การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF BACTERIA *Staphylococcus aureus* FROM ENVIRONMENT AND FOOD

วนิดา ปินะถา

อัสมา อนันตกูล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF BACTERIA *Staphylococcus aureus* FROM ENVIRONMENT AND FOOD

วนิดา ปินะถา

อัสมา อนันตกูล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

STUDY ON ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE OF BACTERIA *Staphylococcus aureus* FROM ENVIRONMENT AND FOOD

WANIDA PINATHA

ASMA ANUNTAGOON

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร Study on Isolation of a Bacteriophage of Bacteria *Staphylococcus aureus* from Environment and Food
ชื่อนักศึกษา	นางสาววนิดา ปินะถา รหัสนักศึกษา 57050887 นางสาวอัสมา อนันตกูล รหัสนักศึกษา 57050922
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร Study on Isolation of a Bacteriophage of Bacteria *Staphylococcus aureus* from Environment and Food
ชื่อนักศึกษา	นางสาววนิดา ปินะถา รหัสนักศึกษา 57050887 นางสาวอัสมา อนันตกูล รหัสนักศึกษา 57050922
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ได้มาแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *S. aureus* ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง Baird-Parker Agar คัดเลือกจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 204 ไอโซเลท แล้วนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การวัดขนาดและศึกษาลักษณะของโคโลนี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม และการวัดขนาดของเซลล์ ลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ การเจริญบนอาหารแข็ง Mannital Salt Agar ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ผลจากการทดสอบไอโซเลททั้ง 204 ไอโซเลท ให้ผลเป็นแบคทีเรีย *S. aureus* จากนั้นจึงทำการคัดเลือกมา 24 ไอโซเลท เพื่อมาทำการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกลูเลสซึ่งให้ผลเป็นบวกทั้งหมด ต่อมาจึงทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร โดยใช้ตัวอย่างจากแหล่งเดียวกับที่แยกแบคทีเรียได้ ในการแยกแบคเทอริโอเฟจทำโดยไม่เพิ่มปริมาณและเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีการตรวจการเกิดพลาค (plaque assay) จากการทดลองการแยกแบคเทอริโอเฟจแบบไม่เพิ่มปริมาณในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมพบบริเวณใสปรากฏทั่วไปบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นในแบคทีเรีย 17 ไอโซเลท และการแยกแบคเทอริโอเฟจแบบเพิ่มปริมาณในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมพบบริเวณใสปรากฏทั่วไปบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นในแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท อย่างไรก็ตามลักษณะบริเวณใสดังกล่าวยังไม่สามารถนำไปทำเพื่อให้เกิดเป็นพลาคเดี่ยวได้ ส่วนการแยกแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างจากอาหารไม่พบแบคเทอริโอเฟจ

คำสำคัญ : การคัดแยก แบคเทอริโอเฟจ แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, การตรวจการเกิด-พลาค อาหาร สิ่งแวดล้อม

Title	Study on Isolation of a Bacteriophage of Bacteria *Staphylococcus aureus* from Environment and Food
Students	Miss Wanida Pinatha Student ID 57050887
	Miss Asma Anuntagoon Student ID 57050922
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr. Wimonmat Boonmee

Abstract

This special project was to study on the isolation of the bacteria *Staphylococcus aureus* from environment and food. After that the isolated bacteria were used as the bacterial host for the bacteriophage isolation. The two hundred and four colonies of the bacteria were isolated on Baird-Parker agar and were evaluated on morphology characterization such as shape, cell size, colony appearance; size, shape and color, Gram staining and motility as well as catalase enzyme production including growth on mannitol salt agar. The result showed two hundred and four isolates of the bacteria were *S. aureus*. After that, selected twenty-four isolates for coagulase enzyme production were done and showed the positive results for all 24 isolates. The twenty-four isolates of the bacteria *S. aureus* then were used as bacterial host for the bacteriophage isolation. The bacteriophages were isolated from both environment and food samples collecting from the same locations using for the bacteria isolation. With and without enrichment of the bacteriophage isolation methods were done. The present of the bacteriophages were determined by plaque assay. The bacteriophage isolation from the environments with and without enrichment, 18 and 17 isolates, respectively, showed scattering small clear zone on the top agar, which all these results could not produce any single plaque from any further attempting experiments. The bacteriophage isolation from foods with and without enrichment, the result showed that there was no any bacteriophage particle.

Keywords: isolation, bacteriophage, bacteria, *Staphylococcus aureus*, plaque assay, environment, food

กติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่องการศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถบรรลุผลได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้คำปรึกษาคำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการสอบโครงงานพิเศษนี้ที่ได้สละเวลาในการเข้ารับฟังการนำเสนอรวมทั้งให้คำแนะนำคำปรึกษาจนโครงงานพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อการเบิกอุปกรณ์สารเคมีต่าง ๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำการทดลองที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดาและขอบคุณเพื่อนๆที่คอยอยู่เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้กันตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนโครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในศึกษาและต่อยอดต่อไป

วนิดา ปินะถา

อัสมา อนันตกูล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญรูป..... ซ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*..... 3
2.2 แบคเทอริโอเฟจ..... 4
2.2.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ..... 4
2.2.2 คุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ..... 5
2.2.3 ชนิดของแบคเทอริโอเฟจ..... 5
2.2.4 การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ..... 7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*..... 7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ..... 8

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11

3.1 อุปกรณ์ 11

3.2 เครื่องมือ 12

3.3 สารเคมี 12

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 13

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ 13

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* 13

3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *S. aureus* 14

3.6 วิธีการทดลอง 14

3.6.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม และตัวอย่างอาหารบนอาหารแข็ง Baird Parker Agar (BPA) 14

3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา 15

3.6.3 การทดสอบลักษณะชีวเคมี 16

3.6.4 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น *S. aureus* 17

3.6.5 การแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *S. aureus* 17

3.6.6 วิธีการทำ plaque assay 19

3.6.7 วิธีการชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจจากจานอาหารวุ้นสองชั้น 19

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย 20

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหาร. 20

4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA 21

4.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา 24

4.1.3 การทดสอบลักษณะชีวเคมี 27

4.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 33

4.2.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 33

4.2.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างอาหาร 37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 40

5.1 สรุปผลการวิจัย 40

5.2 ข้อเสนอแนะ 41

เอกสารอ้างอิง 42

ภาคผนวก 48

ภาคผนวก ก 49

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร..... 22

4.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี..... 30

4.3 ผลการการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ..... 34

4.4 ผลการการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ..... 36

4.5 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน..... 39

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 วงจรชีวิตของเฟจแบบ lytic และ lysogenic..... 7

4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*
ที่เจริญบนอาหารแข็ง BPA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 21

4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*
ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง..... 24

4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *S. aureus*
ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง..... 24

4.3 ลักษณะของเซลล์ที่คาดว่าเป็น *S. aureus*
ย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า..... 26

4.4 ขนาดของเซลล์ที่คาดว่าเป็น *S. aureus* เมื่อย้อมด้วยสีนิโกรซิน
แล้วส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า..... 27

4.5 ลักษณะโคโลนีที่คาดว่าเป็น *S. aureus* และการเปลี่ยนสีของอาหาร MSA..... 28

4.6 ลักษณะของ plaque จากตัวอย่างห้องน้ำที่ปรากฏผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีแบคทีเรีย S_{160} เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านที่ระดับความเจือจางแบคเทอริโอเฟจที่ 10^{-26}..... 37

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะบริเวณที่มีมนุษย์อาศัยอยู่อย่างหนาแน่น เช่น สถานศึกษา บ้านพักคนชรา สถานเลี้ยงเด็ก ร้านอาหาร มักพบตามบริเวณจมูก ผิวหนังของมนุษย์ และเกิดการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ระหว่างมนุษย์และสิ่งแวดล้อมไปมา เนื่องจากในชีวิตประจำวันมนุษย์มีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ตลอดทั้งวัน เช่น ลูกบิดประตู เก้าอี้ รวมถึงอาหารที่มีการสัมผัสกับมือ (Bloomfield and Scott, 1997) ดังนั้นจึงพบ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคและเชื้อฉวยโอกาสในมนุษย์ สัตว์ เช่น ทำให้เกิดผดผื่น ฝีหนอง โรคปอดบวม โรคโลหิตเป็นพิษ หรืออาจส่งผลร้ายแรงถึงขั้นทำให้เสียเสียชีวิต (Kazmierczak et al., 2014) นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคทางปศุสัตว์ เช่น โรคเต้านมอักเสบในวัว โรคไขข้อในไก่ และโรคอาหารเป็นพิษ (Vanderhaeghen et al., 2010)

ปัจจุบันมีการดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin ของเชื้อ *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*: MRSA) และ Vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) (DeLeo and Chambers, 2009; Dulon et al., 2011) การควบคุมเชื้อโรคนี้ทำได้ยากขึ้น จึงมีการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียเพื่อแก้ไขปัญหาการดื้อยา (Weinbauer, 2004) เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านสูง เมื่อแบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียจะไปรบกวนเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียและเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียแล้วกระจายออกนอกเซลล์โดยการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียตาย จึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ ซึ่งแตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากยาปฏิชีวนะสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อครั้งที่ 2 ได้ โดยการติดเชื้อครั้งที่ 2 แบคทีเรียจะพัฒนาตัวเองให้สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะตัวเดิม จึงไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะตัวเดิมในการรักษาได้ (Hankin, 1896; Rosanna et al., 2007)

Rahimzadeh et al. (2016) ได้ศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกจากอ่างล้างมือ ซึ่งจัดเป็นแบคเทอริโอเฟจในแฟมมิลี่ *Siphoviridae* นำมายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเมธิซิลิน (Methicillin) ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วย Gutierrez et al. (2016) ได้ศึกษาการนำแบคเทอริโอเฟจ Φ11, K, ΦH5, ΦA72, CAPSa1 และ CAPSa3 มายับยั้งเชื้อ

แบคทีเรีย *S. aureus* ทั้ง 87 สายพันธุ์ ซึ่ง 64 สายพันธุ์แยกได้จากอาหารทะเลและเนื้อในประเทศนิวซีแลนด์ 23 สายพันธุ์แยกได้จากเนื้อในประเทศสเปน Jensen et al. (2015) ได้ศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกจากสิ่งแวดล้อม 12 สายพันธุ์ แล้วนำแบคเทอริโอเฟจ 1 สายพันธุ์กับแบคเทอริโอเฟจ 2 สายพันธุ์ มาผสมกันเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะและ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะเมธิซิลินที่ปนเปื้อนอยู่ในแก้วและเนื้อผ้า

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และจากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ได้มาแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

2) เพื่อศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร โดยนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิธีการแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

2) งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจัดอยู่ในตระกูล *Staphylococcaceae* มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ บางครั้งอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ทึบแสง มีสีขาว ครีม เหลืองและส้ม ไม่สร้างแคปซูล ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีทั้งในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) มีเมตาบอลิซึมของการหมักและการหายใจ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เอนไซม์เอนโดนิคลีเอส (endonuclease) ที่ทนต่อความร้อน (William and Wilkins, 1994) เอนไซม์ฮีโมไลซิน (hemolysin) ทำให้เกิดวงใสที่ชัดเจนบน blood agar สามารถใช้น้ำตาล mannitol และสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัวโดยเปลี่ยนไฟบริโนเจน (fibrinogen) เป็นไฟบริน (fibrin) ซึ่งช่วยป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาวและการเข้าจับของยาปฏิชีวนะได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการก่อโรครุนแรงขึ้นสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เช่น nutrient agar (NA), tryptic soy agar (TSA) และ brain heartinfusion agar (BHI) เป็นต้น (นิติพงษ์ และ เอกชัย, 2552) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส (William and Wilkins, 1994) บางสายพันธ์สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ต่ำ 6 - 7 องศาเซลเซียส ระดับพีเอช (pH) ที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.5 - 9.3 แต่ช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตที่สุดคือ 7.0 - 7.5 เจริญได้ในสภาพที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 0.83 มีความสามารถทนเกลือได้สูง (สุรีย์, 2553)

โดยทั่วไปสามารถพบแบคทีเรีย *S. aureus* ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งในอากาศ น้ำ ผิวหนังของสัตว์เลือดอุ่น (William and Wilkins, 1994) มักจะมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมสู่คน จากคนสู่สิ่งแวดล้อมไปมา เนื่องจากในชีวิตประจำวันมีการสัมผัสพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนของเชื้อตามสถานที่ต่าง ๆ ที่มีจำนวนประชากรอาศัยอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก เช่น สถานศึกษา บ้านพักคนชรา สถานเลี้ยงเด็ก ร้านอาหาร ในสถานที่เหล่านี้ตามบริเวณห้องน้ำ ห้องอาบน้ำ มักพบเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ตามบริเวณซักโครก อ่างล้างมือ ถังขยะ ส่วนห้องครัวมักจะพบบริเวณอ่างล้างจาน รวมทั้งอาหารก็พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยเช่นกัน (Bloomfield and Scott, 1997)

ปัจจัยที่ทำให้ *S. aureus* ก่อโรค (นิติพงษ์ และ เอกชัย, 2552)

1) Capsule ป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาว และช่วยในการเกาะติดกับอุปกรณ์ต่าง ๆ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้ง่าย

2) Coagulase เปลี่ยนไฟปริโนเจนเป็นไฟบรินป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิส

3) Exfoliatin toxin (ET) ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์ที่เกาะติดกับชั้นหนังกำพร้าทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอก (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS)

4) Hyaluronidase ย่อยกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อทำให้เชื้อแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น

5) Hemolysin เป็นโปรตีนที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

6) Leucosidin ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการทำให้เกิดรูที่ cytoplasmic membrane

7) Lipase ย่อยสลายไขมันที่สะสมบริเวณผิวหนังเพื่อการบุกรุกเข้าสู่ผิวหนัง

8) Protease ย่อยสลายคอลลาเจนและโปรตีนอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อ

9) Protein A จับกับ Fc receptor ของแอนติบอดี้และยับยั้งกระบวนการการฟาโกไซโทซิส

10) Toxic shock syndrome toxin (TSST) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมีอาการท้องร่วง อาเจียนและช็อค

2.2 แบคเทอริโอเฟจ

2.2.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Frederick W. Twort นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษในปี ค.ศ. 1915 โดยได้อธิบายการติดเชื้อของแบคทีเรีย *Staphylococci* ว่าตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรียสามารถผ่านกระดาษกรองได้เหมือนกับไวรัสของสัตว์และไวรัสของพืชแต่ไม่ได้รับการยอมรับจนต่อมาในปี ค.ศ. 1917 Felix d'Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนนาดาได้ทำการทดลองเกี่ยวกับเชื้อ *Shigella aysenteriae* ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคบิด พบว่าเกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Twort โดย d'Herelle ได้ทำการแยกเชื้อ *S. dysenteriae* จากอุจจาระและนำอุจาระไปกรองแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวที่กรองได้ผสมกับอาหารที่มีเชื้อ *S. dysenteriae* จากนั้นบ่มไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อ จึงได้สรุปว่าส่วนที่ผ่านกระดาษกรองได้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และให้ความหมายของแบคเทอริโอเฟจว่า "ตัวกินแบคทีเรีย" (Adams, 1958)

2.2.2 คุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

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

แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูง เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจึงสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้โดยไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อของโฮสต์และแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในโฮสต์ (Sandeep, 2006; Weber-Dabrowska et al., 2003) สามารถคัดเลือกและแยกแบคเทอริโอเฟจได้จากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น น้ำเสีย ทางระบายน้ำเสีย อุจจาระ ดิน น้ำพุ เป็นต้น

2.2.3 ชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

แบ่งตามวงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ (Phage life cycle) มี 2 ชนิด (Abedon, 2008)

2.2.3.1 Lytic phage หรือ virulent phage หมายถึง แบคเทอริโอเฟจที่เมื่อส่งสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียแล้วมีการใช้สารต่าง ๆ จากแบคทีเรียเจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนและจีโนม จากนั้นจะประกอบส่วนต่าง ๆ เข้าเป็น phage progeny เพิ่มจำนวนแล้วทำให้แบคทีเรียแตกออกเพื่อให้ progeny ออกมา และเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียอื่นต่อไป เมื่อเลี้ยงแบคเทอริโอเฟจร่วมกับแบคทีเรียแล้วผสมวุ้นราดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อจะสังเกตเห็นแบคทีเรียถูกทำลายเป็นวงใส เรียกว่าพลาค (plaque)

วงจรชีวิตแบบไลติคประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (Boyd, 1995; Maloy et al., 1994)

1) การเกาะติด (adsorption) แบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปจับกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่บริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ (recepter) ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก

2) การส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (penetration) แบคเทอริโอเฟจจะส่งสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียโดยส่วนประกอบต่าง ๆ ยังอยู่นอกเซลล์

3) การสังเคราะห์สารพันธุกรรมและโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ (biosynthesis) เมื่อสารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียจะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวเองและเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจแทน

4) การประกอบตัวของแบคเทอริโอเฟจ (assembly) โปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียจะประกอบกันขึ้นเป็นอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่สมบูรณ์

5) การทำให้แบคทีเรียแตกสลาย (lysis) เป็นขั้นตอนที่แบคเทอริโอเฟจปล่อยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyem) และ โฮลิน (holin) ออกมาย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อกระจายตัวออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

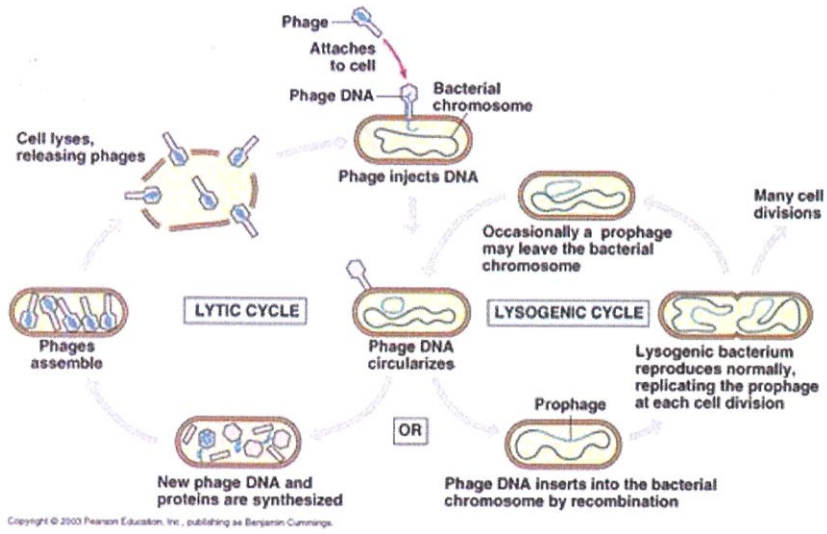
2.2.3.2 Lysogenic phage หรือ temperate phage หมายถึง แบคเทอริโอเฟจที่นำสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไม่มีการสร้าง phage progeny แต่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจจะสอดแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกจีโนมของแบคเทอริโอเฟจระยะนี้ว่า prophage เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมแบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี prophage แฝงอยู่ด้วย กระบวนการนี้เรียกว่า lysogenization แบคทีเรียที่มี prophage แฝงอยู่เรียกว่า lysogen หรือ lysogenic bacteria (รูปที่ 2.1) การอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียเจ้าบ้านและ lysogenic phage สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย เช่น เปลี่ยนแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) อย่างไรก็ตามวงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจทั้งสองประเภท สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงไปมาระหว่างกันและกันได้ (interchangeable) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อม สารอาหารภายในโฮสต์ วงจรชีวิตแบบไลโซจินิคประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (Alcamo, 1996; Mckane and Kandel, 1996)

1) การเกาะติด (adsorption) แบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปจับกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่บริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ (recepter) ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก

2) การส่งสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่แบคทีเรีย โดยสารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลีอิกที่ส่งเข้าไปจะเป็นเส้นตรงหลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวนปิด

3) การสอดแทรกดีเอนเอของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย (integration) โดยอาศัยเอนไซม์อินทีเกรส (integrase enzyme) และจะแบ่งตัวไปพร้อม ๆ กับการแบ่งตัวของแบคทีเรีย

4) การชักนำไปสู่วงจรแบบไลติก (induction) เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุดังนี้ เช่น ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหายหรือปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่น แสงอุลตราไวโอเลต หรือสารเคมีต่าง ๆ เป็นต้น



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจแบบ lytic (ซ้าย) และ lysogenic (ขวา)
ที่มา: www.niles-hs.k12.il.us/jacnau/chpt184.gif **(30มิถุนายน 2561)**

2.2.4 การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ

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

1) พลาคใส (clear plaque) เกิดจากแบคเทอริโอเฟจมีการเพิ่มปริมาณภายในเซลล์เจ้าบ้านเป็นวงจรชีวิตแบบไลติคทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย จึงมีลักษณะของพลาคใส

2) พลาคขุ่น (turbid plaque) เกิดจากเทมเพอเรตเฟจ ซึ่งในช่วงแรกจะมีการเพิ่มปริมาณด้วยวงจรชีวิตแบบไลติคจนถึงระยะหนึ่งจะเข้าสู่วงจรชีวิตแบบไลโซจินิค ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านไม่แตกสลาย จึงปรากฏให้เห็นเป็นพลาคขุ่น

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

Senait and Moorty (2016) ได้มีการศึกษาแยกเชื้อ *Staphylococcus* จากอาหารสำเร็จรูป ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในโรงแรม และร้านอาหารรอบ ๆ โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร blood agar plate จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และเอนไซม์โคเอกูเลส (Coagulase) ทดสอบการย้อมแกรม (gram's staining) ทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลแมนิทอลบนอาหาร manitol salt agar ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลมอลโตส (maltose) บนอาหาร purple agar base และทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin,

chloramphenicol, erythromycin, gentamycin, neomycine, streptomycin, trimethoprim, norfloxacin, tetracycline ผลที่ได้จากการทดลองนี้คือพบอาหารที่มีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ ได้แก่ เบอร์เกอร์, เนื้อที่หั่นเป็นชิ้น, เนื้อย่าง, ไก่ย่าง, ซิกาเวท (Siga wet) โดยในเนื้อย่างเป็นอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* ปริมาณมากที่สุด และในการทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะนั้นพบว่าเชื้อมีความไวต่อ Ampicillin มากที่สุด ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสามารถส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ผู้ประกอบการจึงควรคำนึงถึงผลกระทบและสุขภาพของผู้บริโภคด้วย

หรือชนิด MRSA Reem et al. (2014) ได้ทำการทดลองแยกเชื้อ *S. aureus* ที่ทนต่อเมธิซิลิน (methicillin) และที่ไวต่อเมธิซิลิน หรือชนิด methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) จากบริเวณสิ่งแวดล้อมในคลินิกโรคตาเพื่อระบุลักษณะทางพันธุกรรม ทำการทดลองโดยใช้ผ้าไฟฟ้าสถิต (electrostatic cloths) ป้ายในบริเวณต่าง ๆ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารชนิดแบบคัดเลือก (Selective medium) เฉพาะ *S. aureus* และอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนหน้าอาหารไปทดสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อเปรียบเทียบกับยีน SCCmer โดยใช้โพสฟิลด์เจลอิเล็คโทรโฟเรซิส (Pulsed-field gel electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีของ Dendrogram เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน จากผลการทดลองมีตัวอย่างทั้งหมด 112 ตัวอย่าง พบว่า 27 ตัวอย่าง เป็น MSSA และ 5 ตัวอย่างเป็น MRSA และจากการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าเชื้อที่แยกได้จากคลินิกโรคตานี้มียีน SCCmec II และ USA1000 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับยีน SCCmec IV และ USA300 ที่แยกได้จากโรงพยาบาล โดยมักจะพบเจอเชื้อได้บ่อยที่บริเวณหมอนรองศรีษะและแป้นพิมพ์ของคอมพิวเตอร์

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคเทอริโอเฟจ

Rahimzadeh et al. (2016) ได้ศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกจากอ่างล้างมือของ NICU ซึ่งจัดเป็นแบคเทอริโอเฟจในแฟมมิลี่ *Siphoviridae* นำมายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเมธิซิลิน (Methicillin) ซึ่งแยกได้จากเลือดของผู้ป่วย

Gutierrez et al. (2016) ได้ศึกษาการนำแบคเทอริโอเฟจ Φ11, K, ΦH5, ΦA72, CAPSa1 และ CAPSa3 มายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 87 สายพันธุ์ ซึ่ง 64 สายพันธุ์แยกได้จากอาหารทะเล และเนื้อในประเทศนิวซีแลนด์ และ 23 สายพันธุ์แยกได้จากเนื้อในประเทศสเปน

Jensen et al. (2015) ได้ศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจชนิดไลติกจากสิ่งแวดล้อม 12 สายพันธุ์ แล้วนำมาทำการทดลองใช้แบคเทอริโอเฟจ 1 พันธุ์และแบคเทอริโอเฟจ 2 สายพันธุ์ที่นำมาผสมกันเพื่อ

ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะเมธิซิลินที่ปนเปื้อนอยู่ในแก้วและเนื้อผ้า

Iwano et al. (2018) ได้ทำการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจ ΦSA012 และ ΦSA039 จากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยแบคเทอริโอเฟจนี้มีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* หลายชนิด โดยสามารถฆ่า *S. aureus* ได้ 93 สายพันธุ์ 40 จีโนไทป์ และ *S. aureus* ชนิดที่ดื้อยาเมธิซิลิน (Methicillin) (MRSA) ได้ 6 สายพันธุ์ 6 จีโนไทป์ จากนั้นได้มีการใช้แบคเทอริโอเฟจ ΦSA012 และ ΦSA039 ไปทดสอบกับหนูที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ผลที่ได้คือแบคเทอริโอเฟจ ΦSA012 สามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้

Rasool et al. (2016) ได้ทำการศึกษาแยกแบคเทอริโอเฟจที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลิน (Methicillin) (MRSA) โดยแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำเสียใน taisalabad ประเทศ Pakistan เพื่อนำมายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่แยกได้จากหนองของผู้ป่วยที่เป็นแผลจากไฟไหม้ ได้ทำการทดลองในกระต่ายโดยการฉีดสารละลายแบคเทอริโอเฟจลงไปบริเวณแผลของกระต่ายที่ติดเชื้อ *S. aureus* ผลที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 - 6 ชั่วโมง แบคเทอริโอเฟจสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีที่สุดและพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เมื่อนำหนองของกระต่ายไปตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีน 10 ชนิด โดยโปรตีนมีขนาด 20 - 155 KDa ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้จากน้ำเสียสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลิน (Methicillin) (MRSA) ได้

Li and Zhang (2014) ได้ทำการศึกษาการนำแบคเทอริโอเฟจ SPW ที่มีวงจรชีวิตเป็นแบบไลติกเฟจซึ่งแยกได้จากน้ำเสียของฟาร์มโคนมมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลิน (Methicillin) (MRSA) และทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม พบว่าแบคเทอริโอเฟจ SPW มีความสามารถทำให้เกิดบริเวณใสที่กว้างบนหน้าอาหารวุ้นสองชั้น แบคเทอริโอเฟจ SPW มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัว 62.5 nm และยาว 105 nm จัดอยู่ในแฟมมิลี่ *Myoviridae* เป็นดับเบิลแสตนดีเอ็นเอไวรัส (dsDNA virus) มีขนาด 65-69 kb มีความต้องการแคลเซียมไอออนในการเกาะติดสามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่กว้าง ทนคลอโรฟอม และไอโซโพรพานอล

O'Flaherty et al. (2005) ได้ทำการศึกษาแยกแบคเทอริโอเฟจจากฟาร์มเลี้ยงวัวเพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในวัว สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ทั้งหมด 2 สายพันธุ์คือ DW2 และ CS1 จากนั้นได้นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าแบคเทอริโอเฟจทั้ง 2 สายพันธุ์นี้อยู่ในแฟมมิลี่ *Siphoviridae* จากนั้นได้นำแบคเทอริโอเฟจทั้ง 2 ชนิด มาผสมกับแบคเทอริโอเฟจแฟมมิลี่ *Myoviridae* 1 ชนิด คือ Phage K แล้วนำไปทดสอบกับวัวแล้วดูปริมาณจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมดิบ (Somatic cell count,SCC) ของวัวหาก SCC ของวัวเพิ่มมากขึ้นแสดงว่าสารละลายแบคเทอริโอเฟจทำให้เกิดการระคายเคืองในวัว แต่การทดลองนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ SCC ดังนั้นสารละลายแบคเทอริโอเฟจนี้ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อวัวและสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish, Union Science, Thailand)
2. หลอดทดลอง (Test Tube, PYREX®, Maxico)
3. ปิเปตต์แก้ว (Pipette, PRECICOLOR HBG, Germany) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปตต์(Micropipette, GILSON, France)ขนาด100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
5. ทิป (Tip, ExtraGene Inc., Taiwan) ขนาด 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
6. บีกเกอร์ (Beaker, PYREX, Germany)
7. ขวดแก้ว (Duran Bottle, SCHOTT DURAN, GERMANY)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask, PYREX, USA)
9. กระบอกตวง (Cylinder, NALGENE®, USA)
10. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
11. แท่งแก้วงอ (Spreader)
12. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
13. ช้อนตักสาร (Spatula)
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
15. ไม้พันสำลี (Cotton swabs)
16. สไลด์ (Slide, SAIL, China)
17. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass, HAD, Union Science)
18. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube, Becton Dickinson, USA)
19. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube, ExtraGene Inc., Taiwan)
20. ตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร (CORNING®, Germany)
21. หลอดฉีดยา (Syringe, NIPRO, Thailand)

3.2 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator, memert, The Novacel® Solution for LASER Fiber & LASER CO_2)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker, Lab. Companion, USA)
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow, HOLTEN, HOLTEN LAMINER AIR A/S)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, TOMY, JAPAN)
5. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4ตำแหน่ง (Balance, BP 221S, sartorios, Germany)
6. กระดาษวัดพีเอช (pH Paper, Universal indicator, Germany)
7. ตู้เย็น (Refrigerator, NR-BT264, Panasonic, Japan)
8. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, BINDER, SCIENTIFIC PROMOTION)
9. เครื่องผสม (Vortex Mixer, G560E, Scientific Industries, USA)
10. กล้องจุลทรรศน์ (Optical Microscopes, OLYMPUS, OLYMPUS POTICAL)
11. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper, SONIC, Thailand)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, MERCK, Germany)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder Type I, TM Media, India)
3. ทริปโตน (Tryptone Powder, Sisco, India)
3. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H2O$, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
4. สารละลาย Saline-Magnesium (SM solution)
5. ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl, Vivantis, USA)
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (KH_2PO_4, AjaxFinechem Pty Ltd., Australia)
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (Na_2HPO_4, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
8. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
9. เปปโตน (Peptone, Difco™, Becton, Dickinson and Company Sparks)
10. เจลาติน (Gelatin, Fisher Chemical, USA)
11. สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
12. น้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram Iodine, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
13. สีซาฟรานิน (Safranin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
14. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2, ศิริบัญชา, ประเทศไทย)

15. ชุดทดสอบโคแอคกูแลส (Coagulase Test, BBL™, Becton, Dickinson and Company Sparks)

16. วาสลีน (Vasline, Vasline® Jelly, Univernity)

17. สีนิโกรซิน (Nigrosin, Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

18. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุราการมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

15. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar (BPA, Difco™, Becton, Dickinson and Company Sparks) ที่เติม Egg Yolk Tellurite Supplement (Scaharlau, Spain) (ภาคผนวก ก)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani Agar (LB, Difco™, Becton, Dickinson and Company Sparks) (ภาคผนวก ก)

3. อาหาร Mannitol Salt Agar (MSA, BBL™, Becton, Dickinson and Company Sparks) (ภาคผนวก ก)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI, Himedia, India) (ภาคผนวก ก)

3.5 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

3.5.1.1 ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เก็บตัวอย่างจากห้องน้ำหญิงอาคารพระจอมเกล้า คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ชั้น G, 1, และ 2 โดยเก็บบริเวณลูกบิดประตูฝั่งด้านในของห้องน้ำและบริเวณที่กดชักโครก จำนวน 4 ห้อง กำหนดให้รหัสอักษรตัวที่ 1 เป็นชั้นของห้องน้ำได้แก่ ชั้น G, 1, และ 2 รหัสอักษรตัวที่ 2 กำหนดให้เป็นบริเวณที่เก็บตัวอย่างได้แก่อักษร A คือบริเวณลูกบิดประตูฝั่งด้านในของห้องน้ำ, อักษร B คือบริเวณที่กดชักโครก และรหัสอักษรตัวที่ 3 กำหนดให้เป็นห้องน้ำห้องที่ 1, 2, 3 และ 4 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ตามรหัสดังต่อไปนี้ GA1, GA2, GA3, GA4, GB1, GB2, GB3, GB4, 1A1, 1A2, 1A3, 1A4, 1B1,1B2, 1B3, 1B4, 2A1, 2A2, 2A3, 2A4, 2B1, 2B2, 2B3, และ 2B4

การเก็บตัวอย่างบริเวณลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงฝั่งด้านในใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วมาทำการป้าย (swab) 3 รอบจากซ้ายไปขวาที่บริเวณลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงฝั่งด้านในให้ได้พื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร (5x10 เซนติเมตร) จากนั้นเก็บไม้พันสำลีที่ทำการเก็บตัวอย่างในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่กล่าวไว้ข้างต้น

ส่วนการเก็บตัวอย่างบริเวณที่กดชักโครกใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วมาทำการป้าย 3 รอบจากซ้ายไปขวาให้ได้พื้นที่ 8 ตารางเซนติเมตร (2x4 เซนติเมตร) จากนั้นเก็บไม้พันสำลีที่ทำการเก็บตัวอย่างลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่กล่าวไว้ข้างต้น

3.5.1.2 ตัวอย่างอาหาร 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ลุยสวน, สลัดผัก, ส้มตำ, ขนมเบื้อง, แพนเค้ก, ยำขนมจีน, แอแคร์, ขนมครก, และซูชิ โดยกำหนดให้เป็น F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 และ F9 ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างจากตลาดนัดสุวรรณภูมิอย่างละ 1 ตัวอย่าง

3.5.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรีย *S. aureus*

3.5.2.1 ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียตามหัวข้อ 3.5.1 จากห้องน้ำหญิงอาคารพระจอมเกล้า คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ชั้น G, 1, และ 2 โดยเก็บบริเวณลูกบิดประตูฝั่งด้านในของห้องน้ำและบริเวณที่กดชักโครก จำนวน 4 ห้อง รวมตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ซึ่งการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรียในครั้งนี้ ใช้ปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แทนที่จะเป็น 5 มิลลิตร

3.5.2.2 ตัวอย่างอาหาร 5 ตัวอย่าง คือ แพนเค้ก, แอแคร์, ลุยสวน, สลัดผัก และส้มตำ จากร้านเดิมในตลาดนัดสุวรรณภูมิที่ใช้นำมาแยกแบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างอาหารแต่ละชนิดมาอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนซาไลน์ลงในถุง 225 มิลลิลิตร มัดปากถุงให้แน่นด้วยหนังยาง

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารบนอาหารแข็ง Baird- Parker Agar (BPA)

3.6.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

นำตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากห้องน้ำหญิงที่อยู่ในหลอดทดลองที่มีไม้พันสำลีและสารละลายบัฟเฟอร์ SM 5 มิลลิลิตร จากข้อ 3.5.2.1 นำมาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (Vortex mixer) เพื่อให้เชื้อที่ติดบนสำลีหลุดออกมากระจายในสารละลายให้มากที่สุด ปิเปตต์

ตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง BPA จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร (Spread) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีดำกลมมันวาวมีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี (Bennet et al., 2014) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหาร

ใช้วิธีการดัดแปลงของสุรีย์ (2553) นำตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากอาหารแต่ละชนิดมาใส่ถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว อย่างละ 25 กรัม ทำให้ละเอียดโดยใช้ครกและนำมาใส่ในถุงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมเปปโตนซาไลน์ลงในถุง 225 มิลลิลิตร ปิเปตต์ตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง BPA ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร (Spread) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีดำกลมมันวาวมีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี (Bennet et al., 2014) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

3.6.2.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนี

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากอาหารแข็ง BPA ที่มีลักษณะสีดำกลมมันวาวมีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนีนำมาขีด (cross streak) ลงบนอาหารแข็ง Luria Bertani Agar (LB Agar) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูน สีครีม เหลือง หรือส้ม (Rath and Padhy, 2015) วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Prakash, 2014)

3.6.2.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเหลว LB ที่บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลงบริเวณตรงกลางของแผ่นปิดสไลด์นำวาสลีนทาบริเวณมุมของแผ่นปิดสไลด์ 4 มุมจากนั้นนำสไลด์หลุมมาปิดแผ่นปิดสไลด์ที่มีหยดน้ำที่มีเชื้อ *S. aureus* โดยให้บริเวณที่เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ตรงกลางระหว่างหลุมตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (กัญจนา และคณะ, 2544)

3.6.2.3 การทดสอบการติดสีแกรม

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ gram strain โดยหยดน้ำปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากอาหารแข็ง LB มาเกลี่ย (smear) ลงบนหยดน้ำรอจนแห้งแล้วนำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีนหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนซ้ำอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ 1 นาที หยดเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงบนรอยเกลี่ยเชื้อทิ้งไว้ 10 - 15 วินาที ล้างเอทานอลออกด้วยน้ำกลั่นจากนั้นจึงหยดสีซาฟรานินลงบนรอยเกลี่ยเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีซาฟรานินออกด้วยน้ำรอจนแห้งส่องดูการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (กนกรัตน์ และคณะ, 2558)

3.6.2.4 การวัดขนาดเซลล์

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาย้อมสีแบบ negative strain โดยใช้สีนิโกรซิน (nigrosin) หยดลงบริเวณปลายด้านหนึ่งของสไลด์แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อหยดน้ำลงข้างหยดสีจากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ลงในหยดน้ำใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นมาวางแตะหยดทั้งสองจากนั้นลากสไลด์ช้า ๆตามแนวยาวให้ส่วนผสมแผ่ออกรอจนแห้งส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (กัญจนา และคณะ, 2544)

3.6.3 การทดสอบลักษณะชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

3.6.3.1 การทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar (MSA)

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากอาหารแข็ง BPA ตามลักษณะที่กล่าวไว้ดังหัวข้อ 3.6.1.1 มา Cross Streak บนอาหารแข็ง MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA จะมีสีเหลือง และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง (Aryal, 2016)

3.6.3.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย*S. aureus* จากอาหารแข็ง BPA มา Cross Streak บนอาหารแข็ง LB Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (นันทนา, 2537) หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จะเกิดฟองอากาศบริเวณที่แตะเชื้อลงไป

3.6.3.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (Coagulase)

เขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง BPA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHI) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เติมโคแอคกูเลสพลาสมา (coagulase plasma) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหาร BHI ที่ผ่านการบ่มแล้ว นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจดูการแข็งตัวเมื่อเวลาผ่านไป 2, 4 และ 24 ชั่วโมง (Sperber et al., 1975)

3.6.4 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เริ่มต้น

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวน 1 โคโลนี จากอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในขวดอาหารขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะนิ่งอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.6.5 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

3.6.5.1. การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

3.6.5.1.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ทำการเก็บตัวอย่างตามหัวข้อ 3.5.2.1 นำตัวอย่างทั้งหมดที่ได้ทั้ง 24 ตัวอย่าง เทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วแบ่งใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อนำไปปั่นเหวี่ยงนำมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในขวดที่ฆ่าเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจในขั้นตอนต่อไป

3.6.5.1.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation without Enrichment)

นำตัวอย่างใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจที่เตรียมได้ตามข้อ 3.6.5.1.1 ไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค (ตามข้อ 3.6.6) โดยในขั้นตอนของการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างนั้น ปริมาตรของตัวอย่างที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจที่ใช้คือปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาผสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลท จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลท ที่เป็นตัวแทนของตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่แยกแบคทีเรียได้

3.6.5.1.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation with Enrichment)

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6.5.1.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 1X LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *S. aureus* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างออกมาจากขวดเพาะเลี้ยง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในขวดที่ฆ่าเชื้อ และนำไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค (ตามข้อ 3.6.6)

3.6.5.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างอาหาร

3.6.5.2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างอาหาร 5 ชนิด คือ แพนเค้ก, แอแคร์, ลุยสวน, สลัดผัก และส้มตำ จากตลาดนัดสุวรรณภูมิซึ่งเป็นอาหารที่ให้ผลทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเป็นแบคทีเรีย *S. aureus* นำอาหารแต่ละชนิดมาใส่ในถุงที่ฆ่าเชื้อแล้ว อย่างละ 25 กรัม ทำให้ละเอียดโดยใช้ครกและนำมาใส่ในถุงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนซาไลน์ลงในถุง 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อ แล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในขวดที่ฆ่าเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจในขั้นตอนต่อไป

3.6.5.2.2 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation without Enrichment)

นำตัวอย่างใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจที่เตรียมได้ตามข้อ 3.6.5.2.1 ไปตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค (ตามข้อ 3.6.6) โดยใช้ปริมาตรของตัวอย่างที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้านที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลทจำนวนทั้งหมด 5 ไอโซเลท ที่เป็นตัวแทนของตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่แยกแบคทีเรียมาได้ (โดยใช้ตัวอย่างที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจจากอาหารชนิดใดกับตัวแทนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกมาได้จากอาหารชนิดนั้น ๆ)

3.6.5.2.3 การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation with Enrichment)

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6.5.2.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทำตามวิธีในข้อ 3.6.5.1.3

3.6.6 วิธีการตรวจการเกิดพลาค (plaque assay)

ใช้วิธีดัดแปลงของ Clokie and Kropinski (2009) นำส่วนใสที่ได้จากการกรอง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และแบคทีเรียเจ้าบ้าน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB (top agar) ที่ประกอบด้วยวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกันแล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB (bottom agar) ผสมให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่งโดยการวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นรอให้วุ้นแข็งตัวก่อนนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจโดยดูจากการเกิดขึ้นของพลาค (plaque) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น (double layer agar)

3.6.7 วิธีการชะตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจจากจานอาหารวุ้นสองชั้น

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ SM ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวนจานอาหารวุ้นสองชั้นทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากจานอาหารวุ้นสองชั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อนำไปกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหาร

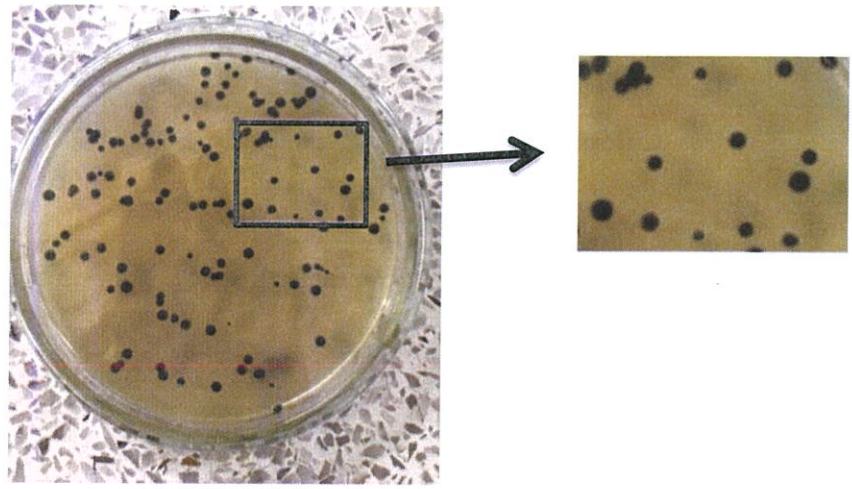
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ทำการเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เนื่องจากในงานวิจัยของ Gutierrez et al. (2016) พบว่าแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและมักจะปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมสู่อาหาร โดยอาหารที่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เช่น อาหารทะเล, เนื้อสด, นม, ชีส, แฮม, พาย และอาหารที่มีการสัมผัสกับพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากห้องน้ำที่บริเวณลูกบิดห้องน้ำและบริเวณชักโครก ชั้น G, 1, และ 2 โดยเก็บในแต่ละชั้นจำนวน 4 ห้อง ของอาคารพระจอมเกล้า สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการใช้มือสัมผัส เพื่อนำมาแยกแบคทีเรีย โดยมีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ส่วนการแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากอาหารนั้น ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย จากตลาดนัดสุวรรณภูมิ จำนวนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ลุยสวน, สลัดผัก, ส้มตำ, ขนมเบื้อง, แพนเค้ก, ยำขนมจีน, แอแคร์, ขนมครก, และซูชิ

นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง Baird-Parker Agar (BPA) และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* แล้วจากนั้นจึงทำการทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอลและเจริญบนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar (MSA), การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase), เอนไซม์โคเอกูเลส (coagulase) และการย้อมแกรม (Senait and Moorty, 2016)

4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Agar (BPA)

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างห้องน้ำ 24 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหาร 9 ตัวอย่าง นำมาทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม 20 ตัวอย่าง ได้แก่ GA1, GA2, GA3, GA4, GB2, 1A1, 1A2, 1A3, 1A4, 1B1, 1B2, 1B3, 1B4, 2A1, 2A2, 2A3, 2B1, 2B2, 2B3 และ 2B4 ตัวอย่างจากอาหาร 7 ตัวอย่าง ได้แก่ F1, F2, F3, F5, F7, F8 และ F9 มีลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* คือ โคโลนีสีดำ, กลม, มันวาว, โค้งนูน และมีบริเวณใสรอบนอกโคโลนี (Bennet et al., 2014) ดังรูปที่ 4.1 จากการคัดแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหาร ได้คัดเลือกโคโลนีมาจำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท (1 โคโลนี คือ 1 ไอโซเลท) ดังตารางที่ 4.1

จากผลการทดลองข้างต้นลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีลักษณะโคโลนีกลม, สีดำ และมีบริเวณโซนขาวขุ่นรอบโคโลนี เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถรีดิวซ์เทลลูไรท์ (tellurite) ในอาหารแข็ง BPA ทำให้โคโลนีมีสีดำ และยังสามารถสร้างเอนไซม์เลซีธีเนส (lethicinase) มาย่อยเลซีธิน (lecitine) ในไข่แดงทำให้เกิดกลีเซอไรด์ (diglycerides) ที่ไม่ละลายน้ำและตกตะกอนทำให้เกิดบริเวณขุ่นรอบโคโลนีและปฏิกิริยาโปรตีโอไลซิส (proteolysis) ย่อยโปรตีนทำให้เกิดบริเวณใสรอบนอกโคโลนี อาหารแข็ง BPA เป็นอาหารเลือกจำเพาะ (selective media) เนื่องจากมีไพรูเวท (pyruvate) และไกลซีน (glycine) ที่ช่วยในการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และยังประกอบด้วยลิเทียม (lithium) และเทลลูไรท์ (tellurite) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นที่ปนเปื้อน (Siegrist, 2011)



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง BPA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 1	GA1	S_1, S_2, S_3, S_4 และ S_5
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 2	GA2	S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{14} และ S_{15}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 3	GA3	S_{16} และ S_{17}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 4	GA4	S_{18}, S_{19} และ S_{20}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 1	GB1	-
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 2	GB2	S_{21}, S_{22}, S_{23} และ S_{24}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 3	GB3	-
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น G ห้องที่ 4	GB4	-
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 1	1A1	S_{25}, S_{26}, S_{27}, S_{28}, S_{29}, S_{30}, S_{31}, S_{32}, S_{33}, S_{34}, S_{35}, S_{36}, S_{37}, S_{38}, S_{39}, S_{40}, S_{41}, S_{42}, S_{43}, S_{44}, S_{45}, S_{46}, S_{47}, S_{48}, S_{49}, S_{50}, S_{51}, S_{52}, S_{53}, S_{54}, S_{55}, S_{56}, S_{57}, S_{58}, S_{59}, S_{60}, S_{61}, S_{62}, S_{63}, S_{64}, S_{65}, S_{66}, S_{67}, S_{68}, S_{69}, S_{70}, S_{71} และ S_{72}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 2	1A2	S_{73}, S_{74}, S_{75}, S_{76} และ S_{77}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 3	1A3	S_{78}, S_{79}, S_{80}, S_{81}, S_{82}, S_{83}, S_{84}, S_{85}, S_{86}, S_{87}, S_{88}, S_{89}, S_{90}, S_{91}, S_{92} และ S_{93}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 4	1A4	S_{94}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 1	1B1	S_{95}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 2	1B2	S_{96}, S_{97}, S_{98}, S_{99}, S_{100}, S_{101}, S_{102}, S_{103}, S_{104}, S_{105}, S_{106}, S_{107}, S_{108}, S_{109}, S_{110}, S_{111}, S_{112} และ S_{113}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 3	1B3	S_{114}, S_{115}, S_{116}, S_{117}, S_{117}, S_{118}, S_{119}, S_{120}, S_{121}, S_{122}, S_{123}, S_{124}, S_{125}, S_{126}, S_{127} และ S_{128}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 1 ห้องที่ 4	1B4	S_{129}, S_{130}, S_{131}, S_{132}, S_{133} และ S_{134}

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 1	2A1	S_{135}, S_{136}, S_{137}, S_{138}, S_{139} และ S_{140}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 2	2A2	S_{141}, S_{142}, S_{143} และ S_{144}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 3	2A3	S_{145} และ S_{146}
ลูกบิดประตูห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 4	2A4	-
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 1	2B1	S_{147}, S_{148}, S_{149}, S_{150}, S_{151} และ S_{152}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 2	2B2	S_{153}, S_{154} และ S_{155}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 3	2B3	S_{156}, S_{157}, S_{158}, S_{159}, S_{160} และ S_{161}
ชักโครกห้องน้ำหญิงชั้น 2 ห้องที่ 4	2B4	S_{162}, S_{163}, S_{164}, S_{165}, S_{166}, S_{167}, S_{168}, S_{169} และ S_{170}
ลุยสวน	F1	S_{171}, S_{172}, S_{173}, S_{174}, S_{175}, S_{176}, S_{177}, S_{178}, S_{179} และ S_{180}
สลัดผัก	F2	S_{181}
ส้มตำปู	F3	S_{182}, S_{183}, S_{184}, S_{185}, S_{186}, S_{187}, S_{188}, S_{189}, S_{190}, S_{191}, S_{192}, S_{193}, S_{194}, S_{195}, S_{196}, S_{197} และ S_{198}
แพนเค้ก	F5	S_{199}
แอแคร์	F7	S_{200} และ S_{201}
ขนมครก	F8	S_{202} และ S_{203}
ซูชิ	F9	S_{204}

4.1.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา

4.1.2.1 การตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ในการตรวจดูลักษณะของโคโลนีและการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB บ่ม 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเป็น *S. aureus* มีลักษณะกลม, ทึบแสง, ขอบเรียบ, นูน, มีสีครีม, เหลือง หรือส้ม (Williams and Wilkins, 1994)

ในการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารมีทั้งหมด 204 ไอโซเลท มีขนาดโคโลนี 0.45 - 1.55 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.2 โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมากกว่าหรือเท่ากับ 1 มิลลิเมตร (Precit et al., 2015) ดังรูปที่ 4.2

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.1.2.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

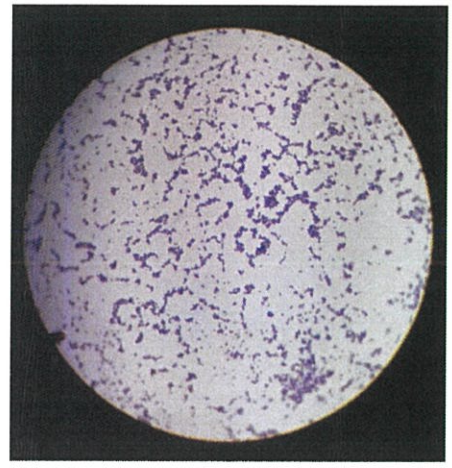
ในการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท ที่เจริญในอาหารเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากการทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหาร ทั้งหมด 204 ไอโซเลท พบว่าไม่สามารถเคลื่อนที่ ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ไม่มีแฟลกเจลล่าที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (Williams and Wilkins, 1994)

4.1.2.3 การทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ในการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลตจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารทั้งหมด 183 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, ,S_3, S_5, S_6, S_7, S_8, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19},S_{20}, S_{21}, S_{22}, S_{23}, S_{24}, S_{26}, S_{27}, S_{28}, S_{29}, S_{30}, S_{31}, S_{32}, S_{33}, S_{34}, S_{35}, S_{36}, S_{41}, S_{42}, S_{43}, S_{44}, S_{45}, S_{46}, S_{47}, S_{48}, S_{49}, S_{50}, S_{51}, S_{52}, S_{53}, S_{54}, S_{55}, S_{56}, S_{57}, S_{58}, S_{59}, S_{60}, S_{61}, S_{62}, S_{63}, S_{64}, S_{65}, S_{66}, S_{67}, S_{68}, S_{69}, S_{70}, S_{71}, S_{72}, S_{73}, S_{74}, S_{75}, S_{76}, S_{81}, S_{82}, S_{83}, S_{84}, S_{85}, S_{86}, S_{87}, S_{89}, S_{90}, S_{91}, S_{92}, S_{93}, S_{94}, S_{95}, S_{96}, S_{97}, S_{98}, S_{99}, S_{100}, S_{105}, S_{106}, S_{107}, S_{108}, S_{109}, S_{110}, S_{111}, S_{112}, S_{113}, S_{114}, S_{115}, S_{116}, S_{117}, S_{118}, S_{119}, S_{120}, S_{121}, S_{122}, S_{123}, S_{124}, S_{125}, S_{126}, S_{127}, S_{128}, S_{133}, S_{134}, S_{135}, S_{136}, S_{137}, S_{138}, S_{139}, S_{140}, S_{141}, S_{142}, S_{143}, S_{144}, S_{145}, S_{146}, S_{147}, S_{148}, S_{153}, S_{154}, S_{155}, S_{156}, S_{157}, S_{158}, S_{159}, S_{160}, S_{161}, S_{162}, S_{163}, S_{164}, S_{165}, S_{166}, S_{167}, S_{169} S_{170} S_{171}, S_{172}, S_{173}, S_{174}, S_{175}, S_{176}, S_{177}, S_{178}, S_{179}, S_{180}, S_{181}, S_{182}, S_{183}, S_{184}, S_{185},S_{186}, S_{187}, S_{190}, S_{191}, S_{192}, S_{193}, S_{194}, S_{197}, S_{198}, S_{199}, S_{200} และ S_{203} ดังตารางที่ 4.2

เมื่อนำไปย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เซลล์ของ *S. aureus* จะมีลักษณะเป็นทรงกลมติดสีม่วงของสีคริสตรัลไวโอเลต (crystalviolet) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มักจะอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม (Williams and Wilkins, 1994) ดังรูป 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์ *S. aureus* ย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.2..4 การวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ในการวัดขนาดเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 183 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยการย้อมสีพื้นหลังด้วยนิโกรซินส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารจำนวน 183 ไอโซเลท ได้แก่ S_1, S_2, ,S_3, S_5, S_6, S_7, S_8, S_{13}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{19},S_{20}, S_{21}, S_{22}, S_{23}, S_{24}, S_{26}, S_{27}, S_{28}, S_{29}, S_{30}, S_{31}, S_{32}, S_{33}, S_{34}, S_{35}, S_{36}, S_{41}, S_{42}, S_{43}, S_{44}, S_{45}, S_{46}, S_{47}, S_{48}, S_{49}, S_{50}, S_{51}, S_{52}, S_{53}, S_{54}, S_{55}, S_{56}, S_{57}, S_{58}, S_{59}, S_{60}, S_{61}, S_{62}, S_{63}, S_{64}, S_{65}, S_{66}, S_{67}, S_{68}, S_{69}, S_{70}, S_{71}, S_{72}, S_{73}, S_{74}, S_{75}, S_{76}, S_{81}, S_{82}, S_{83}, S_{84}, S_{85}, S_{86}, S_{87}, S_{89}, S_{90}, S_{91}, S_{92}, S_{93}, S_{94}, S_{95}, S_{96}, S_{97}, S_{98}, S_{99}, S_{100}, S_{105}, S_{106}, S_{107}, S_{108}, S_{109}, S_{110}, S_{111}, S_{112}, S_{113}, S_{114}, S_{115}, S_{116}, S_{117}, S_{118}, S_{119}, S_{120}, S_{121}, S_{122}, S_{123}, S_{124}, S_{125}, S_{126}, S_{127}, S_{128}, S_{129}, S_{130}, S_{131}, S_{132}, S_{133}, S_{134}, S_{135}, S_{136}, S_{137}, S_{138}, S_{139}, S_{140}, S_{141}, S_{142}, S_{143}, S_{144}, S_{145}, S_{146}, S_{147}, S_{148}, S_{153}, S_{154}, S_{155}, S_{156}, S_{157}, S_{158}, S_{159}, S_{160}, S_{161}, S_{162}, S_{163}, S_{164}, S_{165}, S_{166}, S_{167}, S_{169} S_{170} S_{171}, S_{172}, S_{173}, S_{174}, S_{175}, S_{176}, S_{177}, S_{178}, S_{179}, S_{180}, S_{181}, S_{182}, S_{183}, S_{184}, S_{185},S_{186}, S_{187}, S_{190}, S_{191}, S_{192}, S_{193}, S_{194}, S_{196}, S_{197}, s_{198}, S_{199}, S_{200} และ S_{203} ดังตารางที่ 4.2 มีขนาดเซลล์ขนาด 0.5 – 1 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.4

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร (Williams and Wilkins, 1994)

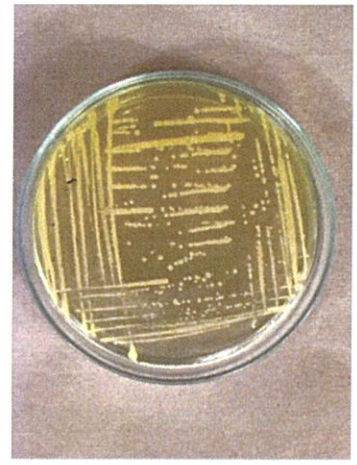
รูปที่ 4.4 ขนาดของเซลล์ที่เป็น *S. aureus* เมื่อย้อมด้วยสีนิโกรซิน (nigrosin) แล้วส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.3 การทดสอบลักษณะชีวเคมี

4.1.3.1 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar (MSA)

ในการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA จำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างห้องน้ำ มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองและเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง MSA จากสีชมพูเป็นสีเหลืองจำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดลองการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารแข็ง MSA ข้างต้นให้การเปลี่ยนสีอาหารเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลืองในอาหาร MSA ซึ่งมีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อ *S. aureus* หมักน้ำตาลแมนนิทอลทีมีอยู่ในอาหาร MSA จึงเกิดกรดขึ้นทำให้อินดิเคเตอร์ในอาหารเปลี่ยนสี นอกจากนี้ยังมีเกลืออยู่ 7.5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่น (Davis, 2005) ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *S. aureus* และการเปลี่ยนสีของอาหาร MSA

4.1.3.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสโดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 เมื่อแตะเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทั้ง 204 ไอโซเลท จากอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองอากาศ จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารมีฟองอากาศเกิดขึ้นจำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ข้างต้นสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) โดยจะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นน้ำและก๊าซออกซิเจนทำให้เกิดฟอง (Yasmeen et al., 2014)

4.1.3.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (Coagulase) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

จากขั้นตอนนี้เป็นต้นไปแบคทีเรียที่ใช้ถูกคัดเลือกมาจำนวน 24 ไอโซเลท ซึ่งทั้ง 24 ไอโซเลท ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีว่าเป็นแบคทีเรีย *S. aureus* จากนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสโดยใช้โคแอคกูเลสพลาสมาโดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมโคแอคกูเลสพลาสมาและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4 และ 24 ชั่วโมง สังเกตการแข็งตัว

พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหาร จำนวน 24 ไอโซเลท ได้แก่ S_2, S_{13}, S_{16}, S_{19}, S_{21}, S_{73}, S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160}, S_{162}, S_{177}, S_{186}, S_{196}, S_{199} และ S_{201} ให้ผลเป็นบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส ดังตารางที่ 4.2

จากผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ข้างต้นเกิดการแข็งตัวของโคแอคกูเลสพลาสมาเนื่องจากเอนไซม์โคแอคกลูเลสทำให้ไฟบริโนเจนในพลาสมาเปลี่ยนเป็นไฟบรินจึงเกิดการแข็งตัวเป็นลิ่มขึ้น (Yasmeen et al., 2014) ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						การทดสอบทางชีวเคมี							
		ลักษณะโคโลนีบน LB		การเคลื่อนที่	ลักษณะของเซลล์			คะตะเลส	การเจริญบนอาหาร MSA	การเจริญบนอาหาร BPA	โคแอคกลูเลส (ชั่วโมง)			
		รูปร่างลักษณะ	ขนาด (mm)		รูปร่าง	ติดสี	ขนาดของเซลล์(μm)				0	2	4	24
	s. aureus	*	1.50	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
GA1	S_2	*	0.45	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1.5	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
GA2	S_{13}	*	0.85	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
GA3	S_{16}	*	0.85	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	3+
GA4	S_{19}	*	0.90	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1.5	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
GB2	S_{21}	*	1.15	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
1A2	S_{73}	*	1.00	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1.5	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
1A3	S_{87}	*	1.00	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1.5	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	1+	1+	2+
1A4	S_{94}	*	1.25	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
1B1	S_{95}	*	1.45	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูน มีบริเวณใส	0	2+	2+	2+

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						การทดสอบทางชีวเคมี						
		ลักษณะโคโลนีบน LB		การเคลื่อนที่	ลักษณะของเซลล์			คะตะเลส	การเจริญบนอาหาร MSA	การเจริญบนอาหาร BPA	โคแอคกลูเลส (ชั่วโมง)			
		รูปร่างลักษณะ	ขนาด (mm)		รูปร่าง	ติดสี	ขนาดของเซลล์(µm)				0	2	4	24
B2	S_{97}	*	1.25	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
1B3	S_{119}	*	1.25	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2B4	S_{133}	*	1.15	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2A1	S_{135}	*	1.55	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2A2	S_{144}	*	1.00	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2A3	S_{146}	*	1.00	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2B1	S_{148}	*	1.25	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2B2	S_{155}	*	1.25	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	1+	1+	2+
2B3	S_{160}	*	1.65	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+
2B4	S_{162}	**	1.40	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1.5	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำนูนมีบริเวณใส	0	2+	2+	2+

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						การทดสอบทางชีวเคมี						
		ลักษณะโคโลนีบน LB		การเคลื่อนที่	ลักษณะของเซลล์			คะตะเลส	การเจริญบนอาหาร MSA	ลักษณะการเจริญบนอาหาร BPA	โคแอคกลูเลส (ชั่วโมง)			
		รูปร่างลักษณะ	ขนาด (mm)		รูปร่างลักษณะ	ติดสี	ขนาดของเซลล์(μm)				0	2	4	24
F1	S_{177}	*	1.40	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำ นูน มีบริเวณใส	0	1+	1+	1+
F2	S_{186}	*	0.80	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำ นูน มีบริเวณใส	0	1+	1+	1+
F3	S_{196}	*	1.05	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำ นูน มีบริเวณใส	0	1+	1+	1+
F5	S_{199}	*	1.05	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	0.5	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำ นูน มีบริเวณใส	0	1+	1+	1+
F7	S_{201}	**	1.00	ไม่เคลื่อนที่	กลม	ม่วง	1	เกิดฟอง O_2	ชมพู → เหลือง	สีดำ นูน มีบริเวณใส	0	1+	1+	1+

การอ่านผล

* โคโลนีมีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีสีขาวนวล

** โคโลนีมีรูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ และมีสีเหลืองนวล, ส้ม

การผลิตเอนไซม์โคแอคกูเลส 0 ไม่เกิดการจับตัวกัน 1+ จับเป็นก้อนแต่ไม่เกิดการรวมกลุ่ม 3+ จับกันเป็นก้อนใหญ่

2+ จับเป็นก้อนและเกิดการรวมกลุ่ม 4+ จับกันเป็นก้อนทั้งหลอดและไม่ขยับ

4.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทำการเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมเก็บตัวอย่างจากบริเวณห้องน้ำหญิง อาคารพระจอมเกล้า คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และตัวอย่างจากอาหารเก็บตัวอย่างจากตลาดนัดสุวรรณภูมิ จากงานวิจัยของ Sandeep (2006) และ Weber-Dabrowska et al. (2003) กล่าวว่าแบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน (host) สูง สามารถคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (บริเวณห้องน้ำ) และตัวอย่างอาหารจากที่เดียวกันกับการแยกแบคทีเรียเจ้าบ้านซึ่งทำการทดลองก่อนหน้านี้ (หัวข้อ 4.1)

4.2.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อม

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณห้องน้ำหญิงอาคารพระจอมเกล้า คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ชั้น G, 1, และ 2 โดยเก็บบริเวณลูกบิดประตูฝั่งด้านในของห้องน้ำและบริเวณที่กดชักโครกของแต่ละชั้น ๆ ละ 4 ห้อง จำนวน 24 ตัวอย่าง การศึกษาในครั้งนี้นำตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจทั้ง 24 ตัวอย่าง มารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไปเตรียมตามหัวข้อ 3.6.5.1.1 แล้วจึงนำไป ตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างของห้องน้ำที่ได้ถูกคัดเลือกแล้วว่าเป็น *S. aureus* จากการทดลองในข้อ 4.1 โดยมีจำนวนแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท ตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค พบว่าแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_2, S_{13}, S_{16},S_{19}, S_{21}, ,S_{73},S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และ S_{162} ทำให้เกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น โดยลักษณะใสที่พบดังกล่าวมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็กปรากฏอยู่ทั่วบริเวณหน้าอาหารวุ้นสองชั้นซึ่งไม่ใช่ลักษณะที่เป็นพลาคเดี่ยว (single plaque) ตามที่ต้องการ จากนั้นจึงนำจานอาหารที่เกิดบริเวณใสไปซะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SM ตามขั้นตอน 3.6.7 เพื่อเก็บเกี่ยวอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่มีอยู่บนผิวหน้าของอาหารวุ้นสองชั้น ทำให้ได้อนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM จากนั้นเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2.1.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบไม่เพิ่มปริมาณและเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมบริเวณห้องน้ำหญิงที่ได้จากการทดลองที่ 4.2.1 นำอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM มาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจเพื่อให้ได้พลาคเดี่ยวโดยทำการทดลองแบบที่ไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจและแบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

4.2.1.1.1 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมบริเวณห้องน้ำหญิงแบบที่ไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจนำอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM มาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจเพื่อให้ได้พลาคเดี่ยวโดยมีแบคทีเรียเจ้าบ้าน 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_2, S_{13}, S_{16},S_{19}, S_{21}, ,S_{73},S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และ S_{162} พบว่าจำนวน 17 ไอโซเลท ได้แก่ S_{16}, S_{19}, S_{21}, S_{73},S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และ S_{162} เกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นเป็นจุดขนาดเล็กซึ่งไม่ใช่ลักษณะที่เป็นพลาคเดี่ยว

ตารางที่ 4.3 ผลการการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	รหัสตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจ	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
S_2	P_2	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
S_{13}	P_{13}	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
S_{16}	P_{16}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{19}	P_{19}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{21}	P_{21}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{73}	P_{73}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{87}	P_{87}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{94}	P_{94}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{95}	P_{95}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{97}	P_{97}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลการการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบไม่เพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

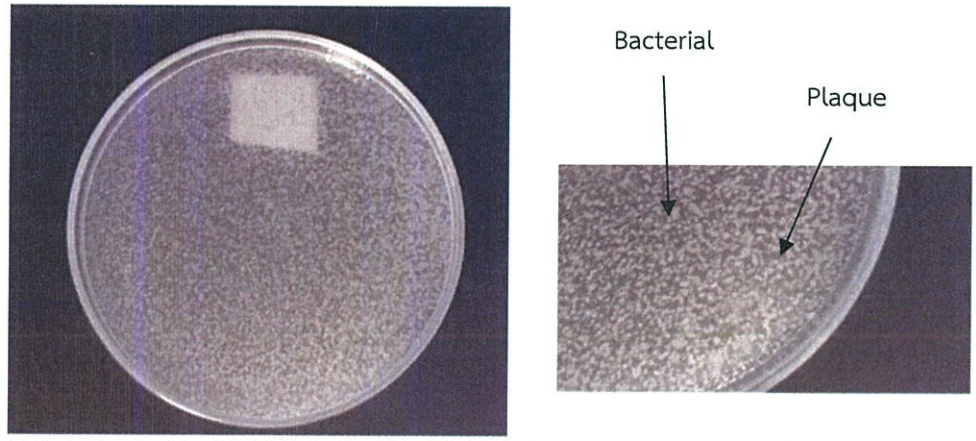
แบคทีเรียเจ้าบ้าน	รหัสตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจ	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
S_{119}	P_{119}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{133}	P_{133}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{135}	P_{135}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{144}	P_{144}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{146}	P_{146}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{148}	P_{148}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{155}	P_{155}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{160}	P_{160}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{162}	P_{162}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค

4.2.1.1.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมบริเวณห้องน้ำหญิงโดยเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ นำอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ SM มาทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจตามวิธีการในหัวข้อ 3.6.5.2.2 โดยมีแบคทีเรียเจ้าบ้าน 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_2, S_{13}, S_{16},S_{19}, S_{21}, ,S_{73},S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และ S_{162} ตรวจหาอนุภาคแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค พบว่าจำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ S_2, S_{16}, S_{19}, S_{21}, S_{73},S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และ S_{162} เกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นเป็นจุดขนาดเล็กซึ่งไม่ใช่ลักษณะที่เป็นพลาคเดี่ยว

ตารางที่ 4.4 ผลการการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมแบบเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

แบคทีเรียเจ้าบ้าน	รหัสตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจ	ผลการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหาร
S_2	P_2	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{13}	P_{13}	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหนาอาหาร
S_{16}	P_{16}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{19}	P_{19}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{21}	P_{21}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{73}	P_{73}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{87}	P_{87}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{94}	P_{94}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{95}	P_{95}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{97}	P_{97}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{119}	P_{119}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{133}	P_{133}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{135}	P_{135}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{144}	P_{144}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{146}	P_{146}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{148}	P_{148}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{155}	P_{155}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{160}	P_{160}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค
S_{162}	P_{162}	พบจุดที่มีลักษณะคล้ายพลาค



รูปที่ 4.6 ลักษณะของ plaque จากตัวอย่างห้องน้ำ ที่ปรากฏผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย S_{160} เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านที่ระดับความเจือจางของแบคเทอริโอเฟจ 10^{-26}

จากการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจจากสิ่งแวดล้อมบริเวณห้องน้ำหญิง พบว่าการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจและแบบที่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจเกิดบริเวณใสบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นเป็นจุดขนาดเล็กซึ่งไม่ใช่ลักษณะที่เป็นพลาคเดี่ยวของการศึกษาทั้งสองรูปแบบ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร ที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจอยู่ไปทำการเจือจางเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดพลาคเดี่ยว (single plaque) บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นแล้วก็ตาม แต่ก็ไม่ปรากฏลักษณะของพลาคเดี่ยวแต่อย่างใด จากผลการทดลองที่เกิดลักษณะดังกล่าวขึ้นอาจเนื่องมาจากผลการเกิดสภาวะการชักนำ (induction) ที่พบในแบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซจินิกได้เกิดการปรับตัวเมื่อมีจำนวนประชากรน้อยลงซึ่งเห็นได้จากการทดลองเมื่อมีการเจือจางจำนวนแบคเทอริโอเฟจให้น้อยลงจึงจะสามารถพบบริเวณใส แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเจือจางแบคเทอริโอเฟจน้อย ๆ (ความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจมาก) กลับไม่พบบริเวณใสหรือพบการเจริญของแบคทีเรียเต็มผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นและรอให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงจะมีการเหนี่ยวนำให้แบคเทอริโอเฟจที่มีชีวิตแบบไลโซจีนิกเปลี่ยนมาเป็นชีวิตแบบไลติก

4.2.2 การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากอาหาร

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างอาหาร ตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างของอาหารที่ได้ถูกคัดเลือกแล้วว่าเป็น *S. aureus* จากการทดลองในข้อ 4.1 โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณและเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ โดยมีแบคทีเรียเจ้าบ้าน 5 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างจากอาหารจำนวน 5 ชนิด คือ ลุยสวน, สลัดผัก, ส้มตำ, แพนเค้ก และแอแคร์

4.2.2.1 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation without Enrichment)

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารแบบไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ โดยมีแบคทีเรียเจ้าบ้าน 5 ไอโซเลท ดังกล่าวข้างต้น พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ S_{177}, S_{186}, S_{196}, s_{199} และ S_{201}ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น

4.2.2.2. การแยกแบคเทอริโอเฟจโดยมีการเพิ่มปริมาณ (Bacteriophage Isolation Enrichment)

การศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารแบบมีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ โดยมีแบคทีเรียเจ้าบ้าน 5 ไอโซเลท ดังกล่าวข้างต้น พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ S_{177}, S_{186}, S_{196}, s_{199} และ S_{201}ไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น

จากการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจจากอาหารพบว่าการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยไม่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจและแบบที่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นทั้งสองรูปแบบแสดงให้เห็นว่าในอาหารไม่มีแบคเทอริโอเฟจ เนื่องจากอาหารมีค่า pH ที่ต่ำและการประกอบอาหารมีการใช้ความร้อนที่มากกว่า 70 องศาเซลเซียส ทำให้แบคเทอริโอเฟจไม่เสถียร Yu et al. (2013) กล่าวว่าแบคเทอริโอแฟจจะเสถียรเมื่ออยู่ในช่วง pH ที่เป็นกลางมากกว่าในช่วง pH ที่เป็นกรดและจะไม่เสถียรเมื่อมีอุณหภูมิที่มากกว่า 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.5 การแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน

แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่นำมาแยก	แบคทีเรียเจ้าบ้าน	วิธีการที่ใช้แยก	ผลการทำ plaque assay
อาคารพระจอมเกล้า สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ห้องน้ำ	S_2,	Without Enrichment	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	พบการเกิดพลาค
		S_{13} และ S_{44}	Without Enrichment	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	ไม่พบการเกิดพลาค
		S_{16}, S_{19}, S_{21}, S_{73}, S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และ S_{162}	Without Enrichment	พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	พบการเกิดพลาค
ตลาดนัดสุวรรณภูมิ	อาหาร	S_{177}, S_{186}, S_{196}, S_{199}, และ S_{201}	Without Enrichment	ไม่พบการเกิดพลาค
			With Enrichment	ไม่พบการเกิดพลาค

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร โดยใช้อาหารแข็ง Baird-Parker Agar นำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาดและลักษณะโคโลนี ขนาดเซลล์ การเคลื่อนที่ และลักษณะชีวเคมีได้แก่ การเจริญบนอาหารแข็ง Mannital Salt Agar ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์โคแอคกูเลส ผลการทดสอบพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร จำนวนทั้งหมด 204 ไอโซเลท โดยแยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 170 ไอโซเลท และจากตัวอย่างอาหาร จำนวน 34 ไอโซเลท จากนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรีย 24 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม จำนวน 19 ไอโซเลท ได้แก่ S_2 ,S_{13}, S_{16},S_{19}, S_{21}, S_{73},S_{87}, S_{94}, S_{95}, S_{97}, S_{119}, S_{133}, S_{135}, S_{144}, S_{146}, S_{148}, S_{155}, S_{160} และS_{162} และเป็นแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหาร จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ S_{177}, S_{186}, S_{196}, S_{199} และ S_{201} เพื่อนำมาใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการแยกแบคเทอริโอเฟจ

จากการศึกษาการแยกแบคเทอริโอเฟจของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหารใช้การตรวจหาอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธีตรวจการเกิดพลาค ในการทดลองเก็บตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจแบบที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณและแบบมีการเพิ่มปริมาณ พบว่าในตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจจากสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้น โดยเกิดบริเวณใสเป็นจุดขนาดเล็กปรากฏอยู่ทั่วบริเวณหน้าอาหารวุ้นสองชั้น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการกรองผ่านตัวกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.20 ไมโครเมตร ที่คาดว่ามีแบคเทอริโอเฟจอยู่ ไปทำการเจือจางเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดพลาคเดี่ยว (single plaque) บนผิวหน้าอาหารวุ้นสองชั้นแล้วก็ตาม แต่ก็ไม่ปรากฏลักษณะของพลาคเดี่ยวแต่อย่างใด ส่วนในตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจจากอาหารไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนหน้าอาหารวุ้นสองชั้นทั้งแบบที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณและแบบที่มีการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ตัวอย่างที่นำมาแยกทั้งแบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ก่อนการนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

2) ควรมีการผสมแบคเทอริโอเฟจกับแบทีเรีย *S. aureus* ที่เป็นเจ้าบ้าน 5 นาที ก่อนจะนำไปผสมกับ LB top agar 7% แล้วเทลงบนจานอาหาร LB agar เพื่อเพิ่มโอกาสให้แบคเทอริโอเฟจเกาะติดกับ *S. aureus* ที่เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Alves et al., 2014)

เอกสารอ้างอิง

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

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

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮาส.

นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. "การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus.*" *สงขลานครินทร์เวชสาร.* 27(4) : 347-358.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2553. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Adam M.R. and Moss M.O. 1995. **Food Microbiology**. Cambridge : The Royal Society of Chemistry.

Alcamo E. 1996. **Fundamentals of Microbiology**. 5th United States of America : Benjamin / Cummings.

Bennett R. W. and Lancette G. A. 2001. **Bacteriological Analytical Manual Chapter 12 *Staphylococcus aureus*.** Food and Drug Administration.

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

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

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

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

DeLeo F. R. and Chambers H. F. 2009. "Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era." *The Journal of Clinical Investigation.* 9 : 2464-2474.

Diana Gutiérrez, Lorena Rodríguez-Rubio, Pilar García, Craig Billington, AruniPremarante, Ana Rodríguez and Beatriz Martínez. 2016. "Phage sensitivity and prophage carriage in *Staphylococcus aureus* isolated from foods in Spain and New Zealand" *International Journal of Food Microbiology.* 230 : 16–20.

D. R. Alves, A. Gaudion, J. E. Bean, P. Perez Esteban, T. C. Arnot, D. R. Harper, W. Kot, L. H., Hansend, M. C. Enright, A and Tobias A. Jenkins. 2014. "Combined use of bacteriophage k and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation." *Applied and Environmental Microbiology.* 21 : 6694–6703.

Farzana Yasmeen, Muhammad Imran Sarwar, Abdul Hakeem, Sikandar Khan Sherwani, Muhammad Shahbaz Hussain, Mubarak Zeb, Irfan Sarwar and MumhamadMumtaz Khan. 2014. "Identification of *Staphylococcus aureus* in Pus samples and its Anti-microbial Susceptibility against Imipenem, Tobramycin and Linezolid." *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy.* 4 : 2049-4963.

Golnar Rahimzadeh, Pooria Gill and Mohammad SadeghRezai. 2016. "Characterization and lytic activity of methicillin-resistant *Staphylococcus.*" *Australasian medical journa*l. 9(6) : 169–175.

Hankin E. H. 1896. "L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera." *Ann. Inst. Pasteur.* 10 : 511.

Hidetomo Iwano, ID, Yusuke Inoue, Takuji Takasago, Hironori Kobayashi, Takaaki Furusawa, Kotomi Taniguchi, Jumpei Fujiki, Hiroshi Yokota, Masaru Usui, Yasunori Tanji, Katsuro Hagiwara, Hidetoshi Higuchi and Yutaka Tamura. 2018. "Bacteriophage ΦSA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model." *Biology*. 8 : 1–13.

Jacques-Antoine Hennekinne, Marie-Laure De Buyser&SylvianeDragacci. 2011. "*Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation." *FEMS Microbiol.* 36 : 815–836.

J.A. Davis, S.R. Farrah and A.C. Wilkie. 2006. "Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar." *Journal compilation*. 42 : 606-611.

Kyle C. Jensen, Bryan B. Hair, Trevor M. Wienclaw, Mark H. Murdock, Jacob B. Hatch, Aaron T. Trent, Tyler D. White, Kyler J. Haskell and Bradford K. Berges. 2015. "Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant." *PLOS ONE*. 10(7) : 1–13.

Longping Li and Zhiying Zhang. 2014. "Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis." *Mol Biol Rep*. 1–10.

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

Mark H. Adums. 1959. **Bacteriophages**. New York : Interscience Publishers.

Markus G. Weinbauer. 2004. "Ecology of prokaryotic viruses." *FEMS Microbiol.* 28 : 127-181.

Mckane L. and Kandel J. 1996. **Microbiology**. United States of America : McGrawHill.

Mimi R. Precit, Daniel J. Wolter, Adam Griffith, Julia Emerson, Jane L. Burns, Lucas R. Hoffman. 2015. "Optimized In Vitro Antibiotic Susceptibility Testing Method for Small-Colony Variant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 3(60) : 1725-1735.

Muhammad Hidayat Rasool, Rukhsana Yousaf, Abu Baker Siddique, Muhammad Saqalein and Mohsin Khurshid. 2016. "Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Bacteriophages Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pakistan." *Jundishapur J Microbiol*. 9(10) : 1–8.

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

Rachel E. Reem, Joany Van Balen, Armando E. Hoet and Colleen M. Cebulla. 2014. "Screening and characterization of *Staphylococcus aureus* from ophthalmology clinic surfaces: a proposed surveillance tool." *Am J Ophthalmol*. 157(4) : 781–787.

Rene N. Beaudoin, Danielle R. DeCesaro, Debrah L. Durkee, and Susan E. Barbaro, Ph.D. 2007. "Isolation of a bacteriophage from sewage sludgeand characterization of its bacterial host cell." *RIVIER ACADEMIC JOURNAL*. 3 : 1–8.

Rosanna Capparelli, Marianna Parlato, GiorgiaBorriello, Paola Salvatore, and Domenico Iannelli. 2007. "Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice." *Antimicrobial agent and chemotherapy* . 51(8) : 2765–2773.

Sandeep, K. 2006. "Bacteriophage precision drugagainst bacterial infection." *Current Science90.* 5 : 631-633.

Senait G.and Pro. A.R.S.Moorty. 2016. "Isolation and Identification of *Staphylococcus* Species from ReadyTo-Eat Meat Products in and Around Debre-Zeit, Ethiopia." *International Journal of Research in Agriculture and Forestry*. 3 : 6–16.

S.F. Bloomfield and E. Scott. 1997. "Cross-contamination and infection in the domesticenvironment and the role of chemical disinfectants." *Journal of Applied Microbiology*. 83 : 1-9.

S. O'Flaherty, R.P. Ross, J. Flynn, W.J. Meaney, G.F. Fitzgerald and A. Coffey. 2005. "Isolation and characterization of two anti-*staphylococcal* bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections." *Letters in Applied Microbiolog.* 41 : 482–486.

Weber-Dabrowska B., Mulczyk M. and Gorski A. 2003. "Bacteriophage as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man." *Transplantation Proceedings*. 35(4) : 1385-1386.

W.H. Sperber and S.R. Tatini. 1975. "Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identificationof *Staphylococcus aureus*." *Appled microbiology*. 29 : 502-505.

Williams and Wilkins. 1994. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. USA : Library of congress cataloging-in-publication data.

Wimmerstedt A. and Kahlmeter G. 2008. "Associated antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*." *Clin Microbiol Infect.* 14(4) : 315-21.

W. vanderhaeghen, K. hermans, F. haesbrouck and P. butaye. 2010. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals.Epidemiol Infect." *Cambridge University*. 138 : 606–625.

Yan-Ping Yu, Ting Gong1, Gunter Jost, Wen-Hua Liu, De-Zan Ye and Zhu-Hua Luo. 2013. "Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a Vibrio strain closely related to Vibrio owensii." *Federation of European Microbiological Societies*. 348 : 112–119

Yoonjee Chang, Hakdong Shin, Ju-Hoon Lee, Chul Jong Park, Soon-Young Paik and Sangryeol Ryu. 2015. "Isolation and Genome Characterization of the Virulent *Staphylococcus aureus* Bacteriophage SA97." *Viruses*. 7 : 5225–5242.

Zuzanna, Kazmierczak, Andrzej, Górski, Krystyna and Dabrowska. 2014. "Facing Antibiotic Resistance: *Staphylococcus aureus* Phages as a Medical (Tool)." *Viruses*. 6 : 2551-2570.

ภาคผนวก

ภาคผนวกก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Agar (BPA)

เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาณที่ใช้คือ 63 กรัมต่อน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย

Enzymatic Digest of Casein	10	กรัม
Beef Extract	5	กรัม
Yeast Extract	1	กรัม
Lithium Chloride	5	กรัม
Glycine	12	กรัม
Sodium Pyruvate	10	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

pH 6.8 ± 0.2

ชั่งอาหารปริมาณ 63 กรัมละลายในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 950 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสจึงเติม Egg Yolk Tellurite Supplement ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันก่อนเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2±0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2±0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar (MSA)

Pancreatic Digest of Casein	5	กรัม
Pancreatic Digest of Animal Tissue	5	กรัม
Beef Extract	1	กรัม
NaCl	75	กรัม
D-mannitol	10	กรัม
Phenol red	0.0250	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.4 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาณที่ใช้คือ 37กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

HM Infusion poeder	12.5	กรัม
BHI Powder	5	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Dextrose (Glucose)	2	กรัม
Sodium hydrogen phosphate	2.5	กรัม

pH 7.4 ± 0.2

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลาย Sailine-magnesium diluent plus gelatin (SMG)

NaCl	5.844	กรัม
MgSO4•7H2O	2.460	กรัม
1 M Tris-HCL (pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
Gelatin	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

7. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 M (1 M Tris-HCl) pH 7.5

Tris-HCl	7.882	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรปรับพีเอชให้ได้ 7.5 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 25 เดือน กรกฎาคม พ.ศ 2561

ข้าพเจ้า นางสาว วนิดา ปินะถา รหัสประจำตัว 57050887

นางสาว อัสมา อนันตกูล รหัสประจำตัว 57050922

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร

ชื่อภาษาอังกฤษ Study on Isolation of a Bacteriophage of Bacteria *Staphylococcus aureus* from Environment and Food

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.81 %

ลงชื่อ.....วนิดา ปินะถา..... ลงชื่อ.....อัสมา อนันตกูล.....

(นางสาววนิดา ปินะถา) (นางสาว อัสมา อนันตกูล)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้วขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....วิมลมาศ บุญมี..... ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม