วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความไว (sensitivity) ของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ต่อการถูกทำลายด้วย lytic phage
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการสร้าง biofilm ของ *P. aeruginosa* กับความไวในการถูกทำลายด้วย lytic phage

วิธีการทดลอง

การเพิ่มจำนวน PA phage

เพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* Micro ที่ติดเชื้อด้วย PA phage ในอาหารเหลว LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1.5 ml ลงใน microcentrifuge tube นำไปเหวี่ยงด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่มี PA phage ลงใน microcentrifuge tube เพื่อเก็บเป็น phage stock ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เพื่อนำไปหาจำนวนของ PA phage ต่อไป

การนับจำนวน PA phage (phage titering) **โดยวิธี** plaque assay

เพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* Micro ในอาหารเหลว LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง หรือวัดค่า optical density ที่ 600 nm ได้ค่าประมาณ 0.5 นำ PA phage stock มาทำการเจือจางด้วยอาหารเหลว LB ที่ความเข้มข้นต่างๆ เติม PA phage 20 µl และเชื้อ *P. aeruginosa* จากข้อ 1 จำนวน 200 µl ลงใน 0.7% soft agar 4 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เทลงบน LB plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนวงใสหรือ plaque นำไปคำนวณหาจำนวนของ phage เป็น PFU/ml

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

เพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ทั้งหมด 65 ไอโซเลต ในอาหารเหลว LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง หรือวัดค่า optical density ที่ 600 nm ได้ค่าประมาณ 0.5 ทดสอบเชื้อ *P. aeruginosa* กับ PA phage จำนวน 10^6 PFU/ml โดยวิธี plaque assay

การทดสอบการสร้าง biofilm **ของ** *P. aeruginosa* **ใน** polystylene microtiter plate

เพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* จำนวน 53 ไอโซเลต ในอาหารเหลว LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 ด้วยอาหารเหลว Brain heart infusion broth+dextrose+tryptone แล้วเติมเชื้อ จำนวน 100 µl ลงใน polystylene microtiter plate วาง plate ในภาชนะที่มีฝาปิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติม 0.1% cystal violet 100 µl ลงใน culture ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วเติม 95% ethanol จำนวน 100 µl เขย่าให้เข้ากันเบาๆแล้วนำไปวัดค่า optical density ที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microtiter plate reader