SWU Sci. J. Vol. 22 No. 2 (2006)

บทความวิจัย

การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ* พรทิพย์ สุขสวัสดิ์ และ จริยา สินเดิมสุข

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียในจีนัสวิบริโอและวิบริโอเฟจ จากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย ทั้งหมด 102 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีอื่น พบว่าเป็น *Vibrio parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท จากนั้นนำ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้มาเป็นโฮสท์สำหรับแยกวิบริโอเฟจ พบว่าสามารถแยกวิบริโอเฟจได้ 9 ตัว ได้แก่ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp9, Vp10, Vp15 และ Vp28 วิบริโอเฟจแต่ละตัวมีขนาดของพลาคแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-2 มิลลิเมตร เมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าวิบริโอเฟจทั้งหมดมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 53.33-93.33 นาโนเมตร มีส่วนหางที่มีความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 66.67-233.33 นาโนเมตร สามารถจัดอยู่ใน Family Myoviridae และ Family Siphoviridae เมื่อนำไปศึกษาโฮสท์-เรนจ์ พบว่าเฟจทั้ง 9 ตัว สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นได้ เมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์ พบว่ามีโฮสท์-เรนจ์ต่างกัน อย่างไรก็ตามวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบ และเมื่อสกัดดีเอ็นเอของเฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp10 Vp15 และ Vp28 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Eco*RI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Nde*I และ *Bgl*II พบว่าวิบริโอเฟจแต่ละตัวมีรูปแบบของดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นวิบริโอเฟจต่างชนิดกัน

คำสำคัญ: วิบริโอเฟจ *Vibrio parahaemolyticus* โฮสท์-เรนจ์ น้ำทะเล อาหารทะเลดิบ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: onanong@swu.ac.th

Characterization of Vibriophages Isolated from Sea Water and Raw Seafood in Thailand

Onanong Pringsulaka*, Phorntip Suksawat and Jariya Sindermsuk

ABSTRACT

Vibrio spp. and vibriophages from sea water and raw seafood in Thailand were isolated. From a total of 102 samples, 80 isolates of suspected-bacteria were obtained. Twenty-eight isolates were identified as *V. parahaemolyticus*, 48 isolates as *V. vulnificus*, 3 isolates as *V. alginolyticus* and 1 isolate as *V. damsela*. The twenty-eight isolates of *V. parahaemolyticus* were employed as hosts for isolation of phages. Isolated phages including Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp9, Vp10, Vp15 and Vp28 produced plaques with entire edges varying from 0.5-2 mm in diameter. Electron micrographs indicated that all phage heads were of an icosahedral form, head size and length of tail varying from 53.33-93.33 nm and 66.67-233.33 nm, respectively. On the basis of the morphology, the phages belong to the families Myoviridae and Siphoviridae. Host-range determination revealed that all 9 strains were capable of infecting the 28 isolates of *V. parahaemolyticus*. Further study on host-range among different species, showed that all phages had different host-range patterns and unable to infect other genera used. In addition, phage DNAs isolated from 6 strains, namely Vp2, Vp4, Vp6, Vp10, Vp15 and Vp28 were characterized by restriction analyses with the following enzymes, *Eco*RI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Nde*I *and Bgl*II. Results showed that the restriction fragment patterns generated were different. Therefore, based on all data obtained from this study, it is confirmed that all vibriophages were different.

Keywords: vibriophages, *Vibrio parahaemolyticus*, host-range, sea water, raw seafood

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

*Corresponding author, e-mail: onanong@swu.ac.th

บทนำ

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็น bacterial virus หมายถึงกลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย เฟจโดยทั่วไปมีหลายชนิด แต่ละชนิดนั้นอาจมีความจำเพาะกับแบคทีเรียชนิดเดียว หรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามชนิดเท่านั้น นอกจากนี้เฟจจัดเป็นออบลิเกตพาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรีย ทำให้การเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฟจเกิดขึ้นเฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย [1, 2]

วิบริโอเฟจ (vibriophages) คือ เฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียจีนัสวิบริโอ (*Vibrio*) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Vibrionaceae เป็นจีนัสที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากมักพบปนเปื้อนมากับสิ่งแวดล้อมในทะเลรวมทั้งอาหารทะเล และก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารในคนและสัตว์ จีนัสวิบริโอที่มีความสำคัญมากทางด้านการแพทย์มี 4 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* [3] ที่ก่อโรคได้บ่อยในประเทศไทยมี 2 สปีชีส์ คือ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* โดย *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ *V. cholerae* ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ซึ่งในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมาพบการระบาดอันเนื่องมาจาก *V. parahaemolyticus* มากขึ้น โดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือปรุงไม่สุก มีรายงานการระบาดของโรคท้องร่วงในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย [4] ไต้หวันระหว่างปี 1996-1999 [5] และสหรัฐอเมริการะหว่างปี 1973-1998 โดยพบการระบาดถึง 40 ครั้ง [6] ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคจากเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี conventional microbiological methods ยังคงใช้เวลานานและสิ้นเปลือง [7] ดังนั้นการนำสมบัติของเฟจที่มีความจำเพาะและทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสปีชีส์เดียว มาใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อ นอกจากจะใช้ระยะเวลาสั้นกว่าแล้วยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาไม่แพง ตัวอย่างของการนำเฟจที่จำเพาะกับจีนัสวิบริโอมาใช้ ได้แก่ การวินิจฉัยเชื้อ *V. cholerae* 01 biotype El Tor [8, 9] นอกจากนี้ในปี 1992 มีการนำเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. cholerae* 0139 มาใช้ในการวินิจฉัยได้ถูกต้องมากขึ้น ซึ่งเดิมคาดว่ามีสาเหตุมาจาก *V. cholerae* 01 [10]

จากประโยชน์และสมบัติของเฟจดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาวิบริโอเฟจโดยเฉพาะเฟจของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย จากนั้นศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกได้เช่น สมบัติทางชีววิทยา ได้แก่ โฮสท์-เรนจ์ (host-range) สมบัติของจีโนม (genome) และความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) รวมทั้งรูปร่างของวิบริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งสมบัติดังกล่าวของวิบริโอเฟจที่แยกได้นี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และใช้ติดตามเชื้อดังกล่าวในแหล่งที่มีการระบาด เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องต่อไป [11, 12]

วิธีการทดลอง

การคัดแยกเชื้อวิบริโอ

ใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะบริเวณต่าง ๆ ของตัวอย่างอาหารทะเลแล้วนำมา streak ลงบนอาหาร thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างน้ำทะเลใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดน้ำตัวอย่าง 0.1-0.3 มิลลิลิตร ทำการ spread plate ลงบนอาหาร TCBS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การจัดจำแนกเชื้อวิบริโอ

การคัดเลือกเบื้องต้น

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีเขียวและสีเหลืองที่เจริญบนอาหาร TCBS ขนาด 2-3 มิลลิลิตร นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ บนอาหารวุ้นเอียง brain heart infusion agar (BHA) ที่มี NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ นำไอโซเลทที่แยกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เพื่อยืนยันเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อในจีนัสวิบริโอ [3]

การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี

นำไอโซเลทที่คาดว่าเป็นเชื้อจีนัสวิบริโอมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การเจริญที่มี NaCl ความเข้มข้นสูงหรือในสภาพไม่มี NaCl การเคลื่อนที่ การใช้กรดอะมิโนไลซิน การสร้างสารในอินโดล การใช้ซิเตรท การสร้างสาร acetoin และการใช้น้ำตาลแมนนิทอล อะราบิโนส และเซลโลไบโอส [3]

การแยกวิบริโอเฟจโดยใช้เชื้อ *Vibrio spp.* ที่แยกได้เป็นโฮสท์

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร nutrient agar (NA) ที่มี NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร NB ที่มี NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-6 ชั่วโมง เติมอาหารทะเลดิบปริมาณ 25 กรัม แล้วบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (น้ำทะเลใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร NB ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) นำตัวอย่างไปตกตะกอน โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์การมีวิบริโอเฟจ [13,14]

การตรวจสอบวิบริโอเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำส่วนน้ำใสที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร NA ที่มีวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมเหลวแล้วบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร NA ที่แข็งตัว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบพลาคที่เกิดขึ้น [15]

การหาปริมาณของวิบริโอเฟจ

นำสารแขวนลอยของวิบริโอเฟจที่เจือจางแบบ serial dilution แต่ละระดับความเจือจางและ *V. parahaemolyticus* ที่ใช้เป็นโฮสท์ มาหาปริมาณวิบริโอเฟจ โดยนับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น คำนวณหาค่าความสามารถในการเกิดพลาค (PFU; plaque forming unit/ml) จากสูตร [16]

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาค} = \frac{\text{จำนวนพลาค}}{\text{ปริมาณเฟจที่ใช้ x ค่าความเจือจาง}}$$

การศึกษารูปร่างของวิบริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำส่วนน้ำใสซึ่งมีวิบริโอเฟจนำมาเติม NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และเติม polyethylene glycol 8000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้งและนำตะกอนเฟจที่ได้มาส่องดูรูปร่าง โดยนำกริดวางทับบนตะกอน 5 นาที จากนั้นนำกริดมาย้อมด้วย uranyl acetate 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [16]

การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจในการติดเชื้อกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น

นำเซลล์แขวนลอยของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่น *Vibrio* สปีชีส์อื่น รวมทั้ง *E. coli* และ *Klebsiella* spp. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร NA ที่มีวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมเหลวแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร NA ที่แข็งตัว จากนั้นหยดวิบริโอเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของวิบริโอเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยดูจากการเกิดพลาคบริเวณที่หยดวิบริโอเฟจลงไป [14, 15]

การสกัดดีเอ็นเอของวิบริโอเฟจ

ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Sambrook และคณะ [17] โดยขั้นตอนคร่าวๆ ทำได้ดังนี้คือ นำส่วนน้ำใสซึ่งมีวิบริโอเฟจมาเติม DNase I และ RNase I ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติม NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แล้วเติม polyethylene glycol 8000 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายให้เข้ากัน จากนั้นทำการตกตะกอนวิบริโอเฟจ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนวิบริโอเฟจที่ได้มาละลายใน TE buffer เติม sodium dodecyl sulfate ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการสกัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1: 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนที่ได้มาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ และเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นระเหยเอธานอลออก ทำการละลายดีเอ็นเอของวิบริโอเฟจด้วย TE buffer

การตรวจสอบดีเอ็นเอของวิบริโอเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Bgl*II และ *Nde*I มาวิเคราะห์ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 μg/ml) จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

ผลการวิจัย

การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อวิบริโอ

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเล และอาหารทะเลดิบ จำนวน 102 ตัวอย่าง โดยอาศัยรูปร่าง การติดสีแกรม และการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส สามารถแยกแบคทีเรียที่เป็นจีนัสวิบริโอได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท

การจัดจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี

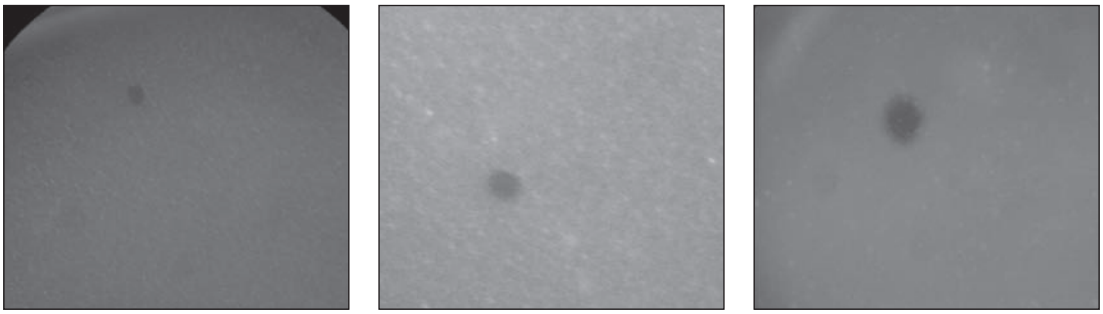
นำไอโซเลทที่คาดว่าอยู่ในจีนัสวิบริโอมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสปีชีส์ จากการทดลองพบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้มาเป็นโฮสท์สำหรับการแยกวิบริโอเฟจในขั้นต่อไป

การแยกและตรวจสอบวิบริโอเฟจโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสท์

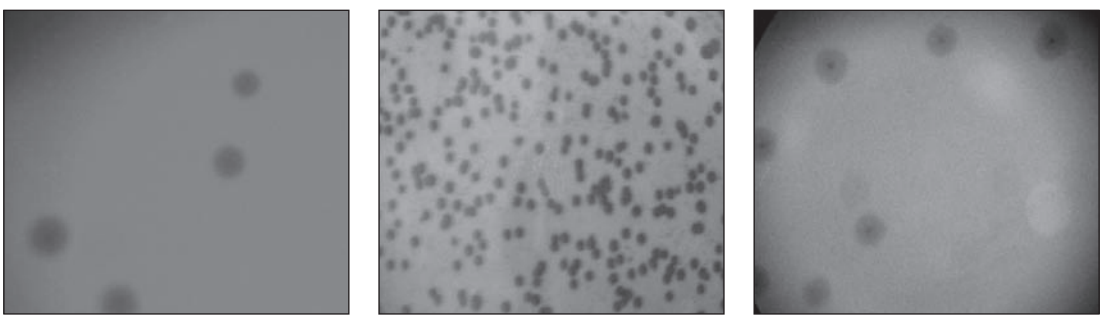
นำ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท ที่แยกได้มาเป็นโฮสท์สำหรับแยกวิบริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำใสที่คาดว่ามีวิบริโอเฟจ จำนวน 28 ตัวอย่าง มาตรวจสอบการมีวิบริโอเฟจโดยการทำอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าสามารถแยกวิบริโอเฟจได้ 9 ตัว โดยการใช้ *V. parahaemolyticus* 9 ไอโซเลทเป็นโฮสท์ ซึ่งลักษณะพลาคของวิบริโอเฟจแต่ละตัวมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1

การศึกษารูปร่างของวิบริโอเฟจ

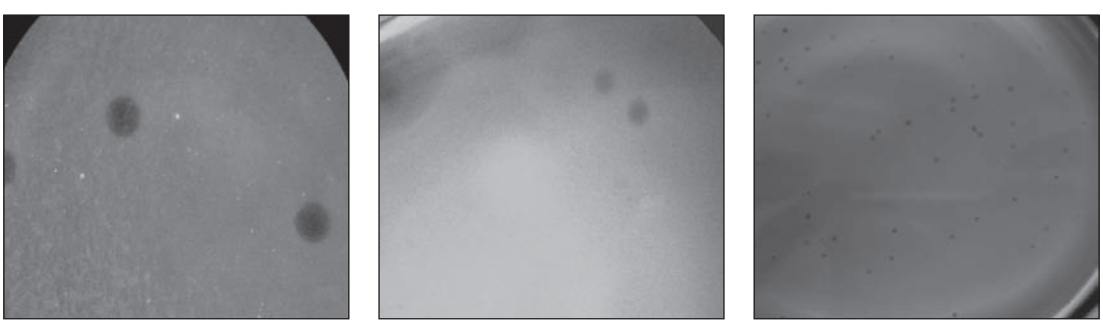
นำวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว มาศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าวิบริโอเฟจ 8 ตัว มีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ส่วนหางยาวและไม่มีชีทห่อหุ้ม ได้แก่ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp28, Vp9, Vp10 และ Vp15 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส มีวิบริโอเฟจเพียง 1 ตัว ที่ส่วนของหางมีชีทห่อหุ้ม ได้แก่ เฟจ Vp8 จึงจัดเฟจนี้อยู่ในกลุ่ม A ตามวิธีของ Bradley และอยู่ใน Family Myoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส ดังแสดงในตารางที่ 1



เฟจ Vp2 เฟจ Vp4 เฟจ Vp6



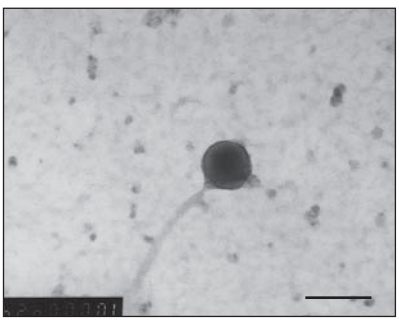
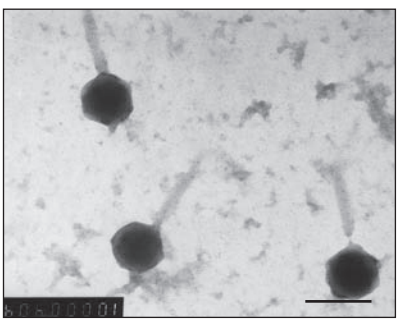
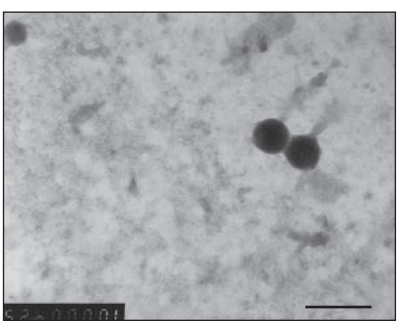
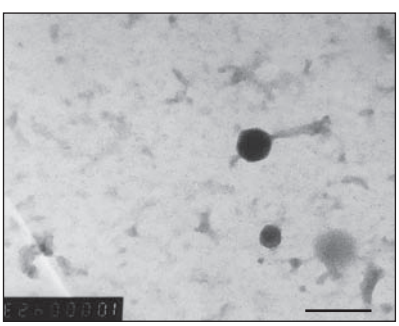
เฟจ Vp7 เฟจ Vp8 เฟจ Vp9



เฟจ Vp10 เฟจ Vp15 เฟจ Vp28

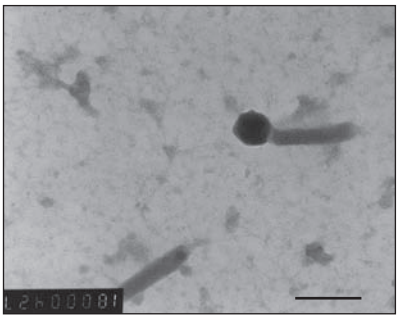
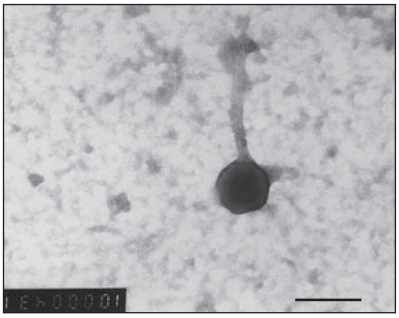
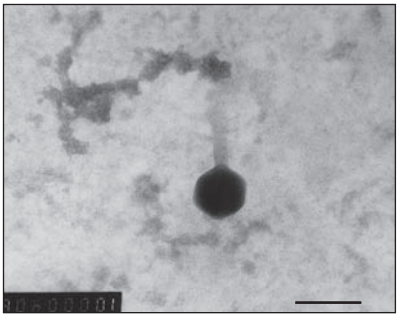
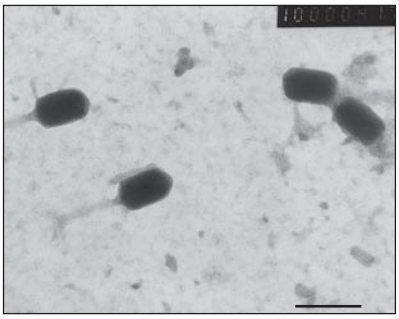
รูปที่ 1 ลักษณะพลาคของวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว

ตารางที่ 1 ผลการศึกษารูปร่างของวิบริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)			รูปร่างของเฟจ
	เส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว	หาง		
		กว้าง	ยาว	
Vp2	80	13.33	233.33	
Vp4	86.67	20	133.33	
Vp6	60	13.33	66.67	
Vp7	53.33	13.33	100	

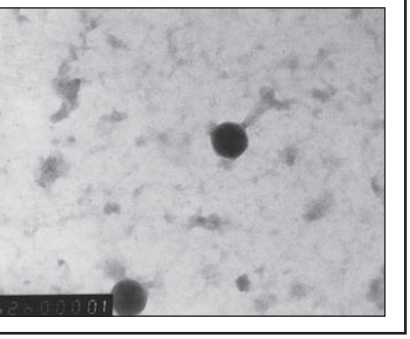
หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)			รูปร่างของเฟจ
	เส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว	หาง		
		กว้าง	ยาว	
Vp8	60	26.27	146.67	
Vp9	93.33	20	193.33	
Vp10	93.33	26.67	100	
Vp15	กว้าง 93.33 ยาว 53.33	13.33	113.33	

หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)			รูปร่างของเฟจ
	เส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว	หาง		
		กว้าง	ยาว	
Vp28	60	20	73.33	

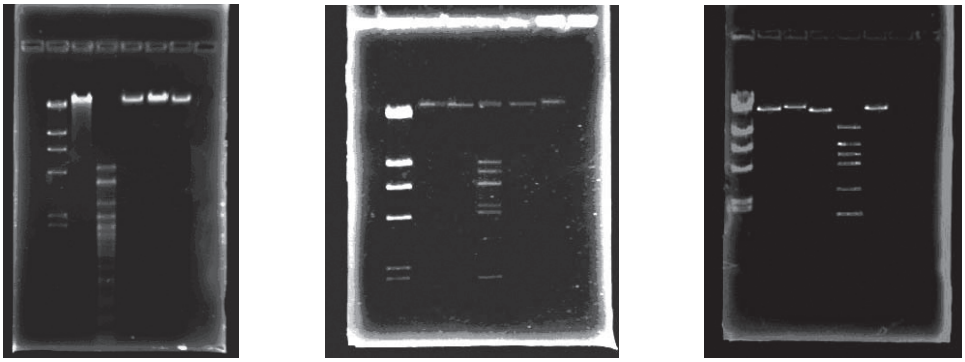
หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

การศึกษาโฮสท์-เรนจ์

การศึกษาความสัมพันธ์ของวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากโฮสท์ โดยทดสอบกับ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลอง พบว่าวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นได้ เมื่อทดสอบกับสปีชีส์อื่น คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. damsela* 1 ไอโซเลท และ *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท พบว่ามีเพียงเฟจ Vp28 เท่านั้นที่ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับสปีชีส์อื่นที่ทดสอบ ส่วนวิบริโอเฟจอีก 8 ตัว สามารถเกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ทดสอบได้ นอกจากนี้การทดสอบความสามารถในการติดเชื้อกับแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ได้แก่ *E. coli* 4 สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. 2 สายพันธุ์ พบว่ามีความต้านทานต่อการติดเชื้อโดยวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว

การตรวจสอบดีเอ็นเอของวิบริโอเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส

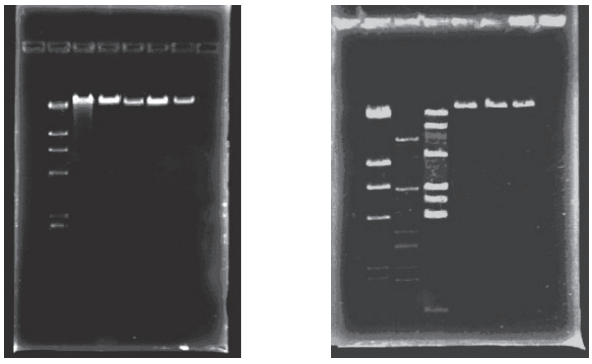
นำวิบริโอเฟจ 5 ตัว คือ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp10 และ Vp28 ซึ่งให้ค่าความสามารถในการเกิดพลาคสูง (10^8 PFU/ml) มาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด พบว่าเฟจ Vp2, Vp6 และ Vp28 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (รูปที่ 2) เฟจ Vp10 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด (รูปที่ 3 (A)) เฟจ Vp4 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI (รูปที่ 3 (B))



M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5

(A) (B) (C)

รูปที่ 2 ดีเอ็นเอของเฟจที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (A) เฟจ Vp2 (lane ที่ 2) (B) เฟจ Vp6 (lane ที่ 3) และ (C) เฟจ Vp28 (lane ที่ 4) โดยที่ lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII



M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5

(A) (B)

รูปที่ 3 ดีเอ็นเอของเฟจ (A) เฟจ Vp10 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด (B) เฟจ Vp4 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (lane ที่ 1) และ *Eco*RI (lane ที่ 2) โดยที่ lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียจีนัสวิบริโอจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ จำนวนทั้งหมด 102 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท โดยเป็น *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท จากการที่แบคทีเรียในจีนัสวิบริโอบางชนิดต้องการ NaCl สำหรับการเจริญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-12 เปอร์เซ็นต์ จึงใช้สมบัติดังกล่าวนี้มาช่วยในการจำแนกสปีชีส์ ทำให้จัดจำแนกได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ระยะเวลาที่คัดแยกแบคทีเรียอยู่ในช่วงฤดูร้อนซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงพบเชื้อวิบริโอจำนวนมาก

เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้ 28 ไอโซเลท มาเป็นโฮสท์สำหรับแยกวิบริโอเฟจ พบว่าสามารถแยกวิบริโอเฟจ ได้ 9 ตัว แต่ละตัวมีขนาดของพลาคแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-2 มิลลิเมตร เมื่อทำการศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าวิบริโอเฟจทั้งหมดมีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 53.33-93.33 นาโนเมตร มีส่วนหางที่มีความยาวแตกต่างกันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 66.67-233.33 นาโนเมตร สามารถแยกวิบริโอเฟจ ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp9, Vp10, Vp15 และ Vp28 มีส่วนหางยาวและไม่มีชีทห่อหุ้ม จัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส กลุ่มที่สอง คือ เฟจ Vp8 ส่วนหางมีชีทห่อหุ้ม จัดเฟจนี้อยู่ในกลุ่ม A ตามวิธีของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Myoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

เมื่อนำวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัวมาศึกษาโฮสท์-เรนจ์ พบว่าวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว สามารถเกิดการติดเชื้อกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากโฮสท์ได้ และเมื่อนำมาทดสอบกับสปีชีส์อื่น มีเพียง *V. alginolyticus* 1 ไอโซเลทเท่านั้น ที่ไม่สามารถเกิดการติดเชื้อโดยวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว วิบริโอเฟจที่มีโฮสท์-เรนจ์กว้าง คือ เฟจ Vp4, Vp7, Vp8 และ Vp10 วิบริโอเฟจที่มีโฮสท์-เรนจ์แคบ คือ เฟจ Vp2, Vp6, Vp9, Vp15 และ Vp28 ส่วนวิบริโอเฟจตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเฉพาะใน *V. parahaemolyticus* คือ เฟจ Vp28 แต่วิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัวไม่สามารถเกิดการติดเชื้อกับจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบ จากการทดลองมีเพียงเฟจ Vp28 ที่ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์และจีนัส อาจนำสมบัติความจำเพาะของเฟจ Vp28 มาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของ *V. parahaemolyticus* ออกจากสปีชีส์อื่นในจีนัสวิบริโอ ส่วนวิบริโอเฟจอีก 8 ตัว สามารถนำมาจัดจำแนกแบคทีเรียในจีนัสวิบริโอออกจากแบคทีเรียจีนัสอื่นได้

เมื่อนำวิบริโอเฟจ 6 ตัว คือ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp10 และ Vp28 มาทำการสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าเป็นวิบริโอเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของวิบริโอเฟจแต่ละตัวหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิดแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นวิบริโอเฟจต่างชนิดกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2548 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. Adams, M. H. 1958. Bacteriophages. New York. Interscience Publishers, Inc.
2. Mckane, L. and Kandel, J. 1996. Microbiology. USA. McGraw -Hill.
3. Elliot, E. L., Kaysner, C. A., Jackson, L. and Tamplin, M. L. 1995. *V. cholerae, V. vulnificus,* and Other *Vibrio* spp. FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition. United States of America. AOAC International.

4. Lesmana, M., Subekti, D., Simanjuntak, C. H., Tjaniadi, P., Campbell, J. R. and Oyofo, B. A. 2001. *V. parahaemolyticus* Associated with Cholera-Like Diarrhea among Patients in North Jakarta, Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 39: 71-75.

5. Chiou, C. S., Hsu, S. Y., Chiu, S. I., Wang, T. K. and Chao, C. S. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3: K6 as Cause of Unusually High Incidence of Food-Borne Disease Outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4621-4625.

6. Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond, R. M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N. H., Griffin, P. M. and Slutsker, L. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 1661-1666.

7. Karunasagar, I. and Kumar, H. S. 2002. Molecular Methods for Rapid and Specific Detection of Pathogens in Seafood. *Aquaculture Asia* 7: 34-36.

8. Basu, S. and Mukerjee, S. 1968. Bacteriophage Typing of *Vibrio cholerae* El Tor. *Experientia* 24: 299-300.

9. Chattopadhyay, D. J, Sarkar, B. L., Ansari, M. Q., Chakrabarti, B. K., Roy, M. K., Ghosh, A. N. and Pal, S. C. 1993. New Phage Typing Scheme for *Vibrio cholerae* 01 Biotype El Tor Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1579-1585.

10. Chakrabarti, A. K., Ghosh, A. N., Nair, G. B., Niyogi, S. K., Bhattacharya, S. K. and Sarkar, B. L. 2000. Development and Evaluation of a Phage Typing Scheme for *Vibrio cholerae* 0139. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 44-49.

11. Faruque, S. M., Naser, I. B., Islam, M. J., Faruque, A. S. G., Ghosh , A. N., Nair , G. B., Sack, D. A., and Mekalanos, J. J. 2005. Seasonal Epidemics of Cholera Inversely Correlate with the Prevalence of Environmental Cholera Phages. *Microbiology* 102: 1701-1707.

12. Madico, G., Checkley, W., Gilman, R. H., Bravo, N., Cabrera, L., Calderon, M. and Ceballos, A. 1996. Active Surveillance for *Vibrio cholerae* 01 and Vibriophages in Sewage Water as a Potential Tool to Predict Cholera Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2968-2972.

13. Baross, J. A., Liston, J. and Morita, R. Y. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages and Other *Vibrio* Bacteriophages in Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 492-499.

14. Koga, T., Toyoshima, S. and Kawata, T. 1982. Morphological Varieties and Host - Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 466-470.
15. Baross, J. A., Liston, J., and Morita, R. Y. 1978. Ecological Relationship Between *Vibrio parahaemolyticus* and Agar-Digesting Vibrios as Evidenced by Bacteriophage Susceptibility Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 500-505.
16. Depaola, A., Motes, M. L., Chan, A. M. and 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.
17. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. 2nd Edition. United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ได้รับบทความวันที่ 23 มิถุนายน 2549
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 7 สิงหาคม 2549