อินโดลได้ และให้ผลบวกกับเมทิลเรด แต่ไม่สร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินัล (acetyl methyl carbinol) และไม่ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MacConkey agar (MAC) ซึ่งเป็น Differential medium จะให้โคโลนีสีชมพูหรือแดงเนื่องจากเกิดการ Ferment น้ำตาล Lactose และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Eosin methylene blue (EMB) ซึ่งเป็น Selective medium จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแวววาวที่เรียกว่า Metallic sheen (Alla et al., 2014) (นิ่งลักษณ์, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

การทดสอบ	ผล
Lactose fermentation	+
Indole production	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Citrate utilization	-
Motility test	+
Lysine decarboxylase test	+
TSI	acid butt / acid slant, เกิด gas
H_2S	-
Urea hydrolysis	-
Acetate utilization	+
Cetrimide	-
ONPG test	+
Phenylalanine deaminase	-
Sucrose fermentation	+
Mannitol fermentation	+
Glucose fermentation	+
Dextrose fermentation	+ , เกิด gas
NO_3 reduction	+ , ไม่เกิด gas

2.1.4 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่สามารถก่อโรคได้

เชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrhoeagenic *E. coli*) ในคนแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มตามกลไกการก่อโรคดังนี้

2.1.4.1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ชนิดนี้ก่อโรคอุจจาระร่วงทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ เนื่องจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อ *E. coli* จะสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ออกมาทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ สารพิษเอนเทอโรทอกซินมี 2 ชนิดคือ

1. Heat-labile toxin (LT) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ มีขนาดมากกว่า 5,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที มีกลไกการทำงานคล้ายกับสารพิษ Cholera toxin ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* โครงสร้างของสารพิษประกอบด้วยส่วนย่อย (Subunit) คือ ส่วนย่อย A 1 หน่วย และส่วนย่อย B 5 หน่วย โดยส่วนย่อย B จะเข้าเกาะกับ Receptor ที่อยู่ในผนังเซลล์ของเยื่อบุลำไส้เล็ก ช่วยให้ส่วนย่อย A จะเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้น เมื่อส่วนย่อย A จับกับส่วนย่อย B ได้แล้ว ส่วนย่อย A จะกระตุ้นเอนไซม์ Adenyl cyclase ที่เยื่อบุผิวลำไส้เล็ก ทำให้ ATP กลายสภาพเป็น Cyclic adenosine monophosphate (c-AMP) มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งน้ำและคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ออกมามากกว่าปกติ รวมถึงยับยั้งการดูดกลับของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้ลำไส้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยมีการขับน้ำและเกลือแร่ต่างๆ ออกมจำนวนมาก ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงคล้ายอหิวาตกโรค

2. Heat-stable toxin (ST) เป็นโปรตีนโมเลกุลเล็ก มีขนาดน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที ก่อโรคโดยการที่ ST จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กัวนีเลตไซเคลส (Guanylate cyclase) ในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้เล็ก ทำให้เกิดการสะสมของ Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการดูดกลับน้ำและโซเดียมภายในลำไส้เล็ก

2.1.4.2 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ชนิดนี้ เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กแรกเกิดจนถึงอายุ 2 ปี (Infantile diarrhea) เชื้อ EPEC ไม่สร้างสารพิษทั้งแบบ LT และ ST แต่เชื้อแบคทีเรียจะเกาะเข้ากับเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก (Enterocyte) และจะทำลายไมโครวิลไล (Microvilli) ที่ผนังเยื่อบุผนังลำไส้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเซลล์ (Cytoskeleton) ส่งผลให้เกิดบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าเกาะเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ได้มากขึ้น คุณสมบัติการเกาะกับ Membrane นี้ซึ่งเรียกว่า Entero adherence factor (EAF) อาการที่พบเมื่อเด็กทารกติดเชื้อ EPEC คือทำให้ท้องร่วงเป็นน้ำ ไม่มีเลือดปน และมีอาการคลื่นไส้ มีไข้และอาเจียน

2.1.4.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ชนิดนี้ ก่อโรคอุจจาระร่วงทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ โดยการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ EIEC ผู้ป่วยจะมีอาการปวดบิดอย่างรุงแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีกลไกการก่อโรคคล้ายกับโรคบิดที่เกิดจาก Shigella คือมี Invasive virulence factor ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนส์ที่อยู่บน Plasmid ทำให้เชื้อสามารถสังเคราะห์โปรตีน (Invasive Protein) ช่วยให้เชื้อสามารถแทรกตัวเข้าไปใน Epithelial cell ของลำไส้ใหญ่ ทำให้เชื้อแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากภายภายในเซลล์ และทำให้เซลล์แตก จากนั้นเชื้อจะลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงแล้วทำลายเซลล์บริเวณนั้น ทำให้ลำไส้เป็นแผลและเกิดการอักเสบ และมีเลือดไหลออกมา

2.1.4.4 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า Hemorrhagic colitis คือมีอาการเลือดออกในลำไส้ ปวดท้องอย่างรุนแรงและอุจจาระออกมาเป็นเลือด นอกจากนั้นยังก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนอีกโรคนั้นก็คือ โรค Hemolytic uremic syndrome (HUS) พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ผู้ป่วยจะมีอาการอุจจาระเป็นเลือด อาเจียน และเป็นสาเหตุของไตวายในเด็ก เชื้อในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น *E. coli* O157:H7, O26:H11, O111:NM แต่ที่มีความสำคัญที่สุด คือ O157:H7 เนื่องจากพบการระบาดของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่เสมอในทวีปอเมริกาและทวีปยุโรป กลไกการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย EHEC คือการใช้ Fimbriae เข้าเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ตรงส่วน Caecum และ Colon แล้วสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษ Cytotoxin ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ Shiga toxin ที่สร้างจาก *Shigella dysenteriae* type1 จึงเรียกสารพิษชนิดนี้ว่า Shiga-like toxin เมื่อนำสารพิษชนิดนี้มาทดสอบกับเนื้อเยื่อเวอโรเซลล์ (Vero cell) ซึ่งเป็นเซลล์จากไตลิงชนิดหนึ่ง (American monkey kidney cell) พบว่าสารพิษชนิดนี้สามารถทำลายเนื้อเยื่อเวอโรเซลล์ได้ จึงเรียกสารพิษ Shiga-like toxin อีกชื่ออย่างหนึ่งว่า Verocytotoxin หรือ Verotoxin (VT) ปัจจุบันพบว่าสารพิษชนิดนี้มี 2 แบบคือ

1. Verotoxin 1 (VT1) หรือ Shiga-like toxin 1 (SLT1) มีคุณสมบัติเหมือน Shiga toxin ของเชื้อ *S. dysenteriae* type 1 และสามารถถูก Neutralize ได้ด้วย Antiserum ต่อ shiga toxin

2. Verotoxin 2 (VT2) หรือ Shiga-like toxin 2 (SLT2) แตกต่างจาก VT1 คือ ที่ไม่ถูก Neutralize ด้วย Antiserum ต่อ Shiga toxin

เชื้อ EHEC บางสายพันธุ์จะสร้างสารพิษชนิด SLT1 หรือ SLT2 อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น แต่บางสายพันธุ์สร้างได้ทั้ง SLT1 และ SLT2 (Emanuel and Lorrence, 2009) (Geo et al., 2016) (David et al., 2007)

2.2 แบคเทอริโอเฟจ

ไวรัส (Virus) ของแบคทีเรีย (Bacteria) เรียกว่า “แบคเทอริโอเฟจ” (Bacteriophages) หรือ “เฟจ” (Phages) เป็นจุลชีพที่มีอนุภาคขนาดเล็กมาก ประกอบไปด้วยกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ที่เป็นดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ภายในอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจไม่มีไรโบโซม (Ribosome), ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) หรือองค์ประกอบย่อยของเซลล์ (Organelles) อื่นๆ เลย ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจจำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบภายในของโฮสท์เซลล์ (Host cell) ที่แบคเทอริโอเฟจเข้าไปเจริญ เพื่อสร้างสิ่งต่างๆ ที่แบคเทอริโอเฟจต้องการขึ้นมา เช่น การสร้างโปรตีน การเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิก เป็นต้น

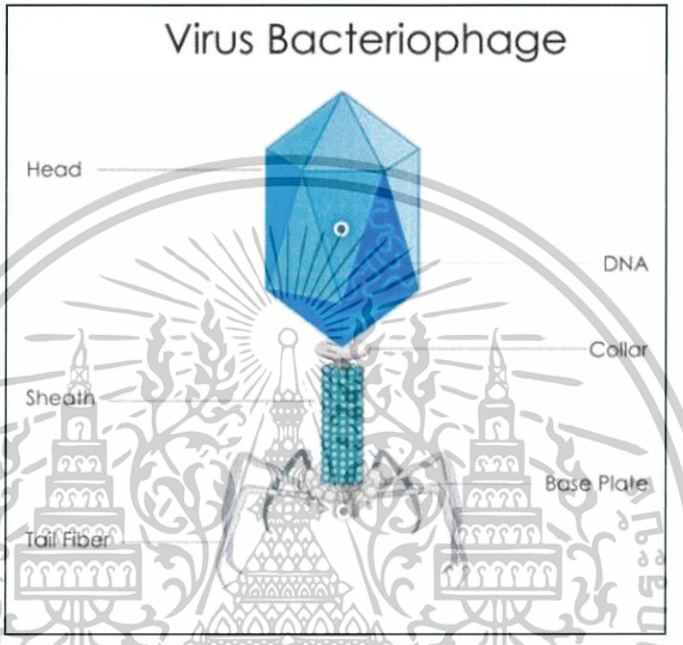
2.2.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือ Phage มาจากภาษากรีกคำว่า “Phagein” ที่แปลว่า “กิน” แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย ถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ 2 คน (ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกัน) (นิติ, 2015) นักวิทยาศาสตร์คนแรกคือ Frederick W. Twort ชาวอังกฤษ ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Micrococcus ในปี ค.ศ. 1915 แล้วพบว่าลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นแตกต่างจากลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย Micrococcus ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถแพร่กระจายไปยังโคโลนีอื่นได้ โดยตัวที่ทำให้เกิดการลักษณะแบบนี้มีขนาดเล็กมาก จนสามารถกรองผ่านเครื่องกรองได้ จึงได้มีการตั้งสมมติฐานไว้อย่างมากมาย แต่ยังไม่ได้รับการยอมรับจนต่อมาในปี ค.ศ. 1917 นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนนาดา Felix d’Herelle ได้ทำการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรีย Shigella aysenteriae และพบเกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Frederick W. Twort คือเขาได้พบกับ “สิ่งที่เป็นปฏิปักษ์” (Antagonisitic) กับเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเจ้าสิ่งนี้มีความสามารถทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแตกสลายและตายได้ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มจำนวนตัวเองเพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงได้อีกด้วย Felix d’Herelle จึงได้เรียกสิ่งนี้ว่า Ultraviruses หรือ Bacteriophage (Elizabeth and Alexander, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบพื้นฐานของแบคเทอริโอเฟจ

โครงสร้างทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจประกอบด้วยส่วนหัว (Head) ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรม และส่วนหาง (Tail) ซึ่งมีหน้าที่ในการยึดเกาะกับโฮสท์เซลล์และส่งถ่ายสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจไปสู่โอสท์ นอกจากนั้นแบคเทอริโอเฟจยังประกอบด้วยส่วนปลอกคอ (Collar) ส่วนแกนกลาง (Core) ส่วนปลอก หุ้ม (Sheath) ส่วนแผ่นฐาน (Baseplate) และส่วนขา (Tail fibers) ซึ่งจะมีลักษณะต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ดังรูปที่ 2.2 (Voyles, 2002)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ
ที่มา: https://www.123rf.com/photo_98918798_education-chart-of-biology-for-virus-bacteriophage-diagram.html
(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)

แบคเทอริโอเฟจที่มีอนุภาคครบสมบูรณ์ (Virion) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิคที่ถูกหุ้มด้วยโปรตีนที่เรียกว่า แคพสิด (Capsid) ส่วนแคพสิดและกรดนิวคลีอิคที่ถูกหุ้มไว้ เรียกรวมกันว่า นิวคลีโอแคพสิต (Nucleocarpsid) โมเลกุลย่อยๆ ของโปรตีนที่มาประกอบรวมกันเป็นแคพสิด จะเรียกว่า แคพโซเมอร์ (Capsomer) ซึ่งการจัดเรียงตัวหรือประกอบของแคพโซเมอร์จะทำให้แคพสิดมีลักษณะและรูปร่างต่างๆ แต่จะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกด้วย จากการจัดเรียงตัวของแคพโซเมอร์ทำให้แบคเทอริโอเฟจรูปร่างลักษณะดังนี้ คือ

2.2.2.1 รูปร่างแบบเหลี่ยมลูกบาศก์ (Cubical structure)

การจัดเรียงตัวของแคพสิดโปรตีนแบบเหลี่ยมลูกบาศก์ (Icosahedral symmetry) จะมีรูปร่างโครงสร้างและขนาดขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะของแคพโซเมอร์ที่มารวมกัน ซึ่งขนาดและรูปร่างของแคพโซเมอร์นั้นขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะของโปรโตเมอร์ (Protomer) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของแคพโซเมอร์อีกที โดยโปรโตเมอร์จะรวมกลุ่มกันกลุ่มละห้าหรือหกอันประกอบกันเป็นแคพโซเมอร์ ซึ่งแคพสิดรูปร่างแบบเหลี่ยมลูกบาศก์ จะมียอดหรือมุม (Corner) อยู่ทั้งหมด 12

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มุม แต่ละมุมจะมีแคพโซเมอร์ที่ประกอบด้วยโปรโตเมอร์ที่มีลักษณะเป็นหน้าสามเหลี่ยม (Triangular face) ที่เหมือนกัน 5 หน้า ในแคพสิดหนึ่งอันจะมีสามเหลี่ยมอยู่ 20 หน้า ซึ่งสามเหลี่ยมแต่ละหน้าจะมีแคพโซเมอร์จำนวนเท่าๆกัน ถ้าหากโปรโตเมอร์มารวมกันเป็นกลุ่ม กลุ่มละหกอัน เรียกว่า เฮกซอน (Hexon) ถ้าหากรวมกันเป็นกลุ่ม กลุ่มละห้าอัน เรียกว่า เพนตอน (Penton) แบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดจะมีจำนวนเฮกซอนและเพนตอนในแคพสิคไม่เท่ากัน (Sandeep, 2006)

2.2.2.2 รูปร่างแบบทรงกระบอก (Cylindrical structure)

การจัดเรียงตัวของแคพสิดโปรตีนแบบทรงกระบอก (Helical symmetry) นี้ โปรโตเมอร์จะจัดเรียงตัวแบบเกลียวหมุนทางเดียว (Single rotational exes) คล้ายๆ เกลียวสว่าน แต่โปรโตเมอร์จะไม่เรียงตัวเหมือนกันทั้งหมด เส้นผ่าศูนย์กลางของทรงกระบอกหรือแคพสิดจะขึ้นอยู่กับลักษณะและขนาดของโปรโตเมอร์ ส่วนความยาวของรูปทรงกระบอกขึ้นอยู่กับความยาวของกรดนิวคลีอิก (Sandeep, 2006)

2.2.2.3 รูปร่างแบบเชิงซ้อน (Complex structure)

การจัดเรียงตัวของแคพสิดแบบนี้จะมีรูปร่างผสมกันของรูปร่างแบบเหลี่ยมลูกบาศก์กับรูปร่างแบบทรงกระ-บอก มักพบในแบคเทอริโอเฟจพวกทีแฟมิลี (T family) ที่มีรูปร่างแบบไบเนอร์ ซิมมิทรี (Biner symmetry) เป็นต้น (Sandeep, 2006)

แบคเทอริโอเฟจบางชนิดมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ประกอบอยู่ด้วย ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่พบเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการจำลองตัวเองของกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอเฟจ (Sandeep, 2006)

2.2.3 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคเทอริโอเฟจ

รูปแบบการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจถูกพัฒนาขึ้นโดย Bradley (1987) และได้รับการปรับปรุงให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นโดย Ackermann and Eisenstark (1974) ซึ่งเป็นพื้นฐานการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจโดยอาศัยรูปร่างและคุณสมบัติของกรดนิวคลีอิก คณะกรรมการแห่งชาติของการจัดจำแนกหมวดหมู่ไวรัส (ICTV = The International Committee on Taxonoray of Viruses) ได้กำหนดหลักเกณฑ์สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามวิธีของ Bradley ซึ่งใช้เป็นพื้นฐานของการจัดหมวดหมู่ของแบคเทอริโอเฟจในปัจจุบัน (Bradley, 1967) ดังนี้

2.2.3.1 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจตามรูปร่างลักษณะ

หลักเกณฑ์อีกประการหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปในการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ คือการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจตามรูปร่างลักษณะ (Morphology) โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม (Bradley, 1967) ดังนี้ คือ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีชีทห่อหุ้มจึงไม่สามารถหดตัวได้ แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีระยางค์ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

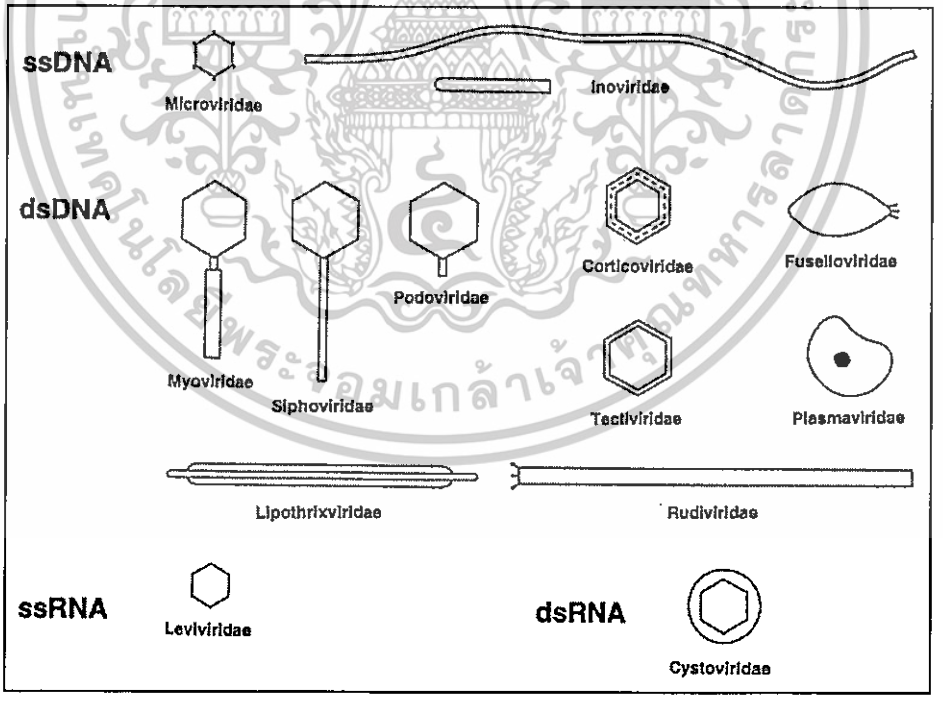
3. กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีชีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีรยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

4. กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคพโซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคพซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

5. กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคพโซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

6. กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวที่ยืดหยุ่นได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้ยังพบแบคเทอริโอเฟจ กลุ่ม G ลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน มี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบแต่ไม่พบส่วนของแคพซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เช่น แบคเทอริโอเฟจ MV-L2 โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจที่พบมีรูปร่างอยู่ในกลุ่ม A, B และ C ดังรูปที่ 2.2.2 (Harley and Klein, 1993)



รูปที่ 2.3 ลักษณะทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา: http://www.thebacteriophages.org/chapters/0020_figure_001.htm

(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 วงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ

วงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

2.2.4.1 วงชีวิตแบบไลติค (lytic cycle)

แบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มจำนวนโดยใช้วงชีวิตแบบไลติคนี้ เรียกว่า ไวรูเลนต์เฟจ (virulent phage) หรือไลติคเฟจ แบคเทอริโอเฟจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตาย เพื่อปล่อยแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา ดังรูปที่ 2.2.4 (Boyd, 1995; Maloy et al., 1994)

วงชีวิตแบบไลติคประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเกาะติด (Adsorption) แบคเทอริโอเฟจจะอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติด (attachment site) ของแบคเทอริโอเฟจกับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) บนเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) แคปซูล (capsule) พิไล (pili) แฟลกเจลลา (flagella) โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นต้น ตำแหน่งเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจ และตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์ของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก ถ้าแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ จะทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเกิดการต้านทานต่อการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจเดิมที่เคยทำให้เกิดการติดเชื้อได้

2. การส่งกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (Penetration) ขั้นตอนนี้ แบคเทอริโอเฟจจะปล่อยกรดนิวคลีอิกผ่านผนังเซลล์จนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย ส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่นยังคงอยู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

3. การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ (Biosynthesis) เมื่อกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียจะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ ตั้งแต่ขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ หลังจากนั้นดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ของแบคเทอริโอเฟจ และ mRNA ของแบคเทอริโอเฟจจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ โดย mRNA ที่สร้างขึ้นในช่วงแรก (early mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์ และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ส่วน mRNA ที่สร้างขึ้นช่วงหลัง (late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ เช่น แคพซิด หาง เป็นต้น หรือแปลรหัสเป็นโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคเทอริโอเฟจรุ่นใหม่ออกมา

4. การประกอบตัวของแบคเทอริโอเฟจ (assembly) ขั้นตอนนี้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคพซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคพซิดจะเชื่อมต่อกับซีทห่อหุ้ม และส่วนหางแล้วประกอบกันเป็นอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่สมบูรณ์

5. การแตกสลายของแบคทีเรีย (lysis) ขั้นตอนนี้อนุภาคแบคเทอริโอเฟจ รุ่นใหม่จะถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตาย เซลล์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่แตกสลายนี้เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) และ โฮลิน (holin) ซึ่งหลั่งโดยแบคเทอริโอเฟจ เพื่อย่อยผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียตามลำดับ

2.2.4.2 วงชีวิตแบบไลโสเจนิค (lysogenic cycle)

แบคเทอริโอเฟจที่มีวงชีวิตทั้งแบบไลโสเจนิคและแบบไลติค ที่เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ (Temperate phage) (Alcamo, 1996; Mckane and Kandel, 1996) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

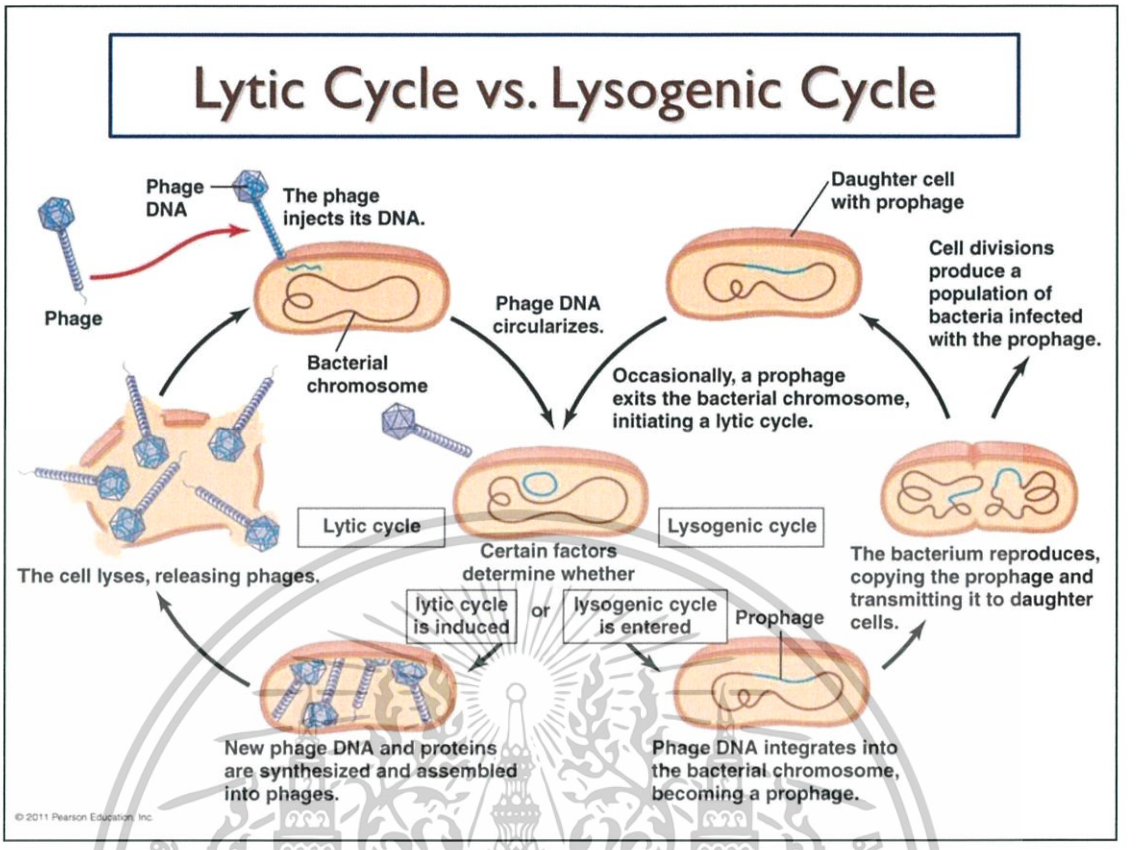
1. การเกาะติด เกิดเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติค

2. การส่งกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคเทอริโอเฟจจะส่งกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจ ที่มีลักษณะเป็นสายตรงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย จากนั้นกรดนิวคลีอิกที่เป็นสายตรงจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวน

3. การสอดแทรกดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจในโครโมโซมของแบคทีเรียเจ้าบ้าน (integration) โดยอาศัยเอนไซม์อินทีเกรส (integrase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกแบคเทอริโอเฟจ ระยะนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ว่า ไลโสเจน (lysogen) ขั้นตอนนี้จะเริ่มจากการจำลองดีเอ็นเอ ถอดรหัส และแปลรหัส จนได้โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) จึงไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ของแบคเทอริโอเฟจได้ เมื่อแบคเทอริโอเฟจเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้ว แบคเทอริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมแบคทีเรีย

4. การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติค (induction) การชักนำเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ดังนี้ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหาย โปรเฟจจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค และจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอุลตราไวโอเลต หรือสารเคมี เช่น มิโตมัยซินซี (mitomycin C) เมื่อแบคทีเรียตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกเหล่านี้ทำให้โปรตีนควบคุมถูกทำลาย แบคเทอริโอเฟจจะเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 วงชีวิตแบบไลติคและไลโสเจนิคของแบคเทอริโอเฟจ
ที่มา: http://xfcyp.com/lysogenic-cycle-definition/
(สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2562)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

Andrea et al. (2019) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณและยีนก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในหอยแมลงภู่ (Mytella falcata) และหอยนางรม (Crassostrea brasiliana) จากแหล่งน้ำในธรรมชาติจำนวน 150 ตัวอย่าง เป็นหอยแมลงภู่ 75 ตัวและหอยนางรม 75 ตัว โดยทำการตรวจหาโคลิฟอร์มและเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยใช้วิธีการ Most Probable Number (MPN) พบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งหมดใน 48 ตัวอย่างจากทั้งหมด 150 ตัวอย่าง คิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 3 ถึง 927 MPN / g และจากการทดสอบทางชีวเคมีพบยีน PhoA กับ Six คิดเป็น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ที่แสดงผลเป็น Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) วิจัยชิ้นนี้ของ Andrea เป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้เทคนิคสำหรับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากเครื่องปรุงรส

ชุติรัตน์ (2546) ได้ทำการทดลองคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากอาหารพรอมบริโภคที่จำหนาย ณ ร้านค้าภายใน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และอาหารอื่นๆจากหางสรรพสินค้า ในอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ผลการศึกษาด้วยวิธี MPN technique ตัวอย่างส่วนใหญ่พบเชื้อฟคอลโคลิฟอรมมีค่าในหน่วย MPN/100 กรัมหรือมิลลิลิตรในระดับที่สูง คัดเลือกแบคทีเรียทั้งที่มีและไมมีสีเขียวเหลือบแสง คลายรอยตัดของชิ้นโลหะบนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แข็ง EMB จำนวน 108 ไอโซเลท นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ด้วยปฏิกิริยา IMViC พบว่าปฏิกิริยา IMViC ใช้ตรวจสอบเชื้อ *E. coli* ได้ถูกต้องมากกว่าการตรวจสอบ โดยใช้ลักษณะโคโลนีบนอาหาร EMB วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อที่เป็นและไม่เป็น *E. coli* ที่ วิเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา IMViC อย่างละ 4 ไอโซเลท ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (พีซีอาร์) และวิธีเจลอิเลคโตรโฟลิซิส พบว่าดีเอนเอที่ได้จากเชื้อ *E. coli* ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่วิเคราะห์ได้จากปฏิกริยา IMViC เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 167 กิโลเบส ของยีน uidA สวนอีก 4 ไอโซเลท ที่ไม่ใช่เชื้อ *E. coli* ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเรียลไทมพีซีอาร์ให้ผลเชนเดียวกัน จึงคาดหวังวาจะใช้ยีน uidA เป็นยีนเครื่องหมายในการตรวจสอบเฉพาะเชื้อ *E. coli* ต่อไป

2.3.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ

Chenxi et al. (2018) ได้ทำการศึกษาการใช้แบคเทอริโอเฟจ LPSE1 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ที่แยกได้จากไส้กรอก โดยการนำแบคเทอริโอเฟจทั้งหมด 35 ชนิด มาเพิ่มปริมาณและทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ในน้ำนม ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าแบคเทอริโอเฟจ LPSE1 ที่ระดับความเข้มข้นของ MOI เท่ากับ 1 และ 100 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* จาก 1.44 $\log_{10}$ CFU / mL และ 2.37 $\log_{10}$ CFU / mL ลดลงเหลือ 0.52 $\log_{10}$ CFU/mL และ 0.49 $\log_{10}$ CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุดจากแบคเทอริโอเฟจทั้งหมด 35 ชนิด เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจ LPSE1 มีช่วงของโฮสต์เรจน์ที่กว้าง รวมถึงช่วง lytic ที่ดี สามารถทนต่อค่า pH ได้หลากหลาย และทนต่อความร้อนได้นาน วิจัยชิ้นนี้เป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้เทคนิคสำหรับการคัดแยกเชื้อแบคเทอริโอเฟจจากเครื่องปรุงรส

Premarathne et al. (2017) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาชนิดของแบคเทอริโอเฟจแบบ lysogenic จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *E. coli* โดยการใช้ Mitomycin C เป็นตัวความคุมการเจริญเติบโตในเชื้อแบคทีเรียโฮสขณะบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงคัดแยกแบคเทอริโอเฟจให้มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 10^2 ถึง $1{,}0^{10}$ PFU / mL ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีความสัมพันธุ์กับแบคทีเรียโฮส เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมของแบคทีเรียโฮส จะมีโอกาสสูงที่แบคเทอริโอเฟจจะจำเพาะต่อแบคทีเรียโฮส

นริศราและคณะ (2560) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติกเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะชนิด Extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (ESBL-E.coli) โดยทำการแยก แบคเทอริโอเฟจ จากน้ำและน้ำเสียด้วยวิธี enrichment method และ double agar layer method จากการทดลอง สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ 7 ชนิด/หรือไอโซเลตจากตัวอย่างน้ำต่างชนิดกัน โดยตั้งชื่อแบคเทอริโอเฟจที่แยก ได้ว่า EP1, EP2, EP3, EP4, EP5, EP6 และ EP7 ตามลำดับ การศึกษาความสามารถในการบุกรุกแบคทีเรีย ได้ทำการทดสอบทั้งหมด 17 ชนิดของแบคเทอริโอเฟจ โดยวิธี spot test พบว่าแบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตที่แยกได้ (ยกเว้น EP2) สามารถบุกรุกแบคทีเรียได้มากกว่าหนึ่งชนิด เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตเป็นแบคเทอริโอเฟจใน order Caudovirales โดย แบคเทอริโอเฟจ EP1, EP2, EP3, EP5, EP6 and EP7 จัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ใน family Siphoviridae และแบคเทอริโอเฟจ EP4 จัดอยู่ใน family Podoviridae การศึกษา one-step growth experiment ทำให้ทราบค่า latent period, burst time และ burst size ของแบคเทอริโอเฟจแต่ละไอโซเลต การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ พบว่าแบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตมีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA และสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ EcoRI จากการศึกษารูปแบบ DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี agarose gel electrophoresis และการศึกษารูปแบบ โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ของแบคเทอริโอเฟจพบว่า แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ทั้งหมดเป็นคนละชนิดกัน ซึ่งบ่งบอกถึงความหลากหลายของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้

Lasha et al. (2019) ได้ทำการศึกษาเพื่อทดสอบว่าแบคเทอริโอเฟจมีความสามารถในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายหรือไม่ โดยการนำแบคเทอริโอเฟจไปทำการทดสอบในลำไส้ของหนูที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* กับ *Escherichia* เป็นแบคทีเรียโฮส พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถส่งต่อ DNA ผ่านตัวรับนิวคลีโอไทด์เซ็นเซอร์ TLR9 ไปสู่เยื่อเมือกของลำไส้ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจมากขึ้นจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ใหญ่ทำงานได้แย่ลง ในขณะเดียวกันเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียโฮสในลำไส้ของหนู จะส่งผลทำให้ปริมาณของแบคเทอริโอเฟจลงลด และส่งผลดีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ จากผลรวมเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถเปลี่ยนแปลงภูมิต้านทานของเยื่อเมือกและสุขภาพของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้

Mohammad et al. (2016) ได้ทำศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากน้ำเสีย เพื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจกับยาปฏิชีวนะ Ceftriaxone โดยทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย จากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจไปทดสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli* พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* จากในน้ำและจากโรงบำบัดน้ำเสียได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ Ceftriaxone

Todd R et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อ *E.coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของวัวที่เลี้ยงในฟาร์ม เพื่อนำมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* O157: H7 ในลำไส้ของแกะ พบว่าแบคเทอริเฟจที่แยกได้สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157: H7 ในอุจจาระของแกะลงได้ ($p < 0.05$) ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังทำการทดลองทดสอบความจำเพาะ และเมื่อทำการผ่าลำไส้ของแกะเพื่อตรวจสอบปริมาณของเชื้อ *E.coli* O157: H7 พบว่ามีปริมาณลดลง ($p < 0.1$) จึงสรุปได้ว่าแยกแบคเทอริเฟจของเชื้อ *E.coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของวัวสามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* O157: H7 ในลำไส้ของแกะได้

Licheng et al. (2019) ได้ทำการศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคเทอริโอเฟจ เมื่อสภาพแวดล้อมของโฮสแบคเทอริโอเฟจมีการเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงแบคเทอริโอเฟจ MS2 ปริมาตร 6.6 log PFU /g ในผลสตรอเบอร์รี่ ที่ถูกล้างด้วยน้ำที่ผ่านการอิเล็กโทรไลต์หรือคลอรีนปริมาณ 50 ppm เป็นเวลา 90 วินาที ทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และทำการหาปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ MS2 ในสตรอเบอร์รี่ วันที่ 1, 15 และ 30 พบว่าการล้างสตรอเบอร์รี่ก่อนการเก็บรักษาจะทำให้ปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ MS2 ลดลงประมาณ 1 log PFU / g แต่การแช่แข็งสตรอเบอร์รี่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส จะทำให้แบคเทอริโอเฟจลดลงเพียง 0.5 log PFU / g ตรงกันข้ามกับการล้างผลสตรอเบอร์รี่หลังจากแช่แข็ง ในน้ำที่ผ่านการอิเล็กโทรไลต์หรือคลอรีนจะทำให้แบคเทอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ริโอเฟจเพิ่มขึ้น 1 log PFU / g จึงได้ข้อสรุปว่าการล้างผลสตรอเบอร์รี่ด้วยสารเคมีต้านจุลินทรีย์ก่อนและหลังการแช่แข็ง จะมีผลต่อปริมาณของแบคเทอริโอเฟจในผลสตรอเบอร์รี่

นริศรและเสรี (2559) ได้ศึกษาเกี่ยวแบคเทอริโอเฟจที่แยกจากสิ่งแวดล้อมและทดสอบประสิทธิผลเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรค ติดเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรค colibacillosis ในไก่เนื้อ โดยใช้ไก่เนื้อจำนวน 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่แรกเป็นกลุ่มควบคุมเป็นไก่ที่เลี้ยงโดยไม่ได้รับเชื้อ *E. coli* และแบคเทอริโอเฟจ กลุ่มที่สองสเปรย์แบคเทอริโอเฟจวันละครั้งติดต่อกันสามวัน กลุ่มที่สามสเปรย์เชื้อ *E. coli* 10^5 cfu/ml ครั้งเดียวก่อนแล้วจึงให้แบคเทอริโอเฟจ 10^{10} pfu/ml เป็นเวลาสามวัน ติดต่อกัน กลุ่มที่สี่สเปรย์เชื้อ *E. coli* แล้วจึงให้ยา norfloxacin ภายในเวลาสองชั่วโมงโดยใช้ขนาด 10 มก./กก. เป็นเวลาสามวันติดต่อกัน กลุ่มที่ห้าไก่ได้รับสเปรย์เชื้อ *E. coli* ในอากาศอย่างเดียว ผลการศึกษาพบว่าอัตราการป่วยและอัตราการตายต่ำทั้งในกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่หนึ่ง) และกลุ่มที่สเปรย์ด้วยแบคเทอริโอเฟจ (กลุ่มที่สอง) คือ 20% 20% กับ 10% 10% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *E. coli* อย่างเดียวมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงคือ 70% กับ 70% ในขณะที่ไก่กลุ่มที่ได้รับฟาจร่วมกับเชื้อ *E. coli* (กลุ่มที่สาม) หรือได้ยา norfloxacin และเชื้อ *E. coli* (กลุ่มที่สี่) มีอัตราการป่วยและอัตราการตายต่ำใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม, 30%, 10% และ 30% และ 20% ตามลำดับ การศึกษานี้สรุปได้ว่าแบคเทอริโอเฟจไม่เป็นพิษต่อไก่เนื้อ และแบคเทอริโอเฟจยังให้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ได้ดีเทียบเท่ากับการให้ยาปฏิชีวนะ norfloxacin แบคเทอริโอเฟจให้ผลสูงในการป้องกันโรคถึง 44.44% ไก่กลุ่มที่ 3 ได้รับเชื้อและแบคเทอริโอเฟจกับไก่กลุ่มที่ 4 ได้รับเชื้อและยามีอัตราการป่วยตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือ

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

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, MERCK, Germany)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder Type I, TM Media, India)
3. ทริปโตน (Tryptone Powder, Sisco, India)
4. สารละลาย Saline-Magnesium (SM solution)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (KH_2PO_4 , AjaxFinechem Pty Ltd., Australia)
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (Na_2HPO_4 , Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
8. สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
9. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (40% KOH)
10. สารละลายอัลฟาแนปทอล (Alpha Naphthol Solution)
11. โคแวครีเอเจนท์ (Kovac's Reagent)
12. สารละลายเมทิวเรด (Methyl Red Solution)
13. น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram Iodine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
14. สีซาฟรานิน (Safranin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
15. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ศิริบัญชา, ประเทศไทย)
16. สีนิโกรซิน (Nigrosin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

เอกสารนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของผู้ให้บริการ ให้ใช้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethyl alcohol, องค์การสุรากรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
18. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Ethyl Alcohol)
19. กลีเซอรอล 80 เปอร์เซ็นต์ (80% Glycerol)
20. Butterfield's phosphate-buffered water

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เก็บตัวอย่างเครื่องปรุงรส ได้แก่ พริกป่น, พริกทอด, น้ำพริกส้ม, น้ำตาล, น้ำจิ้มข้าวมันไก่, น้ำจิ้มจิ้มแจ่วและน้ำจิ้มข้าวหมูแดง จากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 7 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างจากตลาดนัดสถานีคนเดินพระจอมเกล้าเจ้าลาดกระบัง จำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำพริกกะปิ, น้ำพริกปลาร้า, น้ำจิ้มแหนมเนือง, น้ำจิ้มซีฟู้ด, น้ำจิ้มสุกี้, น้ำยำปลาดุกฟู, น้ำพริกเผา, หลนเต้าเจี้ยว, น้ำพริกปลาหวาน, พริกเกลือ, ออริกาโน, กิมจิ, วาซาบิและโชยุ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 21 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่าง พริกป่น, พริกทอด, น้ำพริกส้ม, น้ำตาล, น้ำจิ้มข้าวมันไก่, น้ำจิ้มจิ้มแจ่ว , น้ำจิ้มข้าวหมูแดง ใช้ช้อนพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วตักตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่าง น้ำพริกกะปิ, น้ำพริกปลาร้า, น้ำจิ้มแหนมเนือง, น้ำจิ้มซีฟู้ด, น้ำจิ้มสุกี้, น้ำยำปลาดุกฟู, น้ำพริกเผา, หลนเต้าเจี้ยว, น้ำพริกปลาหวาน, พริกเกลือ, ออริกาโน, กิมจิ, วาซาบิและโชยุ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากตลาดนัดสถานีคนเดินพระจอมเกล้าเจ้าลาดกระบัง

3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* เก็บตัวอย่างน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารอาคารเรียนรวมพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลาดกระบัง จาก 2 บ่อดักไขมัน รวมทั้งหมด 2 ตัวอย่าง โดยใช้หลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างน้ำสกปรกจากแต่ละบ่อมาจำนวน 20 มิลลิลิตร รวมทั้งหมด 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.6 วิธีการทดลอง

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

นำตัวอย่างจากข้อ 3.5.1 มาอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงปั่นตัวอย่าง จากนั้นเติม 225 มิลลิลิตร ของ Butterfield's phosphate-buffered water ปั่นตัวอย่างนาน 2 นาที จากนำมา Cross streak ลงบนอาหารแข็ง EMB agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* โดยทำการคัดเลือกโคโลนีที่ลักษณะสีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Green metallic sheen) (Leininger, 2001) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.2.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนี

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จากอาหารแข็ง EMB ที่มีลักษณะสีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Green metallic sheen) จากข้อ 3.6.1 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดงแล้วเขี่ยเชื้อ นำมาลากลงบนจานอาหารแข็ง NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ หรือเป็นคลื่น สีขาว หรือสีขาวอมเหลือง (Castellani, 1957) วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Prakash, 2014)

3.6.2.2 การทดสอบการติดสีแกรม

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าว่าจะเป็น *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาย้อมสี Gram strain โดยหยดน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียมา Smear ลงบนหยดน้ำรอจนแห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2 – 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลทลงบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างสีคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำกลั่น หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนลงบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างเอทิลแอลกอฮอล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีซาฟรานินด้วยน้ำกลั่น รอจนแห้งแล้วนำไปส่องดูการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (อภิชญา, 2558)

3.6.2.3 การวัดขนาดเซลล์

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ Negative strain โดยใช้สีนิโกรซิน (Nigrosin) หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงบริเวณปลายด้านหนึ่งของสไลด์ แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อหยดน้ำลงข้างหยดสี จากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลงในหยดน้ำ ใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นมาวางแตะหยดทั้งสอง จากนั้นลากสไลด์ช้า ๆ ตามแนวยาวให้ส่วนผสมแผ่ออก รอจนแห้ง แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (กัญจนา และคณะ, 2544)

3.6.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.3.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนแผ่นสไลด์ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จะเกิดฟองอากาศบริเวณที่แตะเชื้อลงไป

3.6.3.2 การทดลอบการสังเคราะห์อินโดล (Indole ring)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาทดสอบการสังเคราะห์อินโดล โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายทริปโตน (Tryptone water) 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยดโคแวครีเอเจนท์ (Kovac's reagent) 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อินโดลได้จะเกิดวงแหวนสีแดง ให้อ่านผลเป็นบวก ส่วนเชื้อที่ไม่เกิดวงแหวนสีแดง ให้อ่านผลเป็นลบ

3.6.3.3 การทดสอบ Methyl red และ Voges - Proskaure

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียใส่ลงในหลอดอาหารเหลว MR-VP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วดูดหลอดอาหารเหลว MR-VP ใส่ในหลอดเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร มาทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskaure ดังนี้

หลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยการหยดสารเมทิลเรด (Methyl red) 4 – 5 หยด จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน หากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นลบ

หลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges - Proskaure โดยหยดสารละลายอัลฟาแนปทอล (Alpha naphthol) 0.6 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ (40% KOH) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน อ่านผลภายใน 2 ชั่วโมง หากเกิดสีชมพูแดงอ่านผลเป็นบวก และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอ่านผลเป็นลบ

3.6.3.4 การทดสอบการใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลากลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนหลอดอาหารแข็ง Simmon's citrate agar นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงอ่านผลเป็นลบ *E.coli* จะให้ผลลบเสมอ (สุรีย์, 2557)

การอ่านค่าชนิดของ *Escherichia coli*

ชนิดของ E. coli	Indole	MR	VP	Citrate
E. coli Type I	+	+	-	-
E. coli Type II	-	+	-	-

3.6.4 การเก็บหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าเป็น *E. coli* บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาเก็บแบบแช่เยือกแข็งในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ โดยนำลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรสารละลายรวม 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.5 การเตรียมหัวเชื้อ *Escherichia coli*

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

3.6.6 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.6.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ S_5, S_{34} และ S_{59}

3.6.6.2. การแยกแบคเทอริโอเฟจจากบ่อดักไขมัน

3.6.6.2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารอาคารเรียนรวมพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จาก 2 บ่อดักไขมัน รวมทั้งหมด 2 ตัวอย่าง โดยดูดตัวอย่างน้ำสกปรกจากแต่ละบ่อมาจำนวน 20 มิลลิลิตร รวมทั้งหมด 40 มิลลิลิตร นำตัวอย่างเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วแบ่งใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรองที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจในขั้นตอนต่อไป

3.6.6.2.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation without Enrichment)

นำส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้จากข้อ 3.6.6.2.1 ไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค (Plaque assay) โดยการนำส่วนใสได้จากการกรองที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลท จำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ S_5, S_{34}, S_{59} ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (Top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้น ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิระหว่าง 55 - 60 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (Bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (Control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่ได้จากการกรอง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (Plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (Double layer agar)

3.6.6.2.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation with Enrichment)

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6.6.2.2 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 1X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* แต่ละไอโซเลท โดยใช้ทั้งหมดจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ S_5, S_{34}, S_{59} ที่ผ่านการบ่มครบ 18 ชั่วโมงแล้ว นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างออกมาจากขวดรูปชมพู่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่าจะมีแบคเทอริโอเฟจลงในขวดที่ฆ่าเชื้อ จากนั้นดูดส่วนใสข้างต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (Top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้น ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิระหว่าง 55 - 60 องศาเซลเซียส แล้วผสมส่วนใสกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวให้เข้ากัน จากเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (Bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (Control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่ได้จากการกรอง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (Plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (Double layer agar)

3.6.6.3 วิธีการทำ Plaque assay

การทำ Plaque assay เพื่อทำการจะแยกแบคเทอริโอเฟจจะใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Clokie and Kropinski (2009) นำส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้ที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการบ่มครบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (Top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้น ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (Bottom agar) พร้อมทั้งทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (Control plate) ที่ไม่มีการเติมส่วนใสที่ได้จากการกรอง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ โดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (Plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (Double layer agar)

3.6.6.4 วิธีการทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์โดยทำการเก็บบริเวณพลาคใส (Picking)

ใช้ทิปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยบริเวณใสจากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 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 นำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองที่มีแบคเทอริโอเฟจลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ทูปที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.6.6.5 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีวิธีการชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจจากจานอาหารวุ้นสองชั้น (Phage lysate)

วิธีการชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจจากจานอาหารวุ้นสองชั้น (Phage lysate) ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) ทำโดยการนำส่วนใสที่ได้จากการกรองที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่แยกได้ที่ผ่านการบ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (Top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้น ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (Bottom agar) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำให้บริเวณผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นเกิด lysis zone ซึ่งเกิดจากเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านแตกและปลดปล่อยอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจออกมานอกเซลล์ จากนั้นจึงโดยทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวนจานอาหารวุ้นสองชั้นทุกๆ 30 นาที เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อนาไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองที่มีแบคเทอริโอเฟจลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6.6.7 วิธีการทำ Spot test

วิธีการทำ Spot test ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำแบคทีเรียเจ้าบ้านที่คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้ที่ผ่านการบ่มครบ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (Top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) เมื่ออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB แข็งตัว นำส่วนใสที่ได้จากการกรองที่มีแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดหรือจุด (spot) ลงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB พร้อมทั้งทำจานอาหารควบคุม (Control plate) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียเจ้าบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากเครื่องปรุงรส เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เนื่องจากในงานวิจัยของ Robert et al., (1982) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารส่วนลำไส้ของคนและสัตว์ สามารถแพร่เข้าสู่คนได้ทางการรับประทานอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ และพบเชื้อชนิดนี้ได้มากในอาหารที่ผ่านการปรุงแบบไม่ถูกสุขลักษณะ การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากเครื่องปรุงรสอันประกอบด้วย พริกป่น, พริกทอด, น้ำพริกส้ม, น้ำตาล, น้ำจิ้มข้าวมันไก่, น้ำจิ้มจิ้มแจ่ว, น้ำจิ้มข้าวหมูแดง จากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 7 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างจากตลาดนัดสถานีคนเดินพระจอมเกล้าเจ้าลาดกระบัง จำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำพริกกะปิ, น้ำพริกปลาร้า, น้ำจิ้มแหนมเนือง, น้ำจิ้มซีฟู้ด, น้ำจิ้มสุกี้, น้ำยำปลาดุกฟู, น้ำพริกเผา, หลนเต้าเจี้ยว, น้ำพริกปลาหวาน, พริกเกลือ, ออริกาโน, กิมจิ, วาซาบิและโชยุ โดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* บนอาหารแข็ง Eosin-Methylene Blue agar (EMB agar) แล้วคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* มาทำการทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาดและลักษณะของโคโลนี ขนาดเซลล์ การเคลื่อนที่ รวมถึงทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ ทดสอบการสร้าง Indole การทดสอบ Voges-Proskaure (VP) การทดสอบ Methyl red (MR) การทดสอบการใช้ Citrate (สุรีย์, 2557)

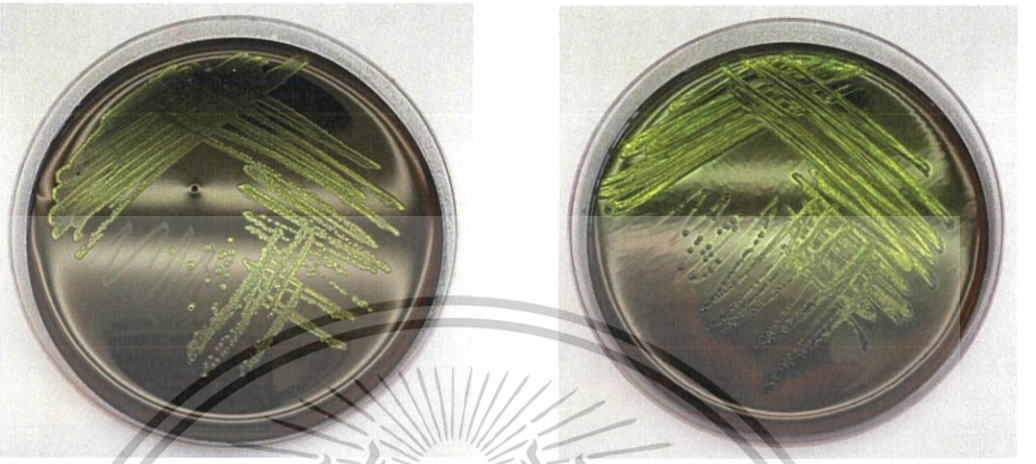
4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin-Methylene Blue agar

นำตัวอย่างเครื่องปรุงรสทั้ง 20 ตัวอย่างที่ต้องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* คือ โคโลนีสีม่วง รูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีบริเวณสีเขียวรอบนอกโคโลนี (Metallic sheen) (Biswas et al., 2010) ดังรูปที่ 4.1 ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง พบแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ได้แก่ P1, P2, P4, P5, P6, P7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20 และ C21 ดังแสดงตารางที่ 4.1 เนื่องจากเชื้อ *E. coli* มักปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม (Robert et al., 1982) จากการคัดแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส จึงได้คัดเลือกโคโลนีมาจำนวนทั้งหมด 108 ไอโซเลท (1 โคโลนี คือ 1 ไอโซเลท)

จากผลการทดลองข้างต้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* มีลักษณะเป็นโคโลนีสีม่วง รูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีบริเวณสีเขียวรอบนอกโคโลนี (Metallic sheen) ดังรูปที่ 4.1 เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลแลกโตสได้อย่างรุนแรง ในอาหาร EMB ทำให้บริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เกิดกรด และทำให้ค่า pH ของอาหารในบริเวณนั้นลดลง จึงเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ Eosin Y และ Methylene blue ในอาหาร EMB และทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้บริเวณนั้นเป็นสีดำเหลือบเขียว (Green metallic sheen) ซึ่งโดยปกติหากเกิดการหมักไม่รุนแรง จะเกิดเป็นโคโลนีเป็นสีชมพู ลักษณะเป็นเมือก และถ้าไม่มีการหมักน้ำตาลแลกโตส โคโลนีที่เกิดขึ้นจะไม่มีสี (Leininger, 2001)



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* เมื่อเจริญบนจานอาหารแข็ง EMB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
พริกป่น	P1	S_1, S_2, S_3, S_4
พริกทอด	P2	S_5, S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}
น้ำส้มสายชู	P3	-
น้ำตาล	P4	S_{12}, S_{13}, S_{14} , S_{15}, S_{16},
น้ำจิ้มข้าวมันไก่	P5	S_{17}, S_{18}, S_{19}, S_{20}, S_{21}, S_{22}, S_{23}, S_{24}, S_{25}
น้ำจิ้มจิ้มแจ่ว	P6	S_{26}, S_{27}, S_{28}
น้ำจิ้มข้าวหมูแดง	P7	S_{29}, S_{30}, S_{31}, S_{32}, S_{33}
น้ำพริกกะปิ	C8	S_{34}, S_{35}, S_{36}, S_{37}, S_{38}, S_{39}, S_{40}, S_{41}, S_{42}, S_{43}, S_{44}
น้ำพริกปลาร้า	C9	S_{45}, S_{46}, S_{47}, S_{48}, S_{49}, S_{50}, S_{51}, S_{52}
น้ำจิ้มแหนมเนือง	C10	S_{53}, S_{54}, S_{55}, S_{56}, S_{57}, S_{58}
น้ำจิ้มซีฟู้ด	C11	S_{59}, S_{60}, S_{61}, S_{62}, S_{63}, S_{64}
น้ำจิ้มสุกี้	C12	S_{65}, S_{66}
น้ำยำปลาดุกฟู	C13	S_{67}, S_{68}, S_{69}, S_{70}, S_{71}
น้ำพริกเผา	C14	S_{72}, S_{73}, S_{74}, S_{75}, S_{76}, S_{77} S_{78}, S_{79}, S_{80}, S_{81}
หลนเต้าเจี้ยว	C15	S_{82}, S_{83}, S_{84}, S_{85}, S_{86}, S_{87}, S_{88}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
น้ำพริกปลาหวาน	C16	S_{89}, S_{90}, S_{91}
พริกเกลือ	C17	S_{92}, S_{93}, S_{94}, S_{95}
ออริกาโน	C18	S_{96}, S_{97}, S_{98}, S_{99}, S_{100}
กิมจิ	C19	S_{101}, S_{102}, S_{103}, S_{104}, S_{105}, S_{106}
วาซาบิ	C20	S_{107}
โชยุ	C21	S_{108}

4.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา

4.1.2.1 การตรวจดูลักษณะโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดงเขี่ยโคโลนีของที่คาดว่าเป็นโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาลาก (Cross streak) บนจานอาหารแข็ง NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} แล้วตรวจดูลักษณะของโคโลนี ซึ่งโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารแข็ง NA จะมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ หรือเป็นคลื่น สีขาวหรือสีขาวอมเหลือง (Castellani, 1957) จากการตรวจสอบทั้ง 20 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีดังที่กล่าวมาข้างต้น

ในการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จำนวน 20 ไอโซเลท ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ บนจานอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทั้ง 20 ไอโซเลท มีขนาดโคโลนีตั้งแต่ 0.93 ถึง 2.01 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.2

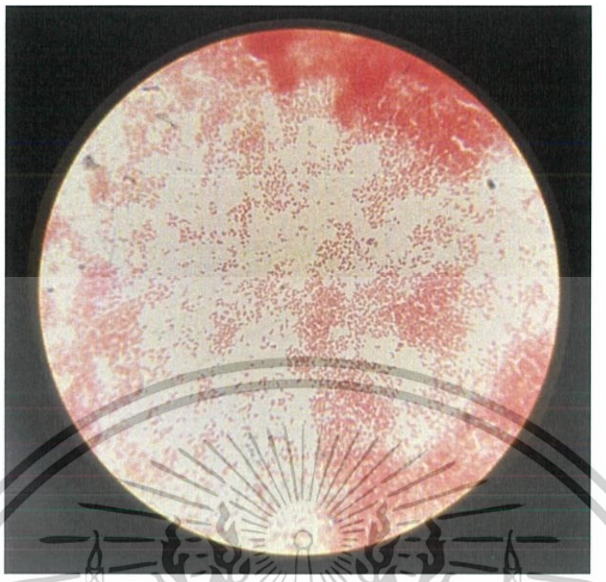
4.1.2.2 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลท ที่เจริญบนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA บ่มที่อุณหูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* สามารถย้อมติดสีแดงของซาฟรานินทั้ง 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108}

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อนำไปย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขนาน 1,000 เท่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟรานิน (Safranin) เนื่องจาก *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งจะมีปริมาณไขมันที่ผนังเซลล์สูง (Outer membrane) และเมื่อไขมันถูกล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ (Decolorize) จะทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุน ส่งผลให้สารประกอบเชิงซ้อน Crystral violet- Iodine ที่จับกับผนังเซลล์ที่ย้อมในขั้นตอนแรกถูกล้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกจากเซลล์ได้ง่าย ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจึงจับกับ Safranin ซึ่งเป็นสีที่สองที่ย้อมทับได้ (P.S. Hiremath and Parashuram, 2011) ดังรูป 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะของเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ย้อมติดสีแดงของ Safranin ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.2.3 การวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} บนหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการย้อมสีพื้นหลังด้วยนิโกรซิน (Nigrosin) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลท มีขนาดกว้าง 0.5 – 1.0 ไมโครเมตร ยาว 1.6 – 2.2 ไมโครเมตร ดังตารางที่ 4.2

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

4.1.3 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

4.1.3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทำได้โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกับเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 20 ไอโซเลท จากหลอดอาหารแข็งลาดเอียง NA ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองอากาศ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

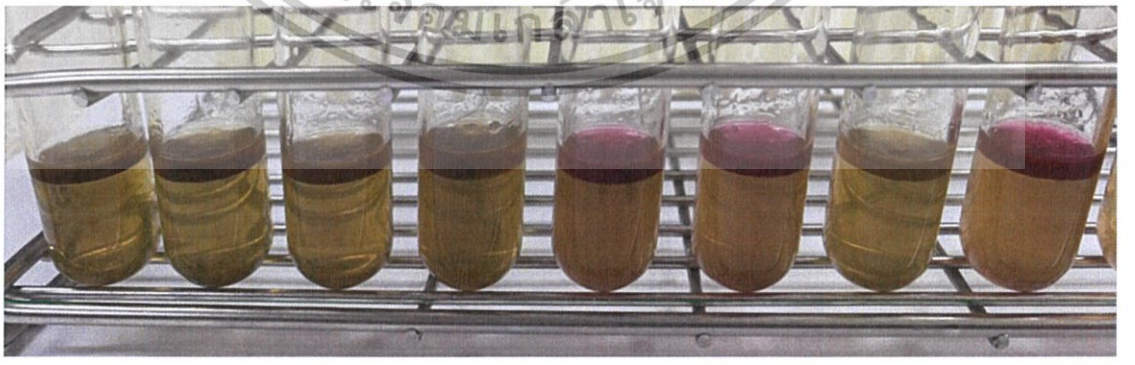
20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} มีฟองอากาศเกิดขึ้น ดังตารางที่ 4.2

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

4.1.3.2 การทดลอบการสังเคราะห์อินโดล (Indole ring) ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อินโดล ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียทีคาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 20 ไอโซเลท จากหลอดอาหารลาดเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารละลายทริปโตน (Tryptone water) 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยดโคแวครีเอเจนท์ (Kovac's reagent) ปริมาณ 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{17}, S_{26}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{107}, S_{108} เกิดเป็นวงแหวนสีชมพู และเชื้อแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ S_{12}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{67}, S_{96}, S_{101} ไม่สามารถสร้างวงแหวนสีชมพูได้ ดังตารางที่ 4.2

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถสังเคราะห์อินโดลได้ (Chris Bell, 1998) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ทริปโตฟาเนส (Tryptophanase) ซึ่งสามารถดีเอมิเนชั่น (Deamination) กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นอินโดล, กรดไพรูวิค และแอมโมเนียม (Botsford, 1972)) เมื่อหยดโคแวครีเอเจนท์ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ (dimethylaminobenzoldehyde) ในโคแวครีเอเจนท์จะทำปฏิกิริยากับอินโดล เกิดการสร้างสีแดงของเรซินโดล (red rasindole dye) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในโคแวครีเอนเจนท์จะสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับเรซินโดล เกิดการเป็นตะกอน แอลกอฮอล์ที่เหลือและตะกอนจะลอยอยู่บริเวณผิวหน้า ทำให้บริเวณผิวหน้าของสารละลายเกิดวงแหวนสีแดงเชอรี่ (Powers, 1977) ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบการสังเคราะห์อินโดลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* หลอดที่เกิดวงแหวนสีชมพูคือเชื้อ *E. coli* Type I ซึ่งสามารถสร้างอินโดลได้ ส่วนหลอดที่ไม่เกิดวงแหวนสีชมพูคือเชื้อ *E. coli* Type II ซึ่งไม่สามารถสร้างอินโดลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3.3 การทดสอบ Methyl red และ Voges – Proskaure ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Escherichia coli*

ในการทดสอบ Methyl red และ Voges - Proskaure ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียทีคาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} จากหลอดอาหารลาดเอียง NA ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว MR-VP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปแบ่งใส่หลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 หลอด หลอดละเท่าๆกัน โดยหลอดที่ 1 นำมาทดสอบ Methyl red โดยการหยดอินดิเคเตอร์เมทิลเรด (Methyl red) พบว่าเกิดเป็นสีแดง (ผลบวก) ทั้งหมด 20 ไอโซเลท ส่วนหลอดที่ 2 นำมาทดสอบ Voges - Proskaure โดยหยดสารละลายอัลฟาแนปทอล (Alpha naphthol) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ผลลบ) ทั้ง 20 ไอโซเลท ดังตาราง 4.2

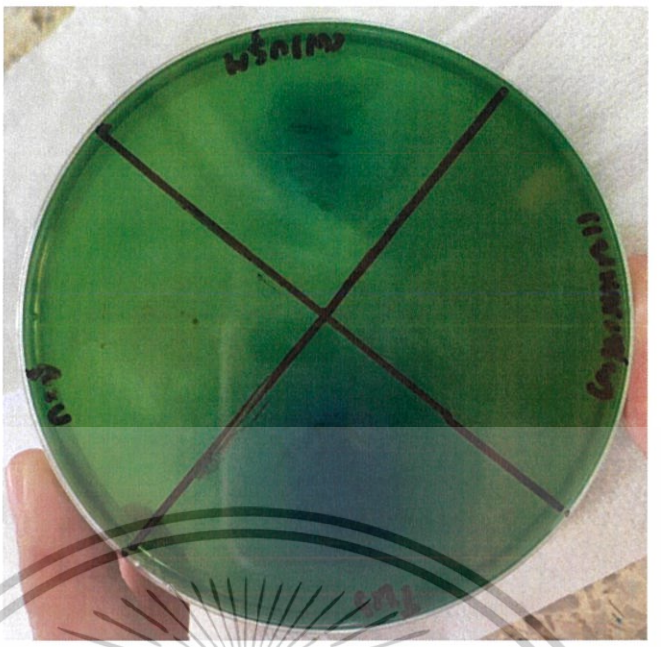
โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้ผลเป็นบวก ในการทดสอบ Methyl red และให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบ Voges – Proskaure เนื่องจากความสามารถในการผลิตกรดไพรูวิคจากการหมักน้ำตาลเดกซ์โทรสของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำให้พีเอชของอาหารลดลง เมื่อหยดอินดิเคเตอร์เมทิลเรดจึงเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง (Clark, 1915) แต่ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไพรูวิค (Pyruvic acid) ที่เกิดขึ้นให้อยู่ในรูปของอะซิโทอิน (Acetoin) ได้ พีเอชของอาหารจึงไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อทดสอบด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้การแร่งปฏิกิริยาของสารละลายอัลฟาแนปทอล (Koneman, n.d.) จึงยังคงเป็นสีเหลือง จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

4.1.3.4 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Escherichia coli*

ในการทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท โดยนำเชื้อแบคทีเรียทีคาดว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} จากหลอดอาหารลาดเอียง NA ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดอาหารแข็ง Simmon's citrate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง ทั้ง 20 ไอโซเลท ดังตาราง 4.2 และรูปที่ 4.4

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท คืออาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ซิเตรส (citrase enzyme) ซึ่งเอนไซม์ซิเตรสจะใช้ในการสลายสารโซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียวในอาหาร simmom's citrate (Simmons, 1926) ทำให้อินดิเคเตอร์โบรโมไทมอลบลูในอาหารไม่เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* บนอาหารแข็ง Simmon's citrate โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli*

อย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						การทดสอบทางชีวเคมี		
		ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA		ลักษณะของเซลล์		ขนาดของเซลล์ กว้าง x ยาว (μm)	Indole	Voges-Proskaure	Methyl red	Citrate
		รูปร่าง ลักษณะ	ขนาด (mm)	รูปร่าง	ติดสี					
พริกป่น	S_1	*	1.11	ท่อนตรง	แดง	0.9 x 2.0	+	-	+	-
พริกทอด	S_5	*	1.41	ท่อนตรง	แดง	0.7 x 1.9	+	-	+	-
น้ำตาล	S_{12}	*	1.33	ท่อนตรง	แดง	0.6 x 1.7	-	-	+	-
น้ำจิ้มข้าวมันไก่	S_{17}	*	1.70	ท่อนตรง	แดง	0.6 x 1.6	+	-	+	-
น้ำจิ้มจิ้มแจ่ว	S_{26}	*	1.52	ท่อนตรง	แดง	0.8 x 2.2	+	-	+	-
น้ำจิ้มข้าวหมูแดง	S_{29}	*	2.01	ท่อนตรง	แดง	0.7 x 1.8	-	-	+	-
น้ำพริกกะปิ	S_{34}	*	1.14	ท่อนตรง	แดง	0.8 x 1.7	-	-	+	-
น้ำพริกปลาร้า	S_{45}	**	1.03	ท่อนตรง	แดง	0.7 x 1.7	-	-	+	-
น้ำจิ้มแหนมเนือง	S_{53}	**	0.93	ท่อนตรง	แดง	0.7 x 2.0	+	-	+	-
น้ำจิ้มซีฟู้ด	S_{59}	*	1.90	ท่อนตรง	แดง	0.6 x 1.9	+	-	+	-
น้ำจิ้มสุกี้	S_{65}	*	1.54	ท่อนตรง	แดง	0.9 x 2.1	+	-	+	-
น้ำยำปลาดุกฟู	S_{67}	*	1.37	ท่อนตรง	แดง	0.9 x 2.0	-	-	+	-
น้ำพริกเผา	S_{72}	*	1.12	ท่อนตรง	แดง	0.6 x 1.8	+	-	+	-
หลนเต้าเจี้ยว	S_{82}	*	1.18	ท่อนตรง	แดง	0.6 x 1.9	+	-	+	-
น้ำพริกปลาหวาน	S_{89}	**	1.62	ท่อนตรง	แดง	0.5 x 1.6	+	-	+	-
พริกเกลือ	S_{92}	*	1.48	ท่อนตรง	แดง	0.8 x 1.9	+	-	+	-
ออริกาโน	S_{96}	*	1.89	ท่อนตรง	แดง	1.0 x 2.1	-	-	+	-
กิมจิ	S_{101}	*	1.06	ท่อนตรง	แดง	0.7 x 1.8	-	-	+	-
วาซาบิ	S_{107}	*	1.37	ท่อนตรง	แดง	0.7 x 1.9	+	-	+	-
โชยุ	S_{108}	*	1.04	ท่อนตรง	แดง	1.0 x 2.2	+	-	+	-

การอ่านผล * โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีสีขาวนวล

** โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และสีเหลืองนวล

4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำสกปรกจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารอาคารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาลาดกระบัง เพื่อนำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจ ในงานวิจัยของ Sandeep (2006) และ Weder – Dabrowska et al. (2003) กล่าวว่า แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน (host) สูง และ Precott (2002) พบว่าบริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน จะมีโอกาสในการแยกแบคเทอริโอเฟจได้น้อย ดังนั้นในการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจในครั้งนี้ จึงใช้ตัวอย่างจากน้ำสกปรกจากโรงอาหารศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการสะสมของน้ำสกปรกและสิ่งปฏิกูลต่างๆที่ไหลลงมาจากโรงอาหาร ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สูง

4.2.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างเครื่องปรุงที่คัดเลือกมาทั้ง 20 ไอโซเลท ไปวัดความสามารถในการเจริญ พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการเจริญดีที่สุด 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากพริกทอด, น้ำพริกกะปิและน้ำจิ้มซีฟู้ด ซึ่งมีรหัสไอโซเลทคือ S_5, S_{34}, S_{59} ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) โดยได้นำทั้ง 3 ไอโซเลท มาใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ โดยวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจทั้งแบบไม่มีการเพิ่มปริมาณและแบบเพิ่มปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ตามข้อที่ 3.6.6.2.2 และข้อ 3.6.6.2.3 จากนั้นจึงนำแบคเทอริโอเฟจที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการ Picking ดังข้อที่ 3.6.6.4 แล้วจึงนำแบคเทอริโอเฟจที่บริสุทธิแล้วมาสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli* (Host range) ดังข้อที่ 3.6.6.7 โดยใช้แบคทีเรียเจ้าบ้านของ *E. coli* ที่แยกได้ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108}

4.2.1.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ที่แยกได้โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจนำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจจากข้อ 3.6.6.2.1 มาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี Plaque assay ตามข้อ 3.6.6.2.2 โดยใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน 3 ไอโซเลท ได้แก่ S_5, S_{34}, S_{59} พบว่าไม่เกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้น 2 ชั้น ทั้ง 3 ไอโซเลท และเกิดจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาคขุ่นจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ S_5 และ S_{34} แต่ผลที่ได้ไม่พบพลาคใสเกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น ดังรูปที่ 4.5

4.2.1.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* แบบเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ

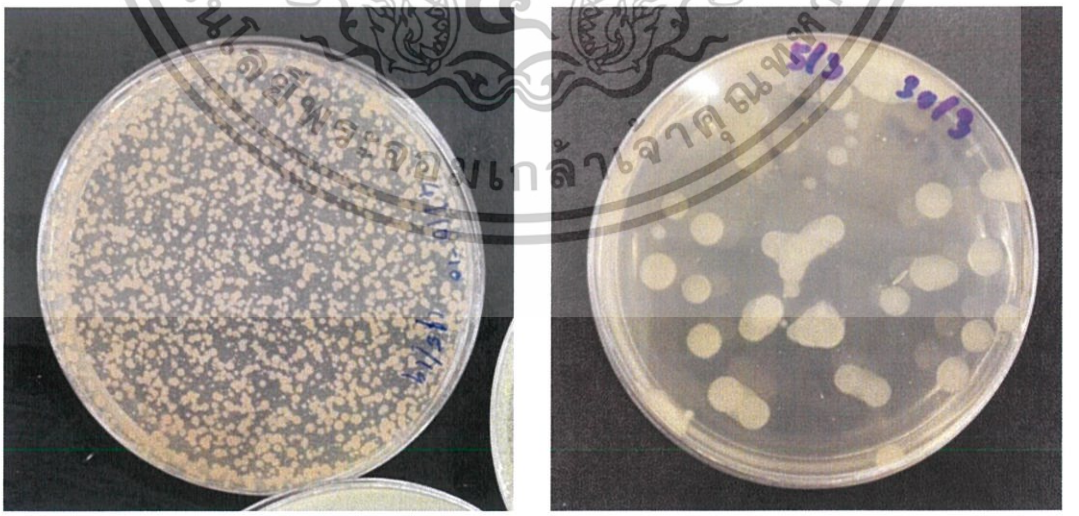
การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ที่แยกได้โดยมีการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจนำส่วนใสที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ไปเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจตามวิธีการในหัวข้อ 3.6.6.2.3 โดยใช้แบคเทอริโอเฟจเจ้าบ้าน 3 ไอโซเลท เลท ได้แก่ S_5, S_{34}, S_{59} พบว่าไม่เกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้น 2 ชั้น ทั้ง 3 ไอโซเลท และเกิดจุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีลักษณะคล้ายพลาคขุ่นจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ S_5 และ S_{34} แต่ผลที่ได้ไม่พบพลาคใสเกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น ดังรูปที่ 4.6

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ที่แยกได้โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจและแบบมีการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟพบว่าไม่เกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้น 2 ชั้น ทั้ง 3 ไอโซเลท และเกิดจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาคขุ่นจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ S_5 และ S_{34} ซึ่งคาดว่าเป็นแบคเทอริโอเฟจแบบไลโสเจนิค และได้ไม่พบพลาคใสที่เป็นแบคเทอริโอเฟจแบบไลติคเกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้นทั้ง 3 ไอโซเลท

รูปที่ 4.5 การเกิดจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาคขุ่นบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นจากการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ด้านซ้ายเป็นของไอโซเลทที่ S_5 และด้านขวาเป็นของไอโซเลทที่ S_{34}



รูปที่ 4.6 การเกิดจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาคขุ่นบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นจากการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* โดยการเพิ่มปริมาณอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ ด้านซ้ายเป็นของไอโซเลทที่ S_5 และด้านขวาเป็นของไอโซเลทที่ S_{34}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.3 การศึกษาการทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (Picking)

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Picking เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียโรงอาหารพระเทพฯ ที่มีแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้เครื่องปรุงรส คือไอโซเลทที่ S_{59} ไม่เกิดการเปลี่ยนบนผิวหน้าอาหาร และไอโซเลทที่ S_5 กับ S_{34} พบว่าเกิดจุดคล้ายพลาคขุ่นทั่วผิวหน้าอาหารวุ้น 2 ชั้น คาดว่าจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาคขุ่นที่เกิดขึ้นของไอโซเลทที่ S_5 กับ S_{34} คือแบคเทอริโอเฟจแบบไลโสเจนิค ซึ่งไม่ตรงตามจุดประสงค์ของการทดลองที่ต้องการแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายเซลล์ของแบคทีเรียได้ (แบคเทอริโอเฟจแบบไลติค) เป็นเหตุให้ไม่สามารถนำแบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ จึงได้ใช้แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากน้ำเสียโรงอาหารพระเทพฯ และเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้จากเศษอาหาร (ชณัฐดาและคณะ, 2561) มาใช้ในการทดลอง

หลังจากการเก็บพลาคใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นที่ใช้เชื้อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากน้ำเสียโรงอาหารพระเทพฯ และเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้จากเศษอาหาร ตามวิธีทำในข้อ 3.6.6.5 ซึ่งให้ผลที่เกิดขึ้นบนจานอาหารวุ้น 2 ชั้น เป็นพลาคใสของแบคเทอริโอเฟจแบบไลติคทั้งหมด 60 พลาค ซึ่งสามารถแยกเป็นแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ได้ 2 พลาค คือสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ลำดับที่ 17 และ 27 มีความเข้มข้น 1.0×10^7 และ 1.49×10^7 ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่แยกได้จากเครื่องปรุงทั้งหมด 20 ไอโซเลท ด้วยวิธี spot test

4.2.1.4 การศึกษาการทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* ด้วยวิธี Spot test

การศึกษาการทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* ด้วยวิธี Spot test ทำได้โดยการนำแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ลำดับที่ 17 และ 27 จากข้อ 4.2.1.3 มาทำการ Spot test ด้วยวิธีในข้อ 3.6.6.7 โดยใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* ที่แยกได้ จำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากเครื่องปรุงรส จากการทดลองไม่พบการเกิดบริเวณใสหรือ lysis zone ตรงบริเวณที่หยดหรือจุดด้วยส่วนใสที่ได้จากการกรองที่มีแบคเทอริโอเฟจปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากลักษณะที่เกิดขึ้นบ่งบอกว่าแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ลำดับที่ 17 และ 27 ไม่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียเจ้าบ้านทั้ง 20 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.6 เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะกับการแบคทีเรียที่จำเพาะเท่านั้น (อภิญญา, 2560) และโอกาสที่จะพบแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียมักจะพบได้มากเมื่อทำการคัดแยกทั้งสองอย่างจากสิ่งแวดล้อมเดียวกัน หากทำการคัดแยกแบคทีเรียกับแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างที่ไม่ได้มาจากสิ่งแวดล้อมเดียวกัน มีโอกาสน้อยที่แบคทีเรียกับแบคเทอริโอเฟจจะจำเพาะต่อกัน (Bull and Levin, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coil* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส โดยใช้อาหารแข็ง *Eosin methyl blue* สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *E. coil* จากตัวอย่างเครื่องปรุงรส 20 ชนิด ได้จำนวนไอโซเลททั้งหมด 108 ไอโซเลท แล้วคัดเลือกมา 20 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} นำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาด และลักษณะโคโลนี ขนาดของเซลล์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอมไซม์คะตะเลส การสังเคราะห์อินโดล Methyl red - Voges proskauer และการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดสอบพบว่าทั้ง 20 ไอโซเลท คือเชื้อแบคทีเรีย *E. coil* จากนั้นเลือกมา 3 ไอโซเลท ได้แก่ S5, S34 และ S59 เพื่อมาเป็นเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

จากการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coil* จากตัวอย่างน้ำสกปรกศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณเฟจและเพิ่มปริมาณเฟจแบบไม่เปลี่ยนอาหาร นำมาตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี Plaque assay กับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้จากเครื่องปรุงรสทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ S5, S34 และ S59 พบว่าไอโซเลท S5 และ S34 เกิดบริเวณใส และได้ใช้แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากน้ำสกปรกศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ และแบคทีเรียเจ้าบ้านจากตัวอย่างเศษอาหารที่ได้จากการทำ Plaque assay จำนวน 60 พลาคเดี่ยว นำมาทำให้เป็นแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ ได้ 2 เฟจ คือพลาคลำดับที่ 17 และ 27 จากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ทั้งสองมาทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียด้วยวิธี Spot test โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเครื่องปรุงรสจำนวน 20 ไอโซเลท คือ S_1, S_5, S_{12}, S_{17}, S_{26}, S_{29}, S_{34}, S_{45}, S_{53}, S_{59}, S_{65}, S_{67}, S_{72}, S_{82}, S_{89}, S_{92}, S_{96}, S_{101}, S_{107}, S_{108} จากการทดลองไม่พบพลาคใส จึงสรุปได้ว่าแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *E. coil* จากตัวอย่างน้ำสกปรกศูนย์เรียนรวมพระเทพฯ ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียจากเครื่องปรุงรสทั้ง 20 ชนิด

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการเก็บรักษาตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจควรเก็บในที่ที่ไม่มีแสง หรือมีแสงรบกวนน้อย เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจมีความไวต่อแสง (Dirckze et al., 1979)

2. ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ ควรนำมาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจให้เร็ว เนื่องจากจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ และสูญเสียกิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา ธีระกุล, เกษตร ทวีเศษ, พัชรี สุนทรนันท และพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2544. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด.

ชุติรัตน์ อัศวเทพ. 2546. การตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* จากตัวอยางอาหารพรอมบริโภค ผักสดและผลไม้ ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร วิทยาเขตกำแพงแสน โดยวิธี MPN Technique และ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ NOBLE PRINT.

นิติ ชูเชิด. 2558. ไวรัสวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ. ศูนย์วิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรมล ยุวนบุณย์. 2550. น้ำพริก : ฐานทรัพยากรอาหาร วิถีชุมชนภายใต้กระแสโลกาภิวัตน์. พิมพ์ครั้งที่ 1 นนทบุรี. แผนงานฐานทรัพยากรอาหาร มูลนิธิชีววิถี.

นริศร นางาม และเสรี แข็งแอ. 2559. การแยกฟาจจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเพื่อรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ *Escherichia coli* (Colibacillosis) ในไก่เนื้อ. ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 44(3) 493-504

นริศรา ปัดภัย, ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. 2560. การแยกและศึกษาลักษณะของไลติกเฟจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ฉบับพิเศษ กรกฎาคม 2560.

ภัทรชัย กีรติสิน. 2549. ตำราแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

รศ.สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ. 2557. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อภิชญา ทองทับ. 2558. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

ผศ.ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2555. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. บริษัท จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด.

Ackermann H.W. and Eisenstark A. 1974. The Present State of Phage Taxonomy. Intervirology. 3 : 201–219

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alla Splichalova, Igor Splichal, Ulrich Sonnenborn, Vojtech Rada. 2014. A modified MacConkey agar for selective enumeration of necrotoxigenic *E. coli* O55 and probiotic *E. coli* Nissle 1917. Journal of Microbiological Methods. 104 : 82-86

Andrea Vásquez-García, Ana Paula Spranger Correia de Oliveira, Julian EduardoMejia-Ballesteros, Silvia Helena Seraphin de Godoy, EdisonBarbieri, Ricardo Luiz Moro de Sousa, Andrezza Maria Fernandes. 2019. *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. Aquaculture. 504 : 158-163

Andrei V.Perepelov, Quan Wang, Sof'ya N.Senchenkova, Ye Qian, Alexander S.Shashkov, Lei Wang, Yuriy A.Knirel, 2015. Structural and genetic studies of the O-antigen of *Escherichia coli* O163. Carbohydrate Research. 404 : 34-38

Bull J J, Levin Bruce R, Terry DeRouin, Nina Walker and Craig A Bloch. 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. BMC Microbiology. 2:35

Baltimore D. 1971. Expression of Animal Virus Genomes. American Society for Microbiology. 235-241

Bharathi Reddy Kunduru, Sanjana Anilkumar Nair, Thenmalarchelvi Rathinavelan. 2016. EK3D: an *E. coli* K antigen 3-dimensional structure database. Nucleic Acids Research. 44 : D675–D681

Biswas S, M A K Parvez, M Shafiquzzaman, S Nahar1, M N Rahman. 2010. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ESCHERICHIA COLI IN READY-TO-EAT FOODS VENDED IN ISLAMIC UNIVERSITY, KUSHTIA. J. bio-sci. 18: 99-103

Botaford, J.L. and Demoss R.D. (1972). Escherichia coli Tryptophanase in the Enteric Environment : JOURNAL OF BACTERIOLOGY (74-80). Illinois, U.S.A.

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

Bradley DE. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. American Society for Microbiology. 31(4): 230–314.

Castellani. And Chalmers. (1957). *Escherichia : Escherichia coli*, Bergey's manual of determinative bacteriology (335-337). Md., U.S.A. : Wavery Press.

Chenxi Huang, Safiullah M. Virk, Jianchun Shi, Yang Zhou, Stephan P. Willias, Mohamed K. Morsy, Hazem E. Abdelnabby, Jie Liu, Xiaohong Wang and Jinquan Li. 2018. Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophage

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LPSE1 Against *Salmonella* enterica in Ready to Eat (RTE) Foods. Frontiers in Microbiology. 9 : (1046)

Chloe E James, Emily V Davies, Joanne L Fothergill, Martin J Walshaw, Colin M Beale, Michael A Brockhurst and Craig Winstanley. 2015. "Lytic activity by temperate phages of *Pseudomonas aeruginosa* in long-term cystic fibrosis chronic lung infections" The ISME Journal. 9 : 1391 – 1398

Chris, B. and Alac, K. (1998). E. Coli : a practical approach to the organism and its control in foods. London.

Clark, W.M. and Lubs, H.A. (1915). J. Infect. Dis.; 17:160-173.

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

David Greenwood, Richard C. B. Slack, John F. Peutherer, Michael R. Barer. 2007. Medical Microbiology : A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. Elsevier Limited.

Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze. 2005. Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press Taylor & Francis Group.

Emanuel Goldman, Lorrence H. Green. 2009. Practical Handbook of MICROBIOLOGY Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group.

Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner. 2016. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Twenty-Seventh Edition. McGraw-Hill Education.

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

Koneman, E.W., et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.

Lasha Gogokhia, Kate Buhrke, Rickesha Bell, Brenden Hoffman, D. Garrett Brown, Christin Hanke-Gogokhia, Nadim J.Ajami, Matthew C.Wong, Arevik Ghazaryan, John F. Valentine, Nathan Porter, Eric Martens, RyanO'Connell, Vinita Jacob, Ellen Scherl, Carl Crawford, W. Zac Stephens, Sherwood R.Casjens,...June L.Round. 2019. Expansion of Bacteriophages Is Linked to Aggravated Intestinal Inflammation and Colitis. Cell host and Microbe. 25(2) : 285-299.e8

LEE, SANG HYON, HIROYASU SATOH, HIROYUKI KATAYAMA, AND TAKASHI MINO. 2004. Isolation, Physiological Characterization of Bacteriophages from Enhanced

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biological Phosphorus Removal Activated Sludge and Their Putative Role. J. Microbiol. Biotechnol. 14(4) : 730–736.

Leininger, D.J., Roberson, J.R. and Elvinger F.O. (2001). Use of eosin methylene blue agar to differentiate Escherichia coli from other gram-negative mastitis pathogens. J Vet Diagn Invest. 13:273–275

Lei Wang, Deborah Rothemund, Heather Curd, Peter R. Reeves. 2003. Species-Wide Variation in the Escherichia coli Flagellin (H-Antigen) Gene. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 185 : 2936–2943

Licheng Huang, Xin Luo, Jingwen Gao, Karl R. Matthews. 2019. Influence of water antimicrobials and storage conditions on inactivating MS2 bacteriophage on strawberries. International Journal of Food Microbiology. 291 : 67-71

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

Mashkoor Mohsin,a Shahbaz Raza,a Nicole Roschanski,b Sebastian Guenther,b Aamir Ali,c,d Peter Schierackc. 2016. Description of the First Escherichia coli Clinical Isolate Harboring the Colistin Resistance Gene mcr-1 from the Indian Subcontinent. American Society for Microbiology. 61(1) e01945-16

Michael Mattey and Janice Spencer. 2008. "Bacteriophage therapy—cooked goose or Phoenix rising?" Current Opinion in Biotechnology. 19 : 608–612.

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. Raymond Schuch, Rockefeller University, UNITED STATES.

Parveen, S., Das, S., Begum, A., Sultana, N., Hoque, M. M. and Ahmad, I. 2014. Microbiological quality assessment of three selected spices in Bangladesh. International Food Research Journal. 21(4) : 1327-1330

Powers, E.M. and Latt, T.G. (1977) Simplified 48-Hour IMVic Test: an Agar Plate Method : APPLIED AND ENVIONMENTAL MICROBIOLOGY (274-279). Massachusett, U.S.A.

P.S. Hiremath and Parashuram Bannigidad. 2011. Automated Gram-staining characterisation of bacterial cells using colour and cell wall properties. Int. J. Biomedical Engineering and Technology. 7 : 3

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Premarathne, J. M. K. J. K., Thung, T. Y., New, C. Y., Huat, J. T. Y., Basri, D. F., Rukayadi, Y., Nakaguchi ,Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2017. Distribution of bacteriophages in food and environment samples. International Food Research Journal. 24(2) : 888-896

Robert E. Black, Kenneth H. Brown, Stan Becker, A.R.M.Abdul Alim, Michael H. Merson. 1982. Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic Escherichia coli diarrhoea in children in rural Bangladesh. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 76(2) : 259–264

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

Simmons, J.S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. J. Infect. Dis., 39:209.

Todd R. Callaway Tom S. Edrington Andrew D. Brabban Robin C. Anderson Michelle L. Rossman Mike J. Engler Mandy A. Carr Ken J. Genovese James E. Keen Mike L. Looper Elizabeth M. Kutter David J. Nisbet. 2008. Bacteriophage Isolated from Feedlot Cattle Can Reduce Escherichia coli O157:H7 Populations in Ruminant Gastrointestinal Tracts. Foodborne Pathogens and Disease.

Trevor Cross, Courtney Schoff, Dylan Chudoff, Libby Graves, Haley Broomell, Katrina Terry, Jennifer Farina, Alexandra Correa, David Shade, David Dunbar. 2015. An Optimized Enrichment Technique for the Isolation of Arthrobacter Bacteriophage Species from Soil Sample Isolates. Journal of Visualized Experiments. 98 : 1-9

Voyles, B.A. 2002. The Biology of Viruses. 2nd ed. New York : McGraw–Hill.

Yujie Yin, Pei'en Ni, Danlei Liu, Shiqiang Yang, Adelaide Almeida, Quanyou Guo, Zilei Zhang, Liuyan Deng, Dapeng Wang. 2019. Bacteriophage potential against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms. Food Control. 98 : 156-163

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
K2HPO4	2	กรัม
Eosin(yellowish)	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกันในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB)

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

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกันในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB)

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

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกันในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na2 HPO4 .12 H2 O	2.9	กรัม
K2 HPO4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

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

5. Simmon's citrate Agar

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

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

6. Tryptone broth (peptone water)

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

7. MR-VP Medium (Glucose Phosphate Broth)

HM infusion powder	12.5	กรัม
BHI powder	5	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Dextrose (Glucose)	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม

pH สุดท้าย (ที่ 25 ° C) 7.4 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. SM buffer

NaCl	5.8	กรัม
MgSO4•7H2O	2	กรัม
Tris-Cl (1 M, pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้