บทความวิจัย

การแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคในปลา *Aeromonas spp.* เพื่อนำไปใช้ควบคุมการระบาดของโรค

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[1*] สิรินธร สุนทรธรรมาสน์[2] วิภาวี รอบคอบ[1] อภิชญา ชมแก้ว[1] สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์[1] ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย[1] ขจีนาฏ โพธิเวชกุล[1] และ อัจฉริยา รังษิรุจิ[2]

ได้รับบทความ: 31 พฤษภาคม 2561
ได้รับบทความแก้ไข: 22 สิงหาคม 2561
ยอมรับตีพิมพ์: 6 กันยายน 2561

บทคัดย่อ

การใช้เฟจในการรักษาการติดเชื้อถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เฟจในการควบคุมการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ยังมีไม่มากนัก ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการแยกเฟจประเภทที่ทำให้เกิดการแตกสลายเพื่อควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. และประเมินประสิทธิภาพในการใช้เฟจเพื่อควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ในระดับห้องปฏิบัติการ จากตัวอย่างน้ำคลองจำนวน 10 แหล่ง สามารถแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. ได้เพียงสายพันธุ์เดียวคือ *Aeromonas* sp. OG-H และนำมาใช้เป็นโฮสต์เพื่อใช้ในการแยกเฟจ โดยสามารถแยกเฟจได้ 2 ตัวที่แตกต่างกันและให้ชื่อว่า ΦOG1 และ ΦOG3 จากการตรวจดูรูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านพบว่า เฟจทั้ง 2 ตัวจัดอยู่ในแฟมิลี Myoviridae เฟจทั้งสองตัวสามารถติดเชื้อได้ใน *Aeromonas* sp. OG-H เพียงสายพันธุ์เดียว และมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ ในช่วง 4.0-11.0 และ 30-65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า การทดลองที่มีการเติมเฟจก่อนการเติมเชื้อจะสามารถลดจำนวนเชื้อได้ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกอย่างเห็นได้ชัด จากข้อมูลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเฟจ ทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในการควบคุมการติดเชื้อ *Aeromonas* ได้

คำสำคัญ: *Aeromonas* แบคเทอริโอเฟจ ความเสถียรต่ออุณหภูมิ ความเสถียรต่อ pH

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: onanong@g.swu.ac.th

Isolation of Bacteriophages Specific to a FIsh Pathogen, *Aeromonas spp.,* as a Candidate for Disease Control

Onanong Pringsulaka[1*], Sirinthorn Sunthornthummas[2], Wiphawee Robkob[1], Apichaya Chomkaew[1], Nuttika Suwannasai[1], Siriruk Sarawaneeyaruk[1] and Achariya Rangsiruji[2]

Received: 31 May 2018
Revised: 22 August 2018
Accepted: 6 September 2018

ABSTRACT

Phage therapy can be used as an alternative method to prevent and control pathogenic bacteria in aquaculture. However, applications of bacteriophages for a control of *Aeromonas* spp. infection are still limited. Therefore, the aims of this study were to isolate lytic bacteriophages of *Aeromonas* spp. from canals and to evaluate the effectiveness of these phages to control *Aeromonas* spp. at the laboratory level. From 10 collecting sites, one isolate of *Aeromonas* designated as *Aeromonas* sp. OG-H was obtained and employed as a host for isolation of the phages. Two different phages were obtained, and specified as ΦOG1 and ΦOG3. Electron micrographs revealed that all isolated phages belonged to the family Myoviridae. These phages were highly specific to their host (*Aeromonas* sp. OG-H) and relatively stable at the pH and temperature ranging from 4.0 to 11.0 and 30 to 65°C, respectively. An in vitro study of the effect of bacteriophages against *Aeromonas* sp. OG-H revealed a remarkable decrease of the pathogen at 12 h, followed by bacterial regrowth to pre-treatment levels. These data suggested that the phages ΦOG1 and ΦOG3 are efficient as biocontrol agents against *Aeromonas* infection.

Keywords: *Aeromonas,* Bacteriophage, Temperature stability, pH stability.

[1] Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
[*] Corresponding author, email: onanong@g.swu.ac.th

บทนำ

Aeromonas spp. จัดอยู่ในแฟมิลี Aeromonadaceae [1-2] เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ปัจจุบันสามารถจัดจำแนกสปีชีส์ของ genus *Aeromonas* ได้ทั้งหมด 31 สปีชีส์ [3] ซึ่งสปีชีส์ส่วนใหญ่สามารถแยกได้จากแหล่งน้ำจืด และสปีชีส์เหล่านี้มักเป็นเชื้อฉวยโอกาส และอาจทำให้เกิดการระบาดได้ [4] โดยเฉพาะ *A. hydrophila* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มนี้ที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคในปลา “Motile Aeromonad Septicemia” (MAS) และ โรค “Hemorrhagic Septicemia” เป็นต้น [5] ทำให้ปลาเกิดการตายเป็นจำนวนมาก [5-6] นอกจากนี้ ยังมีสปีชีส์อื่นที่ทำให้เกิดโรคในปลากลุ่มซาลมอน (salmonids) คือ *A. bestiarum, A. caviae, A. hydrophila, A. piscicola, A. salmonicida* และ *A. veronii* โดยเฉพาะเชื้อ *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* นั้น พบว่าเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดแผลเปื่อยนอกลำตัวและติดเชื้อในกระแสเลือดในปลากลุ่มนี้ [7] ซึ่งผู้เพาะเลี้ยงปลามักนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการทำลายเชื้อดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อนี้มีเพิ่มขึ้น [8] จากรายงานในประเทศไทยพบอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ ดังเช่นในรายงานของ วิพรพรรณ์ และคณะ พบว่า เชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลานิลปกติในกว๊านพะเยาจำนวน 46 ตัวอย่าง พบการดื้อยา Amoxycillin, Colistin และ Amoxycillin + Clavulanic acid [9]

ในช่วงศตวรรษที่ 20 เป็นต้นมา การศึกษาเกี่ยวกับเฟจในการนำไปใช้เป็นตัวยับยั้ง ควบคุม หรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก [10] โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการนำเฟจมาใช้เป็นตัวควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ [11-12] สำหรับการแยกเฟจในแฟมิลี Aeromonadaceae นั้น ได้มีการแยกและศึกษาลักษณะมาบ้าง เช่น ในงานวิจัยของ Silva และคณะ (2016) [13] ได้แยกเฟจ AS-A และนำเฟจที่ได้ไปใช้ควบคุมเชื้อ *A. salmonicida* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแผลหลุมลึก (furunculosis) ที่ก่อให้เกิดการตายอย่างมากในปลา ซึ่งจากงานวิจัยนี้ได้นำเฟจไปใช้ในการรักษาการติดเชื้อชนิดนี้ในปลาลิ้นหมาที่อยู่ในระยะ juvenile จากผลพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหลังจากที่ใส่เฟจลงไป 6 ชั่วโมง จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เฟจในการควบคุมโรคสามารถทำได้จริง อย่างไรก็ตาม การศึกษาในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงาน การใช้เฟจ (phage therapy) ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* ซึ่งพบว่าเฟจมีข้อได้เปรียบ คือ เฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย ไม่ส่งผลเสียหรือผลข้างเคียงมายังมนุษย์ ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม โดยจะติดเชื้อเฉพาะแบคทีเรียจำเพาะเท่านั้น เฟจสามารถทนอยู่ในสภาวะที่หลากหลาย ถึงแม้ว่าอาจเกิดเชื้อสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจ แต่สายพันธุ์กลายเหล่านั้นส่วนใหญ่กลับไปเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเฟจหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการใช้ phage therapy เป็นวิธีควบคุมที่รวดเร็วและไม่แพง [13-14]

การใช้เฟจในการกำจัดและป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรียนั้น ได้ประสบความสำเร็จทั้งในการรักษาการติดเชื้อทั้งในคนและสัตว์ [15-16] อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีผู้แยกเฟจของเชื้อ *Aeromonas* spp. ได้ แต่ยังไม่มีการรายงานในประเทศ ซึ่งเฟจที่แยกได้นั้นยังมีความจำเพาะแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคขึ้นกับโฮสต์ที่ใช้ ประกอบกับเป็นที่ทราบกันดีว่าในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายจึงทำให้การรักษาการติดเชื้อชนิดนี้ต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้ยาเพิ่มขึ้น และส่งผลให้เชื้อดื้อยาหลายชนิด ดังนั้นแนวทางการใช้เฟจในการกำจัดเชื้อนี้จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เชื้อดื้อยาทุก

ประเภทในท้องตลาด และการแยกเฟจจากตัวอย่าง *Aeromonas* spp. ในประเทศจึงมีความจำเป็นเพื่อจะนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ในการศึกษานี้จะแยกเฟจที่สามารถทำลายเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* spp. ศึกษาลักษณะของเชื้อ และการนำไปใช้ในการลดจำนวนเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นข้อมูลที่จะไปประยุกต์ใช้ในบ่อน้ำที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจโดยเฉพาะปลาต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกเชื้อ *Aeromonas* spp.

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆ จำนวน 10 แหล่ง นำมาแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยใช้อาหาร *Aeromonas* Isolation Medium (Himedia, India) คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas* spp. มาจัดจำแนกทาง biochemical characteristic ได้แก่ การใช้น้ำตาลและการสร้างก๊าซในอาหารวุ้น triple sugar iron (TSI agar) การสร้างเอนไซม์ gelatinase การรีดิวซ์ nitrate การทดสอบ oxidation-fermentation test การทดสอบการสร้าง Indole และการสร้างเอนไซม์ Dnase โดยนำไอโซเลตที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยเชื้อ *Aeromonas* spp. จะให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้าง Indole, การรีดิวซ์ nitrate รวมทั้งให้ผลเป็น F จากการทดสอบ oxidation-fermentation test ในขณะที่บางสายพันธุ์จะให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ Dnase และ gelatinase ยกเว้น *A. sobria* ส่วนการใช้น้ำตาลและการสร้างก๊าซในอาหารวุ้น triple sugar iron (TSI agar) จะให้ผลแตกต่างกันออกไป [17] จากนั้นนำมายืนยันว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene ซึ่งทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนดังกล่าวโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพร์เมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเทียบเคียงข้อมูลพันธุกรรมที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อการระบุสปีชีส์ [18]

การแยกแบคเทอริโอเฟจ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ในอาหาร tryptic soy broth (TSB) broth ความเข้มข้น 2 เท่ามากกว่าสูตรปกติเป็นเวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง จากนั้นใส่ตัวอย่างน้ำปริมาณ 25 มิลลิลิตรลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำตัวอย่างไปตกตะกอน เอาน้ำใสนำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีเฟจอยู่หรือไม่โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น [19]

การศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

นำเฟจมาส่องดูรูปร่าง โดยย้อมด้วย uranyl acetate 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [20]

การศึกษาความเสถียรของเฟจ

นำเฟจที่แยกได้มาศึกษาความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ โดยความเสถียรต่อ pH ทำตามวิธีของ Verma และคณะ (2009) [21] โดยปรับ pH ให้เป็น 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 และ 11.0 ในอาหาร TSB broth โดยใช้ 1 M HCl หรือ 1 M NaOH จากนั้นเติมเฟจที่ความเข้มข้น 10^7 PFU/mL บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เฟจในอาหาร TSB ที่ปรับ pH เป็น 7.0 เป็นตัวควบคุม ส่วนความเสถียรต่ออุณหภูมิทำได้โดยบ่มเฟจความเข้มข้น 10^7 PFU/mL ที่อุณหภูมิต่างๆ (20, 25, 30, 37, 50 และ 65 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากบ่ม 1 ชั่วโมงทั้ง 2 การทดลอง นำมาตรวจสอบปริมาณเฟจที่คงเหลือโดยวิธี double agar layer method

การตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อื่น

นำ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้ และ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อ้างอิง มาทดสอบความสามารถในการติดเชื้อของเฟจที่แยกได้ โดยการหยดเฟจลงไปในจานอาหาร TSA ที่ผสมเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่เทไว้ก่อนหน้านี้ บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in-vitro* study)

ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ในระดับห้องปฏิบัติการ จะแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองแรกจะเป็นการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบป้องกัน (pre-exposure) โดยเติมเฟจที่แยกได้ปริมาณ 10^{12} PFU/mL ลงในอาหาร TSB จากนั้นเติมเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/mL ลงไป (MOI เท่ากับ 10,000) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง มานับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในอาหาร TSA และนับจำนวนเฟจโดยนำตัวอย่างมา centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 xg นำส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปนับจำนวนเฟจด้วยวิธี double agar layer method ส่วนการทดลองที่ 2 จะเป็นการศึกษาการยับยั้งเชื้อภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 5 ชั่วโมง (5 h post-exposure) โดยจะเลี้ยงเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/mL ในอาหาร TSB เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมงก่อน จากนั้นจึงเติมเฟจปริมาณ 10^{12} PFU/mL ลงไป เก็บตัวอย่างจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง มานับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต และนับจำนวนเฟจด้วยวิธี double agar layer method ตามวิธีข้างต้น

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparison) แบบ Tukey's HSD Test

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การแยกเชื้อ *Aeromonas* spp.

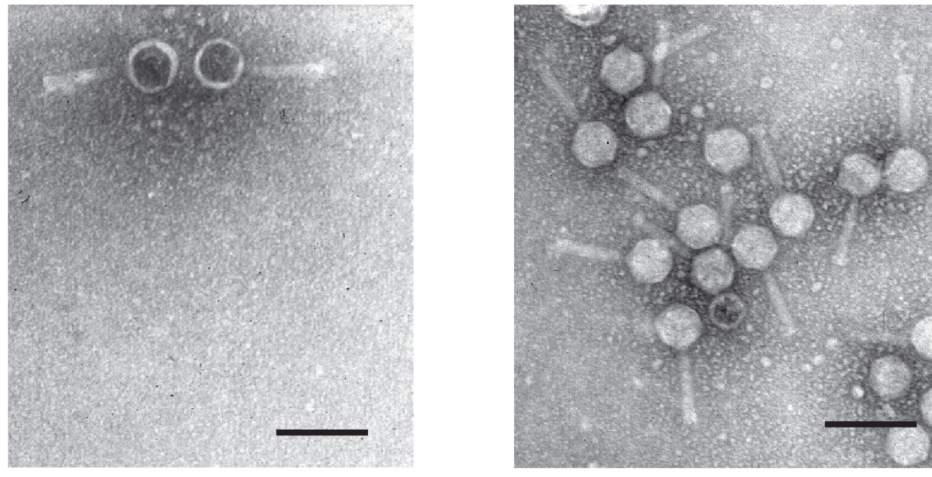
จากการนำน้ำคลองจากแหล่งต่างๆ มาทำการแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. ในอาหาร Aeromonas isolation medium agar ที่มีการเติม ampicillin โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Aeromonas* spp. ไปทำการทดสอบ Biochemical test และเลือกเชื้อที่ให้ผลตรงกับผลการทดสอบเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยเทียบจาก Bergey's manual of systematic bacteriology ทำการยืนยันผลโดยหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene พบว่า จากตัวอย่างทั้งหมด 20 ไอโซเลต ที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas* พบว่า มีเพียงไอโซเลตเดียวคือ ไอโซเลต OG-H ที่ให้ผลใกล้เคียงกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* 97% ดังนั้นจึงใช้ *Aeromonas* sp. OG-H ในการคัดแยกเฟจที่ทำในขั้นตอนต่อไป

การแยกแบคเทอริโอเฟจ

เมื่อนำเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H มาใช้ในการแยกเฟจ พบว่าสามารถแยกเฟจได้ 2 ตัว และให้ชื่อว่า เฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 จึงนำมาทำเฟจให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยเทคนิค single plaque isolation จนครบ 3 ครั้ง นำเฟจที่บริสุทธิ์ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

เมื่อนำเฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 ไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเฟจทั้งสองมีรูปร่างที่ประกอบด้วยส่วนหัวที่เป็น icosahedral head และส่วนหางเป็น long contractile tail ซึ่งจัดเฟจทั้งสองชนิดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* หรืออยู่ใน type A ของการจัดจำแนกแบบ Bradley's classification โดยเฟจ ΦOG1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวเท่ากับ 36 ± 5 นาโนเมตรและส่วนหางยาว 78 ± 6 นาโนเมตร ส่วน ΦOG3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวเท่ากับ 30 ± 12 นาโนเมตร และส่วนหางยาว 72 ± 12 นาโนเมตร (รูปที่ 1) สำหรับเฟจในเชื้อ *Aeromonas* sp. ที่มีรายงานพบว่า ส่วนใหญ่จัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* เช่น เฟจ Aeh1 และ Aeh2 [22], ΦO18P [23], เฟจ Aes012, Aes 508, CC2, pAh6-C, phiAS4, phiAS5, phiO18P, PX29, vB_AsaM-56 [24] และในแฟมิลี *Podoviridae* เช่น phiAS7 [24], เฟจ Ahp1 [25], Bpa5 [26]



รูปที่ 1 รูปร่างของเฟจ ΦOG1 (ซ้าย) และ ΦOG3 (ขวา) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (bar = 60 นาโนเมตร)

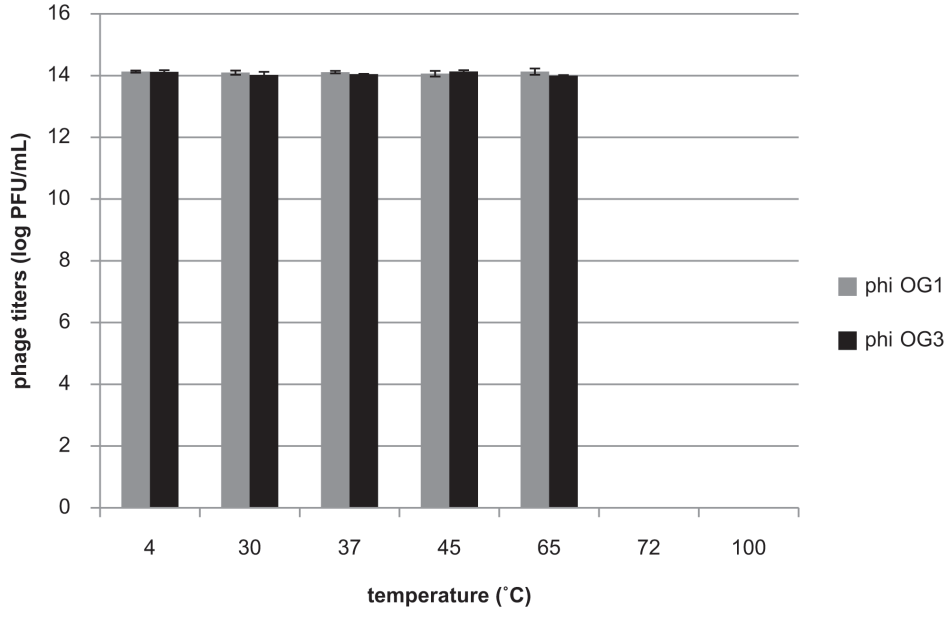
การศึกษาความเสถียรของเฟจ

ความเสถียรทางด้านอุณหภูมิของเฟจ

ผลของความเสถียรทางด้านอุณหภูมิของเฟจทั้ง 2 ตัว แสดงดังรูปที่ 2 โดยพบว่า เฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 สามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 4 จนถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เฟจทั้ง 2 ตัวไม่สามารถมีชีวิตรอดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 72 องศาเซลเซียสขึ้นไป เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 2) อาจเนื่องจากเฟจเป็นอนุภาคที่ประกอบด้วยโปรตีน (capsid) ที่ห่อหุ้มอยู่ด้านนอก ดังนั้น ถ้าอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะส่งผลให้โปรตีนที่อยู่ด้านนอกเสียสภาพได้ ส่งผลให้เฟจไม่สามารถอยู่รอดได้

อุณหภูมิจัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลให้บดบังการเข้าเกาะติดของเฟจและป้องกันไม่ให้เฟจติดเชื้อแบคทีเรียได้ นอกจากนี้จากการรายงานของ Fennema (1996) [27] พบว่า เอนไซม์ไลโซไซม์ของเฟจ T4 จะมีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 12.5 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า เนื่องจากจะเกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ (denaturation) ซึ่งทำให้อธิบายได้ว่าเฟจ T4 ของ *E. coli* จะมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเชื้อที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส มากกว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ความเสถียรของเฟจในกลุ่ม *Aeromonas* ต่ออุณหภูมิ ได้มีรายงานในเฟจ Aehl และ Aeh2 ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อใน *A. hydrophila* ซึ่งพบว่าเฟจทั้งสองตัวมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และการรอดชีวิตจะลดลงเหลือน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง [22]

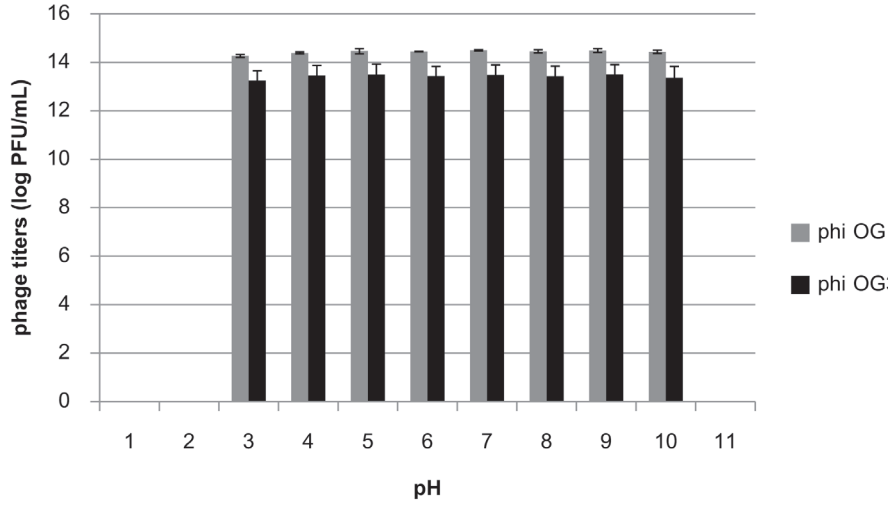


รูปที่ 2 ผลของความเสถียรทางด้านอุณหภูมิของเฟจ ΦOG1 และ ΦOG3, สัญลักษณ์ กราฟแท่งสีเทาแสดงถึงเฟจ ΦOG1 กราฟแท่งสีดำแสดงถึงเฟจ ΦOG3

ความเสถียรทางด้าน pH ของเฟจ

ผลของความเสถียรทางด้าน pH ของเฟจทั้ง 2 ตัว แสดงดังรูปที่ 3 โดยพบว่า เฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 สามารถทนต่อ pH ได้ในช่วง pH 4.0 ถึง 12.0 โดย pH นั้นก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการรอดชีวิตของเฟจ โดยในสภาวะที่ pH มีความเป็นกรดสูง เฟจจะไม่สามารถอยู่รอดได้ เนื่องจากส่งผลให้โปรตีนที่อยู่ด้านนอกเสียสภาพได้

การนำเฟจไปประยุกต์ใช้ในการทำลายเชื้อ (phage therapy) นั้น ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญคือปัจจัยทางกายภาพของสิ่งแวดล้อมที่จะนำเฟจไปประยุกต์ใช้ เช่น อุณหภูมิ และค่า pH โดยค่า pH จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากเนื่องจากมีผลต่อการเข้าเกาะติดของเฟจ ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) รวมทั้งการเพิ่มจำนวนของเฟจภายในเซลล์ [27] โดยทั่วไปการศึกษาผลของ pH ต่อการรอดชีวิตของเฟจจะพบว่าที่ pH ต่ำกว่า 5.0 และสูงกว่า 10.0 จะส่งผลให้เฟจมีการรอดชีวิตลดลง และช่วง pH ที่เหมาะสม คือ ช่วง pH 6.0–8.0 [28-29] โดยในระยะแรกของการติดเชื้อของเฟจโดยการเข้าเกาะกับ รีเซพเตอร์ (receptor) บนเซลล์ของแบคทีเรียนั้นเฟจจะใช้ไลโซไซม์ (lysozyme) เพื่อทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งถือเป็นระยะที่มีความสำคัญมาก หากในระยะนี้มีค่า pH ไม่เหมาะสมจะส่งผลให้บดบังการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์และยังมีผลต่อโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสอีกด้วย ส่งผลให้ป้องกันการเข้าเกาะติดของเฟจต่อรีเซพเตอร์ของโฮสต์ได้ [30-31] ความเสถียรของเฟจในกลุ่ม *Aeromonas* ต่อ pH ได้มีรายงานในเฟจ Aehl และ Aeh2 ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อใน *A. hydrophila* ซึ่งพบว่าเฟจทั้งสองตัวมีความเสถียรที่ pH ในช่วง 5.0-10.0 และจะไม่สามารถรอดชีวิตที่ pH ต่ำหรือสูงกว่านี้ได้ [22]



รูปที่ 3 ผลของความเสถียรทางด้าน pH ของเฟจ ΦOG1 และ ΦOG3, สัญลักษณ์ กราฟแท่งสีเทาแสดงถึงเฟจ ΦOG1 กราฟแท่งสีดำแสดงถึงเฟจ ΦOG3

การตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อื่น

ผลการตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อใน *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อื่น พบว่า เฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *Aeromonas* sp. OG-H ซึ่งใช้เป็นโฮสต์ในการแยกเฟจจากแหล่งน้ำเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเฟจ Aehl และ Aeh2 ที่ติดเชื้อใน *A. hydrophila* ซึ่งพบว่า ไม่สามารถติดเชื้อในจีนัสหรือสปีชีส์อื่นที่ทำการทดสอบ [22]

ตารางที่ 1 ความสามารถในการติดเชื้อของ เฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 กับ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อื่น

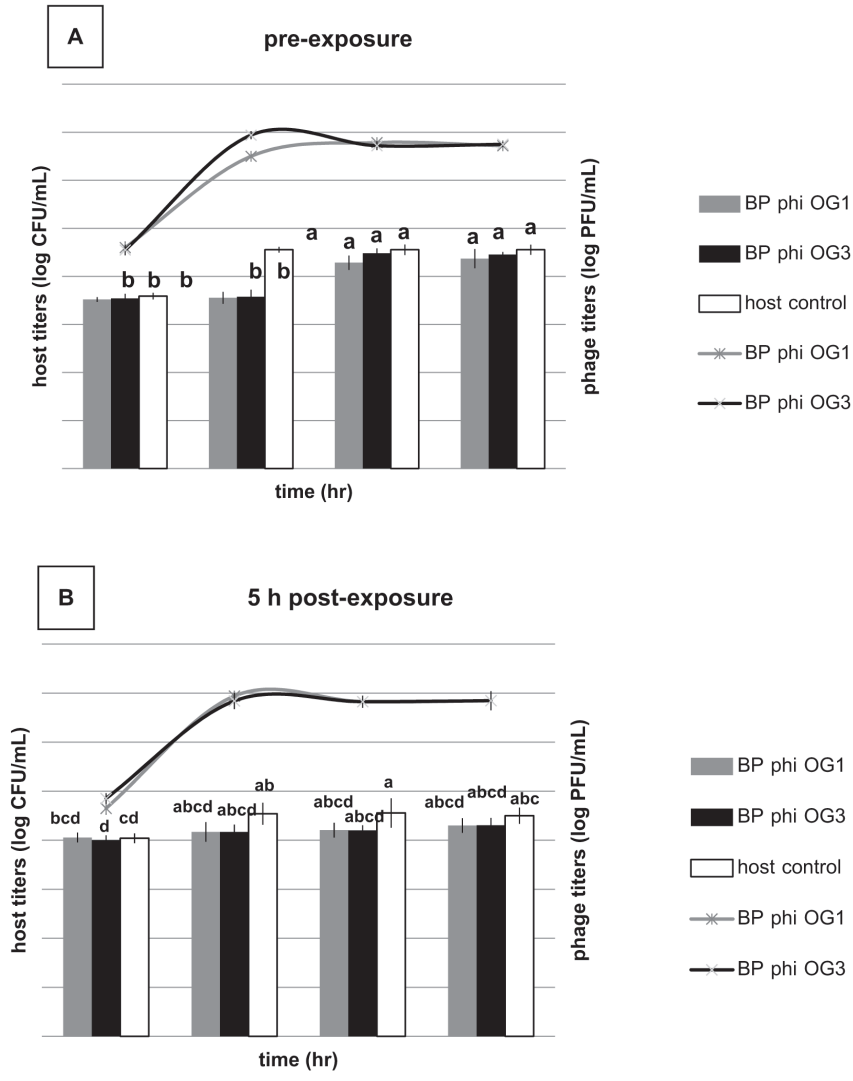
Host / Phage	ΦOG1	ΦOG3
A. hydrophila ATCC 35694	-	-
A. caviae DMST 25498	-	-
A. sobria DMST 12440	-	-
A. sobria DMST 25185	-	-
A. hydrophila DMST 25194	-	-
A. veronii biovar *veronii* ATCC 35624	-	-
A. hydrophila DMST 2798	-	-
A. trota ATCC 49657	-	-
Aeromonas sp. OG-H	✓	✓

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ ✓ แสดงว่าทำให้เกิดการติดเชื้อ; - แสดงว่าไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* OG-H ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการนำเฟจทั้ง 2 ตัวไปใช้ในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H ในระดับห้องปฏิบัติการ ในออกแบบการทดลองเป็น 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองแรกจะเป็นการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบ pre-exposure หรือแบบป้องกัน ซึ่งจะไปประยุกต์ใช้ในกรณีที่ใช้เฟจป้องกันเชื้อก่อนที่จะพบการติดเชื้อ ส่วนการทดลองที่ 2 จะเป็นการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบ post-exposure หรือแบบรักษา ซึ่งจะไปประยุกต์ใช้ในกรณีที่ใช้เฟจเพื่อทำลายเชื้อหลังพบการปนเปื้อน จากผลการทดลองพบว่า ในการทดลองการยับยั้งเชื้อแบบ pre-exposure (รูปที่ 4A) จะให้ผลในการลดจำนวนเชื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดการบ่มเชื้อเพียงอย่างเดียว (host control) ใน 12 ชั่วโมงแรกในเฟจทั้งสองชนิด หลังจากนั้นจะมีเชื้อที่กลับมาเจริญได้ใหม่ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดที่บ่มเชื้อเพียงอย่างเดียว ซึ่งคาดว่าอาจเป็นเชื้อที่กลับมาเจริญใหม่นี้คือเชื้อที่มีการพัฒนาให้ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจ โดยในแต่ละตัวอย่างจะมีการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง 8.74-9.11 log CFU/mL ภายหลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในการทดลองที่ไม่เติมเชื้อโฮสต์หรือมีแต่เฟจเท่านั้น (phage control) พบปริมาณของเฟจคงที่ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงในเฟจทั้งสองตัว (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับการทดลองการเติมเฟจลงไปภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (5 h-exposure) (รูปที่ 4B) พบว่า ทุกชุดการทดลองให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการบ่มเชื้อเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจเกิดจากโฮสต์มีการเจริญจนเฟจที่เติมลงไปมีปริมาณไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อได้ ส่วนในการทดลองที่ไม่เติมเชื้อโฮสต์หรือมีแต่เฟจเท่านั้น พบปริมาณของเฟจคงที่ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงในเฟจทั้งสองตัว (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การเกิดการดื้อของเชื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจมักเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อบริเวณรีเซพเตอร์ที่เฟจเข้าเกาะติด หรืออาจเกิดจากกลไกอื่นได้แก่ กลไกการตัดดีเอ็นเอแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ (restriction modification) การติดเชื้อที่ทำให้มี เฟจลูกหลานออกมาน้อยลง (abortive infection) เป็นต้น [32] อย่างไรก็ตาม ได้มีงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าการแก้ปัญหาเชื้อที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจนั้น อาจปรับปรุงได้โดยการใช้เฟจหลายตัวร่วมกัน (phage cocktails) [33-34] เนื่องจากเฟจที่ต่างกันจะมีบริเวณที่เข้าเกาะติดกับโฮสต์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์เพื่อดื้อต่อเฟจตัวนั้นๆ ก็จะยังคงถูกทำลายด้วยเฟจอื่นที่เข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป [35] จากงานวิจัยของ Pereira และคณะ [36] พบว่า โคโลนีของเชื้อที่ดื้อต่อการติดเชื้อด้วยเฟจมักจะมีขนาดเล็กและเจริญช้า ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนไป และจะถูกทำลายได้ง่ายหรือไวต่อสารเคมีมากขึ้น ดังนั้น การใช้วิธีอื่นร่วมกันการใช้เฟจในการกำจัดหรือยับยั้งเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะจะมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเชื้อ และยังประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากขึ้นด้วย



รูปที่ 4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* sp. OG-H โดยเฟจ ΦOG1 และ ΦOG3 ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in-vitro* study) กราฟแท่งแสดงปริมาณของโฮสต์ *Aeromonas* sp. OG-H ส่วนกราฟเส้นแสดงปริมาณของเฟจ, สัญลักษณ์ BP phi OG1 หมายถึงการบ่มระหว่างโฮสต์และเฟจ ΦOG1; BP phi OG3 หมายถึงการบ่มระหว่างโฮสต์และเฟจ ΦOG3; host control หมายถึงการบ่มโฮสต์เพียงอย่างเดียว, กราฟ A แสดงการทดลองแบบ pre-exposure กราฟ B แสดงการทดลองแบบ post- exposure หลังจากบ่มเชื้อก่อนเป็นเวลา 5 ชั่วโมงแล้วจึงเติมเฟจลงไป (5 h-exposure) ตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษเหนือแท่งกราฟ ถ้าตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 ($p > 0.05$)

สรุปผลการทดลอง

ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานการแยกเฟจที่ติดเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในแฟมิลี Aeromonadaceae จากแหล่งต่างๆ มากมายทั่วโลกก็ตาม [12, 22, 23, 37] แต่ในประเทศไทยการศึกษานี้ถือเป็นการศึกษาแรกที่มีการรายงาน โดยเฟจที่แยกได้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเฟจที่ติดเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* ชนิดอื่นหรือใช้ร่วมกับวิธีหรือสารฆ่าเชื้ออื่นเพื่อส่งเสริมการเข้าทำลายเชื้อ *Aeromonas* ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. Tomas, J. M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiology,* Article ID 256261: 256-261.
2. PHE [Public Health England]. (2015). Identification of *Clostridium* species. UK standard for microbiology investigations. ID 8 issue 4.1. Standards unit, Microbiology Services, PHE, London.
3. Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Navarro, A., Carvalho, J., Aravena-Román, M., Correia, A., Figueras, J., & Saavedra, J. (2016). *Aeromonas lusitana* sp. nov., Isolated from untreated water and vegetables. *Current Microbiology, 72,* 795-803.
4. Aravena-Román, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T. J., Martínez-Murcia, A. J., Shang, B. J., & Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas australiensis* sp. nov., Isolated from irrigation water in western Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63,* 2270-2276.
5. Esteve, C., Amaro, C., Garay, E., Santos, Y., & Toranzo, A. E. (1995). Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *Journal of Applied Microbiology, 78,* 555-562.
6. Alvarado, L. V., & Boehm, K. H., (1989). Virulence factors in motile Aeromonads. *Special Publication. European Aquaculture Society, 10,* 11-12.
7. Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida,* the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology, 169,* 1-7.
8. Jun, J. W., Kim, J. H., Gomez, D. K., Choresca Jr., C. H., Han, J. E., Shin, S. P., & Park, S. C. (2010). Occurrence of tetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* infection in Korean cyprinid loach *(Misgurnus anguillicaudatus). African Journal of Microbiology Research, 4,* 849-855.

9. Nuangmek, W.; Chumlakhorn, W., & Nuangmek, A. (2012). Isolation and antimicrobial drugs sensitivity of *Aeromonas hydrophila* from healthy Nile tilapia in Kwan *Phaya. Khon Kaen Agriculture Journal. 40* Supplement, 355-361. (in Thai)
10. Nakai. T., & Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology, 153*(1), 13-18.
11. Karunasagar, I., Shivu, M. M., Girisha, S. K., Krohne, G., & Karunasagar, I. (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture, 268,* 288-292.
12. Kim, J. H., Gomez, D. K., Nakai, T., & Park, S. C. (2010). Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum. Veterinary Microbiology, 140,* 109-115.
13. Silva, Y. J., Moreirinha, C., Pereira, C., Costa, L., Rocha, R. J. M., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Calado, R., & Almeida, A. (2016). Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in *juvenile Senegalese* sole *(Solea senegalensis)* with phage AS-A. *Aquaculture, 450,* 225-233.
14. Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., Alves, E., Costa, L., & Faustino, M. A. F. (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs, 7,* 268-313.
15. Bruttin, A., & Brussow, H., (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49,* 2874-2878.
16. Chhibber, S., Kaur, S., & Kumari, S. (2008). Therapeutic potential of bacteriophage in treating Klebsiella pneumoniae B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *Journal of Medical Microbiology, 57,* 1508-1513.
17. Abbott, S. L., Cheung, W. K. W., & Janda, J. M. (2003). The genus Aeromonas: Biochemical characteristics, A typical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology, 41*(6): 2348-2357.
18. Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., Editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York. Wiley. pp. 115-175.
19. Baross, J. A., Liston, J., & Morita, R. Y. (1978). Incidence of Vibrio parahaemolyticus bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *Applied and Environmental Microbiology, 36,* 492-499.
20. Depaola, A., Motes, M. L., Chan, A. M., & Suttle, C. A. (1998). Phage infecting Vibrio vulnificus are abundant and diverse in oysters collected from the gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology, 84,* 346-351.
21. Verma, V., & Arankalle, V. A., (2009). Virological evaluation of domestic water

purification devices commonly used in India emphasizes inadequate quality and need for virological standards. *Tropical Medicine & International Health, 14*(8), 885-891.

22. Chow, M. S., & Rouf, M. A. (1983). Isolation and partial characterization of two Aeromonas hydrophila bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology, 45*(5), 1670-1676.
23. Beilstein, F., & Dreiseikelmann, B. (2008). Temperate bacteriophage ΦO18P from an *Aeromonas media* isolate: Characterization and complete genome sequence. *Virology, 373*(1), 25-29.
24. Wang, J. B., Lin, N. T., Tseng, Y. H., & Weng, S. F. (2016). Genomic characterization of the novel *Aeromonas hydrophila* phage Ahp1 suggests the derivation of a new subgroup from phiKMV-like family. *PLoS one* 11(9): e0162060. doi: 10.1371/journal.pone.0162060.
25. Anand, T., Bera, B. C., Virmani, N., Vaid, R. K., Vashisth, M., & Tripathi, B. N. (2018). Isolation and characterization of a novel, T7-like phage against *Aeromonas veronii. Virus Genes, 54*(1), 160-164.
26. Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry. 3rd Ed. New York, USA. Marcel Dekker, Inc.
27. Pirisi, A. (2000). Phage therapy-Advantages over antibiotics? *The Lancet, 356,* 1418.
28. Jarrell, K. F., Vydykhan, T., Lee, P., Agnew, M. D., & Thomas, N. A. (1997). Isolation and characterization of bacteriophage BCJA1, a novel temperate bacteriophage active against the alkaliphilic bacterium, *Bacillus clarkii. Extremophiles, 1,* 199-206.
29. Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E., & Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: A model study. *Journal of Food Protection, 64,* 1116-1121.
30. Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W. J., and Camp, M. J. (2004). Optimizing concentration and timing of phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *Journal of Food Protection, 67,* 1682-1686.
31. Allison, G. E., and Klaenhammer, T. R. (1998). Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal, 8,* 207-226.
32. Carter, C. D., Parks, A., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Magnone, J., Senecal, A., Kropinski, A. M., & Sulakvelidze, A. (2012). Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophage, 2,* 178-185
33. Flynn, G. O., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology, 70,* 3417-3424.
34. Tanji, Y., Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K., and Unno, H. (2004). Toward

rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology and Biotechnology, 64,* 270-274.

35. Pereira, C., Moreirinha, C., Lewicka, M., Almeida, P., Clemente, C., Cunha, A., Delgadillo, I., Romalde, J. L., Nunes, M. L., & Almeida, A. (2016). Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. *Virus Research, 220,* 179-192.
36. Ackermann, H.-W., Dauguet, C., Paterson, W., Popoff, M., Rouf, M., & Vieu, J.-F. (1985). *Aeromonas* bacteriophages: Reexamination and classification. *Annales de l'Institut Pasteur. Virology Institut Pasteur, 136,* 175-199.