

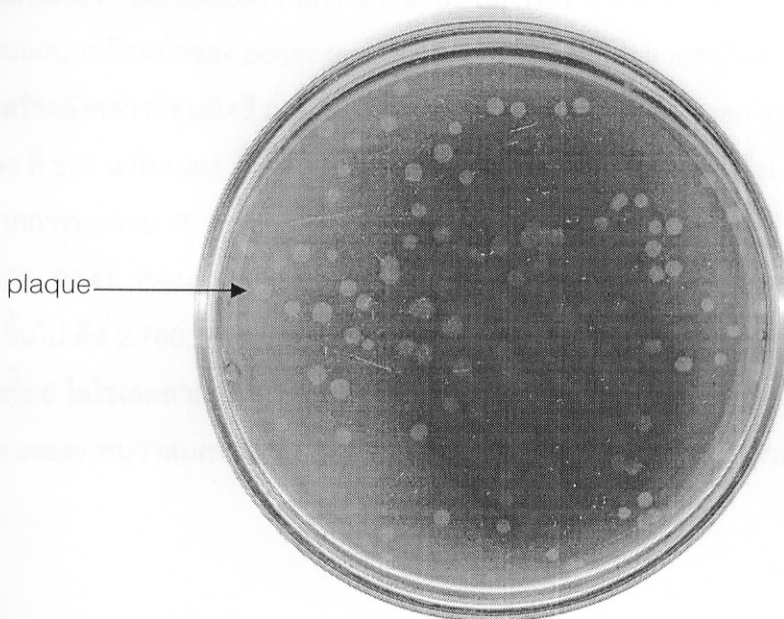
ผลการทดลอง

การเพิ่มจำนวน PA phage

โดยการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวน PA phage ใน *P. aeruginosa* Micro ในอาหารเหลว และหลังจากปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกไปแล้ว เก็บเกี่ยว PA phage ซึ่งอยู่ในส่วนใส (supernatant) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การนับจำนวน PA phage (phage titring) โดยวิธี plaque assay

จากการทำ plaque assay โดยใช้ PA phage และ *P. aeruginosa* Micro จะพบ clear plaque ขนาดประมาณ 0.2 mm และทำการคำนวณจำนวน plaque โดยใช้หน่วยเป็น PFU/ml และนำ PA phage ไปใช้ทดสอบกับแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ต่อไป



รูปที่ 1 ลักษณะ clear plaque ของ *P. aeruginosa* Micro ที่ถูกทำลายด้วย PA phage

ความไวของ *P. aeruginosa* จำนวน 65 ไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ต่อการถูกทำลายด้วย PA phage

ทดสอบ PA phage กับแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จำนวน 65 ไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จากการทำ plaque assay โดยใช้ PA phage จำนวน 10^4 PFU/ml ในการทดสอบกับ *P. aeruginosa* จำนวน 10^6 PFU/ml โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ พบว่ามี *P. aeruginosa* 14 ไอโซเลต ที่มีการสร้าง clear zone (plaque) หรือถูกทำลายโดย PA phage ได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 1

การสร้าง biofilm ของ *P. aeruginosa* จำนวน 66 ไอโซเลต (แยกจากผู้ป่วย 65 ไอโซเลตและ *P. aeruginosa* Micro) โดยการใช้สี crystal violet และ polystyrene microtiter plate

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่มีความสามารถในการสร้าง biofilm จะมีการเจริญเติบโตและเกาะกลุ่มกันเป็นแผ่นบนผิวหน้าของ polystyrene เมื่อทำการล้างเซลล์ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อออกไปจะทำให้โครงสร้างดังกล่าวย้อมติดสี crystal violet และเมื่อละลายด้วยเอธานอล จะสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 นาโนเมตร ที่บ่งชี้ถึงปริมาณของ biofilm ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

จากการทดสอบ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 66 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต คือ PA16, PA17, PA20, PA41, PA44, PA52 ที่มีค่า OD_{595} ของสี crystal violet มากกว่า control ($OD_{595} = 1.99$) ตั้งแต่ 0.5 ขึ้นไป คือ 2.760, 2.541, 3.333, 2.597, 2.510, 2.817 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่เชื้อทั้ง 6 ไอโซเลตสามารถสร้าง biofilm ได้ โดย PA41 มีการสร้าง biofilm ได้มากที่สุด และจากการทำ plaque assay พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตนี้มีความไวต่อการถูกทำลายด้วย PA phage

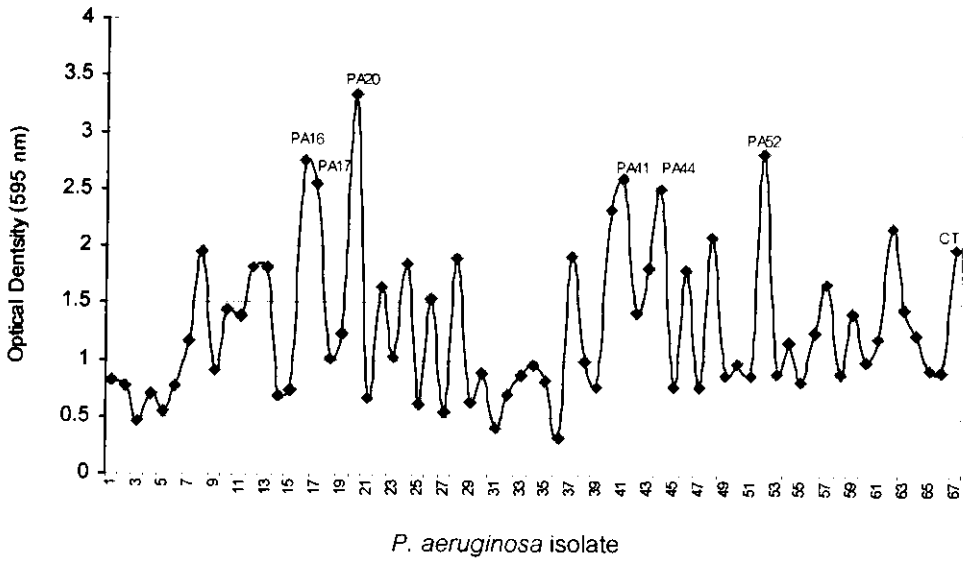
ตารางที่ 1 การสร้าง pigment และ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ plaque ของ *P. aeruginosa* จำนวน 14 ไอโซเลตที่มีความไวต่อการติดเชื้อด้วย PA phage

<i>P. aeruginosa</i>	สีของโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลางของ plaque (mm)
PA1, PA2, PA4	เขียวเข้ม	0.5, 1.0, 1.0
PA46, PA62	เขียวเข้ม	1.0-2.0
PA 10	เขียว	0.5
PA14	เขียว	1.0-2.0
PA25	เขียว	3.0-4.0
PA27, PA51	เขียว	5.0
PA65	ใสไม่มีสี	0.5-1.0
PA34	ใสไม่มีสี	1.0-2.0
PA42, PA50	ใสไม่มีสี	3.0-4.0

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย OD₅₉₅ จากการสร้าง biofilm ของ *P. aeruginosa* จำนวน 66 ไอโซเลต

ไอโซเลต	OD ₅₉₅	ไอโซเลต	OD ₅₉₅	ไอโซเลต	OD ₅₉₅
PA1	0.816	PA23	1.033	PA45	0.772
PA2	0.767	PA24	1.838	PA46	1.790
PA3	0.464	PA25	0.612	PA47	0.771
PA4	0.702	PA26	1.541	PA48	2.090
PA5	0.546	PA27	0.543	PA49	0.866
PA6	0.768	PA28	1.905	PA50	0.982
PA7	1.155	PA29	0.629	PA51	0.871
PA8	1.941	PA30	0.890	PA52	2.817*
PA9	0.913	PA31	0.411	PA53	0.888
PA10	1.441	PA32	0.696	PA54	1.155
PA11	1.379	PA33	0.873	PA55	0.824
PA12	1.807	PA34	0.952	PA56	1.255
PA13	1.807	PA35	0.816	PA57	1.673
PA14	0.679	PA36	0.317	PA58	0.883
PA15	0.733	PA37	1.917	PA59	1.413
PA16*	2.760	PA38	0.996	PA60	0.997
PA17*	2.541	PA39	0.768	PA61	1.189
PA18	1.009	PA40	2.326	PA62	2.164
PA19	1.228	PA41	2.597*	PA63	1.453
PA20*	3.333	PA42	1.426	PA64	1.228
PA21	0.697	PA43	1.814	PA65	0.916
PA22	1.642	PA44	2.510*	Micro	0.913

* ไอโซเลตที่มีค่า OD₅₉₅ เฉลี่ยมากกว่า control ที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD₅₉₅ = 1.99) ตั้งแต่ 0.5 ขึ้นไป



รูปที่ 2 กราฟแสดงผลค่าเฉลี่ย OD₅₉₅ จากการสร้าง biofilm ของ *P. aeruginosa* จำนวน 66 ไอโซเลต