

การแยกแบคทีริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli*
จากสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ

Isolation of Bacteriophages of *Escherichia coli*
from Sewages and its Environmental Area



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2566
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation of Bacteriophages of *Escherichia coli*
from Sewages and its Environmental Area



Chanapat Jaotatid
Nopparit Artkonghan

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การแยกแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> จากสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ Isolation of Bacteriophages of <i>Escherichia coli</i> from Sewages and its Environmental Area
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนาภัทร เจาชาชาติ รหัสนักศึกษา 63050459 นายณพฤทธิ์ อาจคงหาญ รหัสนักศึกษา 6350484
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์	
ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา	
กรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี	
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การแยกแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> จากสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนาภัทร เจาชาชาติ รหัสนักศึกษา 63050459 นายนพฤทธิ์ อัจคงหาญ รหัสนักศึกษา 63050484
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อ *Escherichia coli* และทำให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ และเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจ เนื่องจากในปัจจุบันเชื้อ *Escherichia coli* เป็นเชื้อตัวสำคัญที่เกิดการดื้อยาและแพร่กระจายออกไปเป็นวงกว้างจึงเป็นสาเหตุทำให้การศึกษานี้สนใจที่จะนำแบคทีเรียโอเฟจของเชื้อ *Escherichia coli* มาศึกษาการศึกษานี้ได้เลือกแบคทีเรียโอเฟจไลติกที่แยกได้ด้วยการเก็บตัวอย่างที่เป็นของเหลวจากตัวอย่างน้ำเสียจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารณ 1) นำมาคัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บตัวอย่างของเหลวมาประมาณ 50 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสกรองด้วยตัวกรอง 0.45 μm นำ Filtrate ที่ได้ไป Enrichment ด้วยอาหาร 2X LB ที่เสริมด้วย 1mM CaCl_2 เป็นเวลา 14 วัน เลือก Single clear plaque มา 3 isolates จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย วิธี Picking plaques 3 ครั้งจะถือว่าพลาคนั้นบริสุทธิ์ ซึ่งการศึกษานี้เลือกพลาทที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.48 มิลลิเมตรและมีลักษณะเป็นวงใส (Clear plaque) จากไอโซเลท จม 1 ปี มาศึกษา One-step growth curve ด้วยการใส่ MOI 0.01 เป็นเวลา 10 นาทีหลังจากนั้นนำไป Dilute culture 100 เท่า ด้วยอาหาร LB ที่เสริมด้วย 1mM CaCl_2 โดยเก็บ Co-culture 1 ml. ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 250 นาที พบว่า Latent period, Rise period, Burst size ที่ได้มีค่าเท่ากับ 30 นาที, 140 นาที และ 2.6×10^4 particle/cell ตามลำดับ การศึกษานี้ทำให้ทราบว่าอาหารที่เสริมด้วย CaCl_2 ส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียโอเฟจนั้นสามารถเพิ่มขึ้นต่อมิลลิลิตร (PFU/ml) และทราบถึงวิธีการแยกแบคทีเรียโอเฟจและทำให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการแยกแบคทีเรียโอเฟจซึ่งที่สามารถนำมาใช้ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
คำสำคัญ : แบคทีเรียโอเฟจ, พลาท, แบคทีเรียโอเฟจไลติก, เชื้อ *Escherichia coli*, สิ่งแวดล้อม,
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of Bacteriophages of <i>Escherichia coli</i> from Sewages and its Environmental Area
Students	Miss Chanapat Jaotatid Student ID 63050459 Mr. Nopparit Artkonghan Student ID 63050484
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Dr. Wimonmat Boonmee

Abstract

The aim of this study was to isolate and purify *Escherichia coli* bacteriophages from Sewages and its Environmental Area and to study the One-step growth curve of bacteriophages. Because at present *Escherichia coli* is an important bacteria that has developed drug resistance and has spread widely.

This is the reason why this study is interested in bringing *Escherichia coli* bacteriophages to study. The lytic bacteriophages were selected by collecting liquid samples from sewer wastewater samples. (In front of Chulabhorn Building 1) were isolated and purified. By collecting approximately 50 ml of liquid sample, then centrifuging at 10,000 rpm for 10 minutes, filtering the Supernatant with a 0.45 μm filter, then taking the filtrate to be enriched with 2X LB medium supplemented with 1mM CaCl_2 . After 14 days, select 3 single clear plaque isolates and then purify them by Picking plaques 3 times to consider the plaque as pure. This study selected plaque with a diameter of 1.48 mm and having the characteristics Clear plaque from isolate จก 1B was studied as a one-step growth curve using an MOI of 0.01, incubated for 10 minutes and Dilute culture with LB medium (supplemented with 1mM CaCl_2) by collecting 1 ml. of Co-culture every 10 minutes for 250 minutes. It was found that during the latent period, Rise period, Burst size were equal to 30 minutes, 140 minutes and 3.9×10^4 particle/cell. Accordingly, this study revealed that media with supplemental CaCl_2 resulted in an increase in plaque forming unit per milliliters (PFU/ml). and know how to isolate and purify the bacteriophage from Sewages and its

Environmental Area. To be used as a guideline for isolation bacteriophages that can be used in the future.

Keywords : Bacteriophage, Plaque, lytic phage, *Escherichia coli*, Environment



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของ
ทุก ๆ ท่าน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วิมลมาศ บุญมี และ ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ซึ่งเป็น
ทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการให้แก่ผู้ทำการวิจัย โดยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และ
แนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังช่วยตรวจทาน
โครงการพิเศษฉบับนี้ให้แก่ผู้วิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จได้ ขอขอบพระคุณเป็น
อย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการ
ตรวจสอบโครงการพิเศษฉบับนี้ อีกทั้งยังให้ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความ
สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณความช่วยเหลือจากนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้ช่วยแนะนำ
เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือในงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการทดลอง ทำ
ให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการทดลองจนสำเร็จลงได้ คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณทุกท่าน ที่ให้การ
สนับสนุน และให้กำลังใจผู้วิจัย ซึ่งเป็นแรงผลักดันที่สำคัญที่ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จ
ได้อย่างสมบูรณ์

ชนาภัทร เจาชาทิต
นพฤทธิ์ อัจคงหาญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.2 นิเวศวิทยาของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.3 การจัดจำแนกเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.4 การก่อโรคของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	6
2.1.5 การแยกเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	8
2.2 Bacteriophage.....	11
2.2.1 ความสำคัญและการจำแนกชนิด.....	11
2.2.2 นิเวศวิทยาของ Bacteriophage.....	11
2.2.3 สัณฐานวิทยาของแบคทีริโอเฟจ.....	12
2.2.4 Life cycle of bacteriophage.....	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุแบบสงวนเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 กลไกของ Lytic phage ในการทำลายแบคทีเรีย.....	14
2.2.6 การทำ Plaque assay	15
2.2.7 One-step growth curve.....	15
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	37
3.1 เครื่องมือ	37
3.2 อุปกรณ์.....	38
3.3 สารเคมี	38
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	39
3.5 เชื้อจุลินทรีย์.....	39
3.6 วิธีทดลอง.....	39
3.6.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	39
3.6.2 การเก็บตัวอย่าง	39
3.6.3 Phage Extraction.....	39
3.6.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย (Enrichment phage)	40
3.6.5 การทำ Double layer agar	40
3.6.6 การทำแบคทีเรียโอเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking plaques	40
3.6.7 การชะและการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี Phage lysate.....	41
3.6.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml)	41
3.6.9 ทำ One-step growth curve (Wannasrichan, 2020).....	41
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	43
4.1 การแยกแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และการทำให้บริสุทธิ์.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> (One-step growth curve).....	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	51
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	51
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	51
เอกสารอ้างอิง.....	52
ภาคผนวก.....	60
ภาคผนวก ก.....	61
ภาคผนวก ข.....	64
ภาคผนวก ค.....	65



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> (Detroit, 1980).....	9
4.1 ผลการเกิดพลาจจากการสุมตัวอย่างของแข็งและของเหลว	43
4.2 แสดงจำนวนการเกิดพลาจของแบคทีเรียโอเฟจไลเซจ	48
ข-1 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของ เชื้อ <i>E.coli</i> ...	60
ค-1 แสดงผล One-step growth curve.....	65
ค-2 แสดงผล One-step growth curve (ต่อ).....	66



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แบคทีเรีย <i>E. coli</i> บนอาหาร Eosin methylene blue agar.....	4
รูปที่ 2.2 แอนติเจนของ <i>E. coli</i>	6
รูปที่ 2.3 การศึกษาในหลอดทดลองและอาจไม่ได้สะท้อนถึงอาการที่เกิดขึ้นในมนุษย์ที่ติดเชื้ออย่างสมบูรณ์.....	7
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ T4.....	12
รูปที่ 2.5 lytic and lysogenic cycle.....	13
รูปที่ 2.6 Lytic phage.....	14
รูปที่ 2.7 plaque assay.....	15
รูปที่ 2.8 one-step growth curve.....	16
รูปที่ 4.1 ตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารัตน์ 1) ที่ผ่านการ Enrichment เป็นเวลา 10 วัน.....	45
รูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.4 พลาควที่บริสุทธิ์แล้วของไอโซเลท จภ1เอ, จภ1บี และจภ1ซี ตามลำดับ..	47
รูปที่ 4.5 เช็ค Activity ของเฟจไลเซจ ณ วันที่ 1 พบปริมาณแบคทีริโอเฟจเท่ากับ 1.2×10^5 PFU/ml.....	48
รูปที่ 4.7 One-step growth curve ของแบคทีริโอเฟจ <i>E. coli</i>	50
รูปที่ ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD ₆₀₀ nm.และ Viable cell count (CFU/ml) ของเชื้อ <i>E.coli</i>	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันแบคทีเรียเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่มาจากวิธีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกวิธีและขาดความรับผิดชอบในทางเกษตรกรรม เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์ที่ผิดวิธีและการใช้อย่างขาดความรู้ความเข้าใจถึงผลกระทบที่จะตามมา ทำให้เชื้อดื้อยาเล็ดลอดออกมาจากฟาร์มพร้อมกับน้ำเสียและแล้วปนเปื้อนลงสู่แหล่งดิน แหล่งน้ำซึ่งในแต่ละปีคนไทยติดเชื้อดื้อยาประมาณปีละประมาณ 88,000 คน และเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาอย่างน้อยปีละ 20,000 - 38,000 คน ส่งผลให้ทุก 15 นาที มีคนไทย 1 คนตายเพราะเชื้อดื้อยา คิดเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 46,000 ล้านบาท อีกทั้งการเพิ่มขึ้นของประชากรทำให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะแพร่กระจายออกไปได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น ในปี พ.ศ.2560 World Health Organization (WHO) ประกาศรายชื่อเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะที่ต้องการยาปฏิชีวนะชนิดใหม่มากำจัดอย่างเร่งด่วนซึ่ง 3 อันดับแรกนั้นได้แก่ *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterobacteriaceae* (รวมถึง *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.*, และ *Proteus sp.*) (WHO, 2017) และยังมีการพยากรณ์ว่าในปี พ.ศ.2593 อาจมีผู้เสียชีวิตด้วยสาเหตุการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นถึงปีละ 10 ล้านคน (Anderson, 2023) การแพทย์ปัจจุบันจึงหันมาสนใจการใช้วิธีการรักษาด้วยแบคทีริโอแฟจ (Phage therapy) มากขึ้นเนื่องด้วยการหายาปฏิชีวนะตัวใหม่นั้นหายากและใช้ต้นทุนสูง (Reardon, 2014) การรักษาด้วย Phage therapy มีข้อดีเหนือกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอยู่หลายประการ เช่นแบคทีริโอแฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูงกว่ายาปฏิชีวนะมักมีการยับยั้งแบบ Broad-spectrum inhibition จึงสามารถช่วยลดการเกิด Secondary infection จากเชื้อเดิมนอกจากนี้ต้นทุนยังถูกกว่าการรักษาโดยยาปฏิชีวนะทั่วไป และไม่เกิดอาการแพ้ต่อผู้เข้ารับการรักษา (Side-effect) การที่แบคทีเรียก่อโรคมียุทธศาสตร์ต่อสู้กับแบคทีริโอแฟจเป็นไปได้ก็จริงอยู่ แต่จากงานวิจัยของคุณอัลตามิราโน (Altamirano et al, 2021) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียหลังจากเกิดการติดต่อแบคทีริโอแฟจขึ้นมาแล้ว มักส่งผลทำให้แบคทีเรียตัวนั้นอ่อนแอลง ไวต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วยกันทั้งสิ้น หรือกล่าวได้ว่าความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียดังกล่าวก็ลดลงด้วยเช่นกัน การใช้ Phage therapy จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและอาจเป็นทางออกอีกทางหนึ่งในอนาคตสำหรับต่อสู้กับปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ (Abo-elmaaty et al., 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีริโอเฟจหรือเฟจ (Bacteriophages/ phage) นั้นสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและง่ายต่อการค้นพบมากกว่า จากคำกล่าวที่ว่าที่ใดมีแบคทีเรียที่นั่นมีแบคทีริโอเฟจ แบคทีริโอเฟจนั้นไม่มีคุณสมบัติที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช เนื่องจากการเข้าไปทำการติดเชื้อโดยแบคทีริโอเฟจจะจำเพาะเจาะจงกับเซลล์เจ้าบ้าน (Host)

นั่นคือแบคทีเรียเพียงเท่านั้น (Häusler, 2008) d’Herelle ได้ให้นิยามความหมายของแบคทีริโอเฟจไว้ว่าเป็น Bacteria eater (Adams, 1959)

จากการวิจัยกลุ่มแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ESKAPE หนึ่งในนั้นมีแบคทีเรีย *E. coli* ที่พบว่าเกิดการดื้อยามากที่สุดร้อยละ 12.7 จากการนำเลือดของผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาลมารวบรวม (Jiraporn et al., 2018) การติดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีสาเหตุมาจากติดต่อกับผู้ป่วยได้โดยตรง (Person to person contact) หรือติดเชื้อมากับสิ่งบริโภค อุบัติการณ์ โดยอาการหลังติดเชื้อมักจะไม่แสดงอาการไปจนถึงมีอาการรุนแรง ถึงขั้นมีอาการปวดบิด ขับถ่ายปนเลือดและมีอาการแทรกซ้อนจากการเกิดกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตกถึงขั้นทำให้ไตวายและเสียชีวิตได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557) ปี พ.ศ. 2562 มีการตรวจพบอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เกินมาตรฐานโดยเชื้อส่วนใหญ่ที่พบคือ *E. coli* และอาหารส่วนใหญ่ที่ตรวจพบเชื้อชนิดนี้คืออาหารประเภทริมบาทวิถีซึ่งคนไทยส่วนใหญ่นิยมบริโภคกัน ทำให้โรคท้องร่วงจากแบคทีเรีย *E. coli* ยังคงเป็นโรคติดเชื้ออันดับต้นๆของคนไทย (กองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2562) ในการวิจัยของคุณชาห์ราและคณะ (Chegini et al., 2021) กล่าวว่า ปัญหาอุปสรรคสำคัญที่มีผลในการรักษาด้วยแบคทีริโอเฟจให้ประสบความสำเร็จได้นั้นคือ แบคทีริโอเฟจมีช่วงโฮสต์ (Host range) ที่ค่อนข้างจำกัด นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดทางสภาพแวดล้อมอื่นๆในการใช้แบคทีริโอเฟจอยู่อีก อาทิเช่น อุณหภูมิ ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือการได้รับรังสียูวี เป็นต้น (Abo-elmaaty, 2016)

ในการศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ ศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างจากสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการแยกแบคทีริโอเฟจซึ่งจะสามารถนำมาใช้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อแยกแบคทีริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* และทำให้แบคทีริโอเฟจนั้นบริสุทธิ์จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ
- 2) เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวน (One-step growth curve) ของแบคทีริโอเฟจ *E. coli* จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) การแยกแบคทีเรียโอฟาจของ *E. coli* และการทำให้แบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์จากตัวอย่างในสิ่งและบริเวณโดยรอบ เช่น จากแหล่งดินในฟาร์มปศุสัตว์, แหล่งน้ำเสียจากชุมชน, มูลของสัตว์เลื้อยคืบ
- 2) ศึกษาการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจของ *E. coli* (One-step growth curve) และพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Latent period, Rise period และ Burst size

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงแนวทางการแยกแบคทีเรียโอฟาจของ *E. coli* และการทำให้แบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ
- 2) ทราบถึงกระบวนการที่ใช้เพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจ *E. coli* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและบริเวณโดยรอบ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

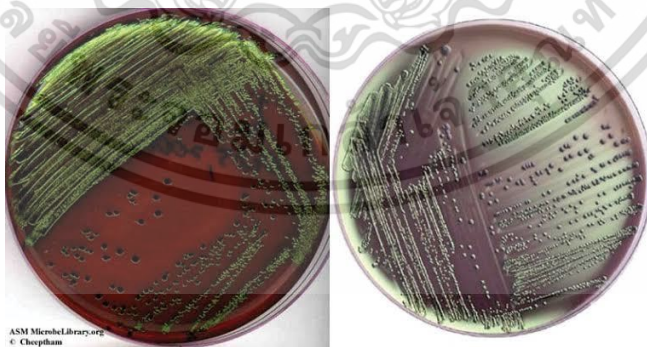
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E.coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (Rod shape) เคลื่อนที่ได้หรือบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ ถ้าเลี้ยงไว้นาน ๆ จะมีลักษณะ Coccobacilli ซึ่งเป็นแท่งที่มีลักษณะสั้นและอ้วน หรือมีลักษณะโคโลนิกรวมๆ ใค้งนูน ขอบเรียบและมีขอบชัดเจน แต่เมื่อเลี้ยงไว้นานจะเป็นแท่งที่ยาวขึ้นทั้งนี้ลักษณะรูปร่างจะขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สร้างสปอร์เป็น Facultative anaerobe คือเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 °C แต่สามารถเจริญที่ 45 °C ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางได้ pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.8 - 7.5 อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Escherichia* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มซึ่งบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย ชนิดที่ 35 สำคัญคือ *E. coli* เชื้อชนิดนี้บางสายพันธุ์ทำให้อาหารเสียและบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค หลายสายพันธุ์ไม่ก่อโรค พบในดิน น้ำ บนพืช ในทางเดินอาหารของคน สัตว์เลื้อยคลาน นก และในอาหารหลาย ชนิด โดยเฉพาะอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีการสัมผัสโดยคน เชื้อนี้ไม่ทนความร้อน การที่พบ *E. coli* ในอาหารที่ผ่านความร้อนโดยการพาสเจอร์ไรส์หรือทำให้สุกแล้ว ชี้ให้เห็นถึงการปนเปื้อนอีกครั้ง หลังผ่านความร้อน (recontamination) ดังนั้นจึงใช้ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ดัชนี (indicator organism) บ่งชี้ถึงสุขลักษณะที่ดีในการผลิตอาหารโดยเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (fecal coliform) (Food Network Solution, 2014)



รูปที่ 2.1 แบคทีเรีย *E. coli* บนอาหาร Eosin methylene blue agar

ที่มา: Aryal, 2020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 นิเวศวิทยาของเชื้อ *Escherichia coli*

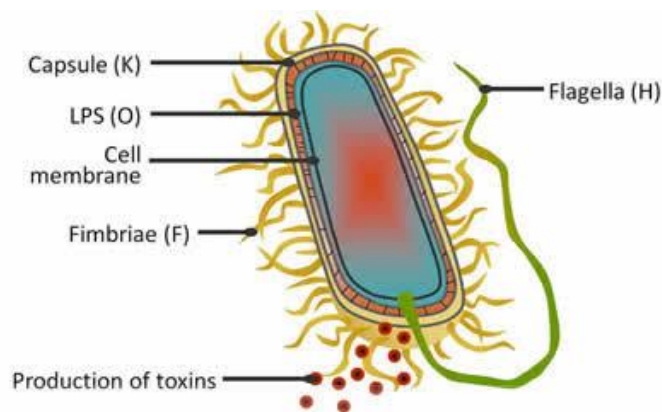
Escherichia coli เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่สามารถพบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ปกติไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรงเมื่ออยู่ในลำไส้ที่ย่อยอาหารปกติ แต่เมื่อใดที่เชื้อรุกร้าเข้าสู่ระบบต่างๆของร่างกายจะทำให้เกิดโรคได้ โดยที่พบบ่อยในคน ได้แก่ โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและโรคท้องเดิน สำหรับโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะมักพบในผู้หญิง โดยได้รับเชื้อจากทางเดินอาหารที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณปากท่อน้ำปัสสาวะ และโรคท้องเดิน ได้รับเชื้อจากการรับประทานอาหาร หรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยปกติสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคท้องเดินส่วนใหญ่นั้นจะก่อโรคไม่รุนแรงและสามารถหายเองได้ แต่ก็มีบางสายพันธุ์ส่วนน้อยที่สามารถทำให้เกิดอาการรุนแรงได้ เช่น ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด ถ่ายอุจจาระมีเลือดปน ถ่ายอุจจาระมากจนเกิดภาวะขาดน้ำหรือไตวายได้ (Mahidol, 2019)

2.1.3 การจัดจำแนกเชื้อ *Escherichia coli*

Escherichia coli อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 °C แต่สามารถเจริญที่ 45 °C ได้ pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.8 - 7.5 อนุกรมวิธานของเชื้ออยู่ในคลาส Gammaproteobacteria ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Escherichia* มีค่า water activity $a_w = 0.95$ สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* แสดงในตารางที่ 7.9 ประมาณร้อยละ 99 ของสายพันธุ์ทั้งหมดของ *E. coli* มีรูปแบบของปฏิกิริยา IMVIC (indole, methyl red, Voges-Proskauer และ citrate เป็น +++ (biotype 1) ส่วนที่เหลือมีรูปแบบของปฏิกิริยาเป็น +++- (biotype 2) ซึ่งแตกต่างจาก *Enterobacter sp.* และ *Klebsiella sp.* ซึ่งให้ผลเป็น - + + สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ ในวงศ์ Enterobacteriaceae เบื้องต้นนั้นนิยมใช้คุณสมบัติการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกันของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล lactose นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อ *E. coli* ได้ด้วยวิธีทางโมเลกุล ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบ (Tille, 2014)

การจำแนกชนิดด้วยวิธีทางซีโรวิทยา สายพันธุ์ของที่ก่อโรคสามารถจำแนกได้ด้วยวิธีทางวิทยาเช่นเดียวกับ Enterobacteria ชนิดอื่น สำหรับเชื้อ *E. coli* จนถึงปัจจุบันได้พบถึงมากกว่า 200 โอโรไทป์ (O serotype) เนื่องจากแฟลกเจลลาโปรตีนมีความแตกต่างกันน้อยกว่า carbohydrate side chains ที่ทำให้เกิดเป็น O groups จึงทำให้มี H antigenic type น้อยกว่ามาก (ประมาณ 30) (Tille, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แอนติเจนของ *E. coli*

ที่มา: Caractéra, 2004

แอนติเจนของ *E. coli* มีอยู่หลายชนิด คือ Somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อนถึง 121 °C ทนกรดอ่อน และแอลกอฮอล์

Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ polysaccharide มักพบห่อหุ้ม ความคิดเห็น 656 เซลล์ เช่น capsule, fimbriae ที่หุ้มตัวแบคทีเรีย

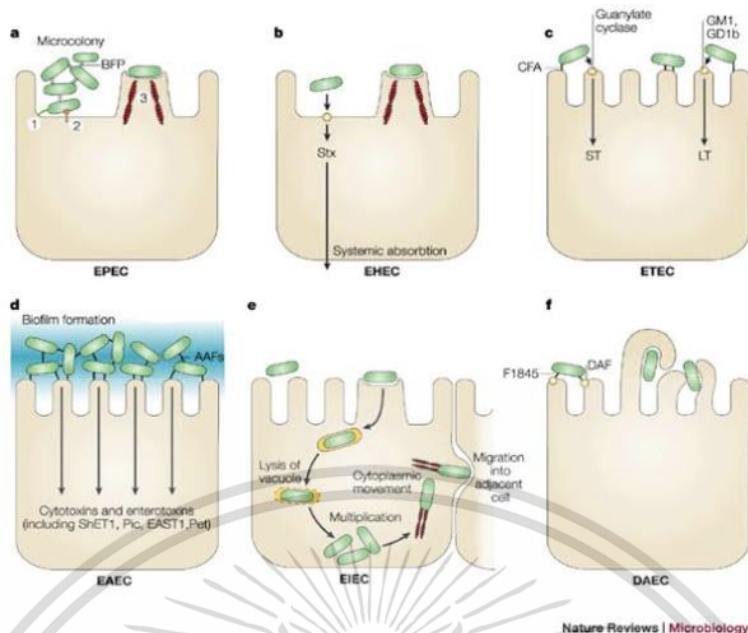
Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของแฟลกเจลลาประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า flagellin ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100 °C สายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่ไม่พบ H-antigen

O, K และ H antigens มีคุณสมบัติทางกายภาพและภูมิคุ้มกันวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจำแนก serotype ของเชื้อรวมถึงการตรวจสอบทางระบาดวิทยาสามารถใช้แอนติเจนเหล่านี้บ่งชี้ (Tille, 2014)

2.1.4 การก่อโรคของเชื้อ *Escherichia coli*

กลุ่มที่มีความรุนแรง เมื่อพิจารณาคุณลักษณะการก่อโรค Serological groupings สามารถแบ่ง *E. coli* มีความรุนแรงในการก่อโรคได้เป็น 6 กลุ่ม คือ 1) Enteraggregative (EAggEC) 2) Enterohemorrhagic (EHEC) 3) Enteroinvasive (EIEC) 4) Enteropathogenic (EPEC) และ 5) Enterotoxigenic (ETEC) โดยจากการศึกษาค้นหาพบสายพันธุ์ของเชื้อ *Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การศึกษาในหลอดทดลองและอาจไม่ได้สะท้อนถึงอาการที่เกิดขึ้นในมนุษย์ที่ติดเชื้ออย่างสมบูรณ์ a. EPEC ยึดติดกับ Enterocytes ของลำไส้เล็ก แต่ทำลาย microvillar ปกติ ทำให้เกิดลักษณะการเกาะติดและดันการหลุดของแผล ความผิดปกติของโครงกระดูกจะมาพร้อมกับการตอบสนองต่อการอักเสบและอาการท้องเสีย 1. การยึดเกาะเริ่มต้น 2. การไอนย้ายโปรตีนตามการหลังประเภท III 3. การสร้างฐาน b. EHEC ยังกระตุ้นให้เกิดแผลเกาะติดและหลุดออกไปแต่ในลำไส้ใหญ่ คุณลักษณะที่โดดเด่นของ EHEC คือการสร้างสารพิษ Shiga ซึ่งการดูดซึมอย่างเป็นระบบซึ่งนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ c. ETEC ยึดติดกับเอนเทอโรไซต์ของลำไส้เล็กและทำให้เกิดอาการท้องเสียเป็นน้ำโดยการหลั่งของเอนเทอโรทอกซินที่เกิดจากความร้อน และ/หรือเอนเทอโรทอกซินที่คงความร้อน d. EAEC ยึดติดกับเยื่อลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ในไบโอฟิล์มหนา และอธิบายรายละเอียดสารคัดหลั่งเอนเทอโรทอกซินและไซโตทอกซิน e. EIEC บุกรุกเซลล์เยื่อบิวิวลำไส้ แยกฟาโกโซม และเคลื่อนผ่านเซลล์โดยการสร้างนิวเคลียสไมโครฟิลาเมนต์แอกติน แบบที่เรียกเคลื่อนที่ไปทางด้านข้างผ่านเยื่อบิวิวโดยการแพร่กระจายจากเซลล์สู่เซลล์โดยตรง หรืออาจออกและกลับเข้าไปในพลาสมาเมมเบรนด้านข้างเบโซ f. DAEC กระตุ้นให้เกิดผลการถ่ายทอดสัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะในเอนเทอโรไซต์ของลำไส้เล็ก ซึ่งแสดงออกมาเป็นการเจริญเติบโตของส่วนยื่นคล้ายเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายนิ้วยาว ซึ่งพันรอบแบคทีเรีย AAF, fimbriae การยึดเกาะแบบรวม

ที่มา: Kaper et al, 2004

Escherichia coli (เป็นสาเหตุของการติดเชื้อนอกลำไส้) หลายชนิด, รวมทั้งเอนโดท็อกซิน, เป็นชนฟิลไลผลิตแคปซูลที่สื่อกลางในการยึดติดเจ้าบ้าน การติดเชื้อแบคทีเรียทางเดินปัสสาวะ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียในเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบของทารกแรกเกิดและการติดเชื้อในโรงพยาบาลบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย สาเหตุที่พบบ่อยที่สุดคือ การติดเชื้อในโรงพยาบาล

ETEC Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ซึ่งผลิตสารพิษที่ต่างกัน เป็นสาเหตุสำคัญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในประเทศกำลังพัฒนา อาการท้องร่วงของเด็กและนักเดินทาง มีลักษณะถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำที่ปนเปื้อน

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), STEC or VTEC (STEC) ที่ผลิตสารพิษจาก shiga อีกหลายประเภท ที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยในมนุษย์ บางครั้งเรียกว่า "non-O157 STEC" (VTEC) ที่ผลิตพิษเวโรไซต์ทอกซินหรือ *E. coli* ที่เกิดจากเอนเทอโรฮีโมริกาจิก (EHEC) สายพันธุ์ STEC สามารถทำให้เกิดการเจ็บป่วยร้ายแรงในมนุษย์โดยการผลิตสารพิษที่สามารถทำลายเยื่อลำไส้และไตอย่างรุนแรง การติดเชื้อสายพันธุ์ STEC อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนร้ายแรง เช่น กลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตก (HUS) ซึ่งบางครั้งอาจทำให้เสียชีวิตได้ สารพิษคล้ายกับสารพิษ Shiga ที่ผลิตโดย *Shigella dysenteriae* มักเกี่ยวข้องกับซีโรไทป์บางชนิด เช่น *E. coli* O157:H7 การอักเสบและการตกเลือดของเยื่อเมือกของลำไส้ใหญ่ (เช่น อาการลำไส้ใหญ่บวมเป็นเลือดออก) สามารถอยู่ในกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตก-ยูรีมีก เป็นผลมาจากการรับประทานเนื้อดิบและน้ำนมดิบที่ไม่ปรุงสุกทำให้เกิดสารพิษที่ไต

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ปัจจัยความรุนแรงไม่แน่นอนแต่พบสิ่งบุกรุก Enterocytes ที่เยื่อลำไส้ใหญ่ในลักษณะที่เกือบเหมือน *Shigella* โรคบิด (เนื้อร้าย, แผลและการอักเสบของลำไส้ใหญ่) มักพบในเด็กเล็กที่อาศัยอยู่ในพื้นที่สุขาภิบาลไม่ดี

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดอาการท้องเสียถาวร (นาน 2 สัปดาห์ขึ้นไป) แพร่กระจายสู่มนุษย์ผ่านทางน้ำที่ปนเปื้อนหรือสัมผัสกับสัตว์ที่ติดเชื้อ และพบได้ทั่วไปในประเทศกำลังพัฒนา โรคท้องร่วงในทารกในประเทศกำลังพัฒนาที่มีรายได้น้อยอาจทำให้อาการท้องเสียเรื้อรัง

Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) อูจจาระร่วงจากเชื้อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ DAEC ยังไม่เป็นที่ยอมรับ เพราะผลจากการศึกษาเชื้อ DAEC ในผู้ป่วยและคนปกติในต่างภูมิภาค ให้ผลการทดลองที่ขัดแย้งกันความสามารถก่อโรคของเชื้อ เพาะแยกเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระ นำเชื้อมาทดสอบการเกาะติดแบบ diffusely adherence กับเซลล์เพาะเลี้ยง HEp-2 หรือ HeLa ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ DAEC

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) อาจเกี่ยวข้องกับการจับกับสารพิษที่มีลักษณะฟิลาและคล้ายเฮโมลิซิน ไม่ทราบกลไกโรคที่แท้จริง ท้องเสียถ่ายอุจจาระเป็นน้ำซึ่งในบางกรณีสามารถยึดเยื่อได้แต่เป็นการส่งสัญญาณไม่ดีต่อร่างกาย (Holt et al., 1994)

2.1.5 การแยกเชื้อ *Escherichia coli*

Escherichia coli มีการหมักน้ำตาลแลคโตส เกิดการอินโดล ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (MAC) จะเกิดโคโลนีสีชมพูกับรอบโคโลนีสีชมพูเข้ม ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ HE

หรือ Hektoen enteric agar (HEK) จะเกิดสีเหลืองเหมือนกับการเกิดโคลีนีเซอีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD) มีสีเหลืองเหมือนกัน อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB) จะหมักแลคโตสเกิดสีน้ำตาลเงินและ metallic green sheet บนอาหาร ส่วนตัวโคลิฟอร์มอื่นหมักเกิดโคลีนีเซอีน (Tille, 2014)

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli* (Detroit, 1980)

การทดสอบ	รายงานผล
Indole	+
Methyl red	+
Motility	V
Voges Proskauer	-
Urea	-
Hydrogen Sulfide (TSI)	-
Gas from D-glucose	+
Lactose	+
Simmons' citrate	-
Lysine decarboxylase	+(V)
Ornithine decarboxylase	-(V) เกิดอาการ
Arginine dihydrolase	+(V)

+ = ผลบวกมากกว่า 80 %

- = ผลลบมากกว่า 80 %

-(V) = สามารถเป็นไปได้ทางผลบวกมากกว่า 50 %

+(V) = สามารถเป็นไปได้ทางผลลบมากกว่า 50 %

การตรวจวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรียและฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

เนื่องจากกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียนี้สามารถตรวจวัดได้ง่ายและปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียสามารถบ่งบอกปริมาณของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจก่อให้เกิดโรคได้ ส่วนฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มของโคลิฟอร์ม แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากระบบทางเดินอาหารโดยตรง แบคทีเรียพวกนี้ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) ถ้าหากมีการตรวจพบในน้ำ แสดงว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนจากอุจจาระโดยตรงหรือโดยอ้อม โคลิฟอร์มแบคทีเรียสามารถย่อย

Lactose ได้ที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ให้ผลเป็นกรดและแก๊ส (อร, 2539) แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดอื่นและยีสต์สามารถย่อย Lactose ได้เช่นเดียวกัน จึงทำการทดสอบ ยืนยันเพื่อบ่งชี้ว่า เป็นโคลิฟอร์ม

แบคทีเรีย หรือฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยถ่ายเชื้อหรือของเหลวบางส่วนจาก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ เกิด แก๊สลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ และ EC medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นและยีสต์จะถูกยับยั้ง ไม่ให้เจริญเติบโต แก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth จะเกิดจาก โคลิฟอร์มแบคทีเรียและแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium จะเกิด จากฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จากนั้นนำจำนวนหลอดที่เกิดแก๊สเทียบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟิ คัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียจาก ตารางดัชนี MPN (จूरियररतन, 2548)

การทดสอบขั้นแรก (presumptive test) การทดสอบขั้นนี้เป็นการตรวจ screen เบื้องต้น เพื่อจะแยกโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการทดสอบอาจใช้ระบบเลี้ยงเชื้อแบบ 3 หลอด หรือ แบบ 5 หลอด ที่ระดับความเจือจาง 3 การเจือจาง คือ จำนวนมิลลิลิตรของตัวอย่างที่ ต่างกันเป็นชุด ๆ ดังนี้ คือ 10 - 1 - 0.1 mg/L หรือ 1 - 0.1 - 0.01 mg/L หรือ 0.1 - 0.01 - 0.001 mg/L ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสกปรกของตัวอย่างน้ำ (จूरियररतन, 2548)

การทดสอบขั้นยืนยัน (confirm test) เนื่องจากการเกิดแก๊สในการทดสอบขั้นแรกยังไม่ สามารถชี้ชัด ได้ว่าแบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างน้ำเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียหรือฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องทดสอบ ยืนยันโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เพื่อทดสอบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ EC medium เพาะ เชื้อที่อุณหภูมิ $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ เพื่อ ทดสอบหาฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (จूरियररतन, 2548)

การทำ completed test สำหรับตรวจหา *E. coli* ทำได้โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวก ในอาหาร EC broth มาลากลงบนอาหาร Levin's Eosin Methylene Blue (L-EMB) Agar บ่มที่ อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ แล้วจึงตรวจดูลักษณะของโคโลนีจัดว่าเป็น *E. coli* (จूरियररतन, 2548)

การคำนวณหาค่า MPN 1. การคำนวณหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำจำนวนหลอด ที่ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth มาเทียบค่า MPN จากตาราง MPN Index ปริมาณโคลิฟอร์ม แบคทีเรีย จะมีหน่วยเป็น MPN/100 ml ทั้งนี้อนุกรมของตัวอย่าง ต้องเท่ากับ 10 1.0 0.1 ml 2. การคำนวณหาปริมาณฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำจำนวนหลอดที่ ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยง เชื้อ EC medium มาเทียบค่า MPN จากตาราง MPN Index Table ปริมาณฟิคัลโคลิฟอร์ม แบคทีเรียจะมี หน่วยเป็น MPN/100 mL. ทั้งนี้อนุกรมของตัวอย่างต้องเท่ากับ 10 1.0 0.1 ml กรณีที่ใช้อนุกรมของตัวอย่าง เท่ากับ 1.0 0.1 0.01 mL. ค่า MPN ที่ได้จะมีค่าเป็น 10 เท่าของค่าที่อ่านได้จากตาราง หรือถ้าใช้อนุกรมของ ตัวอย่างเท่ากับ 0.1 0.01 0.001 mL ค่า MPN ที่ได้ จะมีค่าเป็น 100 เท่าของค่าที่อ่านได้จากตาราง เป็นต้น บางครั้งจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก ไม่มีอยู่ในตาราง MPN Index จะต้องหาค่า MPN/100 mL โดยใช้สูตร (IMPACT, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Bacteriophage

2.2.1 ความสำคัญและการจำแนกชนิด

คำว่า "แบคทีเรียโอเฟจ" มาจากคำภาษากรีก phagein ซึ่งแปลว่า "กิน" เพราะแบคทีเรียโอเฟจดูเหมือนจะ "กิน" แบคทีเรียเมื่อพวกมันติดเชื้อ สิ่งนี้ไม่เป็นความจริงอย่างเคร่งครัด แม้ว่าแบคทีเรียโอเฟจจำนวนมากจะนำส่วนประกอบของเซลล์กลับมาใช้ใหม่และรีไซเคิล และใช้ส่วนประกอบเหล่านี้เพื่อสร้างตัวมันเองให้มากขึ้นก็ตาม โดยทั่วไป การติดเชื้อของเซลล์แบคทีเรียเซลล์เดียวโดยแบคทีเรียโอเฟจเดี่ยวส่งผลให้เกิดการสร้างอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจรุ่นลูกหลานจำนวนมาก สิ่งนี้มาพร้อมกับการสลายความสมบูรณ์ของเซลล์โดยสมบูรณ์ เรียกว่า lysis ซึ่งจะปล่อยแบคทีเรียโอเฟจใหม่ออกมาเพื่อให้สามารถกระจายและค้นหาเซลล์ใหม่ที่จะติดเชื้อได้ กระบวนการที่แบคทีเรียโอเฟจสร้างอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจใหม่ผ่านการติดเชื้อและการสลายของเซลล์เจ้าบ้านเรียกว่าการเจริญเติบโตของไลติก

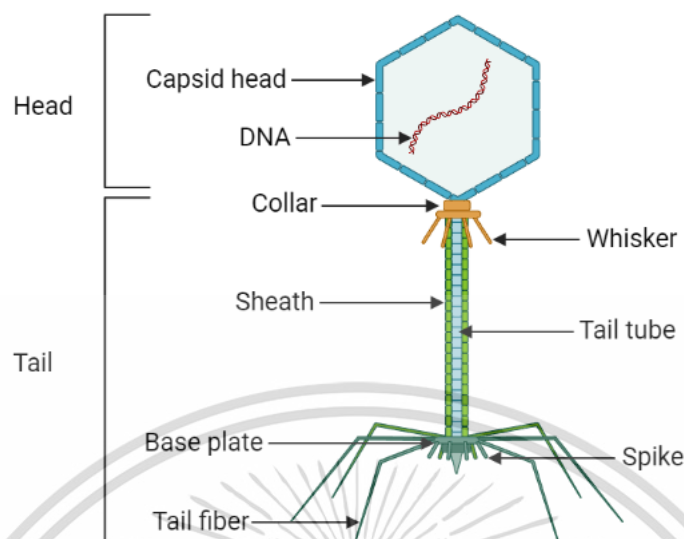
ไวรัสของแบคทีเรียหรือแบคทีเรียโอเฟจ คือไวรัสที่แพร่เชื้อไปยังโฮสต์ของแบคทีเรียและมีคุณสมบัติเหมือนกันกับไวรัสทุกชนิด ประการแรก ไม่สามารถทำซ้ำได้ด้วยตัวเองพวกเขาต้องการโฮสต์ของแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวนลูกหลาน โดยใช้ประโยชน์จากกลไกเซลล์ของโฮสต์ และเปลี่ยนเส้นทางไปสู่การเพิ่มจำนวนลูกหลานของไวรัส ประการที่สอง เช่นเดียวกับไวรัสอื่นๆ แบคทีเรียโอเฟจมีความเฉพาะเจาะจงสำหรับโฮสต์เฉพาะ ช่วงของโฮสต์สามารถจำกัดอยู่ที่แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวหรืออาจขยายไปถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แม้กระทั่งจำพวกก็ได้ อย่างไรก็ตาม มีแบคทีเรียโอเฟจเพียงไม่กี่ชนิด (ถ้ามี) ที่มีช่วงโฮสต์ที่ครอบคลุมลำดับแบคทีเรียที่แตกต่างกัน และการมีระยะโฮสต์ที่ครอบคลุมไฟลาตต่างกันมีโอกาสน้อยกว่าด้วยซ้ำ (SEA-PHAGE, 2013)

2.2.2 นิเวศวิทยาของ Bacteriophage

ตามแนวคิดบริเวณที่มีแบคทีเรียเจ้าบ้านบริเวณนั้นจะมีแบคทีเรียโอเฟจ ตามบริเวณดิน น้ำ ผู้ป่วย โดยมีคุณสมบัติของไวรัส เป็นปรสิตภายในเซลล์ที่แท้จริงอาศัยในแบคทีเรีย โปรโตซัว ฟังไจ สาหร่าย พืชและสัตว์ สามารถมีปฏิกิริยาได้เมื่อเข้าเซลล์เจ้าบ้านถ้าเซลล์จะไม่มีปฏิกิริยาโครงสร้างพื้นฐานของแคปซิดห่อหุ้มสารพันธุกรรม กรดนิวคลีอิกสามารถเป็นได้ทั้ง DNA หรือ RNA เป็นได้อย่างใดอย่างหนึ่งแต่ไม่ได้ทั้งคู่ โดยจะมี double stranded DNA, single stranded DNA, single stranded RNA และ double stranded RNA ตัวของโฮสต์ต้องมี receptor เฉพาะกับไวรัส ส่วนใดส่วนหนึ่งของอนุภาคไวรัสจะมี spike ไปเข้ากับเซลล์โฮสต์เรียก receptor บนเซลล์เจ้าบ้านยึดเกาะนำตัวมันเองเข้าเซลล์ virion ขนาดเล็กแตกเอนไซม์และกลไกสังเคราะห์โปรตีนตัวไรโบซอม (Ackermann, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สัณฐานวิทยาของแบคทีริโอเฟจ



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ T4

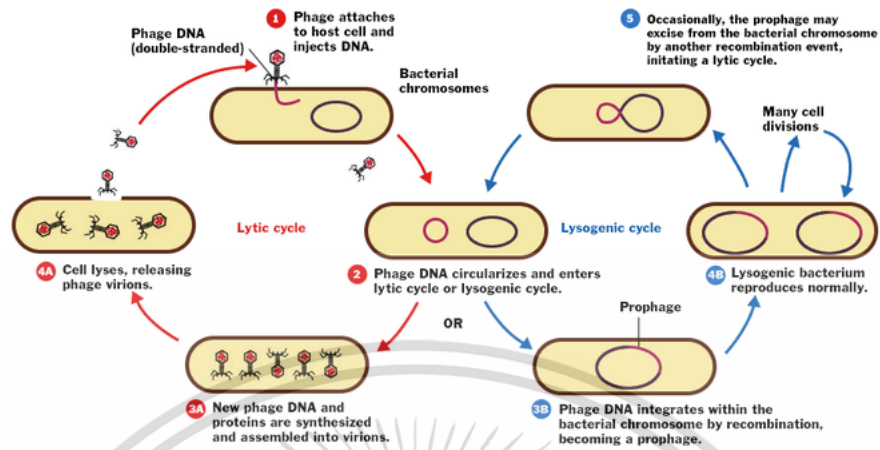
ที่มา: Coaching, 2020

โดยมีตัว Short non-contractile tail จะเป็นพวก Podoviridae ส่วน Contractile tail จะเป็นพวก Myoviridae และส่วน Long non-contractile tail จะเป็นพวก Siphoviridae ในส่วนของ head ที่ Capsid head มีสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจอยู่ตามลักษณะกรดนิวคลีอิก dsDNA รูปร่างของไวรัส Helical, Icosahedral, Complex ไวรัสที่มี Envelope มี Enveloped และ Naked คือไม่มี envelope อนุภาคของแบคทีเรียมีหลายรูปร่างและขนาด แต่ส่วนใหญ่เป็นไวรัสหางที่มีจีโนม DNA แบบเกลียวคู่ (dsDNA) (ลำดับ Caudovirales) ในแบคทีริโอเฟจเหล่านี้ จีโนม DNA เส้นจะบรรจุอยู่ในเปลือกโปรตีน (หัวหรือแคปซิด) ซึ่งติดอยู่ที่หางแบคทีริโอเฟจในลำดับอื่นอาจมี DNA สายเดี่ยว (ssDNA) หรือ RNA และสามารถห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มไขมัน มีโครโมโซมหนึ่งโครโมโซมหนึ่งตัวหรือมากกว่า หรือมีโครงสร้างอื่นๆ ที่หลากหลาย แบคทีริโอเฟจอาจมียืนเพียงไม่กี่ยืนหรือมากกว่า 500 ยืน แต่โดยทั่วไปแล้วแบคทีริโอเฟจหาง dsDNA จะมียืน 50–250 ยืน (โปรดทราบว่าจำนวนนี้น้อยกว่าโฮสต์ของแบคทีเรียซึ่งอาจมียืนมากกว่า 6,000 ยืนมาก) (SEA-PHAGE, 2013)

การจัดจำแนกของไวรัส แบ่งจากเกณฑ์ต้องมีชนิดสารพันธุกรรม, ขนาดจีโนม, Genome configuration, ขนาดอนุภาคไวรัส, สัณฐานวิทยา, การมีหรือไม่มี Envelope, Host range คือความสามารถในการเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านได้มากน้อย, โครงสร้างของแคปซิดไวรัส, คุณสมบัติก่อโรคและความเหมือนกันของจีโนม (Ackermann, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 Life cycle of bacteriophage



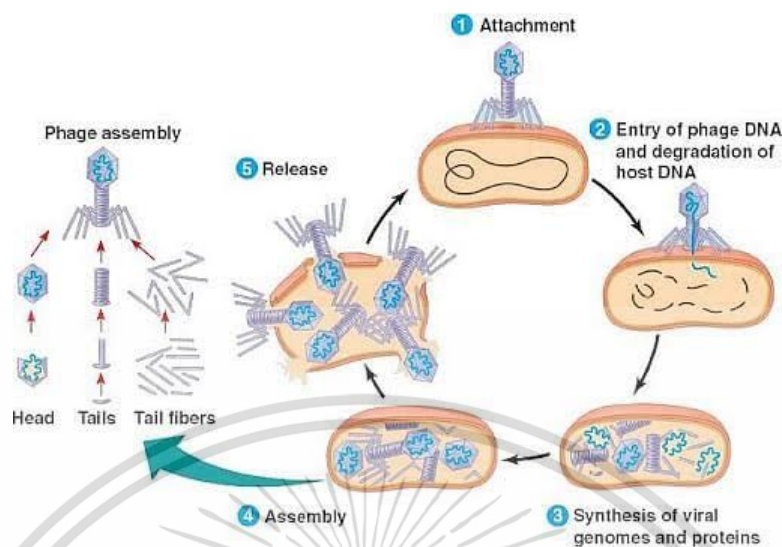
รูปที่ 2.5 lytic and lysogenic cycle

ที่มา: GeeksforGeeks, 2022

มี 2 รูปแบบหลักคือ Lytic cycle or Lytic state และ Lysogeny state or Lysogenic cycle or Lysogenic conversion โดยเราเริ่มจากการเกาะของแบคทีริโอเฟจเกาะเข้าตัวเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน เข้าสู่ผนังเซลล์ เรียกระยะว่า การ Adsorption จากนั้นเข้าสู่การ Penetration เป็นระยะที่สามารถตัดสินใจว่าจะให้ไปกระบวนการ Lytic หรือ กระบวนการ Lysogenic โดส่วนใหญ่มักจะเกิดกระบวนการไลติกมากกว่าคือการที่สารพันธุกรรมจากไวรัสที่เข้าไปในเซลล์ Host bacteria แล้วจะจัดตัวเองให้อยู่ในรูปคล้ายพลาสมิด แล้วดำเนินการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการประกอบเป็นเซลล์ใหม่ เมื่อสร้างสารต่าง ๆ และประกอบตัวเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์แล้วจะปล่อยไลโซไซม์ย่อยเซลล์ Host เพื่อปลดปล่อยลูกหลานไวรัสออกมา ส่วนน้อยจะเป็น Lysogenic หรือ Prophage pathway เป็นวงชีวิตที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสผ่านการแบ่งเซลล์ของเซลล์ Host เพราะเมื่อไวรัสส่งสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ Host แล้ว สารพันธุกรรมจะเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ Host (อาศัยเอนไซม์ integrase) ซึ่งในระหว่างนั้น สารพันธุกรรมของไวรัสจะไม่กำหนดการสร้างอะไร คล้ายกับฝังตัวนิ่งๆ อยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย และเพิ่มจำนวนไปพร้อม ๆ กับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย จนเมื่อถึงสภาวะที่เหมาะสมจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรีย และจัดรูปแบบตัวเองเป็นพลาสมิดซึ่งทำให้เกิดการดำรงชีวิตในวงจร Lytic pathway ต่อไป (baanjomyut, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 กลไกของ Lytic phage ในการทำลายแบคทีเรีย



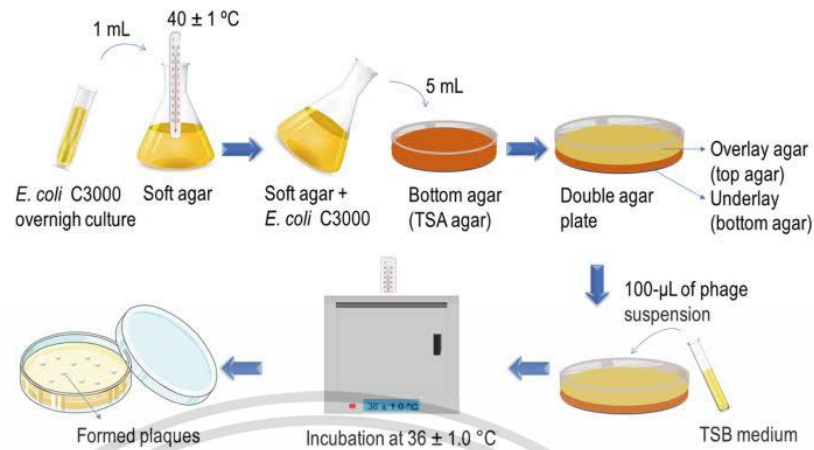
รูปที่ 2.6 Lytic phage

ที่มา: Samanth, 2018

กระบวนการเจริญเติบโตของไลติกสามารถแบ่งหลายระยะ ระยะแรกจะเป็นการยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจกับตัว receptor แบคทีเรียเจ้าบ้านเรียกว่า Adsorption แบคทีริโอเฟจที่เกาะกับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ลงไปไซโตพลาสซึมแล้วฉีดสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจเข้าจีโนมของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน เริ่มปิดระบบโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจและเกิดการสังเคราะห์ส่วนโครงสร้างและส่วนสารพันธุกรรม สร้างส่วนโปรตีนก่อนแล้วค่อย replicate ส่วนอื่นช่วงท้าย ส่วนประกอบโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจครบแล้วค่อยประกอบรวมกันเป็น bacteriophage assembly line เป็นตัวแบคทีริโอเฟจลูกหลานออกมาแล้วเพิ่มจำนวนสมบูรณ์ไปเรื่อยๆ phage progeny ออกเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการ Burst size เซลล์ออกมาปลดปล่อยลูกหลานออกนอกเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านแตกตาย Lysis ไป (Kropinski & Clokie, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 การทำ Plaque assay



รูปที่ 2.7 plaque assay

ที่มา: Tavares da Silva, 2021

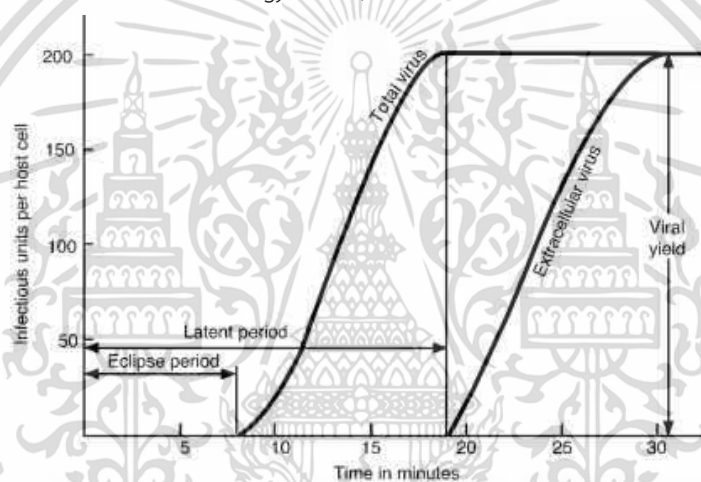
การทดสอบคราบพลาคลิงทรีช่วยให้อ่านผลการมีอยู่ของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจในตัวอย่างได้ด้วยสายตา เป็นการวิเคราะห์ที่สามารถใช้สำหรับการแยกแบคทีเรียโอเฟจ การทำให้บริสุทธิ์ และการไทเทรต ในการทดสอบคราบจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่เป็นโฮสต์จะถูกผสมกับตัวอย่างแบคทีเรียโอเฟจและเติบโตเป็นพื้นที่บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ หากมีแบคทีเรียโอเฟจอยู่ พวกมันจะติดเชื้อและแพร่กระจายเพิ่มจำนวนลูกหลานภายในโฮสต์ของแบคทีเรียและฆ่าเซลล์แบคทีเรียที่เรียกว่า Lytic phage ในกระบวนการนี้ แบคทีเรียโอเฟจที่ถูกจำลองใหม่จะแพร่กระจายภายในวุ้นและทำซ้ำขั้นตอนการติดเชื้อ การจำลองแบบ และการสลายของแบคทีเรียโฮสต์ในบริเวณใกล้เคียง เป็นผลให้พื้นที่ว่างที่มองเห็นได้ของการฆ่าที่เรียกว่าคราบพลาคลิงทรีจะปรากฏชัดเจนบนพื้นที่ที่มีแบคทีเรีย โปรดทราบว่าแต่ละแผ่นเกิดขึ้นจากอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจเพียงอนุภาคเดียวในตัวอย่างแบคทีเรียโอเฟจดั้งเดิม (Kropinski & Clokie, 2009)

2.2.7 one-step growth curve

เพื่อกำหนดระยะเวลาแฝง (ช่วงเวลาระหว่างการดูดซับของแบคทีเรียโอเฟจไปยังเซลล์แบคทีเรียและการปล่อยแบคทีเรียโอเฟจรุ่นลูก) และ Burst size (อัตราส่วนของการนับจำนวนสุดท้ายของอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจที่ปล่อยออกมาต่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ติดเชื้อในช่วงระยะเวลาแฝง) ของ phage ทำการ ทดลองการเจริญเติบโตแบบขั้นตอนเดียว ขนาดการระเบิดและระยะเวลาแฝงถูกตรวจสอบโดยใช้การวิเคราะห์กราฟการเจริญเติบโตแบบขั้นตอนเดียว ในการทดลองการเจริญเติบโตแบบขั้นตอนเดียว จะมีการสังเกตการเจริญเติบโตของ ไวรัสเพียงรอบเดียวหรือรอบเดียว การติดเชื้อเกิดขึ้นพร้อมกันเนื่องจากการปล่อยเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในปริมาณที่มากเกินไปจนติดเชื้อด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจ นั่นหมายถึงการติดเชื้อของอนุภาคจำนวนมากไปยังโฮสต์พร้อมกัน

ตัวแบคทีเรียโอเฟจกำลังเกิดขึ้น จำนวนเซลล์โฮสต์ที่มากเกินไปจะติดเชื้อด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอัตราส่วน 1:10 ในระหว่างการทดลองการเจริญเติบโตแบบขั้นตอนเดียว Delbrück and Ellis (1939) ได้ผสมเซลล์ *E. coli* กับ T4 phage หลังจากช่วงเวลาสั้น ๆ ส่วนผสมถูกเจือจางอย่างมากเพื่อให้แบคทีเรียโอฟาจใด ๆ ที่ปล่อยออกมาจากการสลายเซลล์โฮสต์จะไม่พบและทำให้เซลล์อื่นติดเชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางแล้วไปบ่ม และเมื่อเวลาผ่านไปตัวอย่างจะถูกนำออกเพื่อหาจำนวนของอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่ติดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนของอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่ปล่อยออกมาจากแบคทีเรียจะถูกกำหนดตามช่วงเวลาที่แตกต่างกันโดยใช้วิธีการทดสอบการเกิดพลาจูลินทรีย์ จำนวนอนุภาคของแบคทีเรียโอฟาจเทียบกับเวลาแสดงช่วงเวลาที่แตกต่างกันหลายช่วงในเส้นโค้งการเติบโตที่เป็นผลลัพธ์ ระยะเวลาแฝงเกิดขึ้นทันทีหลังจากเพิ่มแบคทีเรียโอฟาจของช่วง Log phase ในช่วงเวลานี้จะไม่มีการปล่อยแบคทีเรียโอฟาจ พอระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นตามมาและมีลักษณะเฉพาะคือการปล่อยแบคทีเรียโอฟาจติดเชื้ออย่างรวดเร็ว ในที่สุดก็มาถึงช่วง Stationary phase และไม่มีแบคทีเรียโอฟาจเกิดขึ้นอีก (Microbiology note, 2022)



รูปที่ 2.8 one-step growth curve

ที่มา: Mobile Health Knowledge, 2022

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wichanan Wannasrichan et al. (2022) ค้นพบเฟจ lytic ที่มุ่งเป้าไปที่ *P. aeruginosa* ซึ่งถูกกำหนดให้เป็น JJ01 ซึ่งถูกจัดประเภทเป็นสมาชิกของ ตระกูล Myoviridae เนื่องจากมี icosahedral capsid และหางที่หุ้มด้วยเปลือกเกล็ดรูปทรงกลม TEM Phage JJ01 ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 10 นาทีเพื่อให้อนุภาค 90% ของมันถูกดูดซับไปยังเซลล์โฮสต์ และมี latent period 30 นาทีภายในเซลล์โฮสต์เพื่อการจำลองแบบ JJ01 มี burst size ที่ค่อนข้างใหญ่ ซึ่งจะปล่อยอนุภาคประมาณ 10^9 ตัว/เซลล์เมื่อสิ้นสุดวงจรชีวิตของโฮสต์ เฟจสามารถทนต่อค่า pH (3–10) และอุณหภูมิ (4–60°C) ได้หลากหลาย การวิเคราะห์จีโนมแสดงให้เห็นว่า JJ01 มีจีโนมที่สมบูรณ์ของคู่เบส 66,346 คู่ โดยมีเนื้อหา GC 55.7% ด้วยยีนที่สามารถคาดเดาได้ 38 ยีน และมันไม่มีทั้งยีน tRNA หรือยีนของสารพิษ เช่น ยีนที่ดื้อยาหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับไลโซเจนิค Phage JJ01 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง

การเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกำจัดไบโอฟิล์มที่สร้างโดยแบคทีเรีย แม้ว่าแบคทีเรียที่ต้านทานต่อ JJ01 ได้เกิดขึ้นแล้ว พบว่าสายพันธุ์ต้านทานบางสายพันธุ์ผลิตไบโอฟิล์ม น้อยกว่าและเติบโตช้ากว่าสายพันธุ์ธรรมชาติ ในบรรดาเชื้อดื้อยาที่แยกได้ สายพันธุ์ต้านทาน W10 ซึ่ง ทำให้สมรรถภาพทางสรีรวิทยาลดลงอย่างเห็นได้ชัด จะไวต่อโคลิสตินมากกว่าถึงแปดเท่า และทำให้ เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เมื่อเทียบกับชนิดพันธุ์ธรรมชาติ โดยรวมแล้ว ข้อมูลของเราเปิดเผยถึง ศักยภาพของ phage JJ01 ในฐานะตัวเลือกสำหรับการบำบัดด้วย phage ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และสนับสนุนเพิ่มเติมว่าแม้ว่าการใช้ phage จะนำไปสู่การเกิดขึ้นของแบคทีเรียที่ต้านทาน phage ในเวลาต่อมา แต่การแลกเปลี่ยนเชิงวิวัฒนาการจะทำให้พวกมัน ไวต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น

Nicola Mangieri et al. (2020) มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ในสายพันธุ์ STEC และเพื่อตั้งคำถามเกี่ยวกับความทนทานของไวรัสที่อาจใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนในอาหารของ STEC STEC สามสิบเอ็ดของกลุ่มซีโรกรุ๊ปที่แตกต่างกัน ได้รับการตรวจสอบสำหรับการดื้อยาปฏิชีวนะ และความไวต่อการโจมตีด้วยเฟจ สายพันธุ์สิบเปอร์เซ็นต์แสดงความต้านทานหลายค่าสูง ในขณะที่ แอมพิซิลลินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดโดยการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ 65% ในอีก ด้านหนึ่ง เฟจทั้งหมด 20 ตัวถูกแยกออกจากอุจจาระ สิ่งปฏิกูล และวัสดุรองนอนของโค อุณหภูมิของ ไวรัสได้รับการพิสูจน์แล้วว่าไม่มียีนที่สร้างสารพิษจากชิก้าและอินดิมีน ไม่มี STEC ใดที่สามารถต้านทานเฟจได้ทั้งหมด แม้ว่าบางสายพันธุ์จะเปิดเผยความไวที่อ่อนแอโดยการสร้างพลาซมิดก็ตาม แบคทีเรียที่แตกต่างกันสามชนิด ได้รับการคัดเลือกโดยพิจารณาจากโปรไฟล์ RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ที่แตกต่างกัน และการไม่มียีนที่เข้ารหัสความรุนแรงและยีน ต้านทานยาปฏิชีวนะ ตรวจสอบความสามารถ lytic ต่อสายพันธุ์ STEC ที่การติดเชื้อหลายหลาก (MOI = 0.1, 1 และ 10) พบ ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของแสงโดยการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ MOI และส่วนควบคุมที่แตกต่างกัน การลด จำนวนแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพเกิดขึ้นได้ในกรณี 81% โดยมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ MOI สูงสุด ทดสอบประสิทธิภาพของเฟจผสมกับแตงกวาสด ผลลัพธ์แสดงการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรค ลง 1.97–2.01 log CFU/g ที่ 25°C และลดลง 1.16–2.01 log CFU/g ที่ 4°C ในช่วง 24 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ว่าผสมสูตรดังกล่าวมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ได้ ในการควบคุมทางชีวภาพของ STEC serogroups ต่างๆ

Xymena Stachurska et al. (2021) ศึกษาการปรับเปลี่ยนเทคนิคอาหารร่วนสองชั้น (DLA) สำหรับขั้นตอนแรกของการระบุงการร่วมกันระหว่างเฟจและยาปฏิชีวนะ (PAS) สำหรับการ ทำงานร่วมกันระหว่างเฟจและยาปฏิชีวนะ (PAS) มีความแตกต่างในเรื่องเทคนิคในการปรับเปลี่ยนวิธี อาหารร่วนสองชั้น (DLA) เพื่อแสดงผล PAS บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจส่งผลให้ผลการวิจัยไม่ สม่าเสมอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรวมวิธีการตรวจจับผลกระทบของ PAS ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการ ทดสอบในหลอดทดลองขั้นพื้นฐานที่สุด -ในการศึกษานี้ bacteriophage T4 และใช้ยาปฏิชีวนะ 43 ชนิดที่อยู่ในกลุ่มยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน การดัดแปลงวิธี DLA ที่แตกต่างกันเจ็ดแบบได้รับการ

ทดสอบ ในแง่ของการเติมยาปฏิชีวนะและการมีอยู่หรือไม่มีของฐาน จำนวนแผ่นเพลจโดยรวมต่อจานส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับยาปฏิชีวนะที่ใช้ ความแตกต่างของปริมาณคราบจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับประเภทของการปรับเปลี่ยนวิธี DLA จำนวนพลาทที่ใหญ่ที่สุดได้มาจากการเติมยาปฏิชีวนะลงในวันกั้นขวด โดยมีวันด้านบนอยู่ด้วย สิ่งนี้บ่งชี้ว่าแม้ว่ายาปฏิชีวนะสามารถแสดงผลของการทำงานร่วมกันระหว่างเพลจและยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Disc standard แต่ก็คุ้มค่าที่จะตรวจสอบว่าผลที่ได้นั้นน่าพอใจพอๆ กันหรือไม่เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะโดยตรงในวัน โดยคำนึงถึงการใช้แบคทีเรียโอเฟจและโฮสต์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกัน

Ya-Ke Li et al. (2021) ศึกษาการแยกลักษณะและการใช้แบคทีเรียที่มีฤทธิ์กัดกร่อนต่าง JN01 ด้านเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ในนมและเนื้อวัวนี้เพลจที่ทนต่อต่างต่อเชื้อ *E. coli* ชื่อ JN01 ถูกแยกและจำแนกลักษณะจากน้ำเสีย มีฤทธิ์สลายเชื้อต่อเชื้อ *E. coli* 16 ใน 20 ชนิดโดย 11 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ตื้อยามากกว่า 3 สายพันธุ์ ลักษณะทางชีววิทยาของ JN01 พบว่า latent period และระยะสลายคือ 15 นาที และ 85 นาที ตามลำดับ burst size ของ JN01 อยู่ที่ประมาณ 134 PFU ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ JN01 ก่อนข้างเสถียรภายใต้สภาวะเครียด เช่น อุณหภูมิ (30 °C – 70 °C) และ pH (4–13) ที่สำคัญไม่มีการระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง ยาปฏิชีวนะ และไลโซจีนที่รู้จักในจีโนมของ JN01 การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและสายวิวัฒนาการยืนยันว่า JN01 เป็นของ Myoviridae จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *E. coli* O157: H7 ลดลงในตัวอย่างนมและเนื้อดิบเมื่อบำบัดด้วย JN01 ที่อุณหภูมิ 4 °C ผลพบว่า JN01 อาจเป็นสารควบคุมทางชีวภาพตามธรรมชาติสำหรับเชื้อ *E. coli* O157: H7 ในอาหาร

Naveen Chaudhary et al. (2021) ศึกษาคุณลักษณะและ กิจกรรมในหลอดทดลองของ lytic phage RDN37 ที่แยกได้จากน้ำเสียชุมชนที่มีฤทธิ์ยับยั้งต้านทานยาปฏิชีวนะของ Uropathogenic *E. coli* พบว่าเนื่องจากการเกิดขึ้นของสายพันธุ์ *E. coli* (MDR-UPEC) ที่ตื้อต่อยาหลายชนิดที่ตื้อยาหลายตัว จึงหาทางเลือกอื่นนอกเหนือจากยาปฏิชีวนะ เช่น การบำบัดด้วยเพลจ การศึกษาครั้งนี้ได้รับวางแผนเพื่อระบุคุณลักษณะและทดสอบการทำงานของเพลจ (RDN37) ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียชุมชนและพบว่ามีฤทธิ์ต้านการต้านทานยาปฏิชีวนะของ Uropathogenic *E. coli* สรุปร RDN37 เป็นเพลจ lytic ที่คงที่โดยมี large burst size มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* มีศักยภาพในการรักษาโรคติดเชื้อ UTI หรือโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ที่เกิดจาก Uropathogenic *E. coli* ที่ตื้อยาสูง จะต้องผสมเพลจหลายตัวเพื่อเอาชนะช่วงโฮสต์ที่แคบของมัน

Pavel Alexyuk et al. (2022) ค้นหากลไกการแยกและการศึกษาลักษณะของไลติกแบคทีเรียโอเฟจที่ออกฤทธิ์ต่อสายพันธุ์ทางคลินิกของ *E. coli* และการพัฒนาเพลจผสมด้านจุลชีพตรวจสอบแบคทีเรีย lytic *E. coli* หกชนิดที่แยกได้จากน้ำเสีย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและการจัดลำดับจีโนมทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้นั้นเป็นเพลจทางของคลาส Caudoviricetes กราฟการเติบโตขึ้นเดียวเห็นว่า latent period ของการไลติกคือ 20-30 นาที และค่าเฉลี่ยของขนาดไลซิสเป็น 117-155 ในระหว่างการเพาะร่วมกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เพลจ

ยับยั้งการเติบโตของการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียโฮสต์อย่างสมบูรณ์ภายใน 4 ชั่วโมงแรกที่ MOI 10^{-7} ถึง 10^{-3} ช่วงของโฮสต์ที่ถูกแยกโดยแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไปตั้งแต่ 6 ถึง 2 สายพันธุ์จากทั้งหมด 9 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ เฟจผสมที่เกิดจากแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาภายใน 6 ชั่วโมง และคงความสามารถไคติกเป็นเวลา 8 เดือนในการเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดอาจมีประโยชน์ในการต่อสู้กับเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคและพัฒนาเฟจผสมที่มีระยะเวลาการเก็บรักษานานและมีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

Yan Zhou et al. (2022) ในการศึกษาเฟจ lytic vB_EcoM_SQ17 (SQ17) ที่มีโฮสต์ในวงกว้างชนิดใหม่ ได้รับการแยก จำแนกลักษณะ และประเมินศักยภาพในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียในหลอดทดลองและในเมทริกซ์อาหารที่แตกต่างสามชนิด (นม เนื้อดิบ และผักกาดสด) Phage SQ17 สามารถแพร่เชื้อ EHEC O157:H7, ETEC และสายพันธุ์ *E. coli* อื่นๆ ได้ สันฐานวิทยา การเติบโตในชั้นตอนเดียว และการทดสอบความคงตัวแสดงให้เห็นว่าเฟจ SQ17 อยู่ในลำดับ *Caudovirales* ตระกูล *Myoviridae* และสกุล *Mosivirus* มี latent period สั้น 10 นาที burst size 71 PFU/เซลล์ที่ติดเชื้อ มีความเสถียรสูงระหว่าง pH 4 ถึง 12 ทolerant ความคงตัวต่อความร้อนระหว่าง 30°C ถึง 60°C เป็นเวลา 60 นาที การวิเคราะห์ลำดับจีโนมเผยให้เห็นว่าจีโนมของ SQ17 ไม่มียีนใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ สารพิษ โกลโซจีนี หรือปัจจัยความรุนแรง ซึ่งบ่งชี้ถึงการใช้ phage SQ17 ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย ในอาหารเลี้ยงเชื้อลูเรีย-เบอร์ทานี (LB) เฟจ SQ17 ลดจำนวนนับที่มีชีวิตของ EHEC O157:H7 ลงอย่างมีนัยสำคัญมากกว่า $2.40 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$ ($p < 0.05$) หลังจากการบ่ม 6 ชั่วโมงที่ 37°C Phage SQ17 มีศักยภาพที่ดีเยี่ยมในการนำไปใช้กับการควบคุมทางชีวภาพของ EHEC O157:H7 ในนมและเนื้อวัวดิบ ในผักกาดหอมสด การบำบัดด้วย SQ17 ยังส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ EHEC O157:H7 และ ETEC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ทั้ง 4°C และ 25°C ผลลัพธ์ของเราแสดงให้เห็นว่า SQ17 เป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ EHEC O157:H7 และ ETEC ในขั้นตอนการแปรรูปการผลิตอาหารและการเก็บรักษาอาหาร

Pedro Costa et al. (2019) *Enterobacteriaceae Escherichia coli* และ *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* สายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระดับปานกลางและรุนแรงในสภาพแวดล้อมของโรงพยาบาลและชุมชน ส่วนหนึ่งเป็นเพราะพวกมันมักคือดื้อยาปฏิชีวนะ เนื่องจากการรักษาโรคติดเชื้อ *Enterobacteriaceae* เป็นการทดลองการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียวกันในการรักษาการติดเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* แนวคิดเดียวกันนี้สามารถนำไปใช้กับเฟจได้ การใช้เฟจต่างๆ รวมกันในเฟจผสม ซึ่งมักใช้เพื่อหลีกเลี่ยงการพัฒนาของการกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเฟจ ยังช่วยให้สามารถรักษาโรคได้หลายชนิด โดยขยายขอบเขตการออกฤทธิ์ของเฟจให้กว้างขึ้น จุดมุ่งหมายของการศึกษาคือเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเฟจผสมที่มีเฟจสองตัว (ELY-1 ซึ่งผลิตบน *E. coli* และ phSE-5 ผลิตบน *S. Typhimurium*) เพื่อควบคุม *E. coli* และ *S. Typhimurium*

เฟจ ELY-1 และ phSE-5 มีประสิทธิภาพลดด้าน *E. coli* (การลดลงสูงสุด 4.5 และ 3.8 log CFU/ml ตามลำดับ), *S. Typhimurium* (การลดลงสูงสุด 2.2 และ 2.6 log CFU/ml ตามลำดับ) และผสมของแบคทีเรียทั้งสองชนิด (ลดลงสูงสุด 2.2 และ 2.0 log CFU/ml ตามลำดับ) เฟจผสม ELY-1/phSE-5 มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อ *S. Typhimurium* และส่วนผสมของแบคทีเรียทั้งสอง (การลดลงสูงสุด 3.2 log CFU/ml สำหรับทั้งคู่) มากกว่าสารแขวนลอยเฟจเดี่ยวและมีประสิทธิภาพต่อ *E. coli* เช่นเดียวกับเฟจที่จำเพาะ ELY-1 (การลดลงสูงสุด 4.5 log CFU/ml) อย่างไรก็ตาม การใช้ทั้งเฟจผสมและสารแขวนลอยเฟจเดี่ยวไม่ได้ป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์ที่ต้านทานเฟจ โดยรวมแล้วผลลัพธ์บ่งชี้ว่าการใช้เฟจในรูปของเฟจผสมแสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะนำมาใช้อย่างสันนิษฐานได้ นั่นคือ ก่อนที่จะระบุเชื้อโรคได้ ถือเป็นทางไปสู่ในการควบคุมเชื้อ *E. coli* หรือ *S. Typhimurium*

Diana Gutiérrez et al. (2018) เฟจที่จะใช้เพื่อจุดประสงค์นี้ต้องอยู่ภายใต้ลักษณะเฉพาะของจีโนมในเชิงที่ซับซ้อน จำเป็นต้องกำหนดการทำงานเฉพาะของยีนเฟจ ซึ่งจะให้ข้อมูลเพื่อคัดลอกชีววิทยาของเฟจ และเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มียีนที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ยีนที่มีความรุนแรงและต้านทานยาปฏิชีวนะ ในที่นี้ เราจะอธิบายเกณฑ์วิธีง่ายๆ สำหรับการเลือกเฟจกลายพันธุ์ที่มีการสุมลไปตามจีโนมของเฟจตามทฤษฎี บริเวณ DNA ใดๆ อาจถูกกำจัดออกโดยมีข้อกำหนดเพียงอย่างเดียวว่าความมีชีวิตของอนุภาคเฟจยังคงไม่ได้รับผลกระทบ เทคนิคนี้อิงจากความไม่เสถียรของอนุภาคเฟจเมื่อมีสารประกอบคีเลต ส่วนหนึ่งของพวกเฟจที่ขาดส่วน DNA ตามธรรมชาติจะรอดชีวิตจากการรักษาได้ภายในบริบทของเฟจในฐานะยาด้านจุลชีพ เกณฑ์วิธีนี้มีประโยชน์ในการเลือกเวเรียนต์ของไลติกจากเฟจอุณหภูมิพอสมควร ในแง่ของประสิทธิภาพของเฟจ เฟจที่มีฤทธิ์รุนแรงเป็นที่ต้องการมากกว่าเฟจอุณหภูมิปานกลางเพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์ วิธีการนี้ถูกนำมาใช้เพื่อให้ได้การกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวงจร lysogenic ของเฟจที่ติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus* และ *Lactobacillus*)

Zack Hobbs et al. (2016) แบคทีเรียหรือเฟจเป็นไวรัสของสมาชิกของโดเมนแบคทีเรีย ไวรัสเหล่านี้มีบทบาทมากมายในการกำหนดความหลากหลายของชุมชนจุลินทรีย์ โดยผลกระทบจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับกลยุทธ์การติดเชื้อที่เฟจเฉพาะใช้ จากมุมมองที่ประยุกต์ สิ่งเหล่านี้โดยเฉพาะคือชุมชนที่มีแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์หรือทำให้เกิดโรคที่สามารถดัดแปรผ่านการควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียที่ใช้เฟจเป็นสื่อกลาง นั่นคือ ผ่านการบำบัดด้วยเฟจ ในที่นี้ เราพยายามจัดหมวดหมู่เฟจในแง่ของกลยุทธ์การติดเชื้อ ตลอดจนทบทวนหรือแนะนำคำศัพท์เฉพาะทางที่สื่อความหมาย ถูกต้องหรือแยกแยะได้มากขึ้น หมวดหมู่สามารถแยกแยะได้ในแง่ของ (1) ว่าการปล่อยไวรัสเกิดขึ้นหรือไม่ (การติดเชื้อที่มีประสิทธิภาพเทียบกับไลโซจีนี การสลายตัวปลอม และ/หรือสถานะพาหะของเฟจ) (2) วิธีการปล่อยไวรัส (ไลติกเทียบกับการปล่อยเรื้อรัง) และ (3) ระดับของเฟจที่ติดตั้งทางพันธุกรรมเพื่อแสดงวงจรไลโซเจนิค (เฟจอุณหภูมิปานกลางเทียบกับเฟจที่ไม่ใช่อุณหภูมิ) เรากล่าวถึงเป็นพิเศษเกี่ยวกับการใช้หรือใช้มากเกินไปของสิ่งนี้อาจเป็นวลีที่ค่อนข้างคลุมเครือ เช่น Lytic หรือ lysogenic โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้เป็นเครื่องมือในการแยกแยะประเภทของเฟจ เราแนะนำว่าการแบ่งข้อ

โดยนัยนั้นไม่สอดคล้องกับความเข้าใจทั้งในปัจจุบันและในอดีตของชีววิทยาเฟจ ดังนั้นเราจึงพิจารณา คำศัพท์เฉพาะทางที่มีความคลุมเครือน้อยกว่าเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเฟจประเภท Lytic และ Lysogenic

Chloe E. James et al. (2001) แยกเทอริโอเฟจจากโรคเวโรไซโตทอกซิเจนที่แยกได้จาก สายพันธุ์ *Escherichia coli* O157 สายพันธุ์ที่มีการใส่ยีนต้านทานคานามัยซิน (*aph3*) เพื่อยับยั้ง การทำงานของยีนเวโรไซโตทอกซิน (*vt₂*) เพื่อติดเชื้อสายพันธุ์ *Enterobacteriaceae* เชื้อ *Shigella* และ *E. coli* จำนวนหนึ่งไวต่อการติดเชื้อ Lysogenic และเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้เรียบ (O107) ก็ไวต่อ การติดเชื้อ Lysogenic เช่นกัน สายพันธุ์ไลโซจีไนซ์ประกอบด้วย *E. coli* ซีโรไทป์เรียบที่แตกต่างกัน ของทั้งต้นกำเนิดของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งบ่งชี้ว่าแบคทีเรียนี้มีความสามารถอย่างมากในการเผยแพร่ ยีนเวโรไซโตทอกซิน การทดสอบคราบจุลินทรีย์ทางอ้อมแบบใหม่ที่ใช้ เชื้อ *E. coli* *recA441* ซึ่งเซลล์ ที่ติดเชื้อเฟจสามารถเข้าสู่วงจรไลติกเท่านั้น ซึ่งทำให้สามารถตรวจจับเฟจที่ติดเชื้อทั้งหมดได้ได้รับการ พัฒนา

Paul Hyman et al. (2019) เพื่อให้แบคทีเรียโอเฟจมีประโยชน์สำหรับการบำบัดด้วยเฟจ จะต้องแยกออกจากสิ่งแวดล้อมและแสดงให้เห็นว่ามีลักษณะบางอย่างที่นอกเหนือไปจากการฆ่าสาย พันธุ์ของเชื้อโรคแบคทีเรียเป้าหมาย สิ่งเหล่านี้รวมถึงคุณลักษณะที่ต้องการ เช่น ช่วงโฮสต์ที่ค่อนข้าง กว้างและการไม่มีคุณลักษณะอื่นๆ เช่น การพายินของสารพิษและความสามารถในการก่อรูปไลโซเจน แม้ว่าเฟจจะถูกแยกออกโดยทั่วไปในขั้นแรกและต่อมาจึงแสดงคุณลักษณะเฉพาะ แต่ก็เป็นไปได้ที่จะ เปลี่ยนขั้นตอนการแยกเพื่อให้แยกออกจากเฟจที่มีลักษณะเฉพาะที่ต้องการ บางกลุ่มใช้รูปแบบ เหล่านี้เป็นประจำ ในขณะที่บางกลุ่มปรากฏอยู่ในสิ่งพิมพ์เพียงไม่กี่ฉบับเท่านั้น ในการทบทวนนี้ จะ อธิบาย (1) ขั้นตอนการแยกและการแปรผันที่ออกแบบมาเพื่อแยกเฟจด้วยช่วงโฮสต์ที่กว้างกว่า (2) ขั้นตอนการแสดงลักษณะเฉพาะที่ใช้เพื่อแสดงว่าเฟจอาจมีประโยชน์ในการบำบัดด้วยเฟจ ซึ่งรวมถึง ข้อจำกัดบางประการของการแสดงคุณลักษณะดังกล่าว และ (3) ผลการสำรวจและหารีอกับ นักวิจัยเฟจในอุตสาหกรรมและสถาบันการศึกษาเกี่ยวกับแนวทางปฏิบัติในการจำแนกลักษณะของ เฟจ

Zhongjing Lu and Fred Breidt (2015) เฟจชนิดใหม่ Φ 241 ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับ *Escherichia coli* O157:H7 ถูกแยกได้จากการหมักแดงกวางทางอุตสาหกรรมซึ่งมีทั้งความเป็นกรด ($\text{pH} \leq 3.7$) และความเค็ม ($\geq 5\%$ NaCl) มีสูง เฟจอยู่ในวงศ์ *Myoviridae* มี latent period คือ 15 นาที และ burst size เฉลี่ยอยู่ที่ 53 อนุภาคเฟจต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ เฟจสามารถสลาย สายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 ได้ 48 สายพันธุ์ แต่ไม่มีสายพันธุ์ที่ไม่ใช่ O157 18 สายพันธุ์ (ซึ่งรวมถึง *E. coli* O104:H7) หรือการกลายพันธุ์ที่เป็นลบของแอนติเจน 20 ของสายพันธุ์ O157:H7, (ยังขาด แอนติเจน H7) และ F12 (ยังคงแสดงแอนติเจน H7) อย่างไรก็ตาม เฟจสามารถสลาย สายพันธุ์ ต่อ

เอกสารนี้เพิ่มเติมซึ่งแสดงออกแอนติเจน O157 ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าเฟจ Φ 241 มีความจำเพาะสำหรับ ไม่ว่าแอนติเจน O157 และสายพันธุ์ *E. coli* ที่ขาดแอนติเจน O157 มีความทนทานต่อการติดเชื้อเฟจ โดย

ไม่คำนึงว่าจะมีหรือไม่มีแอนติเจน H7 ก็ตาม โปรไฟล์ SDS-PAGE เผยโปรตีนโครงสร้างของเฟจอย่างน้อย 13 ชนิด DNA ของเฟจสามารถต้านทานเอ็นโดนิวคลีเอสที่มีข้อจำกัดที่ใช้กันทั่วไปได้หลายชนิด ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของนิวคลีโอไทด์ที่ถูกดัดแปลงในจีโนมของเฟจ ที่หลายหลากของการติดเชื้อที่ 10, 3 หรือ 0.3 เฟจทำให้เกิดการสลายเซลล์อย่างรวดเร็วภายใน 1 หรือ 2 ชั่วโมง ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ลดลง 3.5 หรือ 4.5 ยูนิตล็อก กิจกรรมไลติกสูง ความจำเพาะและความทนทานต่อ pH ต่ำ และความเค็มสูงทำให้เฟจ Φ 241 เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในอุดมคติของ *E. coli* O157:H7 ในอาหารต่างๆ ตามความรู้ของเรา นี่เป็นรายงานฉบับแรกเกี่ยวกับ เฟจของ *E. coli* O157:H7 ที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดและความเค็มสูง

David Tomat et al. (2013) แบคทีเรียสิบชนิดถูกแยกออกจากอุจจาระและผลการสลายของพวกมันทดสอบกับ Enterobacteriaceae ที่ทำให้เกิดโรคและไม่ทำให้เกิดโรค 103 ชนิด เฟจสองตัว (DT1 และ DT6) ถูกเลือกโดยอิงตามช่วงโฮสต์ของพวกมัน และผลไลติกของพวกมันต่อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรค ตรวจสอบสายพันธุ์ *E. coli* ที่ฉีดเชื้อบนชิ้นเนื้อวัว เราประเมินการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 และเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ใช่ O157 Shiga ที่เป็นพิษต่อเนื้อสัตว์ หลังจากได้รับ DT6 ที่อุณหภูมิ 5 และ 24°C เป็นเวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมง และผลของเฟจทั้งสองต่อเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคทางลำไส้การลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตที่มียีนสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเฟจ ที่ทั้งสองอุณหภูมิถูกสังเกตพบ ด้วยการลดลงมากที่สุดเกิดขึ้นภายในชั่วโมงแรกของการสอบวิเคราะห์ การลดลงยังได้รับอิทธิพลจากความเข้มข้นของเฟจ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด คือ 1.7×10^{10} หน่วยสร้างพลาซมิดต่อมิลลิลิตร (PFU/ml) สำหรับ DT1 และ 1.4×10^{10} PFU/ml สำหรับ DT6 ซึ่งมีประสิทธิผลมากที่สุด เมื่อ ทดสอบสายพันธุ์ *E. coli* และ Shiga toxinogenic *E. coli* (O157:H7) ที่ทำให้เกิดโรค เราได้รับการลดเซลล์ที่มีชีวิต 0.67 log ($p = 0.01$) และ 0.77 log ($p = 0.01$) หลังจากการฟักตัว 3 ชั่วโมงและ 0.80 log ($p = 0.01$) และ 1.15 log ($p = 0.001$) หลังจาก 6 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคทั้งหมด และแบคทีเรียเอนเทอโรแบคทีเรียอื่นๆ ที่ทดสอบสามารถต้านทานได้ นอกจากนี้ เฟจเฟจผสมถูกประเมินบนสองสายพันธุ์และการลดลงเพิ่มเติมถูกสังเกตพบ อย่างไรก็ตาม *E. coli* bacteriophage insensitive mutants (BIMs) ปรากฏในการตรวจวิเคราะห์เนื้อสัตว์ BIM ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์พร้อมกับที่แยกได้โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงขั้นที่สองได้รับการทดสอบเพื่อประเมินความคงตัวและการกลับตัวของพีโนไทป์ของความต้านทาน พวกเขานำเสนอความถี่การเกิดขึ้นต่ำ (6.5×10^{-7} – 1.8×10^{-6}) และความเสถียรและการกลับตัวของตัวแปร ผลลัพธ์บ่งชี้ว่าเฟจที่แยกได้มีความคงตัวในการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลลบต่อปัจจัยความรุนแรงทั้งหมดที่วิเคราะห์ มีกิจกรรมการสลายสำหรับ ไวรัสไทป์ ของ *E. coli* ที่แตกต่างกัน และอาจมีประโยชน์ในการลดพิษของ Shiga *E. coli* และเซลล์ที่มีชีวิตได้ของ *E. coli* ที่ก่อโรคในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

S Viazis et al. (2011) เพื่อแยก ระบุ และจำแนกลักษณะกลุ่มของแบคทีเรียไลติกที่สามารถแพร่เชื้อในซีโรไทป์ *Escherichia coli* (EHEC) ที่เข้าสู่หลอดเลือดได้ โดยแยกเฟจออกจากมูลสัตว์จาก

โคนมและมูลสัตว์โดยใช้ เชื้อ *E. coli* O157, O26 และ O111 เป็นโฮสต์ เฟจถูกทำให้เข้มข้นจาก อุจจาระเหลวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซอทริปติเคส 10 เท่าที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำคืน ได้รับ แผ่นพลาคเฟจโดยการผสมส่วนลอยเหนือตะกอนของการเพาะเลี้ยงที่ถูกกรองกับวุ้นทริปโทน หลอมเหลวซึ่งมีสายพันธุ์โฮสต์ของเฟจ *E. coli* โดยเทวุ้นที่ได้รับการฉีดวัคซีนไว้ด้านบนของวุ้น TS ที่ ทำให้เย็นลง และบ่มเพาะเชื้อในชั่วข้ามคืน เฟจถูกทำให้บริสุทธิ์จากพลาคและคัดกรองด้าน เชื้อ *E. coli* และ EHEC เพิ่มเติมโดยประสิทธิภาพของวิธีการซุบ (EOP) เฟจ CEV2 และเฟจอีกห้าตัวที่ถูกแยก เดี่ยวก่อนหน้านี้ สามารถสลายสายพันธุ์ O157 15 สายพันธุ์ทั้งหมดที่ทดสอบด้วยค่า EOP ที่สูงกว่า 0.001 อย่างสม่ำเสมอ พบว่าเฟจสองตัวมีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้านสายพันธุ์ *E. coli* O157 ผ่าน การทดสอบ EOP และต่อต้านสายพันธุ์ O26 ผ่านการทดสอบเฉพาะจุด แต่ไม่ต่อต้านสายพันธุ์ O serogroup 111 ผสมที่มีเฟจแปดตัวที่ไล่ช้ สายพันธุ์ *E. coli* O157 ส่งผลให้ $CFU\ ml^{-1}$ ลดลง $>5\ log$ ที่ 37°C Multiplex-PCR เปิดเผยว่าไม่มีเฟจทั้งแปดนี้ที่มียีน *stx1*, *stx2*, *hlyA* หรือ *eaeA* แยกที่เรียกลุ่มหนึ่งสามารถสลายสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ EHEC สองซีโรไทป์ได้ กลุ่มเฟจนี้สามารถ นำมารวมกันและอาจใช้เป็นเฟจผสมต้านจุลชีพเพื่อยับยั้ง เชื้อ *E. coli* จากกลุ่ม O serogroups 157 และ 26

François Javaudin et al. (2021) แยกเฟจไลติกชนิดใหม่ 4 ตัว ในหลอดทดลอง เพื่อ ประสิทธิภาพในการต่อต้าน สายพันธุ์ *Escherichia coli* ที่ผลิตเบต้าแลคตาเมสแบบขยายสเปกตรัม (ESBL) และต้านทานต่อคาร์บาเพนิมส์ผ่านคาร์บาเพนิมาส OXA-48 ได้เช่นกัน ขั้นตอนแรกคือการ พัฒนาแบบจำลองการขนส่งทางย่อยอาหารของ ESBL *E. coli* ในหนู ขั้นตอนที่สองคือการทดสอบ ประสิทธิภาพของการรักษาด้วยเฟจทางปากและทางทวารหนัก (เฟจผสมที่มีเฟจสี่ชนิดหรือเฟจไมโคร แคปซูล) เพื่อลดการขนส่งนี้ ผลลัพธ์: การขนส่งทางเดินอาหารที่รุนแรงที่สุดสองแบบจำลองได้มาจากการ ให้แอมม็อกซิซิลลิน ($0.5\ กรัม\ ลิตร^{-1}$) อย่างต่อเนื่องในน้ำดื่ม (แบบจำลองที่ 1) หรือแพนโทพรา โซล ($0.1\ กรัม\ ลิตร^{-1}$) อย่างต่อเนื่องในน้ำดื่ม รวมกับ แอมม็อกซิซิลลิน ($0.5\ g\cdot L^{-1}$) ใน 8 วันแรก (รุ่น 2) การบริหารช่องปากของเฟจผสมเป็นโมเดล 1 ส่งผลให้ความเข้มข้นของ ESBL *E. coli* ใน อุจจาระลดลงชั่วคราว 9 วันหลังจากการทดลองของแบคทีเรีย (ค่ามัธยฐาน = 5.33×10^8 เทียบกับ $2.76 \times 10^9\ CFU\cdot g^{-1}$, $p = 0.02$) ในทางตรงกันข้าม ในแบบจำลอง 2 การให้ยาเฟจผสมนี้ทางปาก หรือทางปาก + ทางทวารหนักไม่ได้เปลี่ยนไคเตอร์ของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (พื้นที่ใต้เส้นโค้ง AUC 3.49×10^9 ; 3.41×10^9 และ 3.82×10^9 สำหรับ กลุ่มควบคุม ทางปาก และทางปาก + ทางทวารหนัก ตามลำดับ; p -value > 0.8 สำหรับการเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มแบบ สองต่อสอง) เช่นเดียวกับการบริหารให้เฟจไมโครแคปซูลแบบรับประทานในแบบจำลอง 1 (AUC = 8.93×10^9 เทียบกับ 9.04×10^9 , $p = 0.81$) สรุป: การรักษาด้วยยารับประทานด้วย amoxicillin ส่งเสริมการขนส่งทางย่อยในหนู ซึ่งก็เกิดขึ้นจากการเติม pantoprazole เช่นกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาของเรายืนยันความยากลำบากในการบรรลุประสิทธิภาพด้วยการบำบัดด้วยเฟจเพื่อลดการ ขนส่งแบคทีเรียย่อยที่ื้อยหลายชนิดในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น มิใช่ผู้จัดทำหรือเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rahmad Lingga et al. (2020) การแยก ลักษณะและประสิทธิภาพของแบคทีเรีย lytic ต่อเชื้อ *Escherichia coli* ที่ทำให้เกิดโรค จากของเสียที่เป็นของเหลวในโรงพยาบาล ความหลากหลายทางชีวภาพ *Escherichia coli* เป็นที่รู้จักในฐานะแบคทีเรียปนเปื้อนที่ทำให้เกิดโรคในน้ำเสียของโรงพยาบาลที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ความกังวลเกี่ยวกับการปรากฏตัวของแบคทีเรียที่ต่อต้านคลอรีนและยาปฏิชีวนะเพิ่มความเร่งด่วนในการค้นหากลยุทธ์ทางเลือกในการควบคุมแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในน้ำเสียของโรงพยาบาล ทางเลือกหนึ่งคือการใช้ lytic bacteriophage การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก จำแนกลักษณะ และตรวจสอบประสิทธิภาพของไลติกแบคทีริโอเฟจต่อเชื้อ *Escherichia coli* ที่ทำให้เกิดโรค จากน้ำเสียของโรงพยาบาล โดยแยก จำแนกลักษณะ (สัณฐานวิทยาของคราบจุลินทรีย์ ช่วงโฮสต์ ไมโครกราฟอิเล็คตรอนของ virion และความไวต่ออุณหภูมิ ค่า pH และการบำบัดด้วยคลอรีน) และทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียไลติกในการควบคุมเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียของโรงพยาบาล ได้รับพหุหน้าที่สำเร็จ ซึ่งทั้งหมดมีคราบชัดเจน (ลักษณะเฉพาะของเฟจไลติก) จากการทดสอบช่วงโฮสต์ เฟจส่วนใหญ่สามารถกำจัด เชื้อ *E. coli* ที่ทดสอบทั้งหมด ได้ แต่ไม่ใช่สำหรับสายพันธุ์อื่น การถ่ายภาพไมโครกราฟอิเล็คตรอนเผยให้เห็นว่าเฟจเป็นของไมโอไวรัส เฟจแสดงความคงตัวในอุณหภูมิสูง, pH ที่หลากหลาย และความเข้มข้นสูงของการบำบัดด้วยคลอรีน การทดสอบประสิทธิภาพเฟจเสนอแนะว่าเฟจมีความสามารถในการลดประชากรของเชื้อ *E. coli* ได้อย่างมีนัยสำคัญทั้งในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ การรวมกันของการบำบัดด้วยเฟจและคลอรีนมีประสิทธิภาพมากกว่าการบำบัดด้วยเฟจเดี่ยว การทดสอบประสิทธิภาพพบว่าการใช้เฟจในน้ำเสียให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากการบำบัดแบบเฟจผสมและการผสมผสานระหว่างการบำบัดเฟจกับคลอรีน ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเฟจอาจเป็นตัวเลือกที่มีศักยภาพในการฆ่าเชื้อโรค

Ashetu Fikadu et al. (2024) การใช้ไลติกแบคทีริโอเฟจเพื่อควบคุมหรือกำจัดแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายชนิด (MDR) ที่ทำให้เกิดโรคเป็นทางเลือกที่น่าหวัง อย่างไรก็ตาม การเกิดขึ้นของแวนริแอนด์ของแบคทีเรียที่ดื้อยาหลังการใช้เฟจอาจทำหายนุ้ประโยชน์ในการรักษาโรค ในการศึกษาี้ เรามุ่งเป้าที่จะแยกเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียเทียบกับ MDR *Escherichia coli* สองตัว รวมถึงตัวแปรที่ต้านทานเฟจของพวกมัน โดยวิธีการ MDR *E. coli* ที่แยกได้ (n = 10) ที่ได้รับจากศูนย์การแพทย์ Jimma ที่ได้รับการระบุและจัดเก็บอย่างถูกต้องถูกนำมาใช้เพื่อแยกแบคทีริโอเฟจ ไลติก lytic สองตัวถูกแยกออกจากตัวอย่างน้ำเสียของโรงพยาบาลตามระเบียบการมาตรฐาน จากการติดเชื้อเฟจเดี่ยว virulent ที่ต้านทานเฟจพัฒนาอย่างรวดเร็วโดยทำหน้าที่เป็นโฮสต์ใหม่สำหรับการแยกเฟจไลติกตัวที่สาม ฤทธิ์สลายของเฟจที่มีฤทธิ์รุนแรงนี้ต่อทั้งโฮสต์และโฮสต์ได้รับการตรวจสอบ มีการประเมินการติดเชื้อโฮสต์ของเฟจผสมต่างๆ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของเฟจแต่ละชนิด จากกระบวนการแยกเฟจรอบแรก มีเฟจ lytic สองชนิดที่ถูกระบุเป็น VBO- *E. coli* 4307 และ VBW- *E. coli* 4194 เมื่อสัมผัสกับ VBO- *E. coli* 4307 *E. coli* 4307 ชนิดพันธุ์พัฒนาความต้านทาน ตัวแปร เฟจตัวที่สาม (VBA- *E. coli* 4307R) ถูกแยกออกจำเพาะสำหรับแวนริแอนด์ต้านทานนี้ (*E. coli* 4307R) ภายใต้

สภาวะที่เหมาะสมที่สุด สำหรับ VBO- *E. coli* 4307, VBW- *E. coli* 4194 และ VBA- *E. coli* 4307R การตรวจจากรวมจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เปรียบเทียบกันได้คือ 2.13×10^{10} PFU mL⁻¹, 9.17×10^{12} PFU mL⁻¹ และ 3.3×10^{10} PFU mL⁻¹ ตามลำดับ เฟจเหล่านี้มีความคงตัวและความสามารถในการสลายเกือบเหมือนกัน แต่แตกต่างกันอย่างมากในช่วงโฮสต์ของ VBA- *E. coli* 4307R แม้ว่าเชื้อก่อโรค MDR ชนิดพันธุ์ป่าสามารถพัฒนาความต้านทานได้อย่างง่ายดายตามเมื่อสัมผัสกับการติดเชื้อเฟจเดี่ยวด้วย VBO- *E. coli* 4307 แต่ก็ยังสามารถแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ออกจากตัวอย่างด้านสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพต่อตัวแปรที่ต้านทานเฟจได้ สิ่งนี้บ่งชี้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะจัดการกับผลกระทบของเชื้อโรคที่ติดต่อเฟจ แม้ว่าจะเป็น MDR ก็ตาม

Sahd Ali et al. (2023) แยกและจำแนกลักษณะของเฟจ lytic ที่เพิ่งแยกได้สองตัวที่สามารถแพร่เชื้อทางคลินิกของ *P. mirabilis* และ *P. vulgaris* นอกจากนี้ ยังมีการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับลักษณะทางชีววิทยาและโมเลกุลด้วย เฟจทั้ง RP6 และ RP7 แสดง โปรไฟล์ที่จำเพาะต่อสกุล *Proteus* โดยไม่มีการให้ฤทธิ์สลายกับตระกูล Enterobacteriaceae อื่น ๆ ค่า MOI ที่เหมาะสมที่สุดของเฟจ RP6 และ RP7 ถูกกำหนดเป็น 0.1 และ 0.01 ตามลำดับ กราฟการเติบโตขึ้นตอนเดียวแสดงให้เห็นว่าเฟจ RP6 และ RP7 มี latent period สั้น 20 นาที และ burst size ขนาดใหญ่ 220–371 PFU/ml ต่อเซลล์โฮสต์ที่ติดเชื้อ การเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลงทันทีหลังจากเฟจถูกเติม ซึ่งแสดงโดยการวัดความหนาแน่นเชิงแสง (OD) หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่า *Proteus* phage RP6 และ RP7 สามารถกำจัดทั้งแพลงก์ตอนและไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่ที่ผลิตโดย *โพรทิวส* ที่แยกได้ที่ทำการทดสอบ

Young-Duck Lee and Jong-Hyun Park (2015) แยกเฟจของ *Escherichia coli* O157:H7 จำนวน 2 ตัวจากตัวอย่างน้ำเสียและควบคุมลักษณะเฉพาะเพื่อควบคุมเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร เฟจที่แยกได้ BECP2 และ BECP6 เป็นของ Myoviridae และ Podoviridae ตามลำดับ burst size ของพวกมันคือ 33 PFU/เซลล์สำหรับ BECP2 และ 51 PFU/เซลล์สำหรับ BECP6 หลังจาก latent period ที่ 25 นาที ตรวจไม่พบยีนพิษของ Shiga บนเฟจ BECP2 หรือ BECP6 เฟจทั้งสองไวต่อเอธานอล 70% เพื่อตรวจสอบประโยชน์ของส่วนผสมเฟจทั้งสองชนิดสำหรับการควบคุมทางชีวภาพของ *E. coli* O157:H7 เราได้วิเคราะห์การลดลงของ *E. coli* O157:H7 ในนมเชิงพาณิชย์และในไบโอฟิล์ม ของผสมลดการเจริญเติบโตของ *E. coli* O157:H7 จาก 6 log CFU/mL เป็น 1 log CFU/mL หลังจากการพักตัว 5 ชั่วโมงที่ 37 °C ในนมเชิงพาณิชย์ ของผสมถูกนำไปใช้กับ *E. coli* O157:H7 ในไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นบนใยแก้ว, เพลตไมโครไทเตอร์ และคูปองที่ทำจากสแตนเลสสตีล ความหนาแน่นของ *E. coli* O157:H7 ในไบโอฟิล์มลดลงจาก OD₆₀₀ 1.1 เป็น 0.6 บนจาน และจาก 6 log CFU/คูปอง ดังนั้นเฟจ BECP2 และ BECP6 อาจเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในสภาพแวดล้อมของไบโอฟิล์ม

Pan Fu et al. (2021) ใช้เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิด เป็นตัวบ่งชี้และแยกออก กำหนดคุณลักษณะ และเปรียบเทียบเฟจใหม่สองตัวใน ตระกูล *Siphoviridae* ที่เรียกว่า vB_EcoS_XF และ

vB_EcoS_XY2 เฟจเหล่านี้สามารถแพร่ เชื้อเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลาย สายพันธุ์ ที่ทำให้เกิดโรคได้ หลายสายพันธุ์ latent period ที่สั้นและ burst size ที่ใหญ่ทำให้แน่ใจได้ว่าพวกมันจะแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็วในเซลล์โฮสต์ การทนต่ออุณหภูมิสูงและระดับ pH สูงทำให้ยังคงมีเสถียรภาพเมื่อใช้ควบคุม สายพันธุ์ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรค ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ชัดเจนเมื่อเซลล์ HEK293 T หรือ A549 ถูกบ่มด้วยเฟจทั้งสองนี้ การวิเคราะห์แมสสเปกโตรเมตรีช่วยให้เราสามารถระบุโปรตีนที่ถูก เข้ารหัสด้วยเฟจได้หลายชนิด การวิเคราะห์จีโนมพบว่าไม่มีการเข้ารหัสโปรตีนที่เป็นพิษหรือโปรตีนยา ปฏิชีวนะ การเปรียบเทียบจีโนมและการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการระบุว่าเฟจที่ระบุมีความคล้ายคลึง กันสูงกับ เฟจของ เชื้อ *E. coli* ในสกุล *Kagunavirus* คุณลักษณะที่พึงประสงค์ของเฟจชนิดใหม่ที่ ระบุทำให้พวกเรามีคุณสมบัติในการรักษาที่ดีและเป็นส่วนประกอบของเฟจผสมเพื่อรักษาเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิด ในอนาคต

Aneela Nawaz et al. (2024) แยกและศึกษาคุณลักษณะโดยละเอียดของแบคทีเรีย Lytic ที่กำหนดให้เป็น ES10 ที่สามารถสลายเชื้อ *E. coli* ที่ ดื้อต่อยาหลายขนาน ES10 มีหัวแบบ icosahedral และส่วนหางแบบไม่หดตัว และขนาดจีโนมเท่ากับ 48,315 คู่เบสยาวเข้ารหัสโปรตีน 74 ตัว ไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ ความรุนแรง และวงจรไลโซเจนิคในจีโนมเฟจ ES10 การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและจีโนมทั้งหมดของเฟจ ES10 แสดงให้เห็นว่า ES10 เป็นสมาชิกของ *Drexlerviridae* เวลาแฝงของ ES10 คือ 30 นาที burst size คือ 90 และการติดเชื้อหลายหลากที่ เหมาะสมคือ 1 ES10 มีความเสถียรในเลือดมนุษย์ และต่อมาทำให้แบคทีเรียโฮสต์ลดลง 99.34% แคลเซียมคลอไรด์ทำให้เวลาการดูดซับและ latent period ของ ES10 สั้นลง และยับยั้งการสร้างไบ โอฟิล์มของแบคทีเรียโฮสต์อย่างมีนัยสำคัญ ES10 ลดแบคทีเรียโฮสต์จากโฟมที่ปนเปื้อนได้ถึง 99.84% เฟจ ES10 มีศักยภาพที่จะใช้ในการบำบัดด้วยเฟจมาตรฐาน

Bruce Wang et al. (2023) การจัดลำดับจีโนมที่เรียแบบมัลติเพล็กซ์แบบเซลล์เดี่ยวขนาดใหญ่ ขนานกัน (M3-seq) ระบุประชากรแบคทีเรียที่หายากและโปรไฟล์การติดเชื้อ phage โดยมีการ เจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนใน เซลล์ *E. coli* ที่ติดเชื้อ phage การเจริญเติบโตของ *E. coli* ที่ เติบโตในระยะเอ็กซ์โปเนนเชียลระยะแรก ($OD \sim 0.2-0.3$) และติดเชื้อ phage ($MOI \sim 100$) หรือ เสริมด้วย phage vehicle (LB) และมีการบำบัดด้วยเฟจอาจเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการต่อสู้กับ การติดเชื้อแบคทีเรีย นักวิจัยต้องเอาชนะความท้าทายหลายประการเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของ การบำบัดด้วยแบคทีเรีย เช่น การขับออกจากกระแสเลือดอย่างรวดเร็ว และการสะสมของแบคทีเรีย ในม้ามในภายหลัง แบคทีเรียเฟจติดเชื้อด้วยอนุภาคเฟจจำนวนมาก: เฟจจำนวนมากช่วยให้มั่นใจได้ ว่าแบคทีเรียทั้งหมดจะติดเชื้ออย่างรวดเร็ว การติดเชื้อในระดับสูงเรียกว่าการติดเชื้อหลายหลาก (MOI) และสามารถทำได้ด้วยอัตราส่วนเฟจต่อโฮสต์ที่ 5 ถึง 10 หน่วยสร้างคราบจุลินทรีย์ (PFU) ต่อ เซลล์ การดูดซับไวรัสเข้าสู่เซลล์สามารถดำเนินการได้ในเวลาที่เหมาะสม

Techaphon Songphasuk et al. (2022) แยก กำหนดคุณลักษณะ และประเมิน ประสิทธิภาพของแบคทีริโอเฟจในการควบคุมเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคโคลิบาซิลลัสในลำไส้ในสุกร

เก็บตัวอย่างสิ่งปลูกิจจำนวน 5 ตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ของฟาร์มสุกรในจังหวัดสุพรรณบุรี ประเทศไทย และเสริมสมรรถนะและแยกแบคทีเรีย ตามด้วยการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการวางซ้อนวันโดยใช้เชื้อ *E. coli* RENR เป็นสายพันธุ์โฮสต์ เฟจที่เลือกถูกแสดงคุณลักษณะเฉพาะโดยการประเมินสัมพันธวิทยาของพวกมัน ในขณะที่ความจำเพาะของพวกมันถูกตรวจสอบโดยการทดสอบช่วงโฮสต์ นอกจากนี้ยังพิจารณาประสิทธิภาพการจับและความหลากหลายของการติดเชื้อ (MOI) อีกด้วยเฟจที่ถูกเลือกสี่ตัว กล่าวคือ vB_Eco-RPNE4i3, vB_Eco-RPNE6i4, vB_Eco-RPNE7i1 และ vB_Eco-RPNE8i3 แสดงให้เห็นรูปแบบที่แตกต่างกันของช่วงโฮสต์และประสิทธิภาพของเฟจ พวกเขาลด ความเข้มข้นของ เชื้อ *E. coli* ที่ MOI ที่ทดสอบ (0.01–100) อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 1 ชั่วโมงเป็นต้นไป อย่างไรก็ตาม การรอกใหม่ของแบคทีเรียถูกสังเกตพบในการบำบัดด้วยเฟจทั้งหมด

Naritsara Battapai et al. (2017) ศึกษาโดยจากน้ำตัวอย่างจำนวน 39 ตัวอย่างที่นำมา แยกและตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL *E. coli* พบว่า มีจำนวน 25 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบ spot test เป็นบวกคือปรากฏ clear zone บน ผิวหน้าอาหาร และเมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบ spot test เป็นบวกไปตรวจยืนยันการมี แบคทีเรียโอเฟจอยู่ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธี double agar layer plaque assay พบว่า มี 7 ตัวอย่างที่พบจุดใส (clear plaque) บนผิวหน้าอาหาร แสดงว่า ในน้ำตัวอย่างทั้ง 7 นี้จะมีแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะ ต่อ ESBL-*E. coli* อยู่จริงและเป็นไลติกเฟจ (lytic phage) เพราะสามารถทำให้เกิดการตายของโฮสต์ ตั้งชื่อแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า EP1, EP2, EP3, EP4, EP5, EP6 และ EP7 ตามลำดับ การนำแบคทีเรียโอเฟจแต่ละตัวที่แยกได้มา ศึกษาลักษณะการเจริญโดยการสร้างกราฟ one step growth curve เพื่อทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่ไลติกเฟจ ใช้ในการเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์จนกระทั่งปลดปล่อย แบคทีเรียโอเฟจ รุ่นลูก (progeny phage) ออกสู่นอก เซลล์ซึ่งเรียกว่า latent period เวลาที่มีการปล่อย อนุภาคไวรัสออกมากที่สุดหนึ่งรอบของการเจริญซึ่ง เป็นเวลาที่โฮสต์เกิดการแตกสลายไปมากที่สุดเช่นกัน เรีย ก ว่า burst time และค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียโอเฟจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่ง เซลล์ (pfu/infected cell) เรียกว่า burst size

Elvis Agbo et al. (2022) แบคทีเรียโอเฟจ vB_SauP_P992 ใหม่ ซึ่งสามารถแยกวิเคราะห์สายพันธุ์ MRSA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้รับการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีเพลตวันคู่ได้สำเร็จ ในเรื่องนี้ ความไวต่อ pH, กราฟการเติบโตแบบขั้นตอนเดียว, ความหลากหลายที่เหมาะสมของการติดเชื้อ (MOI), ความไวต่อความร้อน, ช่วงโฮสต์ของเฟจ และผลของรีเอเจนต์อินทรีย์ต่อแอกติวิตีของเฟจถูกกำหนดหา ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่าหัวของแบคทีเรียโอเฟจมีลักษณะหกเหลี่ยมและมีหางที่ไม่หดตัวและสามารถสร้างฟลาเคเดียวที่มีขอบอย่างประณีตได้ นอกจากนี้ MOI ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.1 one-step growth curve แสดง latent period ของแบคทีเรียโอเฟจประมาณ 20 นาที ระยะเวลาการสลาย 90 นาที และ burst size ประมาณ 65.8 PFU ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ แบคทีเรียโอเฟจ vB_SauP_P992 มีความคงตัวทางความร้อนที่ยอมรับได้ ความคงตัวของ pH และการต้านทานต่อปัจจัยทางกายภาพและเคมี ซึ่งป้องกันแบคทีเรียโอเฟจที่ไม่มีแคปซูล

Ping Li et al. (2022) วิธีการเซลล์เดี่ยวเผยให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ในความสามารถในการผลิตเฟจ แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะประมาณ burst size ของเฟจและความแปรผันของ burst size ในเวลาเดียวกันในเวลาการแยกสลายที่ต่างกัน one-step growth curve ของซีวีวิทยาเฟจสามารถประมาณเวลาการสลายและค่า burst size โดยเฉลี่ยของประชากรเฟจเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ประเมินความแปรผันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ใน burst size ได้ เบอร์เน็ตได้คิดค้นวิธีแรกในการประมาณ burst size ของเซลล์เดี่ยวโดยการเจือจางสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ติดเชื้อ phage ลงในส่วนย่อยเล็กๆ เพื่อให้แต่ละส่วนย่อยมีแบคทีเรียที่ติดเชื้อโดยเฉลี่ยน้อยกว่า 1 ตัว กลยุทธ์นี้ทำให้มั่นใจได้ว่าส่วนลงตัวเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่จะมีแบคทีเรียที่ติดเชื้อมากกว่า 1 ตัว หลังจากการฟักตัวเป็นเวลาเพียงพอเพื่อให้แบคทีเรียทั้งหมดสลายตัว การตรวจคราบจุลินทรีย์เผยให้เห็นการกระจายของ burst size วิธีนี้ได้รับการปรับปรุงในภายหลังเพื่อประมาณการกระจาย burst size ในขนาดตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น วิธีการในช่วงแรกๆ เหล่านี้ใช้เฟจอิสระเพื่อเริ่มการติดเชื้อโดยปล่อยให้การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ที่กำลังเติบโต และจำเป็นต้องเจือจางและกระจายเซลล์อย่างรวดเร็วก่อนที่จะเกิดการระเบิดครั้งแรก การแปรผันที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลจากเวลาที่ต้องใช้สำหรับเฟจในการดูดซึมเข้าสู่เซลล์โฮสต์และฉีดจีโนมของพวกมัน ในทางตรงกันข้าม วิธีการของเราใช้ไลโซเจนที่ขาดการสลายตัว ซึ่งช่วยให้เราสามารถกระตุ้นวงจรไลซิสพร้อมกันในทุกเซลล์ ตลอดจนสลายเซลล์ในเวลาที่ต้องการ การสลายทางเคมีของเซลล์แต่ละเซลล์สามารถถูกกระตุ้นได้ในเวลาเดียวกัน ซึ่งช่วยลดความแปรผันของเซลล์ต่อเซลล์ในระยะเวลากการสลายที่พบในไลโซเจนตามธรรมชาติ สิ่งนี้จะลดผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงเวลาสลายต่อการเปลี่ยนแปลง burst size ให้เหลือน้อยที่สุด ดังนั้นวิธีการนี้เป็นการปรับปรุงให้ดีขึ้นกว่าความพยายามครั้งก่อนซึ่งเซลล์ที่ไม่ก่อให้เกิดการก่อมะเร็งได้รับเชื้อเฟจอิสระ ซึ่งตามด้วยการเจือจาง เพื่อให้ได้ค่าประมาณขนาดเซลล์เดี่ยวที่แตกออก วิธีการของเราทำให้สามารถประมาณค่าเฉลี่ย burst size และการกระจายตัวในเวลาสลายที่แตกต่างกันได้แม่นยำยิ่งขึ้น เมื่อใช้วิธีการนี้ เราสังเกตเห็นว่าสัญญาณรบกวนในใหม่มีการแยกสลายไม่ได้ส่งผลต่อสัญญาณรบกวนใน burst size อย่างมีนัยสำคัญ และ burst size ยังคงที่ตลอดระยะเวลาการแยกสลายที่ต่างกัน คำอธิบายที่เป็นไปได้มากที่สุดสำหรับสัญญาณรบกวนที่มี burst size คงที่ที่สังเกตได้จากการทดลองก็คือ ความแตกต่างระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ใน burst size นั้นมาจากความหลากหลายระหว่างเซลล์ในความจุของเซลล์ (k สูงสุด) เพื่อสร้างเฟจ

Lingchong You et al. (2002) ผลของ ซีวีวิทยาของ *Escherichia coli* ต่อการเจริญเติบโตของ Phage T7 ใน Vivo และใน Silico ทรัพยากรโฮสต์รวมถึงปริมาณของจีโนม DNA ขนาดพูลและอัตราการยึดตัวของ RNA polymerases และโรโบโซม ขนาดสระน้ำของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไซด์ ไตรฟอสเฟต และปริมาตรของเซลล์ การพึ่งพาในซิลิโก (จำลอง) ของอัตราการเพิ่มขึ้นของเฟจภายในเซลล์ต่ออัตราการเติบโตของโฮสต์ทำให้เกิดข้อตกลงที่ดีในเชิงปริมาณกับผลลัพธ์ ในร่างกาย ของเรา ซึ่งเพิ่มขึ้นห้าเท่าสำหรับการเพิ่มขึ้นของโฮสต์สองเท่าต่อชั่วโมง 2.4 เท่า และการพึ่งพาจำลองของ eclipse time บน อัตราการเติบโตตกลงกันในเชิงคุณภาพ โดยเบี่ยงเบนจากความล่าช้าคงที่ เมื่อการ

จำลองถูกใช้เพื่อแยกทรัพยากรโฮสต์ออกจากอัตราการเติบโตของโฮสต์ในเชิงตัวเลข พบว่าการเติบโตของเฟจมีความไวต่อกลไกการแปลโฮสต์มากที่สุด ในการทดลองการเจริญเติบโตในขั้นตอนเดียวภายในเซลล์ โดยวิธีการที่กำหนดไว้ใช้ในการเตรียม การเก็บรักษา และการทดสอบเฟจอุ่นล้างสำหรับเพลตและอุ่นอ่อนสำหรับชั้นซ็อนคือน้ำซุ๊ป LB ที่มีแบคทีเรีย 1.5 และ 0.7% ตามลำดับ เซลล์โฮสต์ผ่านการเพิ่มขึ้นอย่างน้อยหกถึงแปดเท่าหลังจากเข้าสู่สถานะคงตัวใหม่สำหรับการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลแต่ละครั้ง ตามที่กำหนดโดยความหนาแน่นของแสงที่ 600 นาโนเมตร การเก็บตัวอย่างเคมีบำบัดดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ตัวอย่างสิบลิลิตรถูกเติมลงในขวดเชกเกอร์ซึ่งมีอุณหภูมิ 30°C แล้วการใช้เฟจ T7 เป็นระบบแบบจำลอง เราได้สำรวจผลกระทบของสรีรวิทยาของโฮสต์ต่อการเติบโตของเฟจโดยใช้ทั้งวิธีการทดลองและการคำนวณ การทดลองเฟจการเจริญเติบโตในขั้นตอนเดียวดำเนินการโดยการติดเชื้อ เซลล์ *Escherichia coli* ที่เติบโตในอัตราที่ต่างกัน ซึ่งทำได้โดยใช้เคมีบำบัด การทดลองเหล่านี้เสนอแนะการพึ่งพาอัตราการเติบโตของเฟจที่คล้ายคลึงกันกับอัตราการเติบโตของโฮสต์ตั้งที่สังเกตได้จากเฟจอื่นที่ศึกษา: ยิ่งโฮสต์เติบโตเร็วเท่าใด การติดเชื้อเฟจก็จะยิ่งเร็วขึ้นเท่านั้น

Piotr Golec et al. (2008) วิธีง่ายๆ ในการซุ๊ป แบคทีเรีย *Escherichia coli* ให้เกิดพลาซมขนาดเล็กมากหรือไม่มีพลาซมาภายใต้เงื่อนไขมาตรฐานการทำ one-step growth curve โดยนำ *E. coli* O157 EC-48 ถูกเพาะเชื้อไปในตัวกลางน้ำซุ๊ป TSB ขนาด 40 มล. และบ่มที่ 37 °C ด้วยการเขย่าเพื่อให้ได้ OD₆₀₀ ที่ 0.5 เฟจและเซลล์โฮสต์ถูกผสมกับ MOI 0.01 และปล่อยให้ดูดซับเป็นเวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากรบ่ม ส่วนผสมถูกเก็บเกี่ยวโดยการปั่นแยกที่ 10,000 × g เป็นเวลา 1 นาทีที่ 4 °C ต่อมา ส่วนลอยเหนือตะกอนถูกละทิ้งเพื่อกำจัดเฟจอิสระออก เม็ดที่มีเซลล์โฮสต์ที่ติดเชื้อถูกแขวนลอยอีกครั้งอย่างอ่อนโยนในปริมาตรที่เท่ากันของ TSB ที่อุ่นไว้ล่วงหน้าและการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ตัวอย่างถูกถ่ายที่ช่วง 5 นาที (จนถึง 60 นาที) และเฟจไทเตอร์ถูกคำนวณโดยเพลตวันคู่ การทดลองดำเนินการเป็นสามเท่าเพื่อประมาณ burst size และ latent time การวิเคราะห์อนุภาคแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่ามีหัวแบบไอโคซาฮีดรอลและหางยาว ซึ่งเป็นลักษณะของวงศ์ Siphoviridae เฟจมีโฮสต์ที่หลากหลายเพื่อต้านเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดและมีความรุนแรงสูง การทดลองการเจริญเติบโตแบบขั้นตอนเดียวเปิดเผยว่าเฟจ phiC119 นำเสนอ burst size แยกขนาดใหญ่ (210 PFU/เซลล์) และ latent period ที่ 20 นาที จากการวิเคราะห์จีโนม เฟจประกอบด้วยจีโนม DNA แบบเกลียวคู่เชิงเส้นที่มีขนาด 47,319 bp เฟจเข้ารหัสโปรตีนสมบูรณ์ 75 ชนิด แต่ไม่พบยีนไลโซจีนีและความรุนแรงในจีโนม phiC119 ผลลัพธ์เหล่านี้เสนอแนะว่าเฟจ phiC119 อาจเป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่ดี อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้มั่นใจในการควบคุม STEC และเพื่อยืนยันความปลอดภัยของการใช้เฟจ

Jiangtao Zhao et al. (2019) การจำแนกลักษณะทางชีววิทยาของ Lytic Bacteriophage vB_EaeM_ΦEap-3 ที่ติดเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ที่ดื้อยาหลายขนาน ในงานนี้ เราอธิบายแบคทีเรีย lytic ที่มีลักษณะเฉพาะโดยกิจกรรม lytic ที่จำเพาะต่อ *E. aerogenes* ลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาที่ดำเนินการโดย TEM แสดงให้เห็นว่า vB_EaeM_φEap-3 เป็นสมาชิกของตระกูล Myoviridae ในขณะที่การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการโดยใช้เครื่องหมายที่ตรวจสอบแล้วก่อนหน้านี้ แนะนำว่ามันเป็นของสกุลนวนิยาย “Kp15 ไวรัส” ของวงศ์ย่อย Tevenvirinae ลักษณะเฉพาะทาง สรีรวิทยาแสดงให้เห็นว่า vB_EaeM_φEap-3 มีลักษณะเฉพาะโดยมี latent period ที่ค่อนข้างสั้น และมี burst size เป็นอนุภาคเฟจ 109 ตัวต่อเซลล์แบคทีเรียที่ติดเชื้อ ผลลัพธ์ของการทดสอบความ เสถียรของอุณหภูมิและค่า pH ยังช่วยเพิ่มพูนความรู้ของเราเกี่ยวกับเฟจแบบใหม่นี้อีกด้วย คุณลักษณะเหล่านี้ ร่วมกับความจำเพาะของโฮสต์ ความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับเฟจ “ไวรัส Kp15” สกุล lytic อย่างเคร่งครัด และการไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับไลโซจีนี ทำให้ vB_EaeM_φEap-3 เป็นตัวเลือกที่ยอดเยี่ยมสำหรับการใช้งานทางคลินิกที่มีศักยภาพ เช่น การชำระล้างการปนเปื้อนหรือการบำบัด ในที่สุด ผลลัพธ์ยืนยันว่า vB_EaeM_φEap-3 เป็นตัวเลือกที่มี แนวโน้มที่จะขัดขวางการล่าอาณานิคมของ *E. aerogenes*

Cameron Thomas et al. (2003) สำหรับแบคทีริโอเฟจ lytic แบบเฟจจะมี burst size และ latent period การแลกเปลี่ยนนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการปลดปล่อยเฟจลูกหลานจากแบคทีเรียที่ติด เชื้อเกิดขึ้นพร้อมกับการทำลายกลไกที่จำเป็นในการผลิตเฟจลูกหลานมากขึ้น ที่นี้เราใช้การกลายพันธุ์ ของเฟจเพื่อสำรวจปัญหาของการวิวัฒนาการในช่วง latent period ของเฟจ ซึ่งเป็นหน้าที่ของความ หนาแน่นของแบคทีเรียที่ไวต่อเฟจ ทฤษฎีเสนอว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียที่สูงขึ้นควรเลือก สำหรับ latent period ของเฟจที่สั้นลง เราพบว่าความหนาแน่นของโฮสต์ที่สูงขึ้น ($\geq \sim 10^7$ แบคทีเรีย / มล.) สามารถเพิ่มปริมาณสต็อกของ phage RB69 สำหรับตัวแปรที่แสดง latent period ที่สั้นกว่าประเภทไวต์ ตัวแปรหนึ่งที่เรียกว่า sta5 แสดง latent period ที่ ~ 70 ถึง 80% ของ wild type ซึ่งเกือบจะสั้นเท่ากับ eclipse period RB69—และซึ่งมี burst size ที่สอดคล้องกัน ที่คือ $\sim 30\%$ ของคาบนั้น ของประเภท wild เราแสดงให้เห็นว่าที่ความหนาแน่นของโฮสต์ที่สูงขึ้น ($\geq \sim 10^7$ แบคทีเรีย / มล.) sta5 phage สามารถเอาชนะประเภท wild RB69 ได้ แม้ว่าจะอยู่ภายใต้ เงื่อนไขของการแข่งขันโดยตรง (culture เดียวกัน) เท่านั้น เราตีความข้อได้เปรียบนี้ว่าสอดคล้องกับ การเติบโตของประชากร sta5 ที่เร็วขึ้นเล็กน้อย ส่งผลให้ความถี่การกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นหลายเท่าใน ระหว่างการเติบโตของ culture เดียวกัน อย่างไรก็ตาม ข้อได้เปรียบของ sta5 จะหายไป เนื่องจก การแข่งขันทางอ้อมระหว่าง wild type และ mutant แต่มีความหนาแน่นต่ำกว่าของแบคทีเรียที่ไว ต่อเฟจ ($\leq \sim 10^6$ แบคทีเรีย/มล.) จากการสังเกตเหล่านี้ เราแนะนำว่าเฟจที่แสดง latent period ที่ สั้นมากอาจถูกมองว่าเป็นผู้เชี่ยวชาญในการขยายพันธุ์เมื่อแบคทีเรีย ภายใน culture มีความ แพร่หลายสูง

Su-Hyeon Kim et al. (2021) แสดงคุณลักษณะ KFS-EC3 ซึ่งเป็นเฟจโพลีวาเลนต์และไล ดิก ซึ่งแยกได้จากสิ่งปลูกในโรงฆ่าสัตว์ และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการปั่นเหวี่ยงความหนาแน่นของ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ชิเซียมคลอไรด์ ช่วงโฮสต์และประสิทธิภาพของการวิเคราะห์การชูปพบว่า KFS-EC3 มีความ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลากหลายและสามารถแพร่เชื้อ *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. และ *Shigella sonnei* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ KFS-EC3 มี latent period ที่ 20 นาทีและ burst size เป็น ~71 เฟจ/เซลล์ที่ติดเชื้อ KFS-EC3 มีความเสถียรและทำให้เกิดการติดเชื้อหลังจากการเก็บรักษาที่ช่วง pH 3 ถึง 11 และช่วงอุณหภูมิที่ -70 °C ถึง 60 °C KFS-EC3 สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโต ของ *E. coli* O157:H7 ได้ 2 วันที่สูงที่สุด 52 ชั่วโมง แม้ที่ MOI ต่ำสุดที่ 0.001 การวิเคราะห์จีโนมของ KFS-EC3 เปิดเผยว่าประกอบด้วย 167,440 bp และ 273 ORF ที่ระบุว่าเป็นยีนที่ใช้งานได้ โดยไม่มียีนใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ ความรุนแรง ภูมิแพ้ และการสลายตัว ในที่สุดเฟจนี้ก็ถูกจำแนกออกเป็น สกุล *Tequa trovirus* ของตระกูล Myoviridae โดยสรุป KFS-EC3 สามารถแพร่เชื้อ *E. coli* O157:H7, S1ไป พร้อมๆ กัน ซอนเนอและซัลโมเนลลา spp. ที่มีค่า MOI ต่ำที่สุดในช่วงเวลานาน บ่งบอกถึงความเหมาะสมในการควบคุมเชื้อโรคในอาหารไปพร้อมๆ กัน

Luis Amarillas et al. (2016) เชื้อ *E. coli* ทั่วโลก เนื่องจากการเกิดขึ้นของสายพันธุ์ที่ดีต่อยาปฏิชีวนะ แบคทีริโอเฟจจึงถือเป็นทางเลือกที่น่าสนใจแทนแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ควบคุมทางชีวภาพ การแสดงลักษณะเฉพาะเป็นขั้นตอนเบื้องต้นในการออกแบบเฟจสำหรับการควบคุมทางชีวภาพ ในการศึกษา นี้ เราอธิบายลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียที่กำหนดให้ phiC119 ซึ่งสามารถติดเชื้อและสลายสายพันธุ์ STEC ที่ดื้อยาหลายชนิดและเชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์ จีโนมเฟจถูกคัดกรองเพื่อตรวจหา ยีน *stx* โดยใช้ PCR, การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา, ช่วงของโฮสต์ถูกกำหนด และดำเนินการจัดลำดับจีโนม เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปลายที่เกาะติดกันและการระบุประเภทของสารพันธุกรรมผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ของ จีโนม ในการศึกษา นี้ เราอธิบายลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียที่กำหนดให้ phiC119 ซึ่งสามารถติดเชื้อและสลายสายพันธุ์ STEC ที่ดื้อยาหลายชนิดและเชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์ จีโนมเฟจถูกคัดกรองเพื่อตรวจหา ยีน *stx* โดยใช้ PCR, การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา, ช่วงของโฮสต์ถูกกำหนด และดำเนินการจัดลำดับจีโนม เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปลายที่เกาะติดกันและการระบุประเภทของสารพันธุกรรมผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ของ จีโนม การวิเคราะห์อนุภาคแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า มีหัวแบบไอโคซาฮีดรัลและหางยาว ซึ่งเป็นลักษณะของวงศ์ Siphoviridae เฟจมีโฮสต์ที่หลากหลายเพื่อต้านเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดและมีความรุนแรงสูง การทดลองการเจริญเติบโตแบบขั้นตอนเดียวเผยให้เห็นว่าเฟจ phiC119 นำเสนอ large burst size (210 PFU/เซลล์) และ latent period ที่ 20 นาทีจากการวิเคราะห์จีโนม เฟจประกอบด้วยจีโนม DNA แบบเกลียวคู่เชิงเส้นที่มีขนาด 47,319 bp เฟจเข้ารหัสโปรตีนสมบูรณ์ 75 ชนิด แต่ไม่พบยีนไลโซจีนีและความรุนแรงในจีโนม phiC119 ผลลัพธ์เหล่านี้เสนอแนะว่าเฟจ phiC119 อาจเป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่ดี อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้มั่นใจในการควบคุม STEC และเพื่อยืนยันความปลอดภัยของการใช้เฟจ

Marion Dalmaso et al. (2016) แยกและแสดงคุณลักษณะของเฟจจากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ แยก coliphages ใหม่สามรายการคือ ϕ APCEc01, ϕ APCEc02 และ ϕ APCEc03 มีการตรวจสอบลักษณะทางฟิโนไทป์และจีโนม และกิจกรรมการสลายต่อไปโอฟิล์ม และเมื่อใช้ร่วมกับซี

โพรฟลอกซาซิน เฟจทั้งสามลดการเติบโตของ *E.coli* สายพันธุ์ DPC6051 ที่การติดเชื้อหลายหลาก (MOI) ระหว่าง 10^{-3} ถึง 10^5 คืออกเทลของเฟจทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E.coli* เฟจคืออกเทลยังลดการสร้างไบโอฟิล์มและป้องกันการเกิดขึ้นของการกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเฟจซึ่งเกิดขึ้นกับเฟจเดี่ยว เมื่อรวมกับ ciprofloxacin เฟจเพียงอย่างเดียวหรือในคืออกเทลจะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E.coli* และป้องกันการดื้อยาของสายพันธุ์ เฟจใหม่ทั้งสามนี้มีแนวโน้มว่าจะมีสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับ *E.coli*

Tianshi Xiao et al. (2023) *Escherichia coli* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในการติดเชื้อทางคลินิกของมนุษย์และสัตว์แพทย์ เนื่องจากการดื้อยาปฏิชีวนะรวมถึง การดื้อยา โคลิสตินที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก จึงมีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้กับสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิดของจากสัตว์หลายชนิด โดยมีกราฟการเติบโตขึ้นตอนเดียวแสดง latent period 30 นาที และ burst size 11 PFU ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียสูงสุด ภายใน 2 ชั่วโมง ไม่พบการดื้อยาปฏิชีวนะหรือยีนที่มีความรุนแรงในจีโนมเฟจ การศึกษาเพิ่มเติมได้รับการรับประกันว่าจะพัฒนาเฟจ vB_EcoStr-FJ63A ให้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการต่อต้านการติดเชื้อโคลิสติน

Peter Kotsoana Montso et al. (2019) ศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อไลติก *Escherichia coli* O177 ที่แยกได้จากอุจจาระโค เพื่อพิจารณาการใช้งานที่เป็นไปได้ของพวกมันในฐานะสารควบคุมทางชีวภาพแยกแบคทีเรียจำเพาะ lytic *E. coli* O177 ทั้งหมด 31 ตัว สัดส่วนขนาดใหญ่ (71%) ของเฟจที่แยกได้เหล่านี้ผลิตพลาซมิดขนาดใหญ่ ในขณะที่ 29% ผลิตพลาซมิดขนาดเล็กบนวุ้นอ่อน 0.3% โดยอาศัยสัญญาณวิธยาของพลาซมิดที่แตกต่างกันและความชัดเจนและขนาดของพลาซมิด เฟจแปดตัวถูกเลือกสำหรับการวิเคราะห์เพิ่มเติม การทดสอบเฉพาะจุดและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์การซูป (EOP) ถูกดำเนินการเพื่อกำหนดหาช่วงโฮสต์สำหรับเฟจที่เลือก วิเคราะห์รูปร่างและการเจริญเติบโตของเฟจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและวิธีการกราฟการเจริญเติบโตแบบขึ้นตอนเดียว เฟจยังได้รับการประเมินสำหรับความคงตัวของความร้อนและ pH การทดสอบเฉพาะจุดเผยให้เห็นว่าเฟจที่เลือกทั้งหมดสามารถแพร่เชื้อ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตาม ไม่มีเฟจใดที่ติดเชื้อ American Type Culture Collection (ATCC) และสายพันธุ์ *Salmonella* ในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การวิเคราะห์ EOP (ช่วง: 0.1–1.0) แสดงให้เห็นว่าเฟจสามารถแพร่เชื้อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ ได้หลากหลาย เฟจที่แยกได้ที่เลือกมีสัญญาณคล้ายกัน (หัวไอโคซาฮีดรัลและหางหดตัว) และถูกจำแนกประเภทภายใต้อันดับ Caudovirales วงศ์ Myoviridae หัว icosahedral มีขนาดตั้งแต่ 81.2 ถึง 110.77 นาโนเมตร ในขณะที่หางที่หดตัวมีขนาดตั้งแต่ 115.55 ถึง 132.57 นาโนเมตร พบว่าเฟจยังคงมีฤทธิ์อยู่หลังจากการฟักตัวเป็นเวลา 60 นาทีที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ระดับที่เพิ่มขึ้นของ pH ทำให้เกิดการตอบสนองกำลังสองต่อความคงตัวของเฟจทั้งหมด ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเฟจทั้งแปดตัวอยู่ระหว่าง 7.6 ถึง 8.0 ในขณะที่ pH 3.0 เฟจทั้งหมดไม่ทำงาน latent period ของเฟจอยู่ระหว่าง 15 ถึง 25 นาที ในขณะที่ burst size อยู่ระหว่าง 91 ถึง 522 อนุภาคไวรัส [หน่วยสร้างวงใสพลาซมิด]

(PFU)] ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่จำเพาะต่อโลติก *E. coli* O177 ที่แยกได้จากอุจจาระโคมีความเสถียรสูงและมีความสามารถในการติดเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่ทำให้พวกมันมีศักยภาพเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ

Hilal Basak Erol et al. (2022) แยกและระบุลักษณะของเฟจในการรักษาที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *Escherichia coli* และเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับแบคทีเรียในลำไส้ใน *E. coli* เชิงบวกแบบขยายสเปกตรัม (ESBL) (ESBL-EC) และดำเนินการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจโดยใช้แบบจำลองตัวอ่อน *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) Intesti bacteriophage เป็นยาที่ใช้แบคทีเรียหลายชนิด แบคทีเรียที่แยกได้นั้นได้มาจากแม่น้ำ และใช้เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ทางคลินิกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกแบคทีเรีย เฟจถูกคัดกรองครั้งแรกตามสัญญาณวิทยาของพลาคลและช่วงโฮสต์ที่กำหนดหาบนสายพันธุ์ทางคลินิก ความไวของเฟจถูกกำหนดโดยเทียบกับเชื้อ *E. coli* ทางคลินิก 50 ไอโซเลต และห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน 8 ไอโซเลต โดยใช้เทคนิคการทดสอบเฉพาะจุด *E. coli* lytic phage Ec_P6 ถูกใช้เพื่อตรวจสอบผลการรักษาและการป้องกันต่อแบบจำลองตัวอ่อนของ *G. mellonella* สไลด์นี้เตรียมโดย *G. mellonella* hemolymph สำหรับการตรวจทางเซลล์วิทยา ย้อมด้วย May Grünwald Giemsa (MGG) และประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลลัพธ์ของกิจกรรมเผยให้เห็นสเปกตรัม lytic ตั้งแต่ 24% ถึง 97% สายพันธุ์โดยรวมไวต่อเฟจหนึ่งตัวหรือมากกว่าจากแผง ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าแบคทีเรียในลำไส้มีประสิทธิผลอย่างมากในเชื้อ *E. coli* หลากหลายสายพันธุ์ รวมถึงสายพันธุ์ทดสอบ และยังแสดงให้เห็นว่าเฟจ Ec_P6 ที่แยกออกมามีประสิทธิผลเท่ากับเฟจ MOI ที่ดีที่สุดของเฟจนี้คือ 0.01 และการติดเชื้อลดลงเหนือ 60 °C ผลลัพธ์แนะนำว่าเฟจคงตัวที่ค่า pH อยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 9.0 จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าในการติดเชื้อ *E. coli* เพื่อให้อัตราการรอดชีวิตสูง ตัวอ่อนที่ติดเชื้อควรได้รับการรักษาด้วยเฟจ 0.01 MOI (10 μ L, 10⁶ PFU/mL) หลังจากผ่านไป 2 ชั่วโมง และปริมาณโคลิสติน (10 μ L, 2.5 มก./ลิตร) กิโลกรัม. นอกจากนี้ยังป้องกันการติดเชื้อ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา พบว่าเฟจ Ec_P6 มีศักยภาพในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*

Maryanne Kuek et al. (2023) การประเมินศักยภาพของการผสมเฟจไปโอคอนโทรอลและสารประกอบจากพืชธรรมชาติ (คาร์วาครอล) ในการควบคุมเชื้อ *Escherichia coli* ในผักรวมหั่นสด โคลิเฟจสี่ชนิด ซึ่งเรียกว่า *Escherichia* phage SUT_E420, *Escherichia* phage SUT_E520, *Escherichia* phage SUT_E1520 และ *Escherichia* phage SUT_E1620 ถูกแยกออกจากน้ำเสียดิบ การแสดงคุณลักษณะทางชีววิทยาเผยให้เห็นว่าเฟจทั้งสี่มี latent period ที่ 20–30 นาที และ burst size ซึ่งมีตั้งแต่ 116 หน่วยสร้างพลาคล (PFU)/หน่วยสร้างโคลินี (CFU) ถึง 441 PFU/CFU เฟจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโฮสต์ ในหลอดทดลอง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ที่การติดเชื้อหลายหลาก (MOI) จากการวิเคราะห์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องเอ็กซาร์มันผ่าน เฟจทั้งหมดถูกจัดประเภทเป็นเฟจทางในกลุ่ม Caudoviricetes นอกจากนี้ การหาลำดับรุ่นไม่พบว่าต่อไปยังไม่มีโคลิเฟจที่เลือกไว้มียื่นที่เข้ารหัสความรุนแรงหรือปัจจัยต้านทานยาต้านจุลชีพ โดย

เน้นถึงความเหมาะสมของเฟจที่แยกเดี่ยวในฐานะสารควบคุมทางชีวภาพ เมื่อเฟจคือกเทล (~ 10^9 PFU/มล.) ถูกทาเพียงอย่างเดียวบนผักกาดที่ปนเปื้อนเทียมด้วย *E. coli* จะไม่มีแบคทีเรียใดถูกกู้คืนจากตัวอย่างที่บำบัดในวันที่ 0 ตามด้วยการเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปในประชากร *E. coli* หลังจากการพักตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 8 °C ในทางกลับกัน ไม่มีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างตัวอย่างที่ได้รับการรักษาและตัวอย่างที่ไม่ได้รับการรักษาในแง่ของ จำนวน เชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิต เมื่อใช้ carvacrol ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ที่ 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ เพียงอย่างเดียว เมื่อใช้เฟจคือกเทลที่ค่า MOI ประมาณ 1,000 และ MIC carvacrol ร่วมกัน จะไม่ พบ เชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างที่บำบัดในวันที่ 0 และ 1 ตามด้วยการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน ประชากร *E. coli* เป็นประมาณ 1.2–1.3 log CFU/มิลลิลิตรหลังจากการบ่ม 48 ชั่วโมงที่ 8 °C อย่างไรก็ตาม การกำจัด เชื้อ *E. coli* ทั้งหมด ถูกสังเกตพบในตัวอย่างที่บำบัดด้วยเฟจคือกเทลที่ MOI ที่สูงขึ้นที่ ~2000 และ คาร์วาคโรลที่ MIC โดยมีการลดลงประมาณ 4 log CFU/มล. ที่สังเกตพบเมื่อสิ้นสุดวันที่ 3 ผลลัพธ์ที่ ได้รับ ในการศึกษาเน้นย้ำถึงศักยภาพของการรักษาแบบผสมผสานที่เกี่ยวข้องกับเฟจไบโอคอนโทรล และคาร์วาคโรล ซึ่งเป็นวิธีการทางเลือกใหม่ในการลด การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในอาหารพร้อม รับประทานที่ผ่านการแปรรูปขั้นต่ำ

Maciej Konopacki et al. (2020) การประเมินและการเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ไลติกของ เฟจกับโฮสต์ จุดมุ่งหมายของบทความนี้คือการตรวจสอบแนวทางระเบียบวิธีใหม่ (สำหรับการ ประเมินเชิงเปรียบเทียบระหว่างฤทธิ์ของไลติกของแบคทีเรียกับโฮสต์ของแบคทีเรีย เพื่อจุดประสงค์นี้ แบคทีเรียจำลองสองตัว (*Staphylococcus aureus* แกรมบวกและแกรมลบ *Escherichia coli*) ได้รับการเพาะเลี้ยงภายใต้เงื่อนไขการควบคุมและมีแบคทีเรียที่เหมาะสมอยู่ (kayviruses สามตัว สำหรับ *S. aureus* และ wildtypes สามตัวของ phages ที่คล้าย T4 ที่ติดเชื้อ *E. coli*) ที่มีการติด เชื้อหลายหลากเริ่มต้นที่แตกต่างกัน (MOI ตั้งแต่ MOI = 0.1–1 สำหรับ *S. aureus* และ MOI = 0.01–1 สำหรับ *E. coli*) ข้อมูลการทดลองได้รับการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการที่เสนอ ผลลัพธ์ที่ได้รับ จากขั้นตอนที่เสนอแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างการออกฤทธิ์ของเฟจไลติกอย่างชัดเจน ดังนั้น วิธี PhageScore จัดให้มีเครื่องมือที่มีประโยชน์สำหรับการแสดงลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย โดยให้ อัตราที่แม่นยำของการออกฤทธิ์ของไลติก ซึ่งสามารถมีประโยชน์สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างแบค ทีริโอเฟจ

Stephen T. Abedon et al. (2001) การพัฒนาแบบจำลองการคาดการณ์จึงเป็นสิ่งสำคัญ ที่เราจะพิจารณาว่าความแปรผันระหว่างแบบจำลองต่างๆ ในช่วง eclipse time, latent period, ค่าคงที่การดูดซับ, burst size, การจัดการกับความแตกต่างในปริมาณโฮสต์และคุณภาพของโฮสต์ และในกลยุทธ์การสร้างแบบจำลอง สามารถส่งผลกระทบต่อคาดการณ์ได้อย่างไร อันดับแรกเรา เปรียบเทียบแบบจำลองการเจริญเติบโตของเฟจสองแบบจำลองที่ ซึ่งแตกต่างกันเป็นหลักในแง่ของวิธี ที่พวกมันจำลองจลนศาสตร์ของการดูดซับเฟจ หนึ่งในคือการจำลองด้วยคอมพิวเตอร์และอีกอันคือการ ไม้ว่าการคำนวณที่ชัดเจน ที่ ปริมาณโฮสต์ที่สูงกว่า (~ 10^8 เซลล์/มล.) ทั้งสองแบบจำลองทำนายอัตราการ

เติบโตของประชากรเฟจที่กำหนดโดยการทดลองอย่างใกล้ชิด ที่ปริมาณโฮสต์ที่ต่ำกว่า (10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) การจำลองด้วยคอมพิวเตอร์ยังคงทำนายอัตราการเติบโตของเฟจอย่างใกล้ชิด แต่แบบจำลองที่ชัดเจนไม่ได้เป็นเช่นนั้น ต่อไปเราจะมุ่งเน้นไปที่การคาดการณ์ช่วงที่เหมาะสมที่สุด latent period ที่เหมาะสมที่สุดคือ latent period ที่ทำให้การเติบโตของประชากรของเฟจจำเพาะเติบโตสูงสุดเมื่อมีปริมาณและคุณภาพเฉพาะของเซลล์โฮสต์ ทั้งสองรุ่นคาดการณ์ค่า latent period ที่สั้นที่สุดที่คล้ายคลึงกันที่ความหนาแน่นของโฮสต์สูงกว่า (เช่น 17 นาทีที่ 10^8 เซลล์/มล.) อย่างไรก็ตาม ที่ความหนาแน่นของโฮสต์ต่ำกว่า การจำลองด้วยคอมพิวเตอร์จะคาดการณ์ค่าที่เหมาะสมใน latent period ซึ่งสั้นกว่าที่แนะนำโดยการคำนวณที่ชัดเจนมาก (เช่น 90 ต่อ 1,250 นาทีที่ 10^5 เซลล์/มล.) สุดท้ายนี้ เราจะพิจารณาผลกระทบของคุณภาพของโฮสต์ที่มีต่อการวิวัฒนาการ latent period ของเฟจ ด้วยการดูแลแยกความแตกต่างที่โนโทปี latent period จากวิวัฒนาการ latent period เรายืนยันว่าผลกระทบของคุณภาพของโฮสต์ต่อวิวัฒนาการ latent period ของเฟจอาจมีขนาดค่อนข้างเล็ก

Tamirat Salile Sada et al. (2024) แยกและจำแนกลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย lytic จากแหล่งต่างๆ ในเมืองแอดดิสอาบาบา ทดสอบกับ เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ และประเมินศักยภาพในการรักษาภายใต้สภาวะ ในหลอดทดลอง ตัวอย่างทั้งหมด 14 รายการได้รับการประมวลผลเพื่อต่อต้านเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงที่แตกต่างกันหก สายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมและการวิเคราะห์ทราบจุลินทรีย์โดยใช้วิธีวางซ้อนด้วยวุ้นเพื่อนำเชื้อไลติกแบคทีรีโอเฟจที่แยกได้กลับมาใช้ใหม่ เฟจที่แยกได้แสดงคุณลักษณะเฉพาะเพื่อกำหนดหาผลไลติก, ลักษณะเฉพาะการเจริญเติบโต, การออกฤทธิ์ของช่วงโฮสต์ และความคงตัวของอนุภาคในสภาวะ pH ที่ต่างกัน เฟจที่แยกได้ถูกระบุโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และเทคนิคระดับโมเลกุล (PCR) เฟจ 17 ตัวถูกนำกลับคืนมาจากเพลตที่ทดสอบ 84 ตัว จากเฟจที่แยกได้ 17 ชนิดนั้น 11 ชนิด (65%) เป็น เฟจที่มีลักษณะคล้าย *Myoviridae* และเฟจที่แยกได้ 6 ชนิด (35%) คือ *Podoviridae* และ *Siphoviridae* โดยสถาบันวิทยาและการจำแนก PCR ตามการทดสอบช่วงโฮสต์ คุณลักษณะการเติบโตและการทดสอบความคงตัว เฟจที่มีศักยภาพ 7 ชนิดถูกเลือก เฟจเหล่านี้แสดงคุณลักษณะการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น รวมถึง latent period ที่สั้น burst size สูงสุด และช่วงโฮสต์ที่กว้างกว่า ตลอดจนความเสถียรทางความร้อนและความสามารถในการอยู่รอดในระดับ pH ที่หลากหลาย กราฟการเติบโตแบบขั้นตอนเดียวถูกวาดขึ้นโดยใช้ MOI ของเฟจสำหรับโฮสต์ที่แยกเดี่ยวของพวกมัน กราฟการเติบโตของเฟจที่แยกเดี่ยวถูกพล็อตตลอดช่วงเวลาการฟักตัว 15 นาทีถึง 60 นาที และไทเทอร์ถูกคำนวณที่แต่ละช่วงเวลา 15 นาทีโดยใช้การสอบวิเคราะห์วุ้นแบบสองชั้น จากนั้นจะได้ latent period กับ burst size สัมพันธ์ และระยะเวลาการระเบิดจากแต่ละกราฟสำหรับเฟจแต่ละไอโซเลต

Zainab Bibi et al. (2015) ศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกลักษณะเฉพาะบางส่วนของเอนไซม์ไลติกแบคทีรีโอเฟจ PE1 เทียบกับเชื้อ *Escherichia coli* ทางคลินิกที่ดื้อยาหลายชนิด ซึ่ง

แยกได้จากน้ำเสียของโรงพยาบาล เฟจ PE1 ได้แสดงช่วงโฮสต์ที่แคบซึ่งเหมาะสมสำหรับการใช้ในการบำบัดด้วยเฟจ เฟจแสดงกิจกรรมของไลติกสูงถึง 70°C และที่สภาวะที่เป็นต่าง แต่ที่สภาวะที่เป็นกรดที่สูงกว่า กิจกรรมของมันลดลง latent period และ burst size ของ PE1 ประมาณจากกราฟการเติบโตขึ้นตอนเดียวคือ 40 นาที และ 185 หน่วยที่ก่อตัวเป็นพลาสต์ต่อเซลล์ ตามลำดับ เฟจ PE1 ลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโฮสต์ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ก็มีการโตในภายหลัง ในระหว่างระยะเวลาสังเกต 24 ชั่วโมง แบคทีเรียโอเฟจยังคงสามารถลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโฮสต์ของมันได้ ซึ่งเห็นได้จากความหนาแน่นของแสงที่ลดลงในตัวอย่างที่ได้รับเฟจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จีโนมเฟจเป็น DNA แบบเกลียวคู่และมีขนาดใหญ่กว่า 12 kb การดัดแปลงจีโนมและโปรตีนเพิ่มเติมอาจช่วยเผยให้เห็นลักษณะเฉพาะของเฟจนี้ เพื่อใช้ในการบำบัดด้วยเฟจเพื่อต่อต้านเชื้อ *E. coli*

Golnar Rahimzadeh, PhD et al. (2020) แยกและจำแนกลักษณะของเฟจต่อเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างปัสสาวะที่ติดเชื้อ และเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการสลายของเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ในหลอดทดลอง การศึกษาเชิงทดลองนี้ดำเนินการในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล Bouali Sina (ชาร์ประเทศอิหร่าน) ในเดือนพฤษภาคม 2018 โดยตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างปัสสาวะ 9 ตัวอย่างของผู้ป่วยที่เป็นโรค UTI โดยใช้วิธีการทางจุลชีววิทยาทั่วไป แยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่างปัสสาวะที่ติดเชื้อ และตรวจฤทธิ์สลายแบคทีเรียโดยใช้การทดสอบเฉพาะจุด วัดไทเทอร์ของแบคทีเรียโอเฟจโดยใช้เทคนิคหุ่นสองชั้น สันฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจถูกเปิดเผยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และกำหนด latent period และ burst size วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ชุดซอฟต์แวร์ SPSS ผลคือแยกเชื้อ *E. coli* ได้จากตัวอย่างปัสสาวะที่ติดเชื้อจำนวน 9 ตัวอย่าง กิจกรรมการสลายของแบคทีเรียต่อเชื้อ *E. coli* ถูกกำหนดโดยใช้การทดสอบเฉพาะจุดโดยการสังเกตการก่อตัวของโซนยับยั้งกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า เฟจของ เชื้อ *E. coli* latent period คือ 20 นาที โดยมี burst size 1,200 หน่วยสร้างคราบจุลินทรีย์ (PFU) ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ ผลการทดสอบหุ่นสองชั้นแสดงให้เห็นว่าไทเทอร์ของแบคทีเรียโอเฟจอยู่ที่ 20×10^8 PFU/ml สรุบบัคทีเรีย *E. coli* ถูกแยกออกจากตัวอย่างปัสสาวะที่ติดเชื้อและจำแนกลักษณะเฉพาะ และตรวจประสิทธิภาพการสลายของแบคทีเรียต่อ *E. coli* ในหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท thermo scientific รุ่น PRECISION GP 20, US
- 3.1.2 เครื่องผสมสารสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Vortex Mixer) บริษัท Scientific Industries, US.
- 3.1.3 เครื่องผสมสารละลายสำหรับก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy
- 3.1.4 เครื่องไมโครเวฟ บริษัท SHARP รุ่น R-22, Japan
- 3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius, รุ่น BSA224S-CW, Germany
- 3.1.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท TOMY รุ่น ES-315, Japan
- 3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Centrifuge) บริษัท HETTICH ROTINA 380, Germany
- 3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spectrafuge 16m) บริษัท national labnet co., USA
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับ Phage lysate (Heraeus Megafuge 8R Centrifuge) บริษัท Thermo Fisher scientific, Germany
- 3.1.10 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท thermo scientific รุ่น GENESYS 10S UV-VIS, Germany
- 3.1.12 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท POL- EKO-APARATURA SP.J. รุ่น CLW 115 IG Smart, Poland.
- 3.1.13 ตู้ปลอดเชื้อชีววิทยาระดับ 2 (Biological Safety Cabinets) บริษัท thermo scientific รุ่น MSC Advantage 1.2, Germany
- 3.1.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH Meter) บริษัท METTLER TOLEDO, Switzerland
- 3.1.15 ตู้อบลมร้อน 70 (Hot Air Oven) บริษัท Memmert, Germany
- 3.1.16 ตู้บ่มเชื้อสภาวะเขย่า (Shaker) บริษัท GALLENKAMP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 พลาสติกกันกระแทก
- 3.2.2 กระบอกตวงสารขนาด 100 ml.
- 3.2.3 ขวดบรรจุอาหาร (Duran) ขนาด 250 และ 500 ml.
- 3.2.4 ขวดแก้ว vial ขนาด 50 ml.
- 3.2.5 เพลทแก้ว (peti dish) (Union Science Co..Lid. Thailand)
- 3.2.6 ขวดรูปชมพู ขนาด 125 ml.
- 3.2.7 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.2.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.9 ทิปสำหรับเครื่องดูดสาร (Micropipette Tip) ขนาด 5 ml, 1,000 μ l และ 200 μ l
- 3.2.10 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.2.11 แผงแก้วคนสาร
- 3.2.12 คิวเวตต์ (cuvette)
- 3.2.13 ปีกเกอร์ขนาด 50, 250, 500 และ 1,000 ml.
- 3.2.14 กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 10 ml. (Nipro, Thailand)
- 3.2.15 ไมโครปิเปต ขนาด 0.5-5 ml., 100-1,000 μ l., 20-200 μ l. และ 2-20 μ l.
- 3.2.16 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.2.17 ตัวกรองขนาด 0.22 และ 0.45 μ m. (Minisart high low syringe filters, 16555)
- 3.2.18 กระบอกอบเพลท
- 3.2.19 ลูกลายดูดสาร
- 3.2.20 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) บริษัท Extragene, USA
- 3.2.21 Eppendorf Tube ขนาด 2 ml.
- 3.2.22 กระบอกฉีดยาน้ำกลั่น
- 3.2.23 เวอร์เนียคาลิเปอร์ดิจิทัล (Digital Vernier Calipers) บริษัท Mitutoyo CNC, Japan

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 M
- 3.3.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95%
- 3.3.3 เอทิลแอลกอฮอล์ 70%
- 3.3.4 สารละลาย SM buffer pH เท่ากับ 7.5
- 3.3.5 สารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 M.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 3.3.6 สารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 1 M. ขาดที่นั่น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณี 3.3.7 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 M, pH 7.6 ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.4.1 อาหารแข็ง LB (1.5% agar)
- 3.4.2 อาหารเหลว LB (0.3% agar)
- 3.4.3 อาหารเหลว LB
- 3.4.4 อาหารเหลว 2XLB

3.5 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีทดลอง

3.6.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* ในกลีเซอรอลจาก Eppendorf tube stock ที่อุณหภูมิ 4 °C ใช้ loop สะกิดเชื้อมาพอสมควร จากนั้น Streak plate ลงบนอาหาร LA บ่มค้างคืน ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเชื้อจาก Working plate มา 1 loop ลงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวด Vial บ่มสภาวะเขย่าข้ามคืน ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 37 °C

3.6.2 การเก็บตัวอย่าง

3.6.2.1 การเก็บตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

โดยแต่ละตัวอย่างเก็บมาประมาณ 2 g. ผสมกับสารละลาย SM buffer มีค่า pH เท่ากับ 7.5 ปริมาตร 20 ml. ลงหลอดปั่นเหวี่ยง (Sterile conical tube) ขนาด 50 ml. ระหว่างทางนำมาสู่ห้องปฏิบัติการจะเก็บรักษาไว้ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งและเกลือเพื่อรักษาอุณหภูมิ จากนั้นเก็บรักษาไว้ใน 4 °C นำตัวอย่างมาใช้ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้

3.6.2.2 การเก็บตัวอย่างที่เป็นของเหลว

เก็บตัวอย่างมาประมาณ 50 ml. โดยเก็บลึกลงไปจากผิวน้ำประมาณ 30 cm. เนื่องจากรังสียูวีจากแสงแดดส่งผลต่อแบคทีเรียโอเฟจทำให้แบคทีเรียโอเฟจนั้นมีประสิทธิภาพการทำให้เซลล์โฮสต์เกิด Lysis ลดลง (Tomlinson, 2010) จากนั้นปิดฝาให้มิดชิดเก็บรักษาไว้ใน 4 °C พ้นจากแสงแดด นำตัวอย่างมาใช้ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้

3.6.3 Phage Extraction

3.6.3.1 การสกัดแบคทีเรียโอเฟจจากตัวอย่างของแข็ง (Shukla,2019)

ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) นำไปวางบน Shaker ที่ 200 rpm. ประมาณ 1 ชั่วโมง จนสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น นำไป Centrifuge ที่ 3000 rpm, 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

นาที่ เก็บส่วนใส (Supernatant) ไป Centrifuge ที่ 5000 rpm, 20 นาที อีกครั้ง และนำส่วนใสที่ได้มากรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.45 μm แล้วเก็บ Filtrate ที่กรองได้ไว้ในขวด Vial ปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.6.3.2 การสกัดแบคทีริโอเฟจจากตัวอย่างของเหลว (Kropinski & Clokie, 2009)

นำตัวอย่างของเหลวใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 ml. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 μm . จากนั้นเก็บ Filtrate ในขวด vial ปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.6.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีริโอเฟจของแบคทีเรีย (Enrichment phage)

นำ Filtrate ที่เตรียมได้มา 20 ml. ผสมกับ *E.coli* Inoculum จาก 3.5.1 ปริมาตร 0.5 ml. ลงอาหาร LB (2X) 10 ml. ที่เสริมด้วย 1mM CaCl_2 ที่บรรจุอยู่ในขวด Vial ขนาด 50 ml. นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน โดยวันที่ 1, 2, 3, 5, 7 เก็บ Solution นำไปทำ 10 fold dilution จากนั้นนำไป Spot test และ Plaque assay หากไม่พบแบคทีริโอเฟจใน 7 วันแรกให้บ่มต่ออีกจนกว่าแบคทีริโอเฟจนั้นกำลังปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ โดยดูอาหารเก่าออกครึ่งหนึ่งจากนั้นเติมอาหาร LB (2X) ใหม่เข้าไป บ่มต่ออีก 7 วัน และวันที่ 1, 2, 3, 5, 7 เก็บ Solution นำไปทำ 10 fold dilution จากนั้นนำไป Spot test และ Plaque assay ต่ออีกเช่นกัน

3.6.5 การทำ Double layer agar

3.6.5.1 Spot test

นำ *E.coli* Inoculum และ Top agar ผสมรวมกันเทลง Bottom agar รองบน Top agar แข็งตัวและนำแต่ละ Dilution ของ Phage suspension หยด Dilution ละ 10 μl .

3.6.5.2 Plaque assay

นำ Filtrate ที่ผ่านการทำ Serial dilution ด้วย SM buffer แล้วนำมา 100 μl มาผสมกับ *E.coli* Inoculum 200 μl . ที่บ่มไว้ข้ามคืน และมีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง Log phase ($\text{OD}_{600} = 0.3$) จากนั้นนำไปผสมเข้ากับ Top agar 3 ml. จากนั้นนำไป เทลง Bottom agar ที่จนอาหารแข็งตัวและนำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน แล้วตรวจพลาคว (Plaque) ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับจานควบคุม (Control)

3.6.6 การทำแบคทีริโอเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking plaques

เลือก Single plaque โดยใช้ปลาย Tip หรือไม้จิ้มฟันจิ้มแฉะรอบวงพลาควและคว้านเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปใส่ใน SM buffer 1 ml. ที่บรรจุอยู่ใน Eppendorf tube ขนาด 2 ml บ่มทิ้งไว้ในตู้เย็น 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน และนำไปทำ Plaque assay โดยให้ได้ Single plaque และมีขนาดของ Diameter เท่ากันสม่ำเสมอเหมือนกันทั่วทั้งเพลท โดยทำวิธีนี้อย่างน้อย 3 รอบจะถือว่าแบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา โดยผู้จัดทำเอกสารนี้ขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คเทอริโอเฟจที่แยกได้นั้นบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ใน SM buffer 1 ml. ที่บรรจุอยู่ใน Eppendorf tube ขนาด 2 ml.

3.6.7 การเพิ่มและการชะปริมาณแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี Phage lysate

นำแบคเทอริโอเฟจที่บริสุทธิ์มาทำ Plaque assay บ่มที่ 37 °C, ซ้ำมคืน จากนั้นเติม SM buffer 5 ml. ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น แล้วนำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วนจานอาหารเมื่อครบทุกๆ 30 นาทีหรือซ้ำมคืน จากนั้นดูด SM buffer จากอาหารวุ้นสองชั้นที่บ่มแล้ว ใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml. นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm. เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นำ Supernatant ที่ได้มาทำ Serial dilution และทำการเจือจางแล้วนำมาทำ Plaque assay โดยเก็บวันที่ 1, 3, 7, 14 และ 21 จากนั้นคำนวณหาค่า PFU/ml.

3.6.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (OD₆₀₀ nm.& CFU/ml Relations)

3.6.8.1 การเตรียมเซลล์เริ่มต้น (*E.coli* inoculum) สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

เตรียมเซลล์เริ่มต้น (*E.coli* inoculum) โดยเชื้อโคโลนีของแบคทีเรีย *E.coli* ที่เจริญอยู่บน Luria agar (LA) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำมคืน หรือ 18 ชั่วโมง จำนวน 1 loop นำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria broth (LB) ปริมาตร 50 ml. ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 ml. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสถานะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป

3.6.8.2 การเตรียมเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการวัดการเจริญของแบคทีเรีย

นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.8.1 ไปใช้สำหรับเป็นเซลล์เริ่มต้น โดยเติมลงไปในอาหาร LB ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ml. ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 ml. ปรับให้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *E.coli* ให้มีค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ด้วยวัดค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm. นำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและมีการเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สถานะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 60 นาที โดยเก็บเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุกครั้งที่ทำกรเก็บตัวอย่างสำหรับวัดค่า OD₆₀₀ nm. และ VCC เสร็จแล้วให้รับนำ Culture flask ไปเก็บในตู้บ่มเสมอ นำตัวอย่างที่ได้มาวัดค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง และการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิค Spread plate

3.6.9 ทำ One-step growth curve (Wannasrichan, 2020)

นำ *E. coli* inoculum 0.5 ml. (1×10^7 CFU/ml.) ที่อยู่ในระยะ Log phase (OD₆₀₀ ≈ 0.3) ผสมกับ Phage lysate 1 ml. (1×10^5 PFU/ml.) ที่ MOI = 0.01 เป็นเวลา 10 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สถานะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm. จากนั้นนำไป Dilute culture 100 เท่า ด้วยอาหาร LB broth ที่เสริมด้วย 1mM CaCl₂ นำไปบ่มบน Shaker ที่ 200 rpm. เป็นเวลา 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าผูกพันไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุแต่ประสงค์และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาใช้

ชั่วโมง โดยเก็บ Co-culture 1 ml. ทุกๆ 10 นาที รวมถึงเก็บนาทีที่ 0 ด้วยเช่นกัน นำ Co-culture ที่เก็บได้ไป Centrifuged ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาทีและทำ Serial dilution ด้วย SM buffer จากนั้นนำไปทำ Plaque assay หา PFU/ml เพื่อนำไปสร้างกราฟ One-step growth curve แล้วนำไปหาค่า Latent period, Rise period และ Burst size



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การแยกแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และการทำให้บริสุทธิ์

การศึกษาการแยกแบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในช่วงแรกของงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างจากหลายบริเวณโดยรอบของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง ตัวอย่างประเภทของเหลว ได้แก่ น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 1 (บริเวณเขตซอยเก๊ก4), น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 2 (บริเวณเขตซอยเก๊ก4), คลองวัดปลูกศรัทธา, น้ำจากบ่อระบายน้ำ 1 (คณะบริหารธุรกิจ), น้ำจากบ่อระบายน้ำ 2 (คณะบริหารธุรกิจ), น้ำจากฟาร์มสัตว์ทดลอง (คณะเทคโนโลยีการเกษตร) ,คลองแสนแสบ 1 (บริเวณท่าอโศก), คลองแสนแสบ 2 (ท่าเรือประตูน้ำ), คลองแสนแสบ 3 (รามหนึ่ง), น้ำจากบ่อน้ำเสีย (คณะเทคโนโลยีการเกษตร), น้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารัตน์ 1)

ตัวอย่างประเภทของแข็ง ดินจากบริเวณฟาร์มไก่ 1 (คณะเทคโนโลยีการเกษตร), ดินจากบริเวณเลี้ยงแพะ 1 (คณะเทคโนโลยีการเกษตร) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทำการ Enrichment เป็นเวลา 14 วัน

ในการทดลองพบว่าวิธีการแยกแบคทีเรียโอเฟจออกจากตัวอย่างได้สำเร็จคือการแยกจากตัวอย่างของเหลวด้วยการนำตัวอย่างน้ำเสียใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 ml. ด้วย Syringe จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 μm . จากนั้นเก็บ Filtrate ในขวด vial แม้ว่ามีการพบว่าแบคทีเรียโอเฟจมีความสามารถในการเกาะติดของแข็งได้ดีกว่าของเหลวจึงทำให้แบคทีเรียโอเฟจมีความคงตัวและเพิ่มโอกาสการอยู่รอดมากกว่าในของเหลว (Kleczkowska, 1957) แต่วิธีการสกัดตัวอย่างจากของแข็งนั้นค่อนข้างมีกระบวนการที่ซับซ้อนหลากหลายขั้นตอนและมีปัญหาในส่วนของกรนำตัวอย่างมากรองจะทำให้ตัวกรองอุดตันได้อย่างรวดเร็ว การแยกแบคทีเรียโอเฟจโดยแยกตัวอย่างจากของเหลวจึงสะดวกและสามารถแยกได้ประสบความสำเร็จได้รวดเร็วกว่าการใช้วิธีการสกัดจากของแข็ง เนื่องจากการแยกจากตัวอย่างน้ำเสียใช้กระบวนการในการคัดแยกน้อยและใช้ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนของแข็งออกจากของเหลวนั้นแค่เพียงระดับต่ำเท่านั้น (Hyman, 2019) นอกจากนี้ยังพบว่าการกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 μm มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้หัวกรองขนาด 0.22 μm เนื่องจากหัวกรองขนาด 0.22 μm จะทำให้เฟจที่มีขนาดใหญ่กว่าหัวกรองไม่สามารถผ่านลงไปได้จึงเป็นการปิดโอกาสในการพบเฟจขนาดใหญ่และทำให้พบความหลากหลายของแบคทีเรียโอเฟจได้ลดลงอีกด้วย

ตารางที่ 4.1 ผลการเกิดผลจากการสุ่มตัวอย่างของแข็งและของเหลว

ตัวอย่าง	พบการเกิดผล/ไม่พบ
น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 1 (บริเวณเขตซอยเก๊ก4)	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไปใช้ประโยชน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและข้อมูลอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 2 (บริเวณเขตซอยเก๊ก4)	ไม่พบ
น้ำจากคลองวัดปลุกศรีธา	ไม่พบ
น้ำจากบ่อระบายน้ำ 1 (คณะบริหารธุรกิจ)	พบในปริมาณน้อย พลาคซุ่น
น้ำจากบ่อระบายน้ำ 2 (คณะบริหารธุรกิจ)	พบในปริมาณน้อย พลาคซุ่น
น้ำจากฟาร์มสัตว์ทดลอง (คณะเทคโนโลยีการเกษตร)	ไม่พบ
คลองแสนแสบ 1 (บริเวณท่าอโศก)	ไม่พบ
คลองแสนแสบ 2 (ท่าเรือประตูน้ำ)	ไม่พบ
คลองแสนแสบ 3 (รามหนึ่ง)	ไม่พบ
น้ำจากบ่อน้ำเสีย (คณะเทคโนโลยีการเกษตร)	ไม่พบ
น้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารภรณ์ 1)	พบการเกิดพลาควงใสจำนวนมาก
น้ำจากโรงพยาบาลลาดกระบัง	ไม่พบ
ดินจากบริเวณฟาร์มไก่ 1 (คณะเทคโนโลยีการเกษตร)	ไม่พบ
ดินจากบริเวณเลี้ยงแพะ 1 (คณะเทคโนโลยีการเกษตร)	ไม่พบ

จากแหล่งเก็บตัวอย่างทั้ง 14 แหล่งพบเพียง 1 แหล่งที่พบแบคทีเรียโอเฟจไลติกของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* นั่นคือตัวอย่างน้ำเสียจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารภรณ์ 1) พบ Clear plaque แสดงถึงลักษณะสัญญาณวิทยาของ Lytic phage จึงเลือกพลาควงจากตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารภรณ์ 1) มา Picking colony เพื่อทำให้แบคทีเรียโอเฟจนั้นบริสุทธิ์ เนื่องจากบริเวณนั้นมีห้องสุขาอยู่บริเวณใกล้เคียงอีกทั้งบริเวณจุดเก็บเป็นบริเวณจอดรถของบุคลากรภายในสถาบันทำให้มีการสร้างกันสาดมาบดบังแสงยูวีจากดวงอาทิตย์บริเวณจุดเก็บดังกล่าวจึงเป็นบริเวณที่เหมาะสมของแบคทีเรียโอเฟจไลติกของแบคทีเรีย *Escherichia coli* เฟจไลติกนั้นมีวัฏจักรเป็น Lytic cycle โดยเมื่อแบคทีเรียโอเฟจเข้า Adsorption กับแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host) แล้วแบคทีเรียโอเฟจนั้นจะฉีด (inject) สารพันธุกรรมลงไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน กระบวนการนี้เรียกว่า Penetration จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน Replication ของสารพันธุกรรมของไวรัสที่ฉีดเข้าไป ต่อมาจะถึงขั้นตอนที่แบคทีเรียโอเฟจนั้นจะสร้างแต่ละชิ้นส่วนประกอบของมันให้เสร็จพร้อมคร่าว

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดี่ยวและค่อยๆประกอบรวมกับเป็น Mature phage เรียกขั้นนี้ว่า Line-Assembly และเมื่อแบคทีเรียโอเฟจประกอบรวมกันจนสมบูรณ์แล้วนั้นแบคทีเรียโอเฟจจะทำลายผนังเซลล์เจ้าบ้านเพื่อออกมาโดยจะทำให้เซลล์เจ้าบ้านเกิดการแตกตาย (Lysis) เมื่อเทียบกับแบคทีเรียโอเฟจที่มีวัฏจักรแบบ Lysogenic Cycle ซึ่งจะทำให้เกิดพลาไคเป็นลักษณะวงขุ่นและแบคทีเรียโอเฟจชนิดนี้จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ Lysogenic Conversion เป็นสาเหตุทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่เรียกขึ้น (Cristina Howard-Varona et al. 2017) ฉะนั้น Lytic phage จึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาต่อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียมากกว่าการใช้แบคทีเรียโอเฟจแบบ Temperate phage



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารภรณ์ 1) ที่ผ่านการ Enrichment เป็นเวลา 10 วัน

หลังจากการ Enrichment ด้วยการใช้อาหาร LB (2X) ที่เสริมด้วย 1mM CaCl_2 โดยบรรจุอยู่ในขวด Vial ขนาด 50 ml. นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 วัน แล้วพบว่าเกิดพลาไคใสจำนวนมาก เนื่องจากแคลเซียมไอออนมีประจุ 2+ ส่วนบริเวณขาของแบคทีเรียโอเฟจและบริเวณผิวของแบคทีเรีย *Escherichia coli* นั้นมีประจุลบจึงทำให้ Ca เป็นตัวช่วยเพิ่มการ Adsorption ด้วยการดึงดูดแบคทีเรียโอเฟจและเซลล์เจ้าบ้านให้มีโอกาสเข้ามาพบกันมากขึ้นอีกทั้งขนาด Diameter ของ Ca ยังเป็นช่วงระยะที่เหมาะสมให้แบคทีเรียโอเฟจนั้นเกาะและสามารถ inject สารพันธุกรรมของตัวเองเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้พอดี จากนั้นจึงทำการคัดเลือกไอโซเลทเดี่ยวที่สามารถคัดแยกออกมาได้ โดยเลือกไอโซเลทเดี่ยว (Single plaque) มา 3 ไอโซเลท โดยให้ชื่อเป็น จภ1เอ, จภ1บี, จภ1ซี และนำทั้ง 3 ไอโซเลท มา picking colony โดยใช้ไม้จิ้ม

เอกสารนี้ ฟันหรือทิวปแช่ขุ่นหรือพลาไคจากนั้นนำมาล้าง SM buffer ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำ Dilution

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

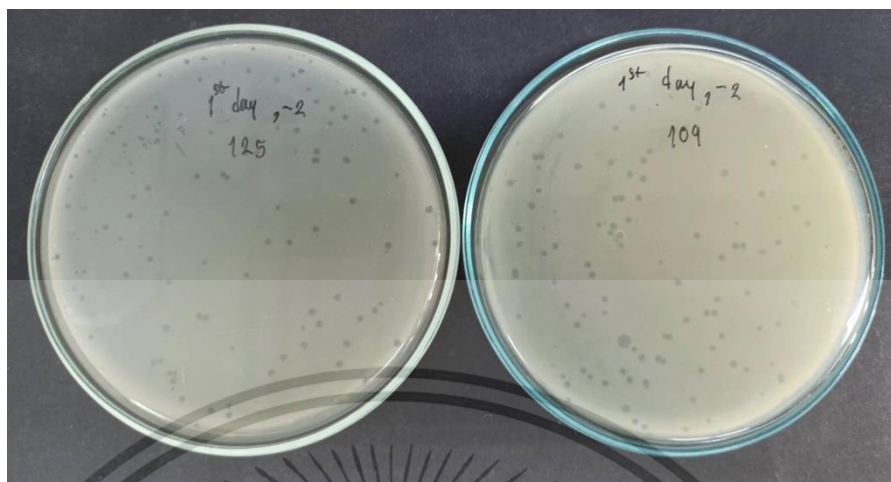
และทำ Plaque assay ทำดังนี้นวนซ้ำ 3 รอบ จะถือว่าแบคทีริโอเฟจนั้นบริสุทธิ์ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เลือกพลาทขนาด 1.48 mm. และมีลักษณะกลมเป็นวงใส (Clear plaque) ที่บริสุทธิ์ของจก1ปี เนื่องด้วยพลาทจากการ Picking plaques ในรอบที่ 4 ไอโซเลทจก1ปีลักษณะพลาทที่เกิดขึ้นมีลักษณะกลมเป็นวงใสขอบเรียบสวยและมี Diameter ขนาดใหญ่สม่ำเสมอเหมือนกันทั้งเพลท ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทของจก1เอันันมีพลาทขนาดเล็กปะปนอยู่ประมาณ 3 ถึง 9 พลาท ส่วนไอโซเลทจก1ซีพลาทจากการ Picking plaques รอบที่ 4 นั้นมีขนาด Diameter เล็กลงอย่างเห็นได้ชัดด้วยตาเปล่าและบางพลาทมีลักษณะโปร่งแสง จากนั้นนำแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์จากไอโซเลท จก1ปีไปทำเฟจไลเซจเริ่มจากการใช้ไม้จิ้มฟันแฉะถูรอบพลาทเดี่ยวที่บริสุทธิ์แล้วคว้านชิ้นด้วยไม้จิ้มฟันเสียบบริเวณด้านข้างและนำไปลง Eppendorf ที่มี SM buffer 1 ml จากนั้นแช่ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืนที่ 4 °C และนำมาทำ Plaque assay บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นเติม SM buffer 5 ml. ลงบนผิวหน้าอาหารรูนสองชั้น นำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วนจานอาหารเมื่อครบทุกๆ 30 นาที จากนั้นดูด SM buffer จากอาหารรูนสองชั้นที่บ่ม 3 ชั่วโมงแล้ว ใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml. นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm. เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำ Supernatant ที่ได้มาทำ Serial dilution และนำแต่ละ Dilution นำมาทำ Plaque assay และเช็ค Activity ของแบคทีริโอเฟจ ณ วันที่ 1, 3, 7, 14 และ 21 พบว่า Stock เฟจไลเซท ในวันที่ 7 นั้นพบขึ้นซึ่งควรมีประมาณราวๆ 1×10^5 PFU/ml แต่กับมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องด้วย Supernatant ของ Phage Lysate stock นั้นไม่ได้ผ่านการกรองด้วยหัว Filter จึงทำให้แบคทีริโอเฟจนั้นมีโอกาสเพิ่มลูกหลานขึ้นได้จากเซลล์แบคทีเรียที่ปะปนอยู่กับตะกอนเซลล์ (Pellet) ที่อยู่บริเวณก้นหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) การเช็ค Activity ของเฟจไลเซทยังเป็นประโยชน์ที่จะทำให้ทราบว่าแบคทีริโอเฟจนั้นยังมีความสามารถในการเข้า infect เซลล์เจ้าบ้านอยู่หรือไม่ นอกจากนี้การทำ Phage Lysate ยังนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการทำ MOI อีกด้วย เมื่อทราบ PFU/ml ของเฟจไลเซทแล้วจากนั้นนำเฟจไลเซทที่ได้ไปใช้สำหรับการทำ One-step growth curve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.4 พลาทที่บริสุทธิ์แล้วของไอโซเลท จภ1เอ, จภ1บี และจภ1ซี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 เซ็ค Activity ของเฟจไลเซจ ณ วันที่ 1 พบปริมาณแบคทีริโอเฟจเท่ากับ 1.2×10^5 PFU/ml. ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนการเกิดพลาควของเฟจไลเซจ ณ วันที่ใดๆ

วันที่	Dilution	จำนวนพลาคว	PFU /ml
1	10^{-2}	109 และ 125	1.2×10^5
3	10^{-2}	181 และ 74	1.3×10^5
7	10^{-2}	224 และ 201	2.1×10^5
14	10^{-2}	234 และ 248	2.4×10^5
21	10^{-2}	34 และ 34	3.4×10^4

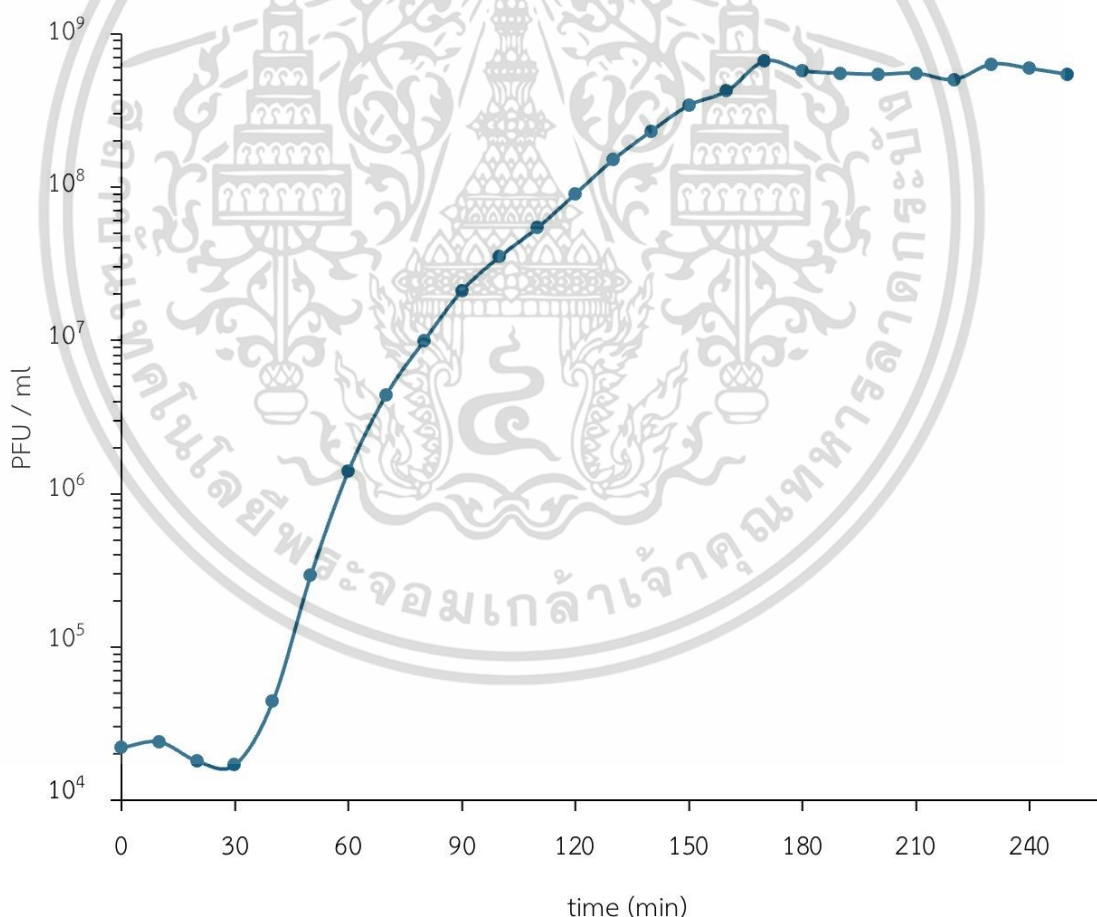
4.2 การเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (One-step growth curve)

Phage lysate 1 ml. (1×10^5 PFU/ml.) ผสมกับ *Escherichia coli* Inoculum 0.5 ml. (1×10^7 CFU /ml.) ในระยะ Log phase ($OD_{600 \text{ nm.}} \approx 0.3$) ที่ซึ่งทราบจากศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ด้วยการหาสัดส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง $OD_{600 \text{ nm.}}$ และ Viable cell count (CFU/ml) ของเชื้อ *E.coli* จากนั้นจะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์สำหรับการทำ MOI โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ MOI ที่ 0.01 เป็นเวลา 10 นาที (Wannasrichan, 2020) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm. จากนั้นนำไป Dilute culture 100 เท่า ด้วยอาหาร LB broth (เสริมด้วย 1mM CaCl_2) เพื่อป้องกันการเกิด Secondary infection นำไปบ่มบน Shaker ที่ 200 rpm. เป็นเวลา 250 นาที โดยเก็บ Co-culture 1 ml. ทุกๆ 10 นาที รวมถึงเก็บนาที่ 0 ด้วยเช่นกัน นำ Co-culture ที่เก็บได้ไป Centrifuged ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาทีและทำ Serial dilution ด้วย SM buffer จากนั้นนำไปทำ Plaque assay หา PFU/ml เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเอาไปทำประโยชน์ด้วยประการใดๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปสร้างกราฟ One-step growth curve โดยค่า Latent period, Rise period, Burst size ที่ได้เท่ากับ 30 นาที, 140 นาที และ 2.6×10^4 particle/cell. ตามลำดับ ซึ่ง ค่า Latent period ที่ได้ นั้นมีค่าใกล้เคียงกับคุณเห็ยที่ศึกษา Phage Sa157lw ของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ATCC43888 มีค่า Latent period อยู่ที่ 30 นาทีเช่นเดียวกัน โดยการศึกษาของคุณเห็ยเพาะเลี้ยง *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) ใน TSB 10 ml. ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมงและใช้เพาะเลี้ยงข้ามคืน 0.2 มิลลิลิตร ด้วยการ Sub-cultured ใน TSB 19.8 มิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 37°C เพื่อใช้หาช่วงระยะเวลา Log phase ของ Bacterial growth จากนั้นทำ MOI ที่ 0.01 พร้อมกับเสริมด้วย 10 mM CaCl_2 จากนั้นบ่ม 37°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้แบคทีเรียไอเฟจ Adsorption กับ Bacterial cells. ต่อมานำไป Centrifuged ที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 min ที่ 4°C นำ Supernatant ที่ได้ดูดออกและนำ Pellet มาชะด้วย 2 ml TSB จากนั้นนำมาใส่ลง 20 ml TSB. หลังจากนั้นทำให้ Homogenization นำ Suspension ที่ได้ออกมา 0.3 ml ใส่ลงใน 29.7 ml TSB และ Incubated ที่ 37°C บน shaking จากนั้นหาปริมาณแบคทีเรียไอเฟจที่เพิ่มขึ้นพบว่าค่า Rise period และ Burst size เท่ากับ 30 นาทีและ 130 ± 18 particle/cell ตามลำดับ (Liao et Al., 2022) จากการศึกษาของคุณจอร์นพบว่าอาหารที่เสริมด้วย CaCl_2 ส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียไอเฟจนั้นเพิ่มขึ้นต่อมิลลิลิตร (PFU/ml) ได้มากกว่าสามเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เสริมด้วย MgCl_2 และอาหารที่ไม่เสริมด้วย CaCl_2 (Control) ด้วยการศึกษาก Phages FeiDWF และ FeiAU ของแบคทีเรีย *Edwardsiella ictalurid* ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งแบคทีเรียไอเฟจทั้งสองมีลักษณะเป็นวงใสและมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.5 ถึง 11 mm. จากการทำ MOI ที่ 0.1 และบ่มช่วงอุณหภูมิที่ 25-30 °C ส่งผลให้มี Latent period ประมาณ 40 min และมี Burst size เท่ากับ 270 viral particles/Bacterial cell. (Walakira, 2008) จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าไอออนแมกนีเซียมนั้นมีประจุ 2+ เช่นเดียวกับกับไอออนแคลเซียมแต่ทำให้เกิดจำนวนลูกหลานของแบคทีเรียไอเฟจนั้นมีจำนวนน้อยกว่าการใช้ CaCl_2 เนื่องจากขนาด Diameter ของแมกนีเซียมนั้นมีขนาดใหญ่กว่าแม้ว่าจะช่วยเพิ่มการ Adsorption แต่ระยะของ Diameter ที่มีขนาดมากขึ้นทำให้ไม่เอื้อต่อการที่แบคทีเรียไอเฟจสามารถ inject สารพันธุกรรมไปถึงเซลล์เจ้าบ้านได้ และจากการศึกษาของคุณเหยาพบว่า MOI ที่เหมาะสมที่สุด (Optimal MOI) ซึ่งให้ค่า PFU/ml มากที่สุดนั้นคือการใช้ MOI อยู่ที่ 0.1 โดยการศึกษา Phage PEC9 ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (APEC) ด้วยการใช้ Host strain AH50 ผสมเข้ากับ Diluted phage (1×10^5 - 1×10^{10} PFUs/mL) ที่ MOI เท่ากับ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, และ 100. และนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำมากรองผ่าน Filter ขนาด 0.22 μm . และนำ Phage titers ไปคำนวณหา PFU/ml ด้วยการใช้ Double-agar overlay method พบว่าปริมาณแบคทีเรียไอเฟจที่ MOI 0.01 มี Phage titer เพิ่มขึ้นหลังจาก Incubation (PFU/mL) แล้วเท่ากับ 1.216×10^9 PFU/mL เอกสารนี้โดยปริมาณแบคทีเรียไอเฟจที่เกิดขึ้นมีจำนวนรองจากการทดสอบ MOI ที่ 0.1 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียไอเฟจเท่ากับ 3.500×10^9 PFU/mL (Yao et al., 2023) ซึ่งปริมาณของแบคทีเรียไอเฟจ (PFU/mL)

ที่เพิ่มขึ้นมีจำนวนแตกต่างกันประมาณ 2.89 เท่าเลยทีเดียว การศึกษา MOI และการศึกษา Adsorption rate นั้นจึงเป็นเรื่องที่ควรศึกษาในงานแบคทีเรียโอเฟจด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ การศึกษาของคุณพาร์คค้นพบ Large Burst size ด้วยเช่นกัน ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 1,914 PFU/cell ด้วยการศึกษาคูณสมบัติของ Lytic phage vB_EcoM-ECP26 และการลดลงของ shiga-toxin ที่เกิดจาก *Escherichia coli* บนผักกาดโรเมน (Romaine) ด้วยการทำให้ Adsorption จากการใช้ 1 mL Diluted host ผสมกับ 1 mL Diluted phage solution แล้วนำมา Inoculated ลง 8 mL LBC broth จากนั้นนำไป Incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 min. หลังจากนั้นนำ Suspension ไป Centrifuged ที่ ความเร็วรอบ 10,000×g, 10 min และต่อจากนั้นนำ Infected cells มา Resuspended อีกครั้งใน LBC broth อีกครั้ง Samples จะถูกพักไว้เป็นเวลา 5 นาที ที่ 37 °C และนำไปทำ Plaque assay บ่มที่ 37 °C, ข้ามคืน ซึ่งสามารถทราบ Latent period และ Burst size จาก One-step growth curve พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ vB_EcoM-ECP26 มีค่า Latent period และ Burst size อยู่ที่ 55 นาทีและ 1914 PFU/cell ตามลำดับ (Park et al., 2020)



รูปที่ 4.7 One-step growth curve ของแบคทีเรียโอเฟจ *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การแยกแบคทีเรียโอฟาจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและบริเวณรอบรั้วที่เป็นของแข็งและของเหลว ตัวอย่างที่พบแบคทีเรียโอฟาจและนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้สำเร็จนั้นเกิดจากตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬารัตน์ 1) ซึ่งการศึกษารังนี้เลือกพลาทที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง (Diameter) 1.48 mm. และมีลักษณะเป็นวงใส (Clear plaque) นำมาใช้สำหรับการทำ One-step growth curve พบว่าแบคทีเรียโอฟาจนั้นมี Latent period, Rise period และ Burst size มีค่าเท่ากับ 30 นาที, 140 นาที และ 2.6×10^4 particle/cell. ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาทดลอง Adsorption rate เพิ่มเติม โดยมีช่วงเวลาบ่ม 15, 20, 25 และ 30 นาที เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการที่แบคทีเรียโอฟาจจะเข้า Adsorpt กับ Host แล้วทำให้เกิดลูกหลานแบคทีเรียโอฟาจมากที่สุด
2. ศึกษา MOI ที่นำไปใช้เพิ่มเติม อาทิศึกษา MOI ที่ 0.001, 0.1 และ 1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบหาสัดส่วนของแบคทีเรียโอฟาจกับโฮสต์ที่เหมาะสมก่อนนำไปทำ Adsorption rate
3. ศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอฟาจ (One-step growth curve) ที่มี Diameter ต่างกัน เพื่อนำไปศึกษาหาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. 2557.

Escherichia coli. <http://www.dmsc.moph.go.th>

จूरีย์รัตน์ สีสmith. 2548. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันอาหารและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2545. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนา วิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหารเรื่องการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร ณ หอประชุม 211 สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพฯ. 2022.

ภาณุมาศ ภูมาศ, ดวงรัตน์ โประ, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล และคณะ. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์ จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย : การศึกษาเบื้องต้น. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข. 2555;6(3):352-360.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. 2562. สตรีที่พูด พบเชื้ออีโคไล มากสุด. <https://www.thaihealth.or.th>

Abo-elmaaty S. et al., 2016. Improved antibacterial efficacy of bacteriophage-cosmetic formulation for treatment of *Staphylococcus aureus* in vitro. Elsevier. 61(2): 201–206.

Adams, Mark Hancock, 1912-1956. Bacteriophages, 1959. New York, Interscience Publishers. MBLWHOI Library.

Ackermann, H.W. 2009. Phage Classification and Characterization. In Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions (M.R.J. Clokie and A.M. Kropinski, eds.) pp. 127-140. Humana Press, N.Y.

Agbo E. et al., 2022. Isolation and Analysis of the Biological Characteristics of a Novel Bacteriophage vB_SauP_P992 Against *Staphylococcus aureus*. Jundishapur Journal of Microbiology: Vol.15, issue 3; e121670.

Alexyuk P. et al., 2022. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Active against Clinical Strains of *E. coli* and Development of a Phage Antimicrobial Cocktail. Pubmed. 14(11):2381.10.3390/v14112381.

Ali S. et al., 2023. Characterization, genome analysis and antibiofilm efficacy of lytic Proteus phages RP6 and RP7 isolated from university hospital sewage. Virus Research. Volume 326 : 199049.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่กระทรวงสาธารณสุขได้จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
Altamirano F. et al., 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. Clinical

- Microbiology Reviews. 10.1128.
- Altamirano F. et al., 2021. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. Pubmed. 10.1038/s41564-020-00830-7.
- Amarillas L. et al., 2016. Characterization of novel bacteriophage phiC119 capable of lysing multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. PeerJ. 10.7717/peerj.2423.
- Anderson, S . 2023. Antimicrobial Resistance Death Toll Could Catch Up to Cancer by 2050, and Pollution is Fuelling its Spread. [Online]. <https://healthpolicy-watch.news/antimicrobial-resistance-deaths-cancer/>.
- Andrew J. Van Last et al., 2023. Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements. Jove Journal. Microbiology.10511.
- Andrew M. Kropinski & Martha R.J. Clokie, 2009. Bacteriophages: *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, Methods in Molecular Biology 501, Humana Press.
- Aryal S. 2023. Microbe Notes. Lysosomes: Structure, Function, Diagram. <https://microbenotes.com/author/sagar-aryal/>
- Baanjomyut. 2000. วงจรชีวิตไวรัส. https://www.baanjomyut.com/library_3/virus/06.html
- Bibi Z. et al., 2015. A Phage P.E 1 , Isolated from Hospital Sewage Reduces the Growth of *Escherichia coli* . Biological Science. Virology. DOI:10.1080/09583157.2015.1086311.
- Chaudhary N. et al., 2021. Characterization and in vitro activity of a lytic phage RDN37 isolated from community sewage water active against MDR Uropathogenic *E. coli*. ScienceDirect. 39:101016.
- Chegini Z. et al., 2021. Bacteriophage therapy for inhibition of multi drug-resistant uropathogenic bacteria: a narrative review. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 10.1186.
- Chemate S. et al., 2016. Phage Therapy: Emergence of a Novel Therapy to Control Bacterial Pathogens. ResearchGate.
- Chengju Fang et al., 2023. Isolation and characterization of three novel lytic phages against K54 serotype carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Cell. Infect. Microbiol. Virus and Host. Volume 13 : 1-10
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และเผยแพร่โดยมูลนิธิส่งเสริมศิลปวัฒนธรรมแห่งราชบัณฑิตยสถาน
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.3389/fcimb.2023.1265011.

Chloe E. James et al., 2001. Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage. AUTHORS INFO & AFFILIATIONS. DOI: 10.1128/AEM.67.9.4335-4337.2001.

Costa P. et al., 2019. Efficiency of Single Phage Suspensions and Phage Cocktail in the Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: An In Vitro Preliminary Study. PMC Disclaimer. PMC 6518180: 30935094.

Dalmasso M. et al., 2016. Three New *Escherichia coli* Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy. PMC. PMCID: PMC4900583. PMID: 27280590. Diagnostic Microbiology: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology THIRTEEN 13 EDITION*. Patricia M. Tille, 2014, ELSEVIER.

Difco Laboratories: *Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical tests*. Detroit, 1980, Difco Laboratories.

Ellis & Delbruck, 1939, studies *E. coli* bacteriophages.

Fikadu A. et al., 2024. Isolation and Phenotypic Characterization of Virulent Bacteriophages Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and Its Phage-Resistant Variant from Sewage Sources. METHODOLOGY. Volume 17 : Pages 293-303.

Food Network Solution. 2014. *Escherichia coli*.
<https://www.foodnetworksolution.com/wiki/escherichia-coli>.

Golec P. et al., 2008. Simple Method for Plating *Escherichia coli* Bacteriophages Forming Very Small Plaques or No Plaques under Standard Conditions. PMCID: PMC2519272. PMID: 18586961.

Golnar Rahimzadeh, PhD et al., 2020. Characterization and Lytic Activity of Isolated *Escherichia coli* Bacteriophages against *Escherichia coli* in vitro. PMC Disclaimer. PMCID: PMC7395952 PMID: 32801419.

Gutiérrez D. et al., 2018. Practical Method for Isolation of Phage Deletion Mutants. Methods Protoc. 2018, 1(1), 10.3390: 1010006.

Häusler, Thomas, 1968-2006, Viruses vs. superbugs: a solution to the antibiotic's crisis? London; New York: Macmillan, 2006, Bacterial diseases.

Health Policy Watch. 2023. Antimicrobial Resistance Death Toll Could Catch Up

เอกสารนี้เป็นเอกสาร to Cancer by 2050, and Pollution is Fuelling its Spread. นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่ <https://healthpolicy-watch.news/antimicrobial-resistance-deaths-cancer/> ไปใช้

- Hilal Basak Erol et al., 2022. The comparison of lytic activity of isolated phage and commercial Intesti bacteriophage on ESBL producer *E. coli* and determination of Ec_P6 phage efficacy with in vivo *Galleria mellonella* larvae model. *Microb Pathog*. PMID:35513294.10.1016.
- Hobbs Z. et al., 2016. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiology Letters*. Volume 363. Issue 7.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH et al, editors: *Bergey’s manual of determinative bacteriology*, ed 9, Baltimore, 1994, Williams & Wilkins.
- Hyman P. et al., 2019. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*. Volume 12: Issue 1 10.3390/ph12010035.
- IMPACT. 2018. การตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรีย. <https://assist-impact.net/th/articles/130595>
- Jamalludeen N. et al., 2007. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*. Volume 124 : Issues 1–2 Pages 47-57.
- Javaudin F. et al., 2021. Impact of Phage Therapy on Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Intestinal Carriage in a Murine Model. *Microorganisms*. Volume 9: Issue 12 10.3390/microorganisms9122580.
- Jiangtao Zhao et al., 2019. Characterizing the Biology of Lytic Bacteriophage vB_EaeM_φEap-3 Infecting Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes*. *Front. Microbiol. Sec. Virology*. Volume 10.
- Jiraporn et al., 2018. The study of antimicrobial resistance (AMR) and ESKAPE Bacteria have been reported in -Healthcare associated bloodstream infections (HA-BSI) by WHONET Program in Nopparat Rajathanee Hospital, 2017-2018. *Thaijo*.
- Kannoly S. et al., 2023. Single-Cell Approach Reveals Intercellular Heterogeneity in Phage-Producing Capacities. *PMCID: PMC9927085. PMID: 36541779*.
- Kleczkowska, J. 1957. A study of the distribution and effects of bacteriophage of root-nodule bacteria in the soil. *Can. J. Microbiol.*, Vol.3 page 171-180.
- Konopacki M. et al., 2020. PhageScore: A simple method for comparative evaluation of bacteriophages lytic activity. *Biochemical Engineering Journal*. Volume 161.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้
 Kuek M. et al., 2023. Control of *Escherichia coli* in Fresh-Cut Mixed Vegetables Using a
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Combination of Bacteriophage and Carvacrol. *Antibiotics*. Volume 12. Issue 11.
- Liao, Y , Zhang, Y , Salvador, A , Ho, K , Cooley, M. and Wu, V. 2022. Characterization of polyvalent *Escherichia* phage Sa157lw for the biocontrol potential of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean seeds. *Front Microbiol.* 13: 1053583.
- Lingchong You et al., 2002. Effects of *Escherichia coli* Physiology on Growth of Phage T7 In Vivo and In Silico. PMC Disclaimer. PMCID: PMC134924. PMID: 11889095.
- Lingga R. et al., 2020. Isolation, characterization and efficacy of lytic bacteriophages against pathogenic *Escherichia coli* from hospital liquid waste. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. Vol. 21 No. 7 (2020) : 10.13057.
- Mahidol. 2019. เชื้ออีโคไล. <https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=1399> .
- Mangieri N. et al., 2020. Evaluation of a Potential Bacteriophage Cocktail for the Control of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* in Food. *Bacteriophages to Fight Food-Borne Pathogens/Phages Struggling for Food Safety*. Volume 11: 10.3389/fmicb.2020.01801.
- Microbiology note. 2022. One-step growth curve ของไวรัส. <https://microbiologynote.com/th/one-step-growth-curve>.
- Moh Alan Yap et al., 2016. Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *PNAS*. 1601654113.
- Naritsara Battapai et al., 2017. Isolation and characterization of lytic phages against antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*.
- Nawaz A. et al., 2024. Characterization of ES10 lytic bacteriophage isolated from hospital waste against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli*. *Phage Biology*. Volume 15 : 10.3389/fmicb.2024.1320974.
- Pan Fu et al., 2021. Identification and characterization of two bacteriophages with lytic activity against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Virus Research*. Volume 291 : 198196.
- Park, D , Lim, G , Lee, Y. and Park, J. 2020. Characteristics of lytic phage vB_EcoM-ECP26 and reduction of shiga-toxin producing *Escherichia coli* on produce romaine. *springeropen*. 63:19.

เอกสารนี้ Peter Kotsoana Montso et al., 2019. Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical *Escherichia coli* O177 Strains ไปใช้

- Isolated From Cattle Feces. Public Health. Infectious Diseases – Surveillance, Prevention and Treatment. Volume 7 : 10.3389/fpubh.2019.00355.
- Ping Li et al., 2022. Characterization of a New Temperate *Escherichia coli* Phage vB_EcoP_ZX5 and Its Regulatory Protein. Pathogens. Volume 11. Issue 12.
- Reardon S. 2014. WHO warns against 'post-antibiotic' era. nature.
<https://www.nature.com/articles/nature.2014.1513>
- Sanjay Kumar Shukla et al., 2014. Isolation of phage from animal waste of different LSF and their utility in phage therapy. ISSN: 2319-7706 Volume 3. SEA-PHAGE. 2013. Protocol 5.3: Plaque Assay.
<https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/5-3-SEA-PHAGE.2013.Protocol.5.5:Enriched.Isolation>
<https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/5-5-protocol>
- SEA-PHAGE. 2013. Chapter 3: Phage Basics.
<https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/3-0-overview>
- SEA-PHAGE. 2013. Chapter 6: Phage Purification.
<https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/6-0-toc>
- Sjahriani T. et al. 2021. Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 Lytic Bacteriophage from Environment Sewage. PubMed. 7383121:10.1155.
- Stachurska X. et al., 2021. Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification. PubMed. 1306:10.3390.
- Stephen T. Abedon et al., 2001. Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability. PMCID: PMC93152. PMID: 11526028.
- S Viazis et al., 2011. Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology, Volume 110 : Issue 5 Pages 1323–1331.
- Su-Hyeon Kim et al., 2021. Characterization of a New and Efficient Polyvalent Phage Infecting *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, and *Shigella sonnei*. Microorganisms. Volume 9. Issue 10.
- Tamirat Salile Sada et al., 2024. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from various sources in Addis Ababa against antimicrobial-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* strains and evaluation of their therapeutic potential. BMC Infectious Diseases. 10.1186. ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
- Techaphon Songphasuk et al., 2022. Bacteriophage efficacy in controlling swine ไม่ว่าการ

enteric colibacillosis pathogens: An in vitro study. PMID: PMC9880851. PMID: 36718320.

Tianshi Xiao et al., 2023. A novel lytic bacteriophage against colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from different animals. *Virus Research*. Volume 329, 199090.

Thomas C. et al., 2003. Experimental Examination of Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Bacterial Availability. *Applied and Environmental Microbiology*. DOI: 10.1128.

Tomat D. et al., 2013. Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Cell. Infect. Microbiol. Molecular Bacterial Pathogenesis*. Volume 3 : 10.3389/fcimb.2013.00020.

Tomlinson, S . 2010. UV Irradiation on Bacteriophage Survival. Master of Science (Chemistry). Coastal Carolina University.

Ya-Ke Li et al., 2021. Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157:H7 in milk and beef. *ScienceDirect*. 144:111266.

Walakira, J . 2008. Discovery, Isolation and Characterization of Bacteriophages Specific for *Edwardsiella ictaluri*. Master of Science (Biological). Auburn University.

Wannasrichan et al., 2022. Phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against a novel lytic phage JJ01 exhibits hypersensitivity to colistin and reduces biofilm production. *Frontiers in Microbiology*. 10.3389/fmicb.2022.1004733

World Health Organization. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

Ya-Ke Li et al., 2021. Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157:H7 in milk and beef. *ScienceDirect*. 144:111266.

Yao, L , Bao, Y , Hu, J , Zhang, B , Wang, Z , Wang, X , Guo, W , Wang, D , Qi, J , Tian, M , Bao, Y , Li, H. and Wang, S. 2023. A lytic phage to control multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) infection. *Front Microbiol*. 13: 1253815.

เอกสารนี้ Young-Duck Lee and Jong-Hyun Park 2015. Characterization and application of phages
ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่ isolated from sewage for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm. *LWT*

- Food Science and Technology. Volume 60 : Issue 1 Pages 571-577.

Yue Xu et al., 2018. Characterization and Genomic Study of Phage vB_EcoS-B2 Infecting Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. Environmental Bacteriophages: from Biological Control Applications to Directed Bacterial Evolution. Volume 9: 10.3389/fmicb.2018.00793..

Zhou Y. et al., 2022. Application of a novel lytic phage vB_EcoM_SQ17 for the biocontrol of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Enterotoxigenic *E. coli* in food matrices. Bacteriophages in the Fight Against Foodborne Pathogens. Microbiol. Volume 13: 10.3389.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

ก.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.1 อาหาร LB broth

Tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ด้วย สารละลาย NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเตรียม เป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้นลงไป 15.0 กรัม หรือจะใช้อาหารสำเร็จรูปของอาหาร LB broth ผสมกับ Agar สำหรับทำเป็นอาหารแข็งและน้ำกลั่น โดยมีอัตราส่วนคือ น้ำกลั่น 1.0 ลิตร ต่อ LB broth 25.0 กรัม กับ Agar 15.0 กรัม นำมาผสมกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.2 อาหาร LB (2X) Broth

Tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
CaCl_2	1.0	mM.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ด้วยสารละลาย NaOH หรือจะใช้อาหารสำเร็จรูปของอาหาร LB broth ผสมกับน้ำกลั่น โดยมีอัตราส่วนคือ น้ำกลั่น 1.0 ลิตร ต่อ LB broth 25.0 กรัม และ 1mM CaCl_2 นำมาผสมกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.3 อาหาร LB top agar

Tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 ด้วย สารละลาย NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที หรือจะใช้อาหารสำเร็จรูปของอาหาร LB broth ผสมกับ agar และน้ำกลั่นโดยมีอัตราส่วนคือ น้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อ LB broth 25.0 กรัม กับ Agar 3.0 กรัม นำมาผสมกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.4 อาหาร EMB (Eosin-methylene blue agar)

EMB agar	37.46	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที โดยอุปกรณ์ที่ใส่อาหารชนิดนี้ควรมีกระดาษหรือกระดาษฟอยล์ห่อหุ้มปกปิดไม่ให้อาหารชนิดนี้โดนแสง

*ข้อควรระวัง ควรทำและเก็บรักษาในบริเวณที่มีด

ก.2 การเตรียมสารละลาย

ก.2.1 สารละลาย Normal saline

NaCl	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เป็นการดำเนินการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2.2 สารละลาย SM buffer

NaCl	5.8	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	2.0	กรัม
1M Tris-HCl (ph 7.5)	50.0	มิลลิลิตร
2%(w/v) gelatin	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

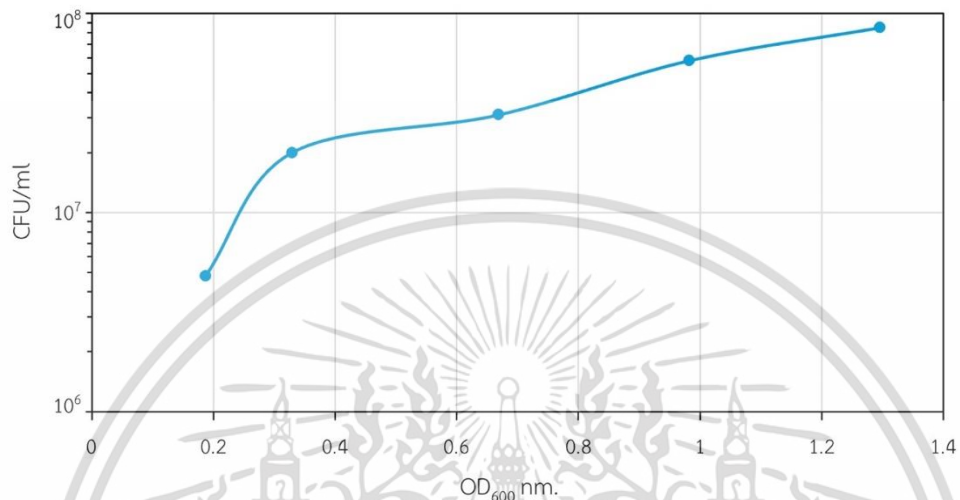
ผสมส่วนผสมทั้งหมด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง OD₆₀₀ nm. และ Viable cell count (CFU/ml) ของ *Escherichia coli*



รูปที่ ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD₆₀₀ nm. และ Viable cell count (CFU/ml) ของเชื้อ *E.coli*

ตารางที่ ข-1 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่าง OD₆₀₀ nm. และ Viable cell count (CFU/ml) ของเชื้อ *E.coli*

		OD ₆₀₀ nm.		CFU/ml		
time (h)	Dilution	OD ₆₀₀ nm.	Avg. real OD ₆₀₀ nm.	Dilution	จำนวนโคโลนี	Avg. CFU/ml
0	1.00	0.188 และ 0.187	0.187	10 ⁻⁴	48 และ 48	4.8 x 10 ⁶
1	1.00	0.329 และ 0.329	0.329	10 ⁻⁴	200 และ 196	2.0 x 10 ⁷
2	1.00	0.670 และ 0.668	0.669	10 ⁻⁵	30 และ 32	3.1 x 10 ⁷
3	0.50	0.489 และ 0.494	0.982	10 ⁻⁵	56 และ 60	5.8 x 10 ⁷
4	0.50	0.747 และ 0.748	1.296	10 ⁻⁵	77 และ 92	8.5 x 10 ⁷
5	0.33	0.475 และ 0.475	1.425	10 ⁻⁵	188 และ 195	1.9 x 10 ⁸
6	0.33	0.527 และ 0.527	1.589	10 ⁻⁵	117 และ 145	2.6 x 10 ⁸
				10 ⁻⁶	39 และ 37	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ให้บุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ควรกรอกลง ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผล One-step growth curve

ตารางที่ ค-1 แสดงผล One-step growth curve โดยทำการเก็บ Co-Culture ทุกๆ 10 นาทีเป็น

เวลา 250 นาที

time (min)	Dilution	จำนวนพลาค	จำนวนพลาคเฉลี่ย	PFU/ml
0	10^{-1}	225 และ 220	222.5	2.2×10^4
10	10^{-1}	245 และ 240	242.5	2.4×10^4
20	10^{-1}	194 และ 167	180.5	1.8×10^4
30	10^{-1}	150 และ 196	173	1.7×10^4
40	10^{-2}	41 และ 46	43.5	4.4×10^4
50	10^{-3}	28 และ 30	29	2.9×10^5
60	10^{-4}	12 และ 15	13.5	1.4×10^6
70	10^{-4}	41 และ 46	43.5	4.4×10^6
80	10^{-4}	103 และ 94	98.5	9.9×10^6
90	10^{-4}	207 และ 209	208	2.1×10^7
100	10^{-5}	34 และ 35	35	3.5×10^7
110	10^{-5}	59 และ 51	55	5.4×10^7
120	10^{-5}	94 และ 84	89	9.0×10^7
130	10^{-5}	152 และ 157	154.5	1.5×10^8
140	10^{-5}	220 และ 236	228	2.3×10^8
150	10^{-6}	32 และ 35	33.5	3.4×10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 แสดงผล One-step growth curve โดยทำการเก็บ Co-Culture ทุกๆ 10 นาทีเป็น

เวลา 250 นาที

time (min)	Dilution	จำนวนพลาต	จำนวนพลาตเฉลี่ย	PFU/ml
160	10^{-6}	40 และ 43	41.5	4.2×10^8
170	10^{-6}	62 และ 69	65.5	6.6×10^8
180	10^{-6}	55 และ 58	56.5	5.7×10^8
190	10^{-6}	59 และ 51	55	5.5×10^8
200	10^{-6}	54 และ 54	54	5.4×10^8
210	10^{-6}	54 และ 56	55	5.5×10^8
220	10^{-6}	48 และ 51	49.5	5.0×10^8
230	10^{-6}	60 และ 66	63	6.3×10^8
240	10^{-6}	58 และ 59	58.5	5.9×10^8
250	10^{-6}	54 และ 54	54	5.4×10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้