การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF *Escherichia coli* FROM SEWAGE AND ITS ENVIRONMENT AREA

นพฤทธิ์ อาจคงหาญ
ชนาภัทร เจาฑาฑิต

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF *Escherichia coli*
FROM SEWAGE AND ITS ENVIRONMENT AREA

NOPPARIT ARTKONGHAN
CHANAPAT JAOTATID

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

หัวข้อโครงงานพิเศษ การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

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

ชื่อนักศึกษา นายนพฤทธิ์ อาจคงหาญ รหัสนักศึกษา 63050484

นางสาวชนาภัทร เจาฑาฑิต รหัสนักศึกษา 6350459

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

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

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ
ชื่อนักศึกษา นายนพฤทธิ์ อาจคงหาญ รหัสนักศึกษา 63050484
นางสาวชนาภัทร เจาฑาฑิต รหัสนักศึกษา 63050459
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และทำให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและสิ่งแวดล้อมบริเวณโดยรอบ พร้อมด้วยศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ เนื่องจากในปัจจุบันแบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียตัวสำคัญที่เกิดการดื้อยาและแพร่กระจายออกไปเป็นวงกว้าง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* จากการใช้ตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและสิ่งแวดล้อมบริเวณโดยรอบ ตัวอย่างนำมาคัดแยกด้วยการ Enrichment ในอาหาร LB ที่มีความเข้มข้นสองเท่าและเสริมด้วย $CaCl_2$ ทำการตรวจผลเป็นระยะเวลา 14 วัน ด้วยเทคนิคอาหารวุ้นสองชั้นทั้งวิธี Plaque assay และ Spot test จากนั้นเลือกพลาคเดี่ยว (Plaque) ที่มีลักษณะเป็นวงใสจำนวน 3 ไอโซเลท ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking technique อย่างน้อย 3 ครั้ง ต่อมานำแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ไปทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีเฟจไลเซท (Phage Lysate) และศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ โดยการใช้ MOI 0.01 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถคัดแยกแบคเทอริโอเฟจได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากท่อระบายน้ำบริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 หลังจากนำมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่า พลาคมีลักษณะเป็นวงใสขอบเรียบ (Clear plaque) และมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.48 มิลลิเมตร เมื่อนำมาศึกษาการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้ พบว่าค่า Latent period, Rise period และ Burst size เท่ากับ 30 นาที, 140 นาที และ 66 PFU/cell ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงวิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ รวมถึงการศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและสิ่งแวดล้อมบริเวณโดยรอบ เพื่อเป็นแนวทางในการแยกแบคเทอริโอเฟจต่อไป

คำสำคัญ : แบคเทอริโอเฟจ, *Escherichia coli*, การแยกแบคเทอริโอเฟจ, Plaque assay, พลาควงใส, One-step growth cruve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of Bacteriophages of *Escherichia coli* from Sewage and its Environmental Area
Students	Mr. Nopparit Artkonghan Student ID 63050484 Miss Chanapat Jaotatid Student ID 63050459
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 purpose of this study was to isolate and purify *Escherichia coli* bacteriophages from sewage and its environmental area, as well as examine the one-step growth curve experiment. According to *E. coli*, it is currently an important bacterium that has grown drug-resistant and expanded globally. Thus, the purpose of this study was to isolate *E. coli* bacteriophages from sewage and its environmental area. Samples were isolated by enrichment in 2X LB medium supplemented with $CaCl_2$. The results were examined for a period of 14 days using the double-layer agar technique, which included both the plaque assay and spot test. From this study, it was found that bacteriophages could be isolated from wastewater samples from the drainage pipes in front of Chulabhorn Building 1 following purification. The three single clear plaques were selected and purified using the picking technique, which was done at least three times. It was found that the plaque had the appearance of a transparent circle with smooth edges (clear plaque) and a diameter of 1.48 millimeters. Afterward, the purified bacteriophages were increased in quantity using the phage lysate method, and then a one-step growth curve experiment was done using a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. As a result of the one-step growth curve of *E. coli* bacteria, the latent period, rise period, and burst size values were 30 minutes, 140 minutes, and 66 PFU/cell, respectively. In this study, methods for isolation and purification were known throughout the work. This includes investigating the one-step growth curve of *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bacteriophages from sewage and its environmental area. This study serves as a guideline for further bacteriophage isolation.

Keywords : Bacteriophage, *Escherichia coli*, Isolation, Plaque assay, Clear plaque, One-step growth cruve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุก ๆ ท่าน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วิมลมาศ บุญมี ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการให้แก่ผู้ทำการวิจัย โดยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังช่วยตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้แก่ผู้วิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จได้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ที่กรุณารับเป็นกรรมการ ในการตรวจสอบโครงงานพิเศษฉบับนี้ อีกทั้งยังให้ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณความช่วยเหลือจากนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้ช่วยแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือในงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการทดลอง ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการทดลองจนสำเร็จลงได้ คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจผู้วิจัย ซึ่งเป็นแรงผลักดันที่สำคัญที่ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

นพฤทธิ์ อาจคงหาญ
ชนาภัทร เจาฑาฑิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ฌ

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 แบคทีเรีย *Escherichia coli* 4

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Escherichia coli* 4

2.1.2 นิเวศวิทยาของแบคทีเรีย *Escherichia coli* 5

2.1.3 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Escherichia coli* 5

2.1.4 การก่อโรคของแบคทีเรีย *Escherichia coli* 6

2.1.5 การแยกแบคทีเรีย *Escherichia coli* 8

2.2 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) 11

2.2.1 ความสำคัญและการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ 11

2.2.2 นิเวศวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ 11

2.2.3 สัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ 12

2.2.4 วัฏจักรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 กลไกของแบคเทอริโอเฟจไลติก (Lytic phage) ในการทำลายแบคทีเรีย........14

2.2.6 Plaque assay........15

2.2.7 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (One-step growth curve)........15

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง........16

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย........20

3.1 เครื่องมือ........20

3.2 อุปกรณ์........21

3.3 สารเคมี........21

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ........22

3.5 จุลินทรีย์........22

3.6 วิธีทดลอง........22

3.6.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย *Escherichia coli*........22

3.6.2 การเก็บตัวอย่าง........22

3.6.3 การสกัดแบคเทอริโอเฟจ (Phage Extraction)........22

3.6.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (Enrichment phage)........23

3.6.5 เทคนิคอาหารวุ้นสองชั้น (Double layer agar method)........23

3.6.6 การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking technique........24

3.6.7 การเพิ่มปริมาณและการชะแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธี Phage lysate........24

3.6.8 การหาความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml)........24

3.6.9 One-step growth curve (Wannasrichan et al., 2020)........25

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล........26

4.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และการทำให้บริสุทธิ์........26

4.2 การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli*........31

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ........34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 สรุปผลการวิจัย...34

5.2 ข้อเสนอแนะ 34

เอกสารอ้างอิง...35

ภาคผนวก...41

ภาคผนวก ก..42

ภาคผนวก ข..45

ภาคผนวก ค..46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *Escherichia coli* (Difco Lab, 1980) 9
4.1 ผลการเกิดพลาคจากการสุ่มตัวอย่างประเภทของแข็งและของเหลว 27
4.2 แสดงจำนวนการเกิดพลาคของเฟจไลเซท ณ วันที่ใดๆ 31
ข.1 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของ *E.coli* 45
ค.1 แสดงผลการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แบคทีเรีย *E. coli* บนอาหาร Eosin methylene blue agar 4

2.2 แอนติเจนของ *E. coli* 6

2.3 การศึกษาการติดเชื้อของแบคทีเรีย *E. coli* ในหลอดทดลอง..... 7

2.4 โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ T4 12

2.5 Lytic และ lysogenic cycle 13

2.6 Lytic phage 14

2.7 Plaque assay..... 15

2.8 One-step growth curve 16

4.1 ตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1) ที่ผ่านการ Enrichment 10 วัน.... 28

4.2, 4.3 และ 4.4 พลาคที่บริสุทธิ์แล้วของไอโซเลท จภ1เอ, จภ1บี และ จภ1ซี ตามลำดับ..... 30

4.5 เช็ค Activity ของเฟจไลเซท ณ วันที่ 1. 31

4.7 One-step growth curve ของแบคเทอริโอเฟจ *E. coli* 33

ข.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของ *E.coli* 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันแบคทีเรียเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่มาจากวิธีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกวิธีและขาดความรับผิดชอบในทางเกษตรกรรม เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์ที่ผิดวิธีและการใช้อย่างขาดความรู้ความเข้าใจถึงผลกระทบที่จะตามมา ทำให้เชื้อดื้อยาเล็ดลอดออกมาพร้อมกับน้ำเสียและแล้วปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งในแต่ละปีคนไทยติดเชื้อดื้อยาประมาณปีละประมาณ 88,000 คน และเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาอย่างน้อยปีละ 20,000-38,000 คน ส่งผลให้ทุก 15 นาที มีคนไทย 1 คนตายเพราะเชื้อดื้อยา คิดเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 46,000 ล้านบาท อีกทั้งการเพิ่มขึ้นของประชากรทำให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะแพร่กระจายออกไปได้อย่างรวดเร็วและขยายออกเป็นวงกว้างมากยิ่งขึ้น ในปีพ.ศ.2560 World Health Organization (WHO) ประกาศรายชื่อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะที่ต้องการยาปฏิชีวนะชนิดใหม่มากำจัดอย่างเร่งด่วนที่สุด โดยหนึ่งใน 3 อันดับแรกนั้นปรากฏว่าพบแบคทีเรีย *Escherichia coli* อยู่ด้วย (WHO, 2017) และยังมีการพยากรณ์ว่าในปี พ.ศ.2593 อาจมีผู้เสียชีวิตด้วยสาเหตุการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นถึงปีละ 10 ล้านคน (Anderson, 2023) จากการวิจัยกลุ่มแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ESKAPE ซึ่งหนึ่งในนั้นมีแบคทีเรีย *E. coli* ที่พบว่าเกิดการดื้อยามากที่สุดร้อยละ 12.7 จากการนำเลือดของผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาลมาวิเคราะห์ (Jiraporn et al., 2018) การติดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีสาเหตุมาจากติดต่อจากผู้ป่วยได้โดยตรง (Person to person contact) หรือติดเชื้อมากับสิ่งบริโภค อุปโภค โดยอาการหลังติดเชื้อมีกระทั่งไม่แสดงอาการไปจนถึงมีอาการรุนแรง ถึงขั้นมีอาการปวดบิด ขับถ่ายปนเลือดและมีอาการแทรกซ้อนจากการเกิดกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตกถึงขึ้นทำให้ไตวายและเสียชีวิตได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557) ปี พ.ศ. 2562 มีการตรวจพบอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เกินมาตราฐานโดยเชื้อส่วนใหญ่ที่พบคือ *E. coli* และอาหารส่วนใหญ่ที่ตรวจพบเชื้อชนิดนี้คืออาหารประเภทริมบาทวิถีซึ่งคนไทยส่วนใหญ่นั้นนิยมบริโภคกัน ทำให้โรคท้องร่วงจากแบคทีเรีย *E. coli* ยังคงเป็นโรคติดเชื้ออันดับต้นๆของคนไทย (กองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2562) อีกทั้งปัจจุบันโลกได้เข้าสู่ยุค Post-antibiotic ทำให้การค้นหายาปฏิชีวนะตัวใหม่เป็นเรื่องยากและต้องใช้ต้นทุนในการศึกษาค้นคว้าสูง (Reardon, 2014) การแพทย์ปัจจุบันจึงหันมาสนใจการใช้วิธีการรักษาด้วยแบคเทอริโอเฟจ (Phage therapy) มากขึ้น

แบคเทอริโอเฟจหรือเฟจ (Bacteriophages/ phage) d’Herelle ได้ให้นิยามความหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแบคเทอริโอเฟจไว้ว่าเป็น Bacteria eater (Adams, 1959) แบคเทอริโอเฟจนั้นสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมดังคำกล่าวที่ว่าที่ใดมีแบคทีเรียที่นั่นมีแบคเทอริโอเฟจ การศึกษาแบคเทอริ-โอเฟจจึงง่ายและใช้ต้นทุนต่ำอีกด้วย แบคเทอริโอเฟจนั้นไม่มีคุณสมบัติที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์และพืช เนื่องจากการเข้าไปทำการติดเชื้อโดยแบคเทอริโอเฟจจะจำเพาะเจาะจงกับเซลล์เจ้าบ้าน (Host) ซึ่งนั่นหมายถึงแบคทีเรียเพียงเท่านั้น (Häusler, 2008) การรักษาด้วย Phage therapy มีข้อดีเหนือกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอยู่หลายประการ อาทิเช่น แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูงกว่ายาปฏิชีวนะ โดยแบคเทอริโอเฟจนั้นจะไม่ฆ่า Normal flora ซึ่งไม่เหมือนดังเช่นยาปฏิชีวนะที่มีจะมีการยับยั้งแบบ Broad-spectrum inhibition ซึ่งจะส่งผลให้ Microbiota ในร่างกายเสียหาย แบคเทอริโอเฟจนั้นมี Self-limitation เมื่อเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านหมดลงแบคเทอริโอเฟจจะถูกร่างกายกำจัดไปเอง และแบคเทอริโอเฟจนั้นจะไม่ทำให้เกิดอาการแพ้แก่ผู้ที่ได้รับการรักษา (Gordillo Altamirano FL, 2019) อีกทั้งในงานวิจัยของคุณอัลตามิราโน (Altamirano et al, 2021) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียหลังจากถูกทรีทด้วยแบคเทอริโอเฟจแล้วส่งผลทำให้แบคทีเรียตัวนั้นอ่อนแอลงและไวต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นั่นหมายถึงความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียก็ลดลงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจยังสามารถนำไปใช้เป็น Postharvest control บนอาหารสดและพัฒนากลายเป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์ที่ใช้ฉีดพ่นบนอาหารเพื่อป้องกันการก่อโรคของแบคทีเรียที่อยู่บนอาหารได้ จากงานวิจัของคุณเทียนได้ทำการศึกษาการประกอบร่วมตัวกันของแบคเทอริโอเฟจบนไมโครเจล ซึ่งนำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพแบบสเปรย์พ่นโดยมีเป้าหมายไปที่แบคทีเรียดื้อยาพบว่า สเปรย์แบคเทอริโอเฟจสามารถช่วยลดแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ได้ 6 logs หรือ 99.9999% นอกจากมีประสิทธิภาพสูงแล้ว สเปรย์แบคเทอริโอเฟจสามารถใช้กับอาหารได้อย่างปลอดภัยและไม่ทำให้อาหารเสียรสชาติ เนื้อสัมผัส หรือคุณภาพของอาหารอีกด้วย (Tian et al., 2022) ในการวิจัยของคุณซาห์ราและคณะ (Chegini et al., 2021) กล่าวว่า ปัญหาอุปสรรคสำคัญที่มีผลในการรักษาด้วยแบคเทอริโอเฟจให้ประสบผลสำเร็จได้นั้นคือ แบคเทอริโอเฟจมีช่วงเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) ที่ค่อนข้างจำกัด นอกจากนี้ยังมีข้อกำจัดทางสภาพแวดล้อมอื่นๆในการใช้แบคเทอริโอเฟจอยู่อีกอาทิเช่น อุณหภูมิ ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือการได้รับรังสียูวี เป็นต้น (Abo-elmaaty, 2016)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคเทอริโอเฟคของแบคทีเรีย *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ พร้อมด้วยศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างจากสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการแยกแบคเทอริโอเฟจซึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* และทำให้แบคเทอริโอเฟจนั้นบริสุทธิ์จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวน (One-step growth curve) ของแบคเทอริโอเฟจ *E. coli* จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) การแยกแบคเทอริโอเฟจของ *E. coli* และการทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบเช่น จากแหล่งดินในฟาร์มปศุสัตว์, แหล่งน้ำเสียจากชุมชน และมูลของสัตว์เลือดอุ่น

2) ศึกษาการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของ *E. coli* (One-step growth curve) และพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Latent period, Rise period และ Burst size

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงแนวทางการแยกแบคเทอริโอเฟจของ *E. coli* และการทำให้แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์จากตัวอย่างในสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

2) ทราบถึงกระบวนที่ใช้เพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ *E. coli* จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

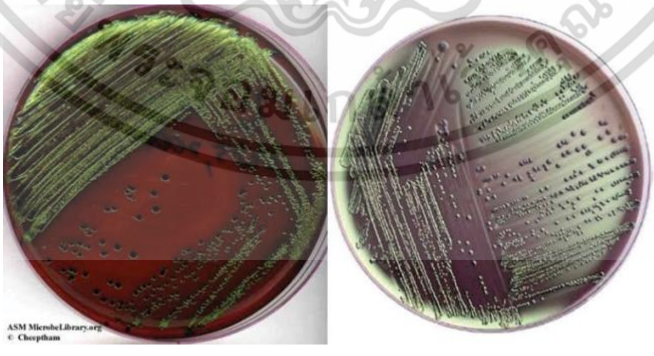
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรีย *Escherichia coli*

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E.coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (Rod shape) โคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหาร EMB จะมีลักษณะกลมสีเขียวมันเงา เรียกว่า Metallic sheen (ดังรูปที่ 2.1) โดยบางชนิดเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ถ้าเลี้ยงไว้ใหม่ๆจะมีลักษณะ Coccobacilli ซึ่งเป็นแท่งที่มีลักษณะสั้นและอ้วน หรือมีลักษณะโคโลนีกลมๆโค้งนูน ขอบเรียบและมีขอบชัดเจน แต่เมื่อเลี้ยงไว้นานจะเป็นแท่งที่ยาวขึ้นทั้งนี้ลักษณะรูปร่างจะขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่สร้างสปอร์ *E.coli* เป็นแบคทีเรียประเภท Facultative anaerobe คือเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37°C แต่สามารถเจริญที่ 45°C ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางได้ pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.8 - 7.5 อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Escherichia* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มซึ่งบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้อาหารเสียและบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค *E.coli* สามารถพบในแหล่งดิน แหล่งน้ำ บนพืช ในทางเดินอาหารของคน สัตว์เลือดอุ่น นก และในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีการสัมผัสโดยคน เชื้อนี้ไม่ทนความร้อน การที่พบ *E. coli* ในอาหารที่ผ่านความร้อนโดยการพาสเจอร์ไรส์หรือทำให้สุกแล้ว ชี้ให้เห็นถึงการปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อน (Recontamination) ดังนั้นจึงใช้ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ดัชนี (Indicator organism) บ่งชี้ถึงสุขลักษณะที่ดีในการผลิตอาหารโดยเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มฟิคอลโคลิ-ฟอร์ม (Fecal coliform) (Food Network Solution, 2014)



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

ที่มา: Aryal, 2020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 นิเวศวิทยาของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

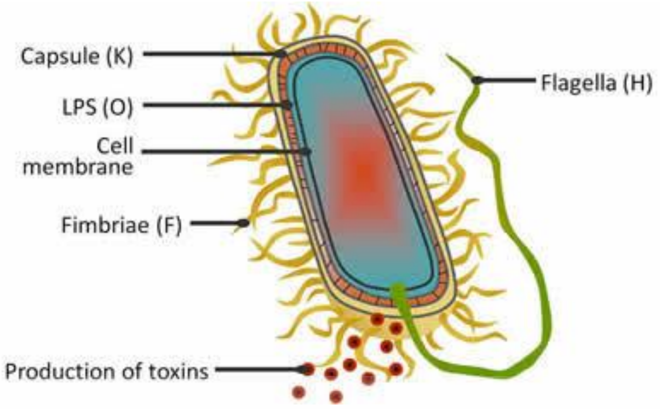
E. coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่สามารถพบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้ที่ย่อยอาหารปกติ แต่เมื่อใดที่เชื้อรุกล้ำเข้าสู่ระบบต่างๆของร่างกายจะทำให้เกิดโรคได้ โดยที่พบบ่อยในคน ได้แก่ โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและโรคท้องเดิน สำหรับโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะมักพบในผู้หญิง โดยได้รับเชื้อจากทางเดินอาหารที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณปากท่อปัสสาวะ และโรคท้องเดิน ได้รับเชื้อจากการรับประทานอาหาร หรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยปกติสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคท้องเดินส่วนใหญ่นั้นจะก่อโรคไม่รุนแรงและสามารถหายเองได้ แต่ก็มีบางสายพันธุ์ส่วนน้อยที่สามารถทำให้เกิดอาการรุนแรงได้ เช่น ถ่ายอุจจาระเป็นมูลเลือด ถ่ายอุจจาระมีเลือดปน ถ่ายอุจจาระมากจนเกิดภาวะขาดน้ำหรือไตวายได้ (Mahidol, 2019)

2.1.3 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Escherichia coli*

แบคทีเรีย *E. coli* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37°C แต่สามารถเจริญที่ 45°C pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.8 - 7.5 อนุกรมวิธานของเชื้ออยู่ในคลาส Gammaproteobacteria ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Escherichia* มีค่า water activity a_w = 0.95 สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* แสดงในตารางที่ 2.1 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 โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลแลคโตส นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อ *E. coli* ได้ด้วยวิธีทางโมเลกุล ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบ (Tille, 2014)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แอนติเจนของ *E. coli*

ที่มา: Ecl, 2004

จากรูปที่ 2.2 แอนติเจนของ *E. coli* มีอยู่หลายชนิด ได้แก่ Somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบลิโพพอลีแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide) พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อนถึง 121°C ทนกรดอ่อนและแอลกอฮอล์

Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบพอลีแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) มักพบห่อหุ้มเซลล์ เช่น Capsule, Fimbriae ที่หุ้มตัวแบคทีเรีย

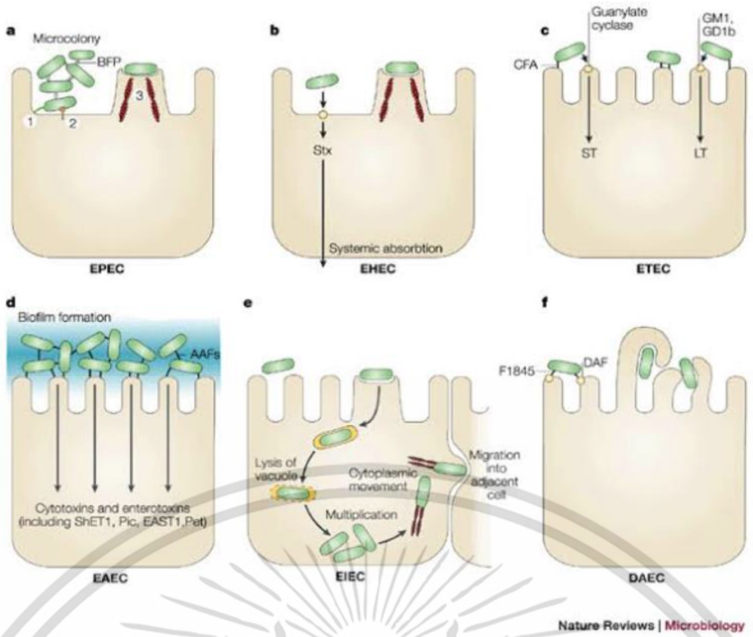
Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของแฟลกเจลลาประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า Flagellin ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100°C สายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่ไม่พบ H-antigen

O, K และ H antigens มีคุณสมบัติทางกายภาพและภูมิคุ้มกันวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจำแนก Serotype ของแบคทีเรียรวมถึงการตรวจสอบทางระบาดวิทยาสามารถใช้แอนติเจนเหล่านี้บ่งชี้ (Tille, 2014)

2.1.4 การก่อโรคของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การศึกษาในหลอดทดลองและอาจไม่ได้สะท้อนถึงอาการที่เกิดขึ้นในมนุษย์ที่ติดเชื้ออย่างสมบูรณ์ **a.** EPEC ยึดติดกับ Enterocytes ของลำไส้เล็ก แต่ทำลาย Microvillar ปกติ ทำให้เกิดลักษณะการเกาะติดและดิ้นการหลุดของแผล ความผิดปกติของโครงกระดูกจะมาพร้อมกับการตอบสนองต่อการอักเสบและอาการท้องเสีย 1. การยึดเกาะเริ่มต้น 2. การโอนย้ายโปรตีนตามการหลั่งประเภท III 3. การสร้างฐาน **b.** EHEC ยังกระตุ้นให้เกิดแผลเกาะติดและหลุดออกไปแต่ในลำไส้ใหญ่ คุณลักษณะที่โดด-เด่นของ EHEC คือการสร้างสารพิษ Shiga ซึ่งการดูดซึมอย่างเป็นระบบซึ่งนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ **c.** ETEC ยึดติดกับเอนเทอโรไซต์ของลำไส้เล็กและทำให้เกิดอาการท้องเสียเป็นน้ำโดยการหลั่งของเอนเทอโรทอกซินที่เกิดจากความร้อน และ/หรือ เอนเทอโรทอกซินที่คงความร้อน **d.** EAEC ยึดติดกับเยื่อบุลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ในไบโอฟิล์มหนา และอธิบายรายละเอียดสารคัดหลั่งเอนเทอ-โรทอกซินและไซโตทอกซิน **e.** EIEC บุกรุกเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ แยกฟาโกโซม และเคลื่อนผ่านเซลล์โดยการสร้างนิวเคลียสไมโครฟิลาเมนต์แอกติน แบคทีเรียอาจเคลื่อนที่ไปทางด้านข้างผ่านเยื่อบุผิวโดยการแพร่กระจายจากเซลล์สู่เซลล์โดยตรง หรืออาจออกและกลับเข้าไปในพลาสมาเมมเบรนด้านข้างเบโซ **f.** DAEC กระตุ้นให้เกิดผลการถ่ายทอดสัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะในเอนเทอโรไซต์ของลำไส้เล็ก ซึ่งแสดงออกมาเป็นการเจริญเติบโตของส่วนยื่นคล้ายเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายนิ้วยาว ซึ่งพันรอบแบคทีเรีย AAF, Fimbriae การยึดเกาะแบบรวม

ที่มา: Kaper et al, 2004

Escherichia coli (เป็นสาเหตุของการติดเชื้อนอกลำไส้) หลายชนิด, รวมทั้งเอนโดท็อกซิน, เป็นขนพิลไลผลิตแคปซูลที่สื่อกลางในการยึดติดเจ้าบ้าน การติดเชื้อแบคทีเรียทางเดินปัสสาวะ แบคทีเรียในเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบของทารกแรกเกิดและการติดเชื้อในโรงพยาบาลบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย สาเหตุที่พบบ่อยที่สุดคือ การติดเชื้อในโรงพยาบาล จากรูปที่ 2.3 แสดงถึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ETEC Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ซึ่งผลิตสารพิษที่แตกต่างกัน เป็นสาเหตุสำคัญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในประเทศกำลังพัฒนา อาการท้องร่วงของเด็กและพวกนักเดินทาง มีลักษณะถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำที่ปนเปื้อน

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

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ปัจจัยความรุนแรงไม่แน่นอนแต่พบสิ่งบุกรุก Entercytes ที่เยื่อยุลำไส้ใหญ่ในลักษณะที่เกือบเหมือน Shigella โรคบิด (เนื้อร้าย, แผล และการอักเสบของลำไส้ใหญ่) มักพบในเด็กเล็กที่อาศัยอยู่ในพื้นที่สุขาภิบาลไม่ดี

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

Diffusely adherent *E. coli* (DARC) อุจจาระร่วงจากเชื้อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ DAEC ยังไม่เป็นที่ยอมรับ เพราะผลจากการศึกษาเชื้อ DAEC ในผู้ป่วยและคนปกติในต่างภูมิภาคให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันในความสามารถก่อโรค การแยกแบคทีเรีย *E. coli* จากอุจจาระ นำเชื้อมาทดสอบการเกาะติดแบบ Diffusely adherence กับเซลล์เพาะเลี้ยง HEp-2 หรือ HeLa ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ DAEC

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

2.1.5 การแยกแบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli มีการหมักน้ำตาลแลคโตส เกิดการอินโดล ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (MAC) จะเกิดโคโลนีสีชมพูกับรอบโคโลนีสีชมพูเข้ม ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ HE หรือ Hektoen enteric agar (HEK) จะเกิดสีเหลืองเหมือนกับการเกิดโคโลนีเชื้อนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD) มีสีเหลืองเหมือนกัน อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

methylene blue agar (EMB) จะหมักแลคโตสเกิดสีดำน้ำเงินและ Metallic green sheet บนอาหาร ส่วนตัวโคลิฟอร์มอื่นหมักเกิดโคโลนีสีชมพู (Tille, 2014) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli* (Difco Lab, 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 ส่วนฟีคอลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มของโคลิฟอร์ม แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากระบบทางเดินอาหารโดยตรง แบคทีเรียพวกนี้ ได้แก่ *Escherichia coli (E. coli)* ถ้าหากมีการตรวจพบในน้ำ แสดงว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนจากอุจจาระโดยตรงหรือโดยอ้อม โคลิฟอร์มแบคทีเรียสามารถย่อยแลคโตส ได้ที่อุณหภูมิ 35±0.5°C ให้ผลเป็นกรดและแก๊ส แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดอื่น และยีสต์สามารถย่อยแลคโตสได้เช่นเดียวกัน จึงทำการทดสอบยืนยันเพื่อบ่งชี้ว่าเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียหรือฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยถ่ายเชื้อหรือของเหลวบางส่วนจาก อาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดแก๊สลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5°C และ EC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 + 0.2°C ทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นและยีสต์จะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญเติบโต แก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth จะเกิดจาก โคลิฟอร์มแบคทีเรียและแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium จะเกิดจากฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จากนั้นนำจำนวนหลอดที่เกิดแก๊สเทียบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟีคัล-โคลิฟอร์มแบคทีเรียจาก ตารางดัชนี MPN (จุรีย์รัตน์, 2548)

การทดสอบขั้นแรก (Presumptive test) การทดสอบขั้นนี้เป็นการตรวจสกีนเบื้องต้นเพื่อจะแยกโคลิฟอร์มแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการทดสอบอาจใช้ระบบเลี้ยงเชื้อแบบ 3 หลอด หรือ แบบ 5 หลอด ที่ระดับความเจือจาง 3 การเจือจาง คือ จำนวนมิลลิลิตรของตัวอย่างที่ต่างกันเป็นชุด 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 (จุรีย์รัตน์, 2548)

การทดสอบขั้นยืนยัน (Confirm test) เนื่องจากการเกิดแก๊สในการทดสอบขั้นแรกยังไม่สามารถชี้ชัด ได้ว่าแบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างน้ำเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียหรือฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องทดสอบ ยืนยันโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C เพื่อทดสอบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ EC medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 + 0.2 °C เพื่อ ทดสอบหาฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (จุรีย์รัตน์, 2548)

การทำ Completed test สำหรับตรวจหา *E. coli* ทำได้โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร EC broth มาลากลงบนอาหาร Levin's Eosin Methylene Blue (L-EMB) Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5°C แล้วจึงตรวจดูลักษณะของโคโลนีจัดว่าเป็น *E. coli* (จุรีย์รัตน์, 2548)

การคำนวณหาค่า MPN

1. การคำนวณหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth มาเทียบค่า MPN จากตาราง MPN Index ปริมาณโคลิฟอร์ม แบคทีเรีย จะมีหน่วยเป็น MPN/100 มิลลิลิตร ทั้งนี้อนุกรมของตัวอย่างต้องเท่ากับ 10, 1.0, 0.1 มิลลิลิตร

2. การคำนวณหาปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยง เชื้อ EC medium มาเทียบค่า MPN จากตาราง MPN Index Table ปริมาณฟีคัลโคลิ-ฟอร์ม แบคทีเรียจะมี หน่วยเป็น MPN/100 มิลลิลิตร ทั้งนี้อนุกรมของตัวอย่างต้องเท่ากับ 10 1.0 0.1 มิลลิลิตร กรณีที่ใช้อนุกรมของตัวอย่าง เท่ากับ 1.0 0.1 0.01 มิลลิลิตร. ค่า MPN ที่ได้จะมีค่าเป็น 10 เท่าของค่าที่อ่านได้จากตาราง หรือถ้าใช้อนุกรมของ ตัวอย่างเท่ากับ 0.1 0.01 0.001 มิลลิลิตร ค่า MPN ที่ได้ จะมีค่าเป็น 100 เท่าของค่าที่อ่านได้จากตาราง เป็นต้น บางครั้งจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไม่มีอยู่ในตาราง MPN Index จะต้องหาค่า MPN/100 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรในการคำนวณ (IMPACT, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage)

2.2.1 ความสำคัญและการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

คำว่า "แบคเทอริโอเฟจ" มาจากคำภาษากรีก phaegin ซึ่งแปลว่า "กิน" เพราะแบคเทอริโอเฟจดูเหมือนจะ "กิน" แบคทีเรีย เมื่อพวกมันเข้าติดเชื้อกับแบคทีเรีย สิ่งนี้ไม่เป็นความจริงอย่างแน่ชัด แม้ว่าแบคเทอริโอเฟจจำนวนมากจะนำส่วนประกอบของเซลล์กลับมาใช้ใหม่และใช้ส่วนประกอบเหล่านี้เพื่อสร้างตัวมันเองให้มากขึ้นก็ตาม โดยทั่วไป การติดเชื้อของเซลล์แบคทีเรียเซลล์เดียวโดยแบคเทอริโอเฟจเดี่ยวส่งผลให้เกิดการสร้างอนุภาคแบคเทอริโอเฟจรุ่นลูกหลานจำนวนมาก สิ่งนี้มาพร้อมกับการสลายความสมบูรณ์ของเซลล์โดยสมบูรณ์ เรียกว่า Lysis ซึ่งจะปล่อยแบคเทอริโอเฟจใหม่ออกมาเพื่อให้สามารถกระจายและค้นหาเซลล์ใหม่ที่จะติดเชื้อได้ กระบวนการที่แบคเทอริโอเฟจร้างอนุภาคแบคเทอริโอเฟจใหม่ผ่านการติดเชื้อและการสลายของเซลล์เจ้าบ้านเรียกว่า Lytic cycle

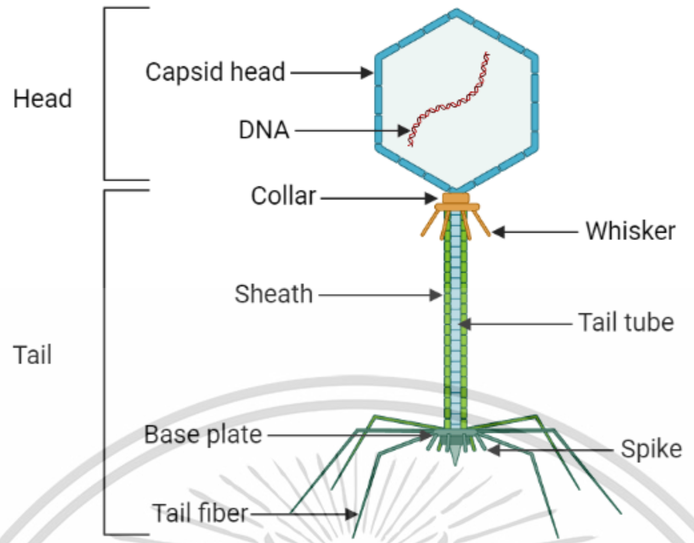
ไวรัสของแบคทีเรียหรือแบคเทอริโอเฟจ คือไวรัสที่แพร่เชื้อไปยังเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านและมีคุณสมบัติเหมือนกันกับไวรัสทุกชนิด ประการแรก ไม่สามารถทำซ้ำได้ด้วยตัวเองพวกมันต้องการเซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวนลูกหลาน โดยใช้ประโยชน์จากกลไกเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน และเปลี่ยนเส้นทางไปสู่การเพิ่มจำนวนลูกหลานของไวรัส ประการที่สอง เช่นเดียวกับไวรัสอื่นๆ แบคเทอริโอเฟจมีความเฉพาะเจาะจงสำหรับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเฉพาะ ช่วงของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน สามารถจำกัดอยู่ที่แบคทีเรียสายพันธุ์เดียว หรืออาจขยายไปถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แม้กระทั่งจำพวกก็ได้ อย่างไรก็ตามมีแบคเทอริโอเฟจเพียงไม่กี่ชนิด (ถ้ามี) ที่มีช่วงเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host range) ที่ครอบคลุมลำดับแบคทีเรียที่แตกต่างกัน และการมีระยะโฮสต์ที่ครอบคลุมไฟลัมต่างกันมีโอกาสน้อยกว่าด้วยซ้ำ (Seaphages.org, 2013)

2.2.2 นิเวศวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ

ตามแนวคิดบริเวณที่มีแบคทีเรียเจ้าบ้านบริเวณนั้นจะมีแบคเทอริโอเฟจ ตามบริเวณดิน น้ำ ผู้ป่วย โดยมีคุณสมบัติของไวรัส เป็นปรสิตภายในเซลล์ที่แท้จริงอาศัยในแบคทีเรีย โปรโตซัว ฟังไจ สาหร่าย พืชและสัตว์ สามารถมีปฏิกิริยาได้เมื่อเข้าเซลล์เจ้าบ้านถ้านอกเซลล์จะไม่มีปฏิกิริยา โครงสร้างพื้นฐานของแคปซิดห่อหุ้มสารพันธุกรรม กรดนิวคลิอิกสามารถเป็นได้ทั้ง DNA หรือ RNA เป็นได้อย่างใดอย่างหนึ่งแต่ไม่ได้ทั้งคู่ โดยจะมี Double stranded DNA, single stranded DNA, Single stranded RNA และ Double stranded RNA ตัวของโฮสต์ต้องมี Receptor เฉพาะกับไวรัสส่วนใดส่วนหนึ่งอนุภาคไวรัสเสมอมี Spike ไปเข้ากับเซลล์โฮสต์เรียก Receptor บนเซลล์เจ้าบ้านยึดเกาะนำตัวมันเองเข้าเซลล์ Virion ขนาดเล็กแตกเอนไซม์และกลไกสังเคราะห์โปรตีนตัวไรโบโซม (Ackermann, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สัณฐานวิทยาแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli*



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ T4

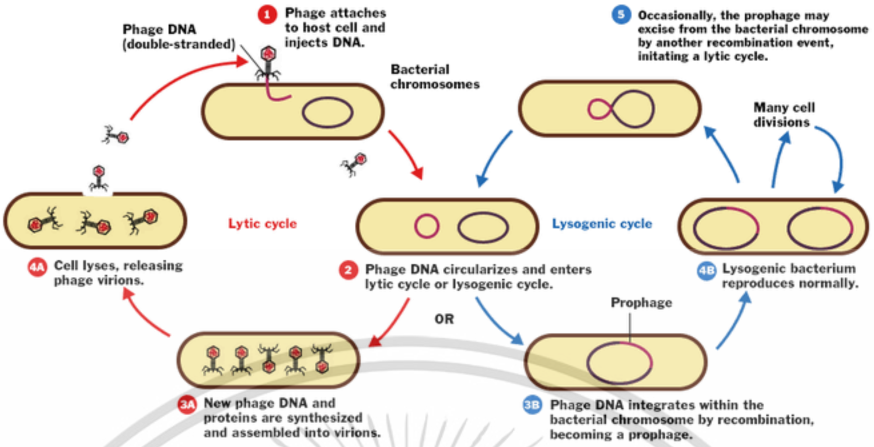
ที่มา: Coaching, 2021

โดยไวรัสที่มี Short non-contractile tail จะเป็นพวก *Podoviridae* ส่วน Contractile tail จะเป็นพวก *Myoviridae* และส่วน Long non-contractile tail จะเป็นพวก *Siphoviridae* ในส่วนของ Head ที่ Capsid head มีสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจอยู่ตามลักษณะกรดนิวคลิอิก dsDNA รูปร่างของไวรัส Helical, Icosahedral และ Complex (ดังรูปที่ 2.4) ไวรัสที่มี Envelope มี Envolaped และ Naked คือไม่มี Envelope อนุภาคของแบคทีเรียมีหลายรูปร่างและขนาด แต่ส่วนใหญ่เป็นไวรัสหางที่มีจีโนม DNA แบบเกลียวคู่ (dsDNA) (Oder *Caudovirales*) ในแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้ จีโนม DNA เชิงเส้นจะบรรจุอยู่ภายในเปลือกโปรตีน (หัวหรือแคปซิด) ซึ่งติดอยู่ที่หางแบคเทอริโอเฟจในลำดับอื่นอาจมี DNA สายเดี่ยว (ssDNA) หรือ RNA และสามารถห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มไขมัน มีโครโมโซมหนึ่งโครโมโซมหนึ่งตัวหรือมากกว่า หรือมีโครงร่างอื่นๆ ที่หลากหลาย แบคเทอริโอเฟจอาจมียีนเพียงไม่กี่ยีนหรือมากกว่า 500 ยีน แต่โดยทั่วไปแล้วแบคเทอริโอเฟจหาง dsDNA จะมียีน 50–250 ยีน (โปรดทราบว่าจำนวนนี้น้อยกว่าโฮสต์ของแบคทีเรียซึ่งอาจมียีนมากกว่า 6,000 ยีน) (Seaphages.org, 2013)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 วัฏจักรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ



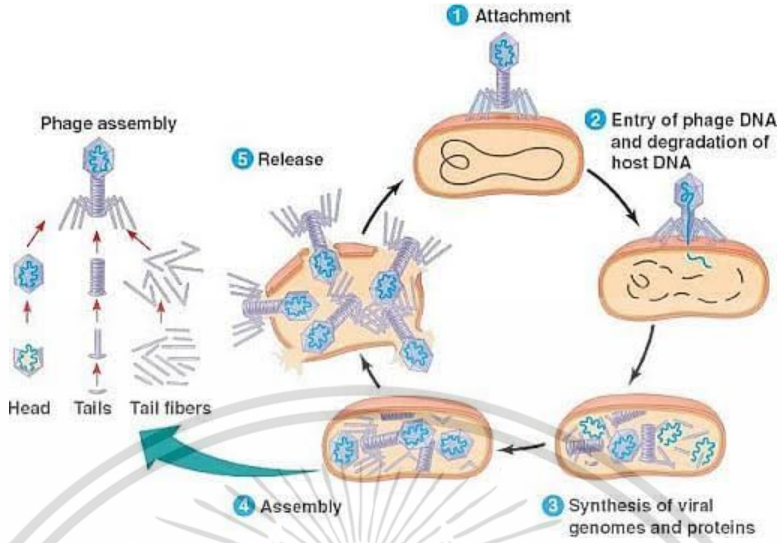
รูปที่ 2.5 Lytic และ lysogenic cycle

ที่มา: GeeksforGeeks, 2024

จากรูปที่ 2.5 ไวรัสมีวัฏจักรชีวิต 2 รูปแบบหลักคือ Lytic cycle หรือ Lytic state และ Lysogeny state หรือ Lysogenic cycle หรือ Lysogenic conversion โดยเราเริ่มจากการเกาะของแบคเทอริโอเฟจเกาะเข้าตัวเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน เข้าสู่ผนังเซลล์ เรียกระยะว่า Adsorption จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Penetration เป็นระยะที่สามารถตัดสินใจว่าจะให้ไปกระบวนการ Lytic หรือกระบวนการ Lysogenic โดนส่วนใหญ่จะเกิดกระบวนการไลติกมากกว่าคือการที่สารพันธุกรรมจากไวรัสที่เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน แล้วจะจัดตัวเองให้อยู่ในรูปคล้ายพลาสมิด แล้วดำเนินการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและสร้างโปรตีนต่างๆ ที่จำเป็นต่อการประกอบเป็นเซลล์ใหม่ เมื่อสร้างสารต่างๆ และประกอบตัวเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์แล้วจะปล่อยไลโซไซม์ย่อยเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อปลดปล่อยลูกหลานไวรัสออกมา ส่วนน้อยจะเป็น Lysogenic หรือ Prophage pathway เป็นวงชีวิตที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสผ่านการแบ่งเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน เพราะเมื่อไวรัสส่งสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน แล้วสารพันธุกรรมจะเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน ด้วยการใช้เอนไซม์ Integrase ซึ่งในระหว่างนั้นสารพันธุกรรมของไวรัสจะไม่กำหนดการสร้างอะไร คล้ายกับฝังตัวนิ่งๆ อยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรียและเพิ่มจำนวนไปพร้อมๆ กับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียจนเมื่อถึงสภาวะที่เหมาะสมจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรีย และจัดรูปแบบตัวเองเป็นพลาสมิดซึ่งทำให้เกิดการดำรงชีวิตในวงจร Lytic pathway ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 กลไกของแบคเทอริโอเฟจไลติก (Lytic phage) ในการทำลายแบคทีเรีย



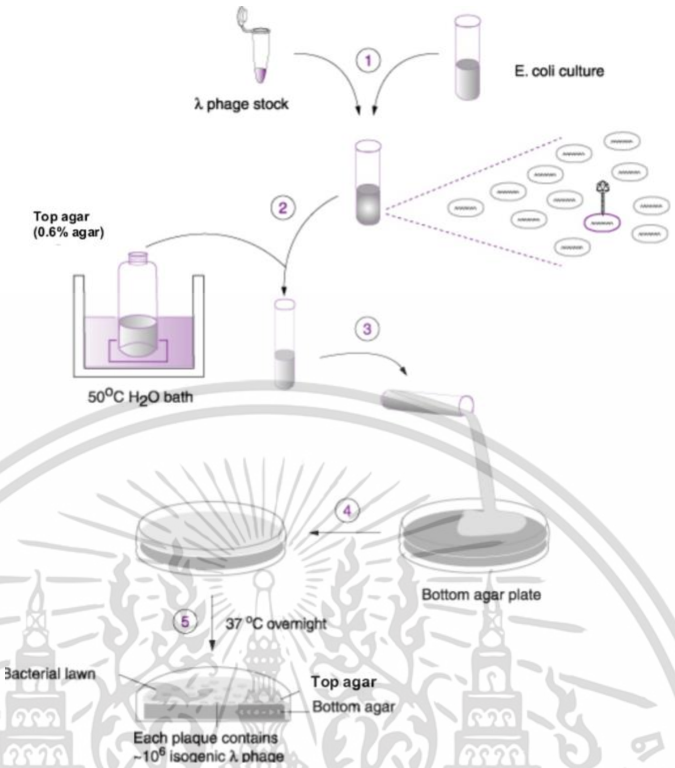
รูปที่ 2.6 Lytic phage

ที่มา: Chemate et al., 2015

กระบวนการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจไลติกสามารถแบ่งได้หลายระยะ (ดังรูปที่ 2.6) ระยะแรกจะเป็นการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจกับตัว Receptor แบคทีเรียเจ้าบ้านเรียกว่า Adsorption แบคเทอริโอเฟจที่เกาะกับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ลงไปในไซโต-พลาสซึมแล้วฉีดสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเข้าจีโนมของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน เริ่มปิดระบบโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจและเกิดการสังเคราะห์ส่วนโครงสร้างและส่วนสารพันธุกรรม สร้างส่วนโปรตีนก่อนแล้วค่อยจำลอง (Replicate) ส่วนอื่นช่วงท้าย ส่วนประกอบโครงสร้างของแบคเทอริ-โอเฟจครบแล้วค่อยประกอบรวมกันเป็น Bacteriophage assembly line เป็นลูกหลานแบคเทอริ-โอเฟจออกมาแล้วเพิ่มจำนวนสมบูรณ์ไปเรื่อยๆ โดยลูกหลานแบคเทอริโอเฟจ (Phage progeny) ออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิด Burst size เซลล์ออกมาปลดปล่อยลูกหลานออกนอกเซลล์แบคทีเรียเจ้า-บ้านแตกตาย (Lysis) (Clokie & Kropinski, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 Plaque assay



รูปที่ 2.7 Plaque assay

ที่มา: Wirusologii et al., 2015

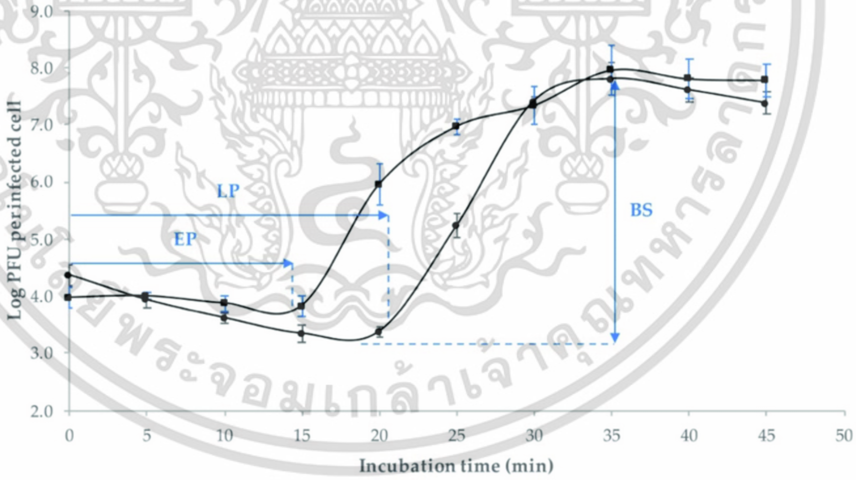
จากรูปที่ 2.7 การทดสอบ Plaque assay จะช่วยให้ยืนยันการมีอยู่ของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างได้ด้วยสายตา เป็นการวิเคราะห์ที่สามารถใช้สำหรับการแยกแบคเทอริโอเฟจ การทำให้บริสุทธิ์ และเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ในการทดสอบแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านจะถูกผสมกับตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจและเติบโตในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นบน (Top agar) หากมีแบคเทอริโอเฟจอยู่ พวกมันจะเข้าติดเชื้อและแพร่กระจายเพิ่มจำนวนลูกหลานภายในเซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรียและฆ่าเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเรียกว่า Lytic phage ในกระบวนการนี้ แบคเทอริโอเฟจที่ถูกเพิ่มขึ้นใหม่จะแพร่กระจายภายในวุ้นและเข้าติดเชื้อกับเซลล์เจ้าบ้านต่อไป และการแตกตายของแบคทีเรียโฮสต์ในบริเวณใกล้เคียงจะเกิดผลให้พื้นที่เกิดวงใสที่มองเห็นได้ที่เรียกว่า พลาค (Plaque) จะปรากฏชัดเจนบนพื้นที่ที่มีแบคทีเรีย โปรดทราบว่าแต่ละพลาคที่เกิดขึ้นจากอนุภาคแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์จะมีเพียงอนุภาคเดียว (Clokie & Kropinski, 2009)

2.2.7 การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (One-step growth curve)

เพื่อกำหนดระยะเวลาแฝง (Latent period) (ช่วงเวลาระหว่างการดูดซับของแบคเทอริโอเฟจไปยังเซลล์แบคทีเรียและปล่อยแบคเทอริโอเฟจรุ่นลูกออกมา) และ Burst size (อัตราส่วนของการนับจำนวนสุดท้ายของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ปล่อยออกมาต่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงระยะเวลาแฝง) ของแบคเทอริโอเฟจ การทดลองการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ Burst size และ Latent period ถูกวิเคราะห์ด้วยการใช้กราฟการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ในการทดลองมีการสังเกตการเพิ่มจำนวนของไวรัส การเข้าติดเชื้อจะเกิดขึ้นพร้อมกัน เนื่องจากมีการปล่อยเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในปริมาณที่มากเกินไปจนติดเชื้อด้วยอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ นั่นหมายถึงการติดเชื้อของอนุภาคจำนวนมากไปยังโฮสต์พร้อมกัน ตัวแบคเทอริโอเฟจที่กำลังเกิดขึ้นกับจำนวนเซลล์เจ้าบ้าน (โฮสต์) ที่มากเกินไปจะติดเชื้อด้วยอนุภาคแบคเทอริโอเฟจในอัตราส่วน 1:10 ในระหว่างการทดลองการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ คุณ Delbriick และ Ellis (1939) ได้ผสมเซลล์ *E. coli* กับ T4 phage หลังจากช่วงเวลาสั้น ๆ ส่วนผสมจะถูกเจือจางเพื่อไม่ให้แบคเทอริโอเฟจเกิดการเข้าติดเชื้อรอบที่สองกับเซลล์เจ้าบ้านตัวเดิม จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางแล้วไปบ่ม และเมื่อเวลาผ่านไปตัวอย่างจะถูกนำออกเพื่อหาจำนวนของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ติดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ปล่อยออกมาจากแบคทีเรียจะถูกกำหนดตามช่วงเวลาที่ต่างกันโดยใช้วิธีการทดสอบการเกิดพลาค จำนวนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจเทียบกับเวลา ช่วง Latent period จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากเพิ่มแบคเทอริโอเฟจของช่วง Log phase ในช่วงเวลานี้จะไม่มีการปล่อยแบคเทอริโอเฟจ ในระยะเวลาต่อมาจะมีการปล่อยลูกหลานแบคเทอริโอเฟจออกมาอย่างรวดเร็ว และท้ายที่สุดจะเข้ามาถึงช่วง Stationary phase ซึ่งจะไม่มีแบคเทอริโอเฟจเกิดขึ้นอีก (Microbiology note, 2022) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กราฟการเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ *E. coli*

ที่มา: Liao et al., 2019

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยของ Dalmasso et al. (2016) ศึกษาแบคเทอริโอเฟจสามชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการใช้สำหรับ Phage Therapy จากลำไส้ของมนุษย์ แบคเทอริโอเฟจ (Coliphages) ทั้งสามชนิด ได้แก่ ϕAPCEc01, ϕAPCEc02 และ ϕAPCEc03 แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ จากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.01, 10 นาที ที่ 37 °C และ Dilute culture ด้วยอาหาร LB broth ที่เสริมด้วย 10 mM $MgSO_4$ พบว่า ϕAPCEc01, ϕAPCEc02 และ ϕAPCEc03 มี Latent period เท่ากับ 10, 0, 10 นาที ตามลำดับ และ Rise period เท่ากับ 60, 50, 50 นาที ตามลำดับ

Fan et al. (2012) ได้ทำการศึกษาวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำเสียในโรงพยาบาลด้วยการใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* ดื้อยาที่ได้จากทางสถานพยาบาล จุดมุ่งหมายหลักของการศึกษานี้เพื่อแยกแบคเทอริโอเฟจชนิดใหม่ที่มีการเข้าติดเชื้อแบบ Broad-spectrum จากน้ำเสียในโรงพยาบาล จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคเทอริโอเฟจ *E. coli* 18 ตัวที่ถูกแยกได้ โดยเลือก *E. coli* bacteriophage E12P1 นำมาศึกษาคุณสมบัติความกว้างเจ้าบ้าน spectrum ต่อไป ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า แบคเทอริโอเฟจ E12P1 มีลักษณะเป็นลูกบาศก์สมมาตร (Cubic symmetry) และมีหางยาว จากการทำ One-step growth curve แบคเทอริโอเฟจ E12P1 ที่ MOI 0.1, 15 นาที ที่ 37°C ในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่ามี Latent period คือ 30 นาที Rise period คือ 20 นาที และ Burst size คือ 43 PFU/cell.

Kim et al. (2021) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ Polyvalent Phage ชนิดใหม่และประสิทธิภาพในการเข้าติดเชื้อกับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. และ *Shigella sonnei*. แบคเทอริโอเฟจ KFS-EC3 แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากโรงฆ่าสัตว์และทำให้บริสุทธิ์ จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.001, 6 นาที ที่ 37 °C พบว่า แบคเทอริโอเฟจ KFS-EC3 มี Latent period เท่ากับ 20 นาที, Rise period เท่ากับ 30 นาที และ Burst size เท่ากับ 71 PFU/cell

Lee et al. (2016) ได้ศึกษาคุณสมบัติและจีโนมของแบคเทอริโอเฟจ HY01 ชนิดใหม่ ที่สามารถเข้าติดเชื้อทั้งแบคทีรีย *Escherichia coli* O157:H7 และ *Shigella flexneri*: ศักยภาพในการเป็นสารควบคุมทางชีวภาพในอาหาร โดยแยกแบคเทอริโอเฟจ HY01 ได้จากตัวอย่างอุจจาระสุกร และนำมาทำให้บริสุทธิ์ จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.001, 20 นาที ที่อุณหภูมิห้องพบว่า มี Latent period เท่ากับ 25 นาที, Rise period เท่ากับ 10 นาที และ Burst size เท่ากับ 25 PFU/cell ของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 และมี Latent period เท่ากับ 15 นาที, Rise period เท่ากับ 15 นาที และ Burst size เท่ากับ 100 PFU/cell ของแบคทีเรีย *S. flexneri*

Liao et al. (2019) ได้ศึกษาคุณสมบัติ Lytic Bacteriophage ในการเป็นสารต้านจุลชีพสำหรับใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพของสายพันธุ์ *Escherichia coli* O145 ที่ผลิตสารพิษ Shiga พบว่า *Escherichia* phage vB_EcoS-Ro145clw (Ro145clw) ของ *E. coli* O145 (RM10808) ที่ถูกแยกได้จากตัวอย่างปุ๋ยหมักและทำให้บริสุทธิ์ แบคเทอริโอเฟจ Ro145clw สามารถลด *E. coli* O145:H28 ใน Lysogeny broth ได้ประมาณ 5 log ที่ 37 °C ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.01, 2 นาที ที่อุณหภูมิห้องพบว่า มี Latent period เท่ากับ 21 นาที, Rise period เท่ากับ 15 นาที และ Burst size เท่ากับ 192 PFU/cell

Lu & Breidt. (2015) ทำการศึกษาแบคเทอริโอเฟจ ϕ241 ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* O157:H7 ที่แยกได้จากอุตสาหกรรมการหมักแตงกวาที่มีความเป็นกรดและความเค็มสูง โดยแบคเทอริโอเฟจ ϕ241 แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากถังหมักของโรงงานอุตสาหกรรมหมักแตงกวาและนำมาทำให้บริสุทธิ์ จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.01, 10 นาที ที่ 37 °C พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕ241 มี Latent period เท่ากับ 15 นาที, Rise period เท่ากับ 15 นาที และ Burst size เท่ากับ 53 PFU/cell

Necel et al. (2020) ศึกษาคุณสมบัติแบคเทอริโอเฟจ vB_Eco4M-7 ที่สามารถเข้าติดเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* O157 (ST2–8624) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการแยกแบคเทอริโอเฟจ vB_Eco4M-7 (grey squares) ได้จากตัวอย่างน้ำเสียในเมืองที่รวบรวมมาจากโรงงานบำบัดน้ำเสียที่ Gdansk ในประเทศโปแลนด์ จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.1, 10 นาที ที่ 37 °C และ Dilute culture ด้วยอาหาร LB broth (เสริมด้วย 3 mM sodium azide) พบว่า Burst size เท่ากับ 100 PFU/cell

Sun et al. (2022) ได้ศึกษาแบคเทอริโอเฟจ *Escherichia* Phage vB_EcoP-Ro45lw ชนิดใหม่ที่มีลักษณะคล้าย *Kayfunavirus* แบคเทอริโอเฟจแยกได้จากตัวอย่างปุ๋ยหมัก (Non-fecal compost sample) และทำให้บริสุทธิ์ จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.01 (เสริมด้วย 10 mM $CaCl_2$) บ่มที่ 37 °C, 5 นาที พบว่า มี Latent period เท่ากับ 15 นาที, Rise period เท่ากับ 20 นาที และ Burst size เท่ากับ 55 PFU/cell

Wang et al. (2006) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการรักษาของแบคเทอริโอเฟจในการช่วยชีวิตหนูจาก *Escherichia coli* ที่ผลิต β-lactamase โดยแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียของโรงพยาบาล Tongji พบว่า จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.01, 5 นาที ที่ 37 °C พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕ 9882 มี Latent period เท่ากับ 30 นาที, Rise period เท่ากับ 50 นาที และ Burst size เท่ากับ 112 PFU/cell

Yıldızlı et al. (2020) ทำการศึกษากิจกรรมการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ Coliphages บน Macrophages ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในหลอดทดลอง การศึกษานี้ได้แยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำเสียและทำให้บริสุทธิ์ จากการทำ One-step growth curve ที่ MOI 0.001, 5 นาที ที่ 37 °C พบว่าแบคเทอริโอเฟจ P1 มี Latent period เท่ากับ 25 นาที, Rise period เท่ากับ 15 นาที และ Burst size เท่ากับ 105 PFU/cell และแบคเทอริโอเฟจ P2 มี Latent period เท่ากับ 20 นาที, Rise period เท่ากับ 30 นาที และ Burst size เท่ากับ 77 PFU/cell

นอกจากนี้การศึกษาของคุณพาร์คค้นพบ Large Burst size ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 1,914 PFU/cell ด้วยการศึกษาคุณสมบัติของ Lytic phage vB_EcoM-ECP26 และการลดลงของ shiga-toxin ที่เกิดจาก *Escherichia coli* บนผักกาดโรเมน (Romaine) ด้วยการทำ Adsorption จากการใช้ 1 มิลลิลิตร Diluted เจ้าบ้าน ผสมกับ 1 มิลลิลิตร Diluted phage solution แล้วนำมาบ่มลง 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร LBC broth จากนั้นนำไป Incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำ Suspension ไป Centrifuged ที่ความเร็วรอบ 10,000×g, 10 นาที และต่อจากนั้นนำเซลล์ที่ติดเชื้อมา Resuspended อีกครั้งใน LBC broth อีกครั้ง ตัวอย่างจะถูกพักไว้เป็นเวลา 5 นาที ที่ 37 °C และนำไปทำ Plaque assay บ่มที่ 37 °C, ข้ามคืน ซึ่งสามารถทราบ Latent period และ Burst size จากการทำ One-step growth curve พบว่า แบคเทอริโอเฟจ vB_EcoM-ECP26 มีค่า Latent period และ Burst size อยู่ที่ 55 นาที และ 1,914 PFU/cell ตามลำดับ (Park et al., 2020)

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

3.17 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 ตู้ปลอดเชื้อชีวนิรภัย ระดับ 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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 พลาสติกกันกระแทก

3.2.2 กระบอกตวงสารขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2.3 ขวดบรรจุอาหาร (Duran) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.2.4 ขวดแก้ว vial ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2.5 เพลทแก้ว (peti dish) (Union Science Co..Ltd. Thailand)

3.2.6 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.2.7 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.9 ทิปดูดสาร (Micropipette Tip) ขนาด 5 มิลลิลิตร 1,000 และ 200 ไมโครลิตร

3.2.10 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)

3.2.11 แท่งแก้วคนสาร

3.2.12 คิวเวตต์ (Cuvette)

3.2.13 บีกเกอร์ขนาด 50, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.14 กระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)

3.2.15 ไมโครปิเปต ขนาด 0.5-5 มิลลิลิตร, 100-1,000 , 20-200 และ 2-20 ไมโครลิตร

3.2.16 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.2.17 ตัวกรองขนาด 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร

3.2.18 กระบอกอบเพลท

3.2.19 ลูกยางดูดสาร

3.2.20 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) บริษัท Extragene, USA

3.2.21 Eppendorf Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.22 กระบอกฉีดน้ำกลั่น

3.2.23 เวอร์เนียคาลิปเปอร์ดิจิทัล (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.

3.3.6 สารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 M.

3.3.7 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 M., pH 7.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 จุลินทรีย์

แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีทดลอง

3.6.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* stock จากอุณหภูมิ 4 °C ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) มา 1 ลูป จากนั้น Streak plate ลงบนอาหาร LA (Luria agar) บ่มค้างคืน ที่อุณหภูมิ 37 °C ต่อจากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยให้ติดมา 1 ลูป นำไปลงอาหาร LB (Luria broth) บ่มในสภาวะเขย่าข้ามคืน ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 37 °C

3.6.2 การเก็บตัวอย่าง

3.6.2.1 การเก็บตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

เก็บตัวอย่างของแข็งประมาณ 2 กรัม ผสมกับสารละลาย SM buffer มีค่า pH เท่ากับ 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงหลอดปั่นเหวี่ยง (Sterile conical tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร ระหว่างทางนำมาสู่ห้องปฏิบัติการจะเก็บรักษาไว้ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งและเกลือเพื่อรักษาอุณหภูมิ จากนั้นเก็บรักษาไว้ใน 4 °C และนำตัวอย่างมาใช้ให้เร็วที่สุด

3.6.2.2 การเก็บตัวอย่างที่เป็นของเหลว

เก็บตัวอย่างของเหลวมาประมาณ 50 มิลลิลิตร ด้วยการใช้ Syringe โดยเก็บลึกลงไปจากผิวน้ำประมาณ 30 เซนติเมตร เนื่องจากรังสียูวีจากแสงแดดส่งผลต่อแบคเทอริโอเฟจให้แบคเทอริ-โอเฟจนั้นมีประสิทธิภาพการทำให้เซลล์เจ้าบ้านเกิด Lysis ลดลง (Tomlinson, 2010) จากนั้นปิดฝาให้มิดชิดเก็บรักษาไว้ใน 4 °C พ้นจากแสงแดด นำตัวอย่างมาใช้ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้

3.6.3 การสกัดแบคเทอริโอเฟจ (Phage Extraction)

3.6.3.1 การสกัดแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างของแข็ง (Shukla,2019)

นำตัวอย่างที่เก็บมาได้ไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) ด้วยการนำไปวางบน Incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ประมาณ 1 ชั่วโมง จนสารละลายผสมเป็นเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกัน จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที, 20 นาที จากนั้นนำเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ไป Centrifuge อีกครั้ง ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที, 20 นาที และนำส่วนใสที่ได้มากรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยเก็บ Filtrate ที่กรองได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ในขวด Vial ปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.6.3.2 การสกัดแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างของเหลว (Twest & Kropinski, 2009)

นำตัวอย่างของเหลวใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บ Filtrate ที่อุณหภูมิ 4 °C ในขวด Vial ปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.6.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (Enrichment phage)

นำ Filtrate ที่เตรียมได้มา 20 มิลลิลิตร ผสมกับ *E. coli* Inoculum จาก 3.6.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงอาหาร LB 10 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของอาหารเป็นสองเท่าและเสริมด้วย 1mM $CaCl_2$ บรรจุอยู่ในขวด Vial ขนาด 50 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยวันที่ 1, 2, 3, 5, 7 เก็บ Solution ไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำ Filtrate ไปทำ 10-fold serial dilution แล้วนำไปทำ Plaque assay และ Spot test หากไม่พบแบคเทอริโอเฟจใน 7 วันแรกให้บ่มต่ออีก 7 วัน ซึ่งอนุมานว่าแบคเทอริโอเฟจนั้นกำลังปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ โดยการดูดอาหารเก่าออกครึ่งหนึ่งจากนั้นเติมอาหาร LB ที่มีความเข้มข้นสองเท่าใหม่เข้าไป จากนั้นบ่มต่ออีก 7 วัน ด้วยการเก็บ Solution ในวันที่ 8, 9, 10, 12, 14 ไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำ Filtrate ไปทำ 10-fold serial dilution แล้วนำไปทำ Plaque assay และ Spot test เช่นกัน

3.6.5 เทคนิคอาหารวุ้นสองชั้น (Double layer agar method)

3.6.5.1 Spot test

E. coli Inoculum 200 ไมโครลิตร และ Top agar 3 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน จากนั้นเทลง Bottom agar และรอจน Top agar แข็งตัว หลังจากนำ Phage suspension ไปทำ 10-fold serial dilution ด้วย SM buffer เรียบร้อยแล้ว นำแต่ละ Dilution หยดลงบน Top agar ที่แข็งตัวแล้ว หยดละ 10 ไมโครลิตร

3.6.5.2 Plaque assay

Phage suspension 100 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ *E. coli* Inoculum 200 ไมโครลิตร ที่บ่มทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงและมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่ในช่วง Log phase (OD_{600} nm ≈ 0.3) จากนั้นนำไปผสมเข้ากับ Top agar 3 มิลลิลิตร แล้วเทลง Bottom agar ทิ้งจนอาหารแข็งตัว และนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน แล้วตรวจปริมาณพลาคที่เกิดขึ้น (PFU/ml) เปรียบเทียบกับจานควบคุม (Control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.6 การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking technique

เลือก Single plaque โดยใช้ปลายทิป หรือ ไม้จิ้มฟันจิ้มแซะวุ้นรอบวงพลาค และคว้านเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปใส่ลง SM buffer 1 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน Eppendof tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ในตู้เย็น 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปทำ Plaque assay โดยให้ได้ Single plaque และขนาดของพลาคที่เกิดขึ้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากันสม่ำเสมอเหมือนกันทั่วทั้งเพลท ด้วยการทำอย่างน้อย 3 รอบ จะถือว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นั้นบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ใน SM buffer 1 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน Eppendof tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.6.7 การเพิ่มปริมาณและการชะแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธี Phage lysate

โดยการนำแบคเทอริโอเฟจที่บริสุทธิ์แล้วมาทำ Plaque assay ด้วยการบ่มที่ 37 °C, ข้ามคืน หลังจากนั้นเติม SM buffer 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น และนำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วนจานอาหารเมื่อครบทุกๆ 30 นาที หรือบ่มไว้ข้ามคืน จากนั้นดูด SM buffer จากอาหารวุ้นสองชั้นที่บ่มแล้ว เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน ใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) ที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และนำ Supernatant ที่ได้มาทำ Serial dilution แล้วนำมาทำ Plaque assay โดยเก็บวันที่ 1, 3, 7, 14 และ 21 เพื่อเช็ค Activity ของเฟจไลเซทที่เกิดขึ้น จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า PFU/ml

3.6.8 การหาความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

3.6.8.1 การเตรียมเซลล์เริ่มต้น (Inoculum) สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

เตรียมเซลล์เริ่มต้น โดยเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญอยู่บน Luria agar (LA) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน หรือ 18 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป นำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria broth (LB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน หรือ 18 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป

3.6.8.2 การเตรียมเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการวัดการเจริญของแบคทีเรีย

นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.8.1 ไปใช้สำหรับเป็นเซลล์เริ่มต้น โดยเติมลงไปในอาหาร LB ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิลิตร. ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ปรับให้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *E. coli* ให้มีค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ด้วยวัดค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 60 นาที โดยเก็บเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ทำการเก็บตัวอย่างสำหรับวัดค่า OD และ Viable cell count (CFU/ml) เสร็จแล้ว ให้รีบนำ Culture flask ไปเก็บในตู้บ่ม (Incubator shaker) เสมอ นำตัวอย่างที่ได้มาวัดค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง โดยใช้ LB ในการทำการเจือจาง และตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค Spread plate ทำการเจือจางด้วยสารละลาย Normal saline

3.6.9 One-step growth curve (Wannasrichan et al., 2020)

Phage lysate 1 มิลลิลิตร ($1x10^5$ PFU/ml) ผสมเข้ากับ *E. coli* inoculum 0.5 มิลลิลิตร ($1x10^7$ CFU/ml) ที่อยู่ในระยะ Log phase ($OD_{600} \approx 0.3$) ที่ MOI 0.01 บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำไป Dilute culture 100 เท่า ด้วยอาหาร LB broth ที่เสริมด้วย 1mM $CaCl_2$ จากนั้นนำไปบ่มบน Incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเก็บ Co-culture 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 นาที รวมถึงเก็บนาทีที่ 0 ด้วยเช่นกัน นำ Co-culture ที่เก็บได้ไป Centrifuged ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้นนำไปทำ Serial dilution ด้วย SM buffer และ Plaque assay นำไปคำนวณหา PFU/ml เพื่อนำไปสร้างกราฟ One-step growth curve แล้วนำไปหาค่า Latent period, Rise period และ Burst size

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และการทำให้บริสุทธิ์

การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* ในช่วงเริ่มแรกของงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างจากหลายบริเวณทั้งโดยรอบของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบังและภายนอกสถาบัน ซึ่งตัวอย่างประเภทของเหลว ที่ได้นำมาทดลองคัดแยกแบคเทอริโอเฟจ ได้แก่ น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 1 (บริเวณเขตซอยเกกี 4), น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 2 (บริเวณเขตซอยเกกี 4), คลองวัดปลูกศรัทธา, น้ำจากบ่อระบายน้ำ 1 (คณะบริหารธุรกิจ), น้ำจากบ่อระบายน้ำ 2 (คณะบริหารธุรกิจ), น้ำจากฟาร์มสัตว์ทดลอง (คณะเทคโนการเกษตร) ,คลองแสนแสบ 1 (บริเวณท่าอโศก), คลองแสนแสบ 2 (ท่าเรือประตูน้ำ), คลองแสนแสบ 3 (รามหนึ่ง), น้ำจากบ่อน้ำเสีย (คณะเทคโนการเกษตร), น้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1), น้ำจากบ่อน้ำ (บริเวณป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์) และ น้ำจากบ่อน้ำ (บริเวณโรงอาหารตึกพระเทพ) และ ตัวอย่างประเภทของแข็ง ที่ได้นำมาคัดแยกแบคเทอริโอเฟจ ได้แก่ ดินจากบริเวณฟาร์มไก่(คณะเทคโนการเกษตร), ดินจากบริเวณเลี้ยงแพะ (คณะเทคโนการเกษตร) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทำการ Enrichment เป็นเวลา 14 วัน

จากการศึกษาพบว่าวิธีการแยกแบคเทอริโอเฟจออกจากตัวอย่างได้สำเร็จ คือการแยกจากตัวอย่างประเภทของเหลว ด้วยการนำตัวอย่างของเหลวใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วย Syringe จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บ Filtrate ที่อุณหภูมิ 4 °C ในขวด Vial แม้ว่ามีการค้นพบว่า แบคเทอริโอเฟจมีความสามารถในการเกาะติดของแข็งได้ดีกว่าของเหลวจึงทำให้แบคเทอริโอเฟจมีความคงตัวและเพิ่มโอกาสการอยู่รอดได้มากกว่าในตัวอย่างประเภทของเหลว (Kleczkowska, 1957) แต่วิธีการสกัดตัวอย่างจากของแข็งนั้นค่อนข้างมีกระบวนการที่ยากและซับซ้อนต้องทำหลายขั้นตอน ทำให้เกิดอุปสรรคระหว่างกระบวนการแยกมากมาย เช่น ในส่วนของการนำตัวอย่างของแข็งมากรองด้วยตัวกรอง ผลปรากฏว่าตัวกรองเกิดการอุดตันอย่างรวดเร็ว อีกทั้งการสกัดตัวอย่างจากประเภทของแข็งต้องใช้ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงค่อนข้างสูง และต้องทำหลายรอบเพื่อสกัดแบคเทอริโอเฟจให้ออกมาเกิดผลสำเร็จ การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างประเภทของเหลว จึงสะดวกและสามารถแยกให้เกิดผลสำเร็จได้ง่ายและรวดเร็วกว่าการใช้วิธีการสกัดจากตัวอย่างประเภทของแข็ง เนื่องจากการแยกจากตัวอย่างประเภทของเหลว ใช้กระบวนการคัดแยกน้อย ไม่ซับซ้อนและใช้ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกแบคเทอริโอเฟจออกจากตัวอย่างในระดับต่ำเท่านั้น (Hyman, 2019)

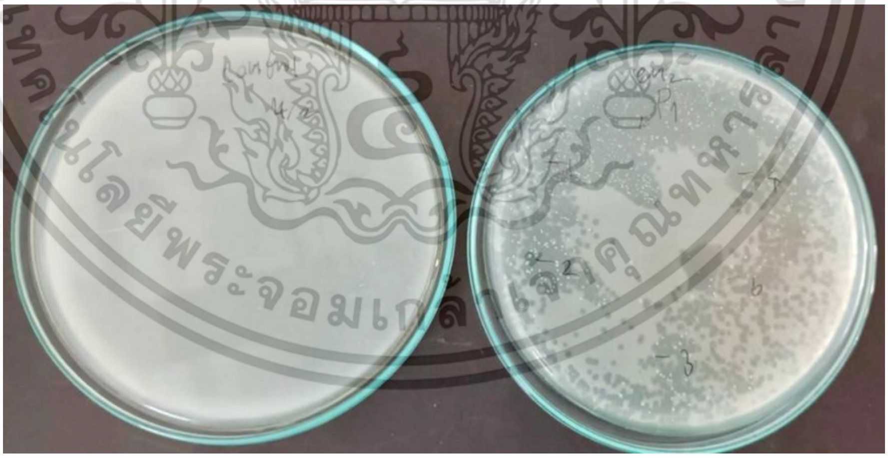
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการเกิดพลาคจากการสุ่มตัวอย่างประเภทของแข็งและของเหลว

ตัวอย่าง	พบการเกิดพลาค/ไม่พบ
น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 1 (บริเวณเขตซอยเกกี 4)	ไม่พบ
น้ำจากท่อน้ำทิ้ง 2 (บริเวณเขตซอยเกกี 4)	ไม่พบ
น้ำจากคลองวัดปลูกศรัทธา	ไม่พบ
น้ำจากบ่อระบายน้ำ 1 (คณะบริหารธุรกิจ)	พบในปริมาณน้อย พลาคขุ่น
น้ำจากบ่อระบายน้ำ 2 (คณะบริหารธุรกิจ)	พบในปริมาณน้อย พลาคขุ่น
น้ำจากฟาร์มสัตว์ทดลอง (คณะเทคโนการเกษตร)	ไม่พบ
คลองแสนแสบ 1 (บริเวณท่าอโศก)	ไม่พบ
คลองแสนแสบ 2 (ท่าเรือประตูน้ำ)	ไม่พบ
คลองแสนแสบ 3 (รามหนึ่ง)	ไม่พบ
น้ำจากบ่อน้ำเสีย (คณะเทคโนการเกษตร)	ไม่พบ
น้ำจากท่อระบายน้ำ (บริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1)	พบการเกิดพลาควงใส จำนวนมาก
น้ำจากบ่อน้ำ (บริเวณป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์)	ไม่พบ
น้ำจากบ่อน้ำ (บริเวณโรงอาหารตึกพระเทพ)	ไม่พบ
ดินจากบริเวณฟาร์มไก่ (คณะเทคโนการเกษตร)	ไม่พบ
ดินจากบริเวณเลี้ยงแพะ (คณะเทคโนการเกษตร)	ไม่พบ

ดังตารางที่ 4.1 จากแหล่งเก็บตัวอย่างทั้งหมด 15 แหล่ง พบเพียง 1 แหล่งที่สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* ออกมาได้นั้นคือ ตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำบริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 พบพลาควงใส (Clear plaque) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งการเกิดพลาควงใสแสดงถึงลักษณะทางสันฐานวิทยาของ Lytic phage จึงเลือกพลาควงใสที่ได้จากตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำ

บริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 มาคัดแยก เนื่องจากบริเวณจุดเก็บตัวอย่างนั้นมีห้องสุขาอยู่บริเวณใกล้เคียง อีกทั้งบริเวณจุดเก็บเป็นบริเวณจอดรถของบุคลากรภายในสถาบันจึงทำให้มีการสร้างกันสาดมาบดบังแสงจากดวงอาทิตย์ บริเวณจุดเก็บดังกล่าวจึงเป็นบริเวณแหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมของแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งแบคเทอริโอเฟจไลติกนั้นมีวัฏจักรเป็น Lytic cycle โดยเมื่อแบคเทอริโอเฟจเข้า Adsorption กับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน จากนั้นแล้วแบคเทอริโอเฟจนั้นจะฉีด (Inject) สารพันธุกรรมลงไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน กระบวนการนี้เรียกว่า Penetration ต่อมาจะเข้าสู่ขั้นตอนการจำลองตัวเอง (Replication) ของสารพันธุกรรมไวรัสที่ฉีดเข้าไป หลังจากนั้นแบคเทอริโอเฟจจะสร้างส่วนประกอบให้แต่ละชิ้นส่วนเสร็จสมบูรณ์พร้อมในคราวเดียวและประกอบชิ้นส่วนแต่ละส่วนที่สมบูรณ์แล้วรวมเข้าด้วยกันให้กลายเป็น Mature phage เรียกขั้นตอนประกอบชิ้นส่วนนี้ว่า Line-Assembly และเมื่อแบคเทอริโอเฟจประกอบรวมกันจนสมบูรณ์แล้วแบคเทอริโอเฟจจะทำลายผนังเซลล์เจ้าบ้าน โดยทำให้เซลล์เจ้าบ้านเกิดการแตกตาย (Lysis) เพื่อออกมา (Release) และลูกหลานที่เกิดขึ้นก็จะเข้าติดเชื้อเซลล์เจ้าบ้านตัวต่อไป โดยเมื่อเทียบ Life cycle กับแบคเทอริโอเฟจ (Temperate phage) ที่มีวัฏจักรแบบ Lysogenic Cycle แบคเทอ-ริโอเฟจชนิดนี้ จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ Lysogenic Conversion ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย และลักษณะพลาคที่เกิดขึ้นจะมีเป็นลักษณะวงขุ่น (Cristina Howard-Varona et al. 2017) ฉะนั้น Lytic phage จึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาต่อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคเรียมากกว่าการใช้แบคเทอริโอเฟจแบบไลโซจีนิก



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

จากรูปที่ 4.1 หลังจากการ Enrichment ด้วยการใช้อาหาร LB ที่มีความเข้มข้นสองเท่าและเสริมด้วย 1mM $CaCl_2$ โดยบรรจุอยู่ในขวด Vial ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 วัน แล้วพบว่าเกิดพลาคใสจำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

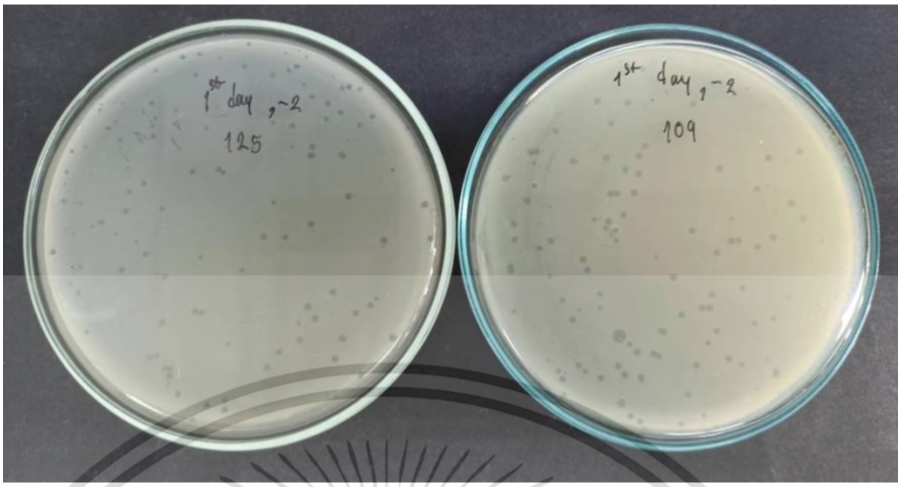
เนื่องจากในอาหาร LB มีการเสริมด้วย $CaCl_2$ ซึ่งแคลเซียมไอออนนั้นมีประจุ 2+ ส่วนบริเวณขาของแบคเทอริโอเฟจและบริเวณผิวของแบคทีเรีย *E. coli* นั้นมีประจุลบจึงทำให้ Ca^{2+} เป็นตัวช่วยดึงดูดแบคเทอริโอเฟจและเซลล์เจ้าบ้านให้มีโอกาสเข้ามาพบกันมากขึ้น (Walakira, 2008) จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทเดี่ยว (Single plaque) โดยเลือกมา 3 ไอโซเลท ให้ชื่อเป็น จภ1เอ, จภ1บี และ จภ1ซี หลังจากนั้นนำทั้ง 3 ไอโซเลท มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking technique (ดังรูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.4) โดยใช้ไม้จิ้มฟันหรือทิปแซะวุ้นรอบพลาค จากนั้นคว้านเนื้อวุ้นนำมาลง SM buffer ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน โดยอนุมานว่าแบคเทอริโอเฟจแพร่ (Diffuse) มาอยู่ใน SM buffer แล้ว หลังจากนั้นนำมาทำ 10-fold Serial Dilution และ Plaque assay โดยทำอย่างน้อย 3 รอบ จะถือว่าแบคเทอริโอเฟจนั้นบริสุทธิ์ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ เลือกพลาคที่มีลักษณะกลมเป็นวงใส (Clear plaque) และพลาคมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.48 มิลลิเมตร ที่บริสุทธิ์จากไอโซเลท จภ1บี เนื่องด้วยลักษณะพลาคที่เกิดขึ้นจากการ Picking technique ในรอบที่ 4 ไอโซเลทของ จภ1บี พลาคที่เกิดขึ้นมีลักษณะกลมเป็นวงใสขอบเรียบสวยและมีเส้นผ่านศูนย์กลาง (Diameter) ขนาดใหญ่สม่ำเสมอเหมือนกันทั้งเพลท ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทของ จภ1เอ นั้นมีพลาคขนาดเล็กปะปนอยู่ประมาณ 3 ถึง 9 พลาค ส่วนไอโซเลทของ จภ1ซี ลักษณะพลาคที่เกิดขึ้นจากการ Picking technique รอบที่ 4 นั้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลงอย่างเห็นได้ชัดด้วยตาเปล่าและบางพลาคมีลักษณะโปร่งแสง ต่อจากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจที่บริสุทธิ์แล้วจากการ Picking technique รอบที่4 ของไอโซเลท จภ1บี ไปทำเฟจไลเซท (Phage Lysate) ด้วยการใช้ไม้จิ้มฟันแซะวุ้นรอบพลาคเดี่ยวจิ้มแซะลึกไปจนถึงชั้น Bottom agar แล้วคว้านชิ้นวุ้นและใช้ไม้จิ้มฟันเสียบบริเวณด้านข้างชิ้นวุ้นไม่ให้โดนบริเวณพลาค จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปลง Eppendorf tube ที่มี SM buffer 1 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นนำมาทำ Plaque assay บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นใส่ SM buffer 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น นำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วนจานอาหารเมื่อครบทุกๆ 30 นาที จากนั้นดูด SM buffer จากอาหารวุ้นสองชั้นที่บ่มแล้ว ใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) ที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำ Supernatant ที่ได้มาทำ Serial dilution และ Plaque assay เพื่อเช็ค Activity ของแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ ณ วันที่ 1, 3, 7, 14 และ 21 พบว่าเฟจไลเซทในวันที่ 7 ซึ่งควรมีปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่ใกล้เคียงกับวันที่ 1 (รูปที่ 4.5) ประมาณ $1x10^5$ PFU/ml แต่กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องด้วย Supernatant ของเฟจไลเซทนั้นไม่ได้ผ่านการกรองด้วยตัวกรอง (Filter) จึงทำให้แบคเทอริโอเฟจนั้นมีโอกาสเข้าติดเชื้อกับเซลล์เจ้าบ้านได้อีกครั้ง จากเซลล์แบคทีเรียที่ปะปนอยู่กับตะกอนเซลล์ (Pellet) บริเวณก้นหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) จึงส่งผลทำให้แบคเทอริโอเฟจสามารถเพิ่มลูกหลานได้อีกครั้ง การเช็ค Activity ของเฟจไลเซท (ตารางที่ 4.2) เพื่อใช้ประโยชน์สำหรับทำให้ทราบว่าแบคเทอริโอเฟจนั้นยังมีความสามารถในการเข้าติดเชื้อเซลล์เจ้าบ้านอยู่หรือไม่ นอกจากนี้การทำเฟจไลเซทยังนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการทำ MOI ด้วย โดยเมื่อทราบความเข้มข้นของ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (PFU/ml) จากเฟจไลเซทที่มีอยู่แล้ว จากนั้นนำเฟจไลเซทไปใช้สำหรับการทำ One-step growth curve

รูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.4 พลาคที่บริสุทธิ์แล้วของไอโซเลท จภ1เอ, จภ1บี และ จภ1ซี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 เช็ค Activity ของเฟจไลเซท ณ วันที่ 1 พบปริมาณแบคเทอริโอเฟจ เท่ากับ 1.2×10^{5} PFU/ml

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนการเกิดพลาคของเฟจไลเซท ณ วันที่ใดๆ

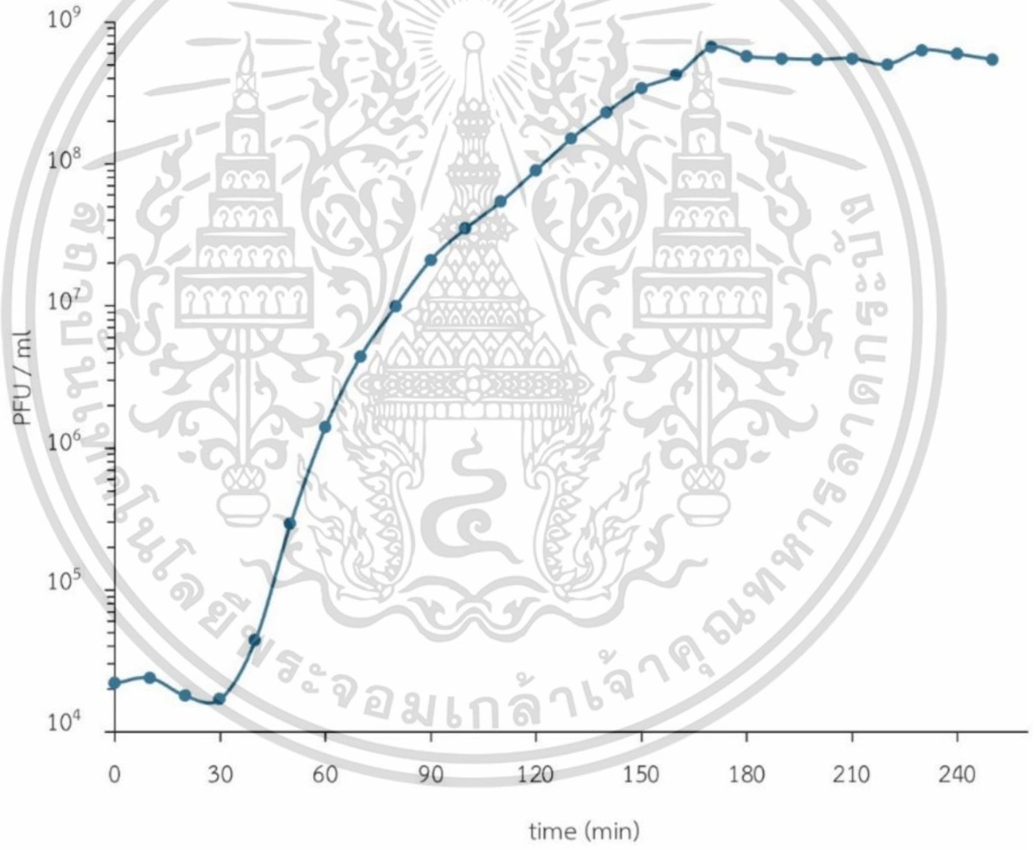
วันที่	ระดับความเจือจาง	จำนวนพลาค	PFU /ml
1	10^{-2}	109 และ 125	1.2×10^{5}
3	10^{-2}	181 และ 74	1.3×10^{5}
7	10^{-2}	224 และ 201	2.1×10^{5}
14	10^{-2}	234 และ 248	2.4×10^{5}
21	10^{-2}	34 และ 34	3.4×10^{4}

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

Phage lysate 1 มิลลิลิตร (1×10^{5} PFU/ml) ผสมเข้ากับ *E. coli* Inoculum 0.5 มิลลิลิตร (1×10^{7} CFU /ml) ที่อยู่ในระยะ Log phase (OD_{600} nm ≈ 0.3) ที่ซึ่งทราบจากศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยการหาสัดส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งจะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์สำหรับการทำ MOI โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ MOI 0.01 เป็นระยะเวลา 10 นาที (Wannasrichan et al., 2020) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ต่อจากนั้นนำไป Dilute culture 100 เท่า ด้วยอาหาร LB broth ที่เสริมด้วย 1mM $CaCl_2$ เพื่อป้องกันไม่ให้แบคเทอริโอเฟจเกิดการเข้าติดเชื้อกับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเป็นรอบที่สอง จากนั้นนำไปบ่มบน Incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 250 นาที โดยเก็บ Co-culture 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 นาที

รวมถึงเก็บนาทีที่ 0 ด้วยเช่นกัน นำ Co-culture ที่เก็บได้ไป Centrifuged ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีแล้วนำมาทำ Serial dilution ด้วย SM buffer และนำไปทำ Plaque assay คำนวณหา PFU/ml เพื่อนำไปสร้างกราฟ One-step growth curve พบว่าค่า Latent period, Rise period และ Burst size ที่ได้ เท่ากับ 30 นาที, 140 นาที และ 66 PFU/cell ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.7) ซึ่งค่า Latent period ที่ได้นั้นมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของคุณเหลียวที่ศึกษา Phage Sa157lw ของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ATCC43888 พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีค่า Latent period อยู่ที่ 30 นาทีเช่นเดียวกัน โดยการศึกษาของคุณเหลียวเพาะเลี้ยง *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) ใน TSB 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมงและนำมาใช้ 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 โดยในขั้นตอนนี้คุณเหลียวจะเสริมด้วย 10 mM $CaCl_2$ พร้อมกับการทำ MOI ไปด้วยและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้แบคเทอริโอเฟจ Adsorption กับเซลล์แบคทีเรีย ต่อมานำไป Centrifuged ที่ความเร็วรอบ 10,000 × g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำ Supernatant ที่ได้ดูดออกและนำตะกอนเซลล์ (Pellet) มาชะด้วย TSB 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาใส่ลง TSB 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ Homogenization และนำเซลล์แขวนลอย (Suspension) มา 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลง TSB 29.7 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บน Incubator shaker จากนั้นนำไปหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าค่า Rise period และ Burst size เท่ากับ 30 นาที และ 130 ± 18 PFU/cell ตามลำดับ (Liao et Al., 2022) จากศึกษาของคุณจอร์นพบว่าอาหารที่เสริมด้วย $CaCl_2$ ส่งผลให้จำนวนแบคเทอริโอเฟจนั้นเพิ่มขึ้นต่อมิลลิลิตร (PFU/ml) ได้มากกว่าสามเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เสริมด้วย $MgCl_2$ และอาหารที่ไม่เสริมด้วย $CaCl_2$ (Control) เนื่องจาก Ca^{2+} สามารถช่วยเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจบนพื้นผิวของเซลล์เจ้าบ้าน หรือสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์ ซึ่งเพิ่มการเข้าถึงของแบคเทอริโอเฟจกับเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นแคลเซียมที่ 500 µM เหมาะสมที่สุดสำหรับ Phage infection ด้วยการศึกษา Phages FeiDWF และ FeiAU ของแบคทีเรีย *Edwardsiella ictalurid* ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งแบคเทอริโอเฟจทั้งสองมีลักษณะเป็นวงใสและมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.5 ถึง 11 มิลลิเมตร จากการทำ MOI 0.1 บ่มอุณหภูมิที่ 30 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำมาทำ One-step growth curve พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้งสองมีค่า Latent period ประมาณ 40 นาที , Rise period เท่ากับ 10 นาที และ Burst size เท่ากับ 270 viral PFUs/Bacterial cell (Walakira, 2008) และจากการศึกษาของคุณวาตานาเบะพบว่า แคลเซียมไอออนมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเข้าติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจภายหลัง Adsorption เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่มีแคลเซียมไอออนที่เสริมเข้าไป ไม่พบกระบวนการซึมผ่าน (Penetration) ของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (Watanabe & Takesue, 1972) จากการศึกษาของคุณเหยาพบว่า MOI ที่เหมาะสมที่สุด (Optimal MOI) ซึ่งให้ค่า PFU/ml มากที่สุดนั้นคือการใช้ MOI 0.1 โดยการศึกษา Phage

PEC9 ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (APEC) ด้วยการใช้เซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ 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 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และนำไปคำนวณหา PFU/ml ด้วย Double-agar overlay method พบว่าปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่ MOI 0.01 มีปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (Phage titer) เพิ่มขึ้นหลังจากบ่ม (PFU/ml) แล้ว เท่ากับ 1.22×10^9 PFU/ml โดยปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นมีจำนวนรองจากการทดสอบ MOI 0.1 ซึ่งมีปริมาณแบคเทอริโอเฟจเท่ากับ 3.50×10^9 PFU/ml (Yao et al., 2023) ซึ่งปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ (PFU/ml) ที่เพิ่มขึ้นมีจำนวนแตกต่างกันประมาณ 2.89 เท่าเลยทีเดียว การศึกษา MOI และการศึกษา Adsorption rate นั้นจึงเป็นเรื่องที่ควรศึกษาเพิ่มขึ้นในงานแบคเทอริโอเฟจด้วยเช่นกัน



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากตัวอย่างสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบทั้งตัวอย่างประเภทของแข็งและของเหลว ตัวอย่างที่นำมาคัดแยกและสามารถพบแบคเทอริโอเฟจของ *E. coli* ได้จากตัวอย่างน้ำจากท่อระบายน้ำบริเวณหน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Picking technique จากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์มาเพิ่มปริมาณด้วยการทำ Phage lysate และนำมาศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ *E. coli* โดยการใช้ MOI 0.01 พบว่า พลาคบริสุทธิ์ที่ได้มีลักษณะเป็นวงใสขอบเรียบ (Clear plaque) และมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.48 มิลลิเมตร เมื่อนำมาใช้สำหรับการทำ One-step growth curve พบว่าแบคเทอริโอเฟจที่ได้นั้นมีค่า Latent period, Rise period และ Burst size มีค่าเท่ากับ 30 นาที, 140 นาที และ 66 PFU/cell ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาทดลอง Adsorption rate เพิ่มเติม โดยมีช่วงเวลาบ่ม 15, 20, 25 และ 30 นาที เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการที่แบคเทอริโอเฟจจะเข้า Adsorpt กับเซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำให้เกิดลูกหลานแบคเทอริโอเฟจมากที่สุด

2. ศึกษา MOI ที่นำไปใช้เพิ่มเติม อาทิศึกษา MOI ที่ 0.001, 0.1 และ 1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบหาสัดส่วนของแบคเทอริโอเฟจกับเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมก่อนนำไปทำ Adsorption rate

3. ศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (One-step growth curve) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง (Diameter) ต่างกัน เพื่อนำไปศึกษาหาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริ-โอเฟจแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. 2557. *Escherichia coli.* http://www.dmsc.moph.go.th

จุรีย์รัตน์ สีสมิทธิ์. 2548. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สถาบันอาหารและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2545. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนา วิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหารเรื่องการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร ณ หอประชุม 211 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพฯ. 2022.

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

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. 2562. สตรีทฟู้ด 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.

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งนั้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aryal S. 2023. Microbe Notes. Lysosomes: Structure, Function, Diagram. https://microbenotes.com/author/sagar-aryal/

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. Z., Wahid, A. A. and Inamdar, N. 2015.Phage Therapy: Emergence of a Novel Therapy to Control Bacterial Pathogens. Inventi Rapid: Pharm Biotech & Microbio Vol. 2015, Issue 2. 1(2):1.

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: 10.3389/fcimb.2023.1265011.

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

Coaching, A. 2021. Life Cycle of Bacteriophage & Lytic Cycle & Lysogenic Cycle Induction. [Online]. https://www.ahmadcoaching.com/2021/02/life-cycle-of-bacteriophage-lytic-lysogenic-induction.html.

Dalmasso, M , Strain, R , Neve, H , Franz, C. M. A. P., Cousin, F. J., Ross, R. P. and Hill, C. 2016. Three New *Escherichia coli* Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy. PLOS ONE. 11(6): e0156773.

Difco Laboratories: Differentation of Enterobacterianceae by biochemical tests. Detroit, 1980, Difco Laboratories.

EcL, The Reference Laboratory for *Escherichia coli.* 2004. Pathogenic *E. coli*. [Online]. http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp.

Fan, H , Mi, Z , Fan, J. and Tong, Y. 2022. A fast method for large-scale isolation of phages from hospital sewage using clinical drug-resistant *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology. 11(22): 6143-6148.

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

Geeksforgeeks. 2024. Bacteriophage – Definition, Structure, Life Cycle, Importance. [Online]. https://www.geeksforgeeks.org/bacteriophage-definition-structure-life-

เอกสารนี้เป็นเอกส
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cycle-importance/.

Gordillo Altamirano FL. and Barr JJ. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. Clin Microbiol Rev. 2019; 32 (2): e00066-18.

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 to Cancer by 2050, and Pollution is Fuelling its Spread. https://healthpolicy-watch.news/antimicrobial-resistance-deaths-cancer/.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PH et al, editors: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, ed 9, Baltimore, 1994, Williams & Wilkins company.

Howard-Varona, C , Hargreaves, K. R., Abedon, S. T. and Sullivan, M. B., 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. ISME Journal. 11(7): 1511–1520.

Hyman P., 2019. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. Pharmaceuticals. MDPI. 12(1): 35.

IMPACT. 2018. การตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรีย. https://assist- impact.net/th/articles/130595

Jamalludeen N. et al., 2007. Isolation and characterization of nine bacteriophages hat lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology. Volume 124: Issues 1–2 Pages 47-57.

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.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. nature. 2:123–140.

Kim, S. H., Adeyemi, D. E. and Park, M. K. 2021. Characterization of a New and Efficient Polyvalent Phage infecting *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Shigella sonnei*. MDPI. 9(10). 2105.

Kleczkowska, J. 1957. A study of the distribution and effects of bacteriophage of root-nodule bacteria in the soil. Canadian Journal of Microbiology. 3(2):171-180.

Lee, H., Ku, H., Lee, D. H., Kim, Y. T., Shin, H., Ryu, S. and Lee, J. H. 2016. Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01

infecting Both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. PLOS ONE. 11(12): e0168985.

Liao, Y , Salvador, A , Harden, L , Liu, F , Lavenburg, V , Li, R. and Wu, V. 2019. Characterization of a Lytic Bacteriophage as an Antimicrobial Agent for Biocontrol of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O145 Strains. MDPI. 8(2):74.

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.

Lu, Z. and Breidt, B. 2015. *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage ϕ241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity. Frontiers in Microbiology. 6(975): 67.

Mahidol. 2019. เชื้ออีโคไล. https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=1399 .

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.

Necel, A , Bloch, S , Nejman-Faleńczyk, B , Grabski, M , Topka, G , Dydecka, A , Kosznik-Kwaśnicka, K , Grabowski, L , Jurczak-Kurek, A , Wołkowicz, T , Węgrzyn, G. and Węgrzyn, A. 2020. Characterization of a bacteriophage, vB_Eco4M-7, that effectively infects many *Escherichia coli* O157 strains. nature. 10: 3743.

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.

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-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Sun, X , Liao, Y. T., Zhang, Y , Salvado, A , Ho, K. J. and Wu, V. C. H. 2022. A New *Kayfunavirus*-like *Escherichia* Phage vB_EcoP-Ro45lw with Antimicrobial Potential of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O45 Strain. MDPI. 11(1):77.

Tian, L , He, L , Jackson, K , Saif, A , Khan, S , Wan, Z , Didar, T. D. and Hosseinidoust, Z. 2022. Self-assembling nanofibrous bacteriophage microgels as sprayable antimicrobials targeting multidrug-resistant bacteria. nature. 13: 7158.

Tille, P. M. 2014. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 13th Edition. UK. ELSEVIER.

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

Twest, R. V. and Kropinski, A. 2009. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 501:15-21.

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

Wang, J , Hu, B , Xu, M , Hu, J., et al. 2006. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. International Journal of Molecular Medicine. 17: 347-355.

Wannasrichan, W , Htoo, H. H., Suwansaeng, R , Pogliano, J , Nonejuie, P. and Chaikeeratisak, V. et al., 2022. Phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against a novel lytic phage JJ01 exhibits hypersensitivity to colistin and reduces biofilm production. Frontiers in Microbiology. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1004733.

Watanabe, K , Takesue, S. 1972. The requirement for Calcium in infection with *Lactobacillus* phage. J gen Virol. 17:19–30.

เอกสารนี้เป็น...ที่...ได้รับ...ให้...เพื่อ...ไม่...ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งนี้...ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Wirusologii, Z , Adamczyk-Popławska, M , Kwiatek, A. and Radlińska, M. 2015. MOLECULAR VIRUSOLOGY Exercise script. nature. Faculty of Biology. University of Warsaw.

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.

Yıldızlı, G , Coral, G. and Ayaz, F. 2020. Immunostimulatory Activities of Coliphages on In Vitro Activated Mammalian Macrophages. 43: 2.

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 ควรทำและเก็บรักษาในบริเวณที่มืด

ก.2 การเตรียมสารละลาย

ก.2.1 สารละลาย Normal saline

NaCl	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่อนุญาตให้นำไปใช้ได้ ... ใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2.2 สารละลาย SM buffer

NaCl	5.8	กรัม
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	2.0	กรัม
1M Tris-HCl (ph 7.5)	50.0	มิลลิลิตร
2%(w/v) gelatin	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

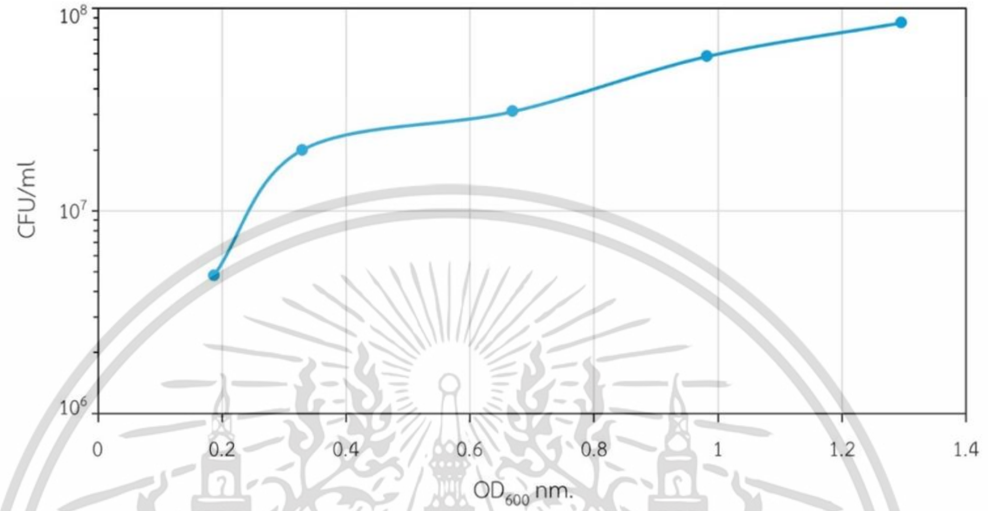
ผสมส่วนผสมทั้งหมด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

แสดงค่าความสัมพันธ์ระว่าง OD_{600} nm และ Viable cell count (CFU/ml) ของ แบคทีเรีย *Escherichia coli*



รูปที่ ข.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของ *E. coli*

ตารางที่ ข.1 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่าง OD และ Viable cell count (CFU/ml) ของ *E. coli*

OD_{600} nm.				CFU/ml		
เวลา (ชั่วโมง)	ระดับความเจือจาง	OD_{600} nm	Avg. real OD_{600} nm.	ระดับความเจืองจาง	จำนวนโคโลนี	Avg. CFU/ml
0	1.00	0.188 และ 0.187	0.187	10^{-4}	48 และ 48	4.8×10^6
1	1.00	0.329 และ 0.329	0.329	10^{-4}	200 และ 196	2.0×10^7
2	1.00	0.670 และ 0.668	0.669	10^{-5}	30 และ 32	3.1×10^7
3	0.50	0.489 และ 0.494	0.982	10^{-5}	56 และ 60	5.8×10^7
4	0.50	0.747 และ 0.748	1.296	10^{-5}	77 และ 92	8.5×10^7
5	0.33	0.475 และ 0.475	1.425	10^{-5}	188 และ 195	1.9×10^8
6	0.33	0.527 และ 0.527	1.589	10^{-5}	117 และ 145	2.6×10^8
				10^{-6}	39 และ 37	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (One-step growth curve)

ตารางที่ ค.1 แสดงผลการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* (PFU/ml)

เวลา (นาที)	ระดับความเจือจาง	จำนวนพลาค	จำนวนพลาคเฉลี่ย	PFU/ml
0	10^{-1}	225 และ220	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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1(ต่อ) แสดงผลการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *E. coli* (PFU/มิลลิลิตร)

เวลา (นาที)	ระดับความเจือจาง	จำนวนพลาค	จำนวนพลาคเฉลี่ย	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}

ค.2 การคำนวณหาปริมาณลูกหลานของแบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นต่อเซลล์แบคทีเรีย (Burst size) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Burst size}\left(\frac{\text{PFU}}{\text{cell}}\right) = \frac{\text{ปริมาณแบคเทอริโอเฟจไทเทอร์สูงสุด}\left(\frac{\text{PFU}}{\text{ml}}\right)}{\text{ปริมาณเซลล์แบคทีรียเจ้าบ้านเริ่มต้น}\left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}\right)}$$

แทนค่า

$$\text{Burst size}\left(\frac{\text{PFU}}{\text{cell}}\right) = \frac{6.6 \times 10^{8}\left(\frac{\text{PFU}}{\text{ml}}\right)}{1 \times 10^{7}\left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}\right)}$$

เพราะฉะนั้น

Burst size = 66 PFU/cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 27 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นายนพฤทธิ์ อาจคงหาญ รหัสประจำตัว 63050484

นางสาวชนาภัทร เจาฑาฑิต รหัสประจำตัว 6350459

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากสิ่งปฏิกูลและบริเวณสิ่งแวดล้อมโดยรอบ

ชื่อภาษาอังกฤษ ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF *Escherichia coli* FROM SEWAGE AND ITS ENVIRONMENT AREA

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว ด้วยโปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.79%

ลงชื่อ นพฤทธิ์ อาจคงหาญ
(นายนพฤทธิ์ อาจคงหาญ)
นักศึกษา

ลงชื่อ ชนาภัทร
(นางสาวชนาภัทร เจาฑาฑิต)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ...
(ดร.วิมลมาศ บุญมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้