



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียโอฟิลาที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*
เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

โดย

นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และคณะ

กันยายน 2553



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียฟาจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* เพื่อใช้เป็น
ตัวควบคุมการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

Isolation of bacteriophage specific to a giant tiger prawn pathogen, *Vibrio*
harveyi, as a candidate for disease control

คณะผู้วิจัย

1. นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ
2. นางปาริชาติ พุ่มขจร

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2552 - 2553

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม. อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย เรื่อง “การแยกเชื้อแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ” เป็นโครงการวิจัยที่มีนายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นหัวหน้าโครงการ และมี นางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นผู้ร่วมโครงการ โครงการวิจัยดังกล่าวได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552 และ 2553 โดยได้รับทุนสนับสนุนเป็นจำนวนเงิน 323,300 บาท (สามแสนสองหมื่นสามพันสามร้อยบาทถ้วน) จากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552 และ ได้รับทุนสนับสนุนเป็นจำนวนเงิน 424,600 บาท (สี่แสนสองหมื่นสี่พันหกร้อยบาทถ้วน) จากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2553 จากการดำเนินการโครงการวิจัยดังกล่าวเป็นเวลา 2 ปี โดยเริ่มดำเนินการตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 และได้เสร็จสิ้นสมบูรณ์เมื่อ 30 กันยายน 2553 ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ทุกประการ กล่าวคือ สามารถตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ได้ ทราบความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ทราบกลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียโอฟาจบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ทราบความสามารถในการทนความร้อน สารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอฟาจ ทราบรูปร่างลักษณะ จำนวนโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบ รวมทั้งชนิด และขนาดของ DNA ของแบคทีเรียโอฟาจ

นอกจากนี้แล้วผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ยังได้มีการนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในชื่อเรื่อง

“Isolation and partial characterization of bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*” ในวารสาร African Journal of Microbiology Research ปี 2010 ฉบับที่ 4(16) หน้า 1794-1800.

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และควบคุมโรคของกุ้งกุลาดำมักก่อให้เกิดผลในเชิงลบ เช่น ก่อให้เกิดแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และก่อให้เกิดปัญหาในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และต่อสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการตกค้างของสารในผลผลิต และในธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีความต้องการทางเลือกที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคของกุ้งกุลาดำ ซึ่งการใช้แบคทีริโอเฟจในการรักษาโรคถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหา และศึกษาคุณสมบัติของแบคทีริโอเฟจที่มีความสามารถในการบุกรุกทำลาย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงของกุ้งกุลาดำ ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจตัวอย่างน้ำจำนวน 12 ตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งพบว่าตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแห่งหนึ่งมีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบอย่างจำเพาะ แบคทีริโอเฟจดังกล่าวถูกให้ชื่อว่า bacteriophage PW2 จากการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 โดย bacteriophage PW2 พบว่า 90% ของแบคทีริโอเฟจดังกล่าว สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 ได้ภายในเวลา 30 นาที การศึกษาการทนของ bacteriophage PW2 ต่อความร้อน และสารเคมีแสดงให้เห็นว่าแบคทีริโอเฟจดังกล่าวสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสามารถทนต่อสารเคมีที่นำมาใช้ทดสอบทุกชนิด ความเข้มข้นของ CaCl_2 มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage PW2 โดยแบคทีริโอเฟจดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนในสภาวะที่มี CaCl_2 ความเข้มข้น 20 mM ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มี CaCl_2 หรือมี CaCl_2 น้อยกว่า 10 mM จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า bacteriophage PW2 มีส่วนหัวเป็นรูป icosahedral ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ± 3.8 นาโนเมตร และมีส่วนหางเป็นแบบ noncontractile tail ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 ± 0.5 นาโนเมตร และมีความยาว 136 ± 6.2 นาโนเมตร ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage PW2 ไว้ใน family Siphoviridae nucleic acid ของ bacteriophage PW2 ถูกตรวจสอบพบว่าเป็น DNA สายคู่ ทั้งนี้เนื่องจาก nucleic acid ของ bacteriophage PW2 สามารถถูกย่อยสลายได้โดย restriction enzymes แต่ไม่ถูกย่อยสลายโดย RNase และ S1 nuclease นอกจากนี้ยังพบว่า DNA ของ bacteriophage PW2 มีขนาดประมาณ 46kb การศึกษาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่า bacteriophage PW2 ประกอบด้วยโปรตีนหลักอย่างน้อย 6 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75, 60, 35, 30, 20 และ 15 kDa

Abstract

The use of chemicals and antibiotics to prevent and treat diseases of *Penaeus monodon* (giant tiger prawn) has been known to have adverse effects including the development of drug resistant bacteria and the safety problems to consumers and environment caused by their accumulation in animal products and environment. Thus, an alternative approach has been needed for controlling the diseases. Recently, bacteriophage therapy has been shown to be a potential one. This study aimed to find and characterize a bacteriophage infecting *Vibrio harveyi*, a pathogen causing the luminous disease in *P. monodon*. Twelve water samples collected from natural water resources and from *P. monodon* ponds were screened for the desired bacteriophage. Bacteriophage PW2 isolated from a *P. monodon* pond had ability to specifically infect all tested strains of *V. harveyi*. Test of bacteriophage adsorption on the cell surface of the *V. harveyi* CS101 revealed that 90% of the phage was adsorbed on the bacterial cell surface within 30 min. Heat and chemical sensitivity tests showed that bacteriophage PW2 was resistant to heat at 50°C for 30 min and to all chemicals and antibiotics used in this study. Concentration of CaCl_2 was found to influence the propagation of the phage. It propagated in the *V. harveyi* CS101 culture with 20 mM CaCl_2 better than in that without CaCl_2 or containing CaCl_2 below 10 mM. Transmission electron microscopy showed that bacteriophage PW2 had an icosahedral head (50 ± 3.8 nm in diameter) and a noncontractile tail (11 ± 0.5 nm in diameter and 136 ± 6.2 nm in length). It could be classified as a member in the family *Siphoviridae*. The nucleic acid of bacteriophage PW2 was found to be double stranded DNA because it could be degraded by restriction enzymes but not by RNase and S1 nuclease. Furthermore, DNA of bacteriophage PW2 was estimated to be 46 kb. Analysis of proteins purified from bacteriophage PW2 by SDS-PAGE revealed that it contained at least 6 major proteins with molecular mass of 75, 60, 35, 30, 20 and 15 kDa

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์ และวิธีการ	31
ผลการทดลอง	39
วิจารณ์ผลการทดลอง	53
สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	66
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	74
รายงานการเงิน	76

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การจัดจำแนกชนิด และคุณสมบัติโดยทั่วไปของ bacteriophages	15
2 จำนวนของ bacteriophages ที่มีรายงานว่าสามารถบุกรุกแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ	17
3 แบคทีเรียที่สามารถถูกบุกรุกได้โดย bacteriophages กลุ่มต่าง ๆ	18
4 ลักษณะทั่วไปของ genome ของ bacteriophages บางชนิด	19
5 ความสามารถของ bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ <i>V. harveyi</i>	40
6 ความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ	42
7 เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ <i>V. harveyi</i> CS101	45
8 จำนวน phage ที่ตรวจวัดได้ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้นต่าง ๆ	46
9 อัตราการรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 เมื่อบ่ม bacteriophage PW2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที	48
10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 ในสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ	49

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะรูปร่างของกึ่งกลาดำ	4
2 ไดอะแกรม (diagram) แสดงลักษณะของ bacteriophages ใน families ต่าง ๆ	16
3 genetic map ของ bacteriophage M13	20
4 genetic map ของ bacteriophage λ (แสดงเฉพาะยีนบางยีนเท่านั้น)	20
5 lytic cycle ของ bacteriophage T4	22
6 bacteriophage lambda สามารถทำให้เกิดได้ทั้ง lysogeny และ lytic cycle	24
7 ระยะ early infection และ late infection ของ lytic cycle	26
8 การแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ lytic cycle มีลักษณะเป็นลำดับขั้น	27
9 inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ <i>V. harveyi</i> โดย bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2	41
10 plaque ที่เกิดจากการนำ bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2 มาทำ plaque assay โดยใช้ <i>V. harveyi</i> CS101 เป็นโฮสต์เซลล์	41
11 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ <i>V. harveyi</i> CS101	44
12 จำนวน phage ที่ตรวจวัดได้ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้นต่าง ๆ	46
13 อัตราการรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 เมื่อบ่ม bacteriophage PW2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที	47
14 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 ในสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	50
15 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ bacteriophage PW2	51
16 SDS-PAGE ของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบส่วนประกอบของ bacteriophage NLP8	51
17 แถบ (band) ของ nucleic acid ของ bacteriophage PW2 ที่ปรากฏบนแผ่น agarose gel	52

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (Giant tiger prawn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* จัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางและเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย ปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่ผู้เลี้ยงกุ้งประสบในการเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดนี้คือ การเกิดโรคเรืองแสง (Luminous vibriosis) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และสร้างความเสียหายอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยการติดเชื้อสามารถเกิดขึ้นได้เกือบทุกระยะ (life stages) ของการเจริญเติบโตของกุ้ง กุ้งที่ติดเชื้อจะมีอาการที่สังเกตได้คือ กุ้งมักลอยอยู่ที่ขอบบ่อเพาะเลี้ยง ไม่กินอาหาร ตัวหลวม สีลำตัวขุ่น ซีเหงือกมีสีดำ ตับและตับอ่อนอักเสบ และจะมีการเรืองแสงเกิดขึ้นในเวลากลางคืน การรักษาสามารถทำได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และฆ่าเชื้อในน้ำด้วยไฮโอไดนหรือเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride ; BKC) (Lavilla-Pitogo และคณะ 1998, Lavilla-Pitogo และคณะ 1992, http://www.thailandshrimp.com/agriculture_tiger8.html)

เนื่องจากกระแสการต่อต้านการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีเพื่อฆ่าเชื้อโรค ทั้งในส่วนที่ใช้กับน้ำเลี้ยงกุ้งหรือผสมอาหารให้กุ้งกินได้เพิ่มมากขึ้น อันเนื่องมาจากความกลัวว่าจะมีผลตกค้างในส่วนของเนื้อกุ้งที่จะนำมาบริโภค รวมทั้งผลตกค้างในธรรมชาติ ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมในระยะยาว อีกทั้งปัญหาที่เกี่ยวกับการค้าระหว่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการไม่ยอมรับกุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารเคมีของประเทศผู้ส่งนำเข้ากุ้งจากประเทศไทย แม้นัยหนึ่งจะเชื่อว่าเป็นการต่อต้านเพื่อใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้า อย่างไรก็ตามผู้เลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องตอบสนองนโยบายการส่งออกของรัฐบาล โดยพยายามลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงกุ้งและนำวิธีธรรมชาติบำบัดมาใช้ในวงการเพาะเลี้ยงกุ้งเพิ่มมากขึ้น เพื่อหวังจะแก้ปัญหาดังกล่าว วิธีการหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือการนำแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) มาใช้ในการฆ่าเชื้อก่อโรค หรือการรักษาโดยใช้แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage therapy) (Alisky และคณะ 1998, Barrow และคณะ 1998, Barrow และ Soothill 1997) ซึ่งการใช้แบคทีริโอเฟจควบคุมหรือทำลายเชื้อก่อโรค มีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีหลายประการคือ แบคทีริโอเฟจสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ (specific) คือ แบคทีริโอเฟจชนิดใดชนิดหนึ่ง มักจะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น และการเจริญของแบคทีริโอเฟจสามารถถูกควบคุมได้โดยตัวของมันเอง (self-limitation) คือเมื่อแบคทีเรียที่จะเพาะต่อแบคทีริโอเฟจนั้นตายไป หรือหมดไปจากบริเวณที่มีแบคทีริโอ

เฟลจอยู่ ก็จะทำให้แบคทีเรียโอเฟลจหยุดการเพิ่มจำนวนตามไปด้วย นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟลจยังถือว่าเป็นพิษ (non-toxic) ต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

แบคทีเรียโอเฟลจ คือไวรัสของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบได้แทบทุกแห่งในธรรมชาติ เช่น ในดิน อากาศ อาหาร แหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำเสียหรือน้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือนหรือโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น หรืออาจกล่าวได้ว่าที่ใดมีแบคทีเรียที่นั่นก็ย่อมมีแบคทีเรียโอเฟลจ ทั้งนี้เพราะว่าแบคทีเรียโอเฟลจต้องอาศัยแบคทีเรียเพื่อการเพิ่มจำนวน (replication) เมื่อแบคทีเรียโอเฟลจเข้าไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟลจจะอาศัยกลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียเพื่อจำลองตัวเอง และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากมายมหาศาลภายในเวลาอันสั้น จากนั้นแบคทีเรียโอเฟลจก็จะทำให้แบคทีเรียเกิดการแตกสลาย (lysis) และปล่อยแบคทีเรียโอเฟลจจำนวนมากมายื่นออกมาจากเซลล์แบคทีเรียที่ตายไป จากนั้นแบคทีเรียโอเฟลจที่เกิดขึ้นใหม่นี้ก็สามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่อยู่ข้างเคียง แล้วเริ่มกลับเข้าสู่วงจรของการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟลจได้ต่อไป จนกระทั่งทำให้แบคทีเรียนั้นหมดไปในที่สุด จากคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟลจที่กล่าวมานี้ ทำให้นักวิทยาศาสตร์เริ่มหันมาค้นหาและศึกษาแบคทีเรียโอเฟลจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาทั้งในวงการแพทย์ อุตสาหกรรมและเกษตรกรรม โดยหวังว่าจะสามารถนำแบคทีเรียโอเฟลจไปใช้ฆ่าเชื้อก่อโรคเพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ หรือนำไปใช้ในการรักษาโรคที่เชื้อเกิดการดื้อ (resistance) ต่อยาปฏิชีวนะ หรือใช้ในกรณีที่เชื้อไม่สามารถถูกทำลายได้โดยสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อโดยทั่วไป เป็นต้น

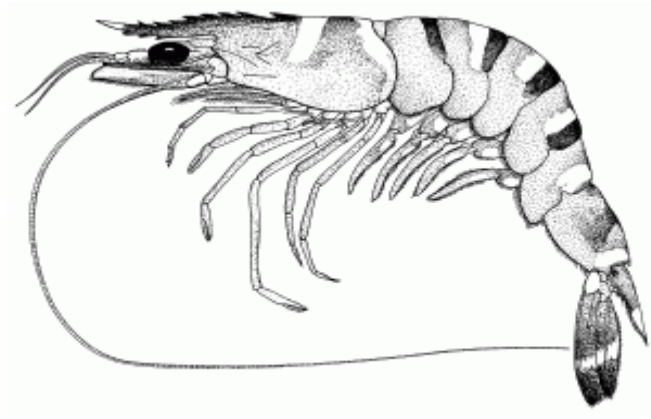
การศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์คือ ต้องการแยกเชื้อแบคทีเรียโอเฟลจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยจะทำการแยกแบคทีเรียโอเฟลจจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งรวมถึงจากแหล่งน้ำธรรมชาติต่าง ๆ จากนั้นจะคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟลจที่มีความสามารถในการฆ่าหรือทำลายเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ดีที่สุด (high virulence) มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไปคือ การทำให้แบคทีเรียโอเฟลจบริสุทธิ์ ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟลจในการทำลาย *Vibrio* สายพันธุ์อื่นหรือเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ศึกษาการทนความร้อน การทนต่อสารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอเฟลจ ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟลจในการเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์ ศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟลจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียโอเฟลจ และศึกษา DNA ของแบคทีเรียโอเฟลจ ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้น่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำได้ต่อไป

ตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (Giant tiger prawn) เป็นสัตว์ในวงศ์ (family) Penaeidae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* ในประเทศไทยกุ้งกุลาดำเป็นที่รู้จักกันในหลากหลายชื่อ เช่น กุ้งกุลากุ้งทะเล กุ้งเสือดำนก กุ้งเสื่อ และ กุ้งลาย เป็นต้น กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่คนนิยมเลี้ยงเพื่อการค้าและมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ทะเล ถิ่นอาศัยตามธรรมชาติพบได้ทั่วไปในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยพบกระจายอยู่ทั่วไป พบมากที่บริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งชุมพรถึงนครศรีธรรมราช และทางฝั่งอันดามันจะพบมากที่ภูเก็ตและระนอง ชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีดินเป็นทรายปนโคลน หรือทรายปนเปลือกหอยและหินปะการัง สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี อดทนและโตเร็ว ลักษณะทั่วไปของกุ้งชนิดนี้คือ ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลาย ลายมีสีออกน้ำตาลเข้มด้านข้างลายจะมีแถบสีขาว ด้านบนของกริมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3-4 ซี่ สันกริยาวเกือบถึงคาราเปด (carapace) มีสันตับ (hepatic crest) ยาวตรงขนานไปกับลำตัว หนวดยาวไม่มีลายชัดเจน ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาวว่ายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงิน ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มี exopod เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีขนาดความยาวได้ถึง 33 เซนติเมตร โดยตัวเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ (รูปที่ 1)

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทยได้เข้าสู่ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาในปี พ.ศ. 2529 ซึ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตให้มากในพื้นที่จำกัด ทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวออกไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว โดยเฉพาะพื้นที่จังหวัดชายทะเลต่าง ๆ ซึ่งในปัจจุบันมีเนื้อที่การเลี้ยงประมาณ 450,000 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 200,000-250,000 ตัน/ปี ส่งผลให้นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา ประเทศไทยได้กลายเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์ไปยังตลาดโลก และยังคงครองความเป็นผู้นำมาจนถึงปัจจุบัน โดยสามารถสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศปีละกว่า 100,000 ล้านบาท



รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของกุ้งกุลาดำ

(ที่มา : http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=21)

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำถูกจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum: Arthropoda

Class: Crustacia

Subclass: Malacostraca

Order: Decapoda

Suborder: Dendrobranchiae

Superfamily: Penaeoidea

Family: Penaeidae

(http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=21)

เพศของกุ้งกุลาดำ

เพศของกุ้งกุลาดำสามารถถูกจัดจำแนก โดยอาศัยอวัยวะเพศภายนอกที่มองเห็นได้อย่างชัดเจน โดยกุ้งกุลาดำที่ถูกจัดเป็นเพศผู้จะมีอวัยวะเพศผู้ที่เรียกว่า petasma ซึ่งเกิดจากการเชื่อมติดกันของแขนงอันในของขาว่ายน้ำคู่แรกทั้งสองข้าง ส่วนกุ้งกุลาดำที่ถูกจัดเป็นเพศเมียจะมีอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า thelycum ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของผนังด้านท้อง (sternal plate) ของระยางค์ส่วนนอก ปล้องที่ 7 และ 8 (หรือตรงกับขาเดินคู่ที่ 4 ถึง 5) ไปเป็นถุงสำหรับรับน้ำเชื้อของเพศผู้

การผสมพันธุ์กันระหว่างกุ้งกุลาดำเพศผู้ และกุ้งกุลาดำเพศเมียเป็นการผสมพันธุ์ภายนอก โดยกุ้งกุลาดำเพศเมียจะทำการวางไข่ในน้ำ โดยการวางไข่แต่ละครั้งกุ้งกุลาดำเพศเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 300,000 ฟอง ในขณะที่กุ้งกุลาดำเพศเมียทำการวางไข่ กุ้งกุลาดำเพศผู้ก็จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาผสมกับไข่ โดยปกติแล้วการผสมพันธุ์ของกุ้งกุลาดำแต่ละครั้งกินเวลาประมาณ 2 ถึง 7 นาที

วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะฟักเป็นตัวอ่อนภายในเวลา 12 ชั่วโมง ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ได้อยู่ในระยะที่เรียกว่า Nauplius มีขนาดประมาณ 0.3 มิลลิเมตร และยังไม่กินอาหาร ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำอยู่ในระยะนี้ประมาณ 2 วัน ซึ่งมีการลอกคราบประมาณ 6 ครั้ง จากนั้นตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำจะเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า Protozoea ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำในระยะนี้มีขนาดประมาณ 1 ถึง 3 มิลลิเมตร กินแพลงตอนพืชเป็นอาหาร มีการลอกคราบประมาณ 3 ครั้งซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 4 วัน จากนั้นตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำจะเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า Mysis ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำในระยะนี้มีขนาดประมาณ 3.3 ถึง 5 มิลลิเมตร กินแพลงตอนสัตว์เป็นอาหาร หลังจากที่ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำอยู่ในระยะนี้ 3 ถึง 4 วัน ก็จะเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า Postlarva ซึ่งตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 20 วัน โดยแต่ละวันตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามจำนวนวันที่อยู่ในระยะนี้ เช่น P1 หมายถึงตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำที่อยู่ในระยะ Postlarva วันที่ 1 และ P20 หมายถึงตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำที่อยู่ในระยะ Postlarva วันที่ 20 เป็นต้น หลังจากสิ้นสุดระยะ Postlarva กุ้งกุลาดำจะมีขนาดประมาณ 2 ถึง 3 เซนติเมตร และเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า Juvenile ซึ่งเป็นระยะที่กุ้งกุลาดำมีลักษณะต่าง ๆ เหมือนกุ้งกุลาดำตัวเต็มวัย เพียงแต่ยังไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ จากนั้นกุ้งกุลาดำจะเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ (maturation) และใช้เวลาอีกประมาณ 10 เดือนในการพัฒนาไปเป็นกุ้งกุลาดำตัวเต็มวัย

โรคของกุ้งกุลาดำ

โรคของกุ้งกุลาดำมีหลากหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีสาเหตุของโรค และอาการของโรคที่แตกต่างกัน การป้องกัน และการรักษาโรคของกุ้งกุลาดำแต่ละโรคก็มีความแตกต่างกัน

โรคของกุ้งกุลาดำสามารถแบ่งตามลักษณะความรุนแรงของโรคได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. โรคติดเชื้อที่ทำให้ผลผลิตกุ้งเสียหายอย่างรุนแรง ซึ่งมีทั้งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส และโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โรคกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสที่สำคัญได้แก่ โรคดวง

ขาว และโรคหัวเหลือง เป็นต้น ส่วนโรคกึ่งที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ โรค vibriosis และโรคเรืองแสง เป็นต้น

2 โรคที่ทำให้ผลผลิตกุ้งเสียหายไม่รุนแรง ซึ่งได้แก่โรคที่เกิดจากโปรโตซัวต่าง ๆ

โรคของกุ้งกุลาดำที่สำคัญ ได้แก่

โรคดวงขาว (White spot syndrome)

โรคดวงขาวของกุ้งกุลาดำเกิดจากเชื้อไวรัส white spot syndrome virus (WSSV) ซึ่งเป็น double stranded DNA virus ชนิดหนึ่ง อวัยวะที่มักถูกทำลายโดยไวรัสดังกล่าว ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิวได้เปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมมน้ำเหลือง และเม็ดเลือด โรคดวงขาวถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยพบในกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยในขณะนั้นได้เรียกว่าไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคว่า Penaeid Rod-shaped DNA virus (PRDV) หรือ Rod-shaped Nuclear virus of *P. japonicus* (RV-PJ) ต่อมาได้มีการระบาดของโรสดังกล่าวในประเทศไทย ได้พบอินโดนีเซีย เวียดนาม มาเลเซีย อินเดีย และอีกหลายประเทศในทวีปเอเชีย ตั้งแต่ต้นปี ค.ศ. 1995 และตั้งแต่ต้นปี ค.ศ. 1997 โรคนี้ได้ระบาดในแหล่งเลี้ยงกุ้งในแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้อาการดังนี้ ลำตัวมีสีแดง และมักพบดวงสีขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 ถึง 2 มิลลิเมตรที่เปลือก ไม่มีแรงติดตัว มักว่ายน้ำบริเวณผิวน้ำหรือเกยขอบบ่อ กินอาหารได้น้อยลง ลอกคราบไม่ออก กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้อัตราการตายประมาณ 80% ถึง 100% และมักตายภายใน 4 ถึง 5 วัน ในปัจจุบันยังไม่มียา หรือสารเคมีที่สามารถรักษาโรคนี้ได้

การป้องกันการเกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำสามารถทำได้โดย ดูแลคุณภาพของน้ำ และสภาพพื้นบ่อให้ดี และควรมีบ่อพักน้ำ คัดเลือกเฉพาะลูกกุ้งกุลาดำที่ปลอดเชื้อในการปล่อยลงบ่อเลี้ยง ป้องกันอย่าให้ในบ่อเลี้ยงมีตัวพาหะ หรือตัวนำเชื้อโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งได้แก่ กุ้งเคย หรือกุ้งชนิดอื่น ๆ รวมทั้งปูชนิดต่าง ๆ และหลีกเลี่ยงการปล่อยลูกกุ้งกุลาดำลงบ่อเลี้ยงในช่วงปลายปี แต่หากจำเป็นจริง ๆ ก็ไม่ควรเลี้ยงเต็มพื้นที่ (http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=98)

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองของกุ้งกุลาดำเกิดจากการติดเชื้อไวรัส Yellow head virus (YHV) ซึ่งเป็น single stranded RNA virus ชนิดหนึ่ง อวัยวะที่สามารถติดเชื้อได้เช่น บริเวณเหงือก ต่อมมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด และเม็ดเลือด โรคนี้มีการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย และต่อมาได้มีการระบาดในแหล่งเลี้ยงกุ้งในหลาย ๆ ประเทศของทวีปเอเชีย กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้อาการดังนี้ บริเวณหัวของกุ้งจะบวมโตมีสีเหลืองชัด บริเวณตับและตับ

อ่อนจะบวมโตมีสีเหลืองชัดเจนเช่นกัน เมื่อเกิดโรคนี้ขึ้นกับกุ้งกุลาดำจะทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็วภายใน 2 ถึง 3 วัน ในปัจจุบันยังไม่มียา หรือสารเคมีที่สามารถใช้รักษาโรคนี้ได้

การป้องกันการเกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำสามารถทำได้โดย ดูแลคุณภาพของน้ำ และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้ดี คัดเลือกเฉพาะลูกกุ้งกุลาดำที่ปลอดเชื้อในการปล่อยลงในบ่อเลี้ยง และป้องกันอย่าให้ในบ่อเลี้ยงมีตัวพาหะ หรือตัวนำเชื้อโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งได้แก่ กุ้งเคย หรือกุ้งชนิดอื่น ๆ รวมทั้งปูชนิดต่าง ๆ (http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=98)

โรค vibriosis

โรค vibriosis ของกุ้งกุลาดำเกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่ง กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้มีอาการดังนี้ ตามระยางค์มีรอยไหม้สีดำเกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการที่กุ้งพยายามสร้างเม็ดสี มีการอักเสบของตับ และตับอ่อน ตับฝ่อ กินอาหารได้น้อยลง กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้จะทยอยตายเรื่อย ๆ การรักษาโรคนี้สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีในกลุ่มไอบิดีน หรือยาปฏิชีวนะต่าง ๆ

การป้องกันการเกิดโรค vibriosis ในกุ้งกุลาดำสามารถทำได้โดย ควบคุมปริมาณอาหารที่ให้กับกุ้งกุลาดำให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ควบคุมปัจจัยการเลี้ยงต่าง ๆ เช่น คุณภาพน้ำ ให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม (http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=98)

โรคช้ำขาว

โรคช้ำขาวของกุ้งกุลาดำเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารบริเวณลำไส้ หรืออาจเกิดจากการที่กุ้งกุลาดำได้รับสารพิษ หรือโปรโตซัวบางชนิด กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้มีอาการดังนี้ กินอาหารได้น้อยลง ผอม ตัวเริ่มนึ่ม มีการกินกันเอง และมีการพบซีสีขาวลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ การรักษาโรคนี้สามารถทำได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Sulfonamides หรือในกลุ่ม aminoglycoside โดยอาจใช้ร่วมกับ probiotic ก็ได้

การป้องกันการเกิดโรคช้ำขาวในกุ้งกุลาดำสามารถทำได้โดย คัดเลือกอาหารที่มีคุณภาพ และตรวจสอบความปลอดภัยของอาหารตลอดเวลา นอกจากนี้ยังอาจทำได้โดยการให้ probiotic เสริมไปกับอาหาร (http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=98)

โรคเรืองแสง (luminous vibriosis)

โรคเรืองแสงของกุ้งกุลาดำเกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้มีอาการดังนี้ กุ้งลอยอยู่ที่ขอบบ่อ ไม่กินอาหาร ตัวหวม สีลำตัวขุ่น ซีเหงือกมีสีดำ ตับอักเสบ ตับอ่อนมีสีซีดลง และจะมีการเรืองแสงเกิดขึ้นในเวลากลางคืน หากกุ้งกุลาดำติดเชื้อ *Virio harveyi* สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงในการก่อโรค (highly virulent strain) สามารถ

ทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 100 % เมื่อในบ่อมีเชื้อเพียง 10^2 cfu/ml (Lavilla-Pitogo และคณะ 1992) การรักษาโรคนี้สามารถทำได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะ และฆ่าเชื้อในน้ำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Benzalkonium chloride)

การป้องกันการเกิดโรค vibriosis ในกุ้งกุลาดำสามารถทำได้โดย ควบคุมความเค็มของน้ำให้อยู่ในระดับ 5 ถึง 7 ppt ควบคุมปริมาณอาหารที่ให้กับกุ้งกุลาดำให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ควบคุมปัจจัยการเลี้ยงต่าง ๆ เช่น คุณภาพน้ำ ให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม (http://www.thailandshrimp.com/agriculture_tiger8.html, Lavilla-Pitogo 1998)

การแก้ปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง

วิธีการแก้ปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งที่ผู้เพาะเลี้ยงนิยมใช้กันอยู่ทั่วไปในปัจจุบันคือ การใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และสารเคมี โดยยาปฏิชีวนะและสารเคมีที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและยี่ห้อทั้งที่ถูกกฎหมายและไม่ถูกกฎหมาย เนื่องจากหน่วยงานที่รับผิดชอบไม่สามารถควบคุมดูแลได้อย่างทั่วถึง ดังนั้นจึงเปิดโอกาสให้มีการขายสินค้าที่ไม่ได้ขึ้นทะเบียนได้อย่างเสรี และขาดระเบียบปฏิบัติที่ถูกต้อง เช่น การโฆษณาสรรพคุณสินค้าอย่างเกินความจริง ไม่มีฉลากสินค้าที่ระบุถึงส่วนผสมและปริมาณของสารออกฤทธิ์ ไม่บอกวันผลิตและวันหมดอายุของสินค้า ทำให้เกษตรกรตกอยู่ในฐานะผู้เสียเปรียบ อีกทั้งการดำเนินธุรกิจของผู้ค้ายาและสารเคมีในลักษณะเช่นนี้ย่อมนำมาซึ่งปัญหาที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิตกุ้งของประเทศ ทั้งในแง่การตกค้างของยาและสารเคมีในกุ้ง และในแง่ของการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคในกุ้ง ซึ่งจะส่งผลทำให้ยากต่อการรักษาในอนาคต ตลอดจนผลกระทบระยะยาวต่อสิ่งแวดล้อมในแหล่งเลี้ยงกุ้งซึ่งเกษตรกรยังจำเป็นต้องใช้เป็นแหล่งประกอบอาชีพของตนและครอบครัวสืบไป

สำหรับสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างกว้างขวาง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545) คือ ออกซิเตทราไซคลิน (Oxytetracycline, OTC) กับออกซอลินิก แอซิด (Oxolinic acid, OA) ซึ่งเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่อนุญาตให้ใช้อย่างถูกกฎหมาย โดยเฉพาะ OTC นั้นเป็นยาที่ CODEX ขึ้นทะเบียนให้ใช้ในการผลิตสัตว์น้ำและสัตว์บกเพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อย่างไรก็ตามการนำยามาใช้นี้ก็ต้องทราบวิธีการใช้และใช้อย่างถูกต้อง และสิ่งสำคัญที่สุดก็คือ จะต้องไม่ให้เหลือตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์เกินกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ว่าปลอดภัยและสามารถนำสัตว์นั้นมาบริโภคได้ ซึ่งเรียกค่าดังกล่าวนี้ว่า MRL (Maximum Residue Limit) โดย OTC มีค่า MRL กำหนดไว้ที่ 0.05 ppm สำหรับประเทศญี่ปุ่น และ 0.01 ppm สำหรับสหภาพยุโรป ส่วน OA มีค่า MRL กำหนดไว้ที่ 0.05 ppm สำหรับประเทศญี่ปุ่น และ 0.00 ppm สำหรับสหภาพยุโรป ซึ่งหมายความว่า จะต้องไม่มีหลงเหลืออยู่เลย สำหรับสารปฏิชีวนะที่ไม่ควรใช้โดย

เด็ดขาดในการเพาะเลี้ยงกึ่ง ได้แก่ ยากลุ่มคลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol) ยากลุ่มเบต้าแลคแตม (β -Lactams) ยากลุ่มไนโตรฟิวแรน (Nitrofurans) ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) ยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamides) และยากลุ่มไกลโคเปปไทด์ (Glycopeptides) เป็นต้น

เชื้อแบคทีเรียในจิ้นัส *Vibrio*

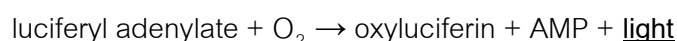
แบคทีเรียในจิ้นัส *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae มีรูปร่างแบบแท่ง (rod) โดยอาจเป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร และยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ (gram-negative) สร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ไม่สร้างสปอร์ (spore) และแคปซูล (capsule) เคลื่อนที่ได้รวดเร็วโดยใช้แฟลเจลลา (flagella) ที่ปลายเซลล์เพียงเส้นเดียวหรือมากกว่า 1 เส้น บางสายพันธุ์อาจพบแฟลเจลลาอยู่ด้านข้างของเซลล์ การเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโดยทั่วไป สามารถเห็นโคโลนีขนาด 2-3 มิลลิเมตร ได้ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีบน blood agar และ chocolate agar จะมีสีเขียวและวาวแสง บางสปีชีส์ (species) ให้ฮีโมลิซิสแบบบีตา (β -hemolysis) รอบโคโลนีบน blood agar เนื่องจากเชื้อมีความทนทานน้อยต่อสภาวะที่เป็นกรด แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH 8.0-9.5) จึงได้นำคุณสมบัตินี้ของเชื้อมาใช้ในการอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ (enrichment media) อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective media) และอาหารที่ใช้แยกชนิดของเชื้อ (differential media) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ ได้แก่ alkaline peptone water ซึ่งมี pH 8.6 อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Vibrio* บน TCBS agar จะขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อในการหมักย่อยซูโครส สปีชีส์ที่สามารถหมักย่อยซูโครส เช่น *V. cholerae* และ *V. alginolyticus* จะให้โคโลนีสีเหลือง ส่วนสปีชีส์ที่ไม่หมักย่อยซูโครส เช่น *V. minicus* และ *V. parahaemolyticus* จะให้โคโลนีสีเขียว สำหรับ *V. harveyi* สามารถเจริญได้บน TCBS agar แต่อาจให้โคโลนีสีเหลืองหรือสีเขียวก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (strain) *Vibrio* บางสปีชีส์ไม่สามารถเจริญบน TCBS agar เช่น *V. hollisae* และบางสายพันธุ์ของ *V. metschnikovii* (วิภาวดี, 2540) สำหรับอาหารที่ใช้แยกชนิดของเชื้อ (differential media) ที่เหมาะสมต่อการคัดแยกเชื้อ *V. harveyi* ได้แก่ *V. harveyi* agar (VHA) (Harris และคณะ 1996) เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และอาศัยความสามารถในการหมักย่อยเซลลูโลส (cellulose) และ ออโรนิน (ornithine) ของ *V. harveyi* ทำให้เชื้อ *V. harveyi* มีลักษณะโคโลนี

เฉพาะและแตกต่างไปจากโคโลนีของ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ บน VHA คือ โคโลนีมีสีเขียว กลางโคโลนีมีสีเขียวเข้ม รอบโคโลนีมีสีเหลือง (yellow halo) (Harris และคณะ 1996)

Vibrio harveyi

Vibrio harveyi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคเรืองแสง (luminous vibriosis) ในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง (Karunasagar และคณะ 1994, Pizzuto และ Hirst 1995, Alvarez และคณะ 1998) และปลา (Kraxberger-Beatty และคณะ 1990, Ishimaru และ Muroga 1997) ได้ ความสามารถในการก่อโรคของ *V. harveyi* เกี่ยวข้องกับยีน hemolysin (Zhang และคณะ 2001) โดยปกติแล้ว *Vibrio harveyi* สามารถเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองได้ โดยการเรืองแสงดังกล่าวเกิดจากปฏิกิริยาที่ต้องอาศัยเอนไซม์ luciferase โดยเอนไซม์ luciferase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ของ luciferin

ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเรืองแสงประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้



Vibrio harveyi ถูกจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Vibrionales

Family: Vibrionaceae

Genus: *Vibrio*

Species: *V. harveyi*

(http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_harveyi)

Bacteriophages

Bacteriophages (bacterial viruses) ถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์สองท่าน คือ Dr. Frederick William Twort (ในปีค.ศ. 1915) และ Dr. Felix Hubert d'Herelle (ในปีค.ศ. 1917) (Ackermann 2003) โดย Dr. Twort ซึ่งเป็นนักพยาธิวิทยา (pathologist) ชาวอังกฤษ ได้ทำการวิจัยที่กรุงลอนดอน (London) ประเทศอังกฤษ และพบไวรัส (virus) ที่สามารถทำให้ *Micrococcus* ปลายพันธุ์ได้ ส่วน Dr. d'Herelle ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสเชื้อสาย

แคนาดา ได้ทำการวิจัยที่สถาบัน the Pasteur Institute of Paris ในกรุงปารีส (Paris) ประเทศฝรั่งเศส และพบการแตกสลาย (lysis) ของ *Shigella* โดยไวรัส นอกจากนี้ Dr. d'Herelle ยังเป็นบุคคลแรกที่ได้ใช้คำว่า “bacteriophages” ในการเรียกไวรัสที่สามารถบุกรุก (infect) แบคทีเรีย

bacteriophages โดยทั่วไปมักประกอบด้วย genome ที่มี capsid หรือ protein coat ห่อหุ้มอยู่ โดย bacteriophages บางชนิดอาจมี envelope ซึ่งมีไขมัน (lipid) เป็นส่วนประกอบ ห่อหุ้ม capsid อีกชั้นหนึ่ง genome ของ bacteriophages อาจเป็น single-stranded DNA (ssDNA) double-stranded DNA (dsDNA) single-stranded RNA (ssRNA) หรือ double-stranded RNA (dsRNA) ก็ได้ นอกจากนี้ genome ของ bacteriophages ยังอาจมีรูปร่างเป็น circular หรือ linear ก็ได้ (Ackermann 2003)

การจัดจำแนก bacteriophages (Bacteriophage classification)

ในอดีตที่ผ่านมา มีการจัดจำแนก bacteriophage กันหลากหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อกำหนด และกฎเกณฑ์ที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น การจัดจำแนก bacteriophage ตามวิธีของ d'Herelle (1918) การจัดจำแนก bacteriophage ตามวิธีของ Holmes (1948) การจัดจำแนก bacteriophage ตามวิธีของ Lwoff และคณะ (1962) และการจัดจำแนก bacteriophage ตามวิธีของ Bradley (1967) เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการจัดตั้งหน่วยงานซึ่งทำหน้าที่จัดจำแนก bacteriophages ขึ้นเรียกว่า “International Committee for Taxonomy of Viruses” หรือ “ICTV”

ICTV ได้จัดจำแนกไวรัสทั้งหมดออกเป็น 3 orders 61 families และ 241 genera (Ackermann 2003) โดย bacteriophage ถูกจัดอยู่ใน 1 order 13 families และ 30 genera (ตารางที่ 1) ส่วนการตั้งชื่อไวรัสได้ใช้ภาษาละติน (latin) หรือภาษากรีก (Greek) โดยถ้าเป็นชื่อ order ให้ลงท้ายชื่อด้วย *-virales* ถ้าเป็นชื่อ family ให้ลงท้ายชื่อด้วย *-viridae* และถ้าเป็นชื่อ genus ให้ลงท้ายชื่อด้วย *-virus*

ตามการจัดจำแนก bacteriophages ของ ICTV bacteriophages ที่มีรูปร่าง tailed shape จะถูกจัดอยู่ใน order “*Caudovirales*” ซึ่ง bacteriophages ที่อยู่ใน order นี้ยังถูกแบ่งออกเป็น 3 families คือ *Myoviridae* *Siphoviridae* และ *Podoviridae* ส่วน bacteriophages ที่มีรูปร่าง polyhedral shape จะถูกแบ่งออกเป็น 5 families คือ *Microviridae* *Corticoviridae* *Tectiviridae* *Leviviridae* และ *Cystoviridae* ในขณะที่ bacteriophages ที่มีรูปร่าง filamentous shape จะถูกแบ่งออกเป็น 3 families คือ *Inoviridae* *Lipothrixviridae* และ *Rudiviridae* นอกจากนี้ bacteriophages ที่มีรูปร่าง pleomorphic shape จะถูกแบ่งออกเป็น 2 families คือ *Plasmaviridae* และ *Fuselloviridae* จากตารางที่ 1 ตารางที่ 2 และตารางที่ 3 จะ

เห็นว่า bacteriophages ใน families ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็น รูปร่างของ bacteriophages ชนิดของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ของ bacteriophages ลักษณะและส่วนประกอบของ bacteriophages ตลอดจนความสามารถของ bacteriophages ในการบุกรุกแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ เป็นต้น อย่างไรก็ตามข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับ bacteriophages ที่ได้นำเสนอในที่นี้อาจไม่ถูกต้องในขนาดข้างหน้า ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาและค้นหา bacteriophages ชนิดใหม่ ๆ ยังคงดำเนินต่อไปเรื่อย ๆ และมีการคาดการณ์ว่าในอนาคตจะมี bacteriophages ชนิดใหม่ ๆ ถูกค้นพบอีกมาก

Tailed phages

Tailed phage จัดเป็น bacteriophages กลุ่มที่ใหญ่ที่สุด เนื่องจากมี bacteriophages ประมาณ 96% ของ bacteriophages ทั้งหมด (Ackermann 1999, 1996) ลักษณะโดยทั่วไปของ tailed phages ประกอบด้วย ส่วนหัวที่มีสมมาตรแบบลูกบาศก์ (head with cubic symmetry) และส่วนหางที่ขดเป็นเกลียว (helical tail) (Lwoff และคณะ 1962) genome ของ tailed phages ทุกชนิดเป็น linear dsDNA ซึ่งมีอยู่ 1 อัน และถูกล้อมรอบด้วย capsid

Tailed phages ทุกชนิดจัดอยู่ใน order *Caudovirales* โดย bacteriophages ที่อยู่ใน order ดังกล่าวยังสามารถถูกแบ่งออกได้เป็น 3 families คือ *Myoviridae* *Siphoviridae* และ *Podoviridae* (ตารางที่ 1, รูปที่ 1)

ใน family *Myoviridae* มี tailed phages อยู่ประมาณ 25% ของ tailed phages ทั้งหมด ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ ส่วนหางของ bacteriophages มีลักษณะยืดหดได้ (contractile tail) และประกอบด้วยแกนกลางที่เรียกว่า central tube ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยส่วนที่เรียกว่า sheath bacteriophages ใน family *Myoviridae* ยังสามารถแบ่งได้เป็น 6 genera โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น T4 เป็นต้น (Ackermann 2003)

ใน family *Siphoviridae* มี tailed phages อยู่ประมาณ 61% ของ tailed phages ทั้งหมด ซึ่งจัดเป็น family ที่ใหญ่ที่สุดของ tailed phages ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ ส่วนหางของ bacteriophages มีลักษณะยาว และไม่สามารถยืดหดได้ (long, noncontractile tail) bacteriophages ใน family *Siphoviridae* ยังสามารถแบ่งได้เป็น 6 genera โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น lambda (λ) เป็นต้น (Ackermann 2003)

ใน family *Podoviridae* มี tailed phages อยู่ประมาณ 14% ของ tailed phages ทั้งหมด ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ ส่วนหางของ bacteriophages มีลักษณะสั้น

(short tail) bacteriophages ใน family *Podoviridae* ยังสามารถแบ่งได้เป็น 3 genera โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น T7 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Polyhedral phages

Polyhedral phages เป็น bacteriophages ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม genome ของ bacteriophages ในกลุ่มนี้มีทั้งแบบ ssDNA dsDNA ssRNA และ dsRNA polyhedral phages ถูกจัดแบ่งเป็น 5 families คือ *Microviridae* *Corticoviridae* *Tectiviridae* *Leviviridae* และ *Cystoviridae* (ตารางที่ 1, รูปที่ 1)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Microviridae* เป็น circular ssDNA ซึ่งมี 1 อัน และถูกห่อหุ้มด้วย capsid ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ เป็น bacteriophages ที่มีขนาดเล็ก bacteriophages ใน family *Microviridae* สามารถแบ่งได้เป็น 4 genera โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น Φ X174 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Corticoviridae* เป็น circular dsDNA ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ capsid ของ bacteriophages ใน family นี้ ประกอบด้วย ชั้นของโปรตีน 2 ชั้น โดยมีชั้นของ lipid bilayer แทรกอยู่ตรงกลาง bacteriophages ใน family *Corticoviridae* มีเพียง 1 genus โดย bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ ได้แก่ PM2 (Ackermann 2003)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Tectiviridae* เป็น linear dsDNA ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ มี capsid ที่แข็งแรง (rigid protein capsid) และมี lipoprotein vesicles อยู่ภายใน (internal lipoprotein vesicles) ซึ่งในขณะที่ bacteriophages ใน family นี้เกาะที่ผิวของแบคทีเรีย vesicle ดังกล่าวจะเปลี่ยนไปเป็นท่อ (tail-like tube) ที่มีความยาวประมาณ 60 นาโนเมตร ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นทางให้ DNA ถูกปล่อยจาก bacteriophages เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย bacteriophages ใน family *Corticoviridae* มีเพียง 1 genus โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น PRD1 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Leviviridae* เป็น linear ssRNA ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วย capsid ที่มีโครงสร้างแตกต่างจาก RNA viruses ทั่วไป (Valegard และคณะ 1990) bacteriophages ใน family นี้มีลักษณะคล้าย polioviruses bacteriophages ใน family *Leviviridae* สามารถแบ่งได้เป็น 2 genera โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น MS2 เป็นต้น (Valegard และคณะ 1990, Ackermann 2003)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Cystoviridae* เป็น linear dsRNA ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน family นี้คือ มี envelope ซึ่งประกอบด้วยไขมัน (lipid containing envelope) ล้อมรอบด้านนอกของ capsid และ bacteriophages ใน family นี้สามารถบุกรุกได้เฉพาะ *Pseudomonas syringae* เท่านั้น bacteriophages ใน family *Cystoviridae* มีเพียง 1 genus โดย bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ได้แก่ $\Phi 6$ (Ackermann 2003)

Filamentous phages

Filamentous phages เป็น bacteriophages ที่มีรูปร่างเป็นสาย หรือเป็นเส้น genome ของ bacteriophages ในกลุ่มนี้มีทั้งแบบ ssDNA และ dsDNA filamentous phages ถูกจัดแบ่งเป็น 3 families คือ *Inoviridae* *Lipothrixviridae* และ *Rudiviridae* (ตารางที่ 1, รูปที่ 1)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Inoviridae* เป็น circular ssDNA bacteriophages ใน family นี้สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 genera คือ *Inovirus* และ *Plectrovirus* ใน genus *Inovirus* มี bacteriophages 42 ชนิด ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน genus นี้คือ มีลักษณะเป็นสายยาว (long filament) ซึ่งอาจแข็ง (rigid) หรือยืดหยุ่นได้ (flexible) ก็ได้ มีความทนทานต่อความร้อน แต่ไวต่อ chloroform แบคทีเรียที่สามารถเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของ bacteriophages ใน genus *Inovirus* ได้ ได้แก่ แบคทีเรียที่จัดเป็น enterobacteria *Clostridium* (Kim และ Blaschek 1991) *Propionibacterium* (Gautier 1999) ส่วนใน genus *Plectrovirus* มี bacteriophages 15 ชนิด ลักษณะเด่นของ bacteriophages ใน genus นี้คือ มีลักษณะเป็นแท่งตรงสั้น ๆ (short, straight rod) แบคทีเรียที่สามารถเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของ bacteriophages ใน genus *Inovirus* ได้ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม mycoplasmas (Ackermann 2003)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Lipothrixviridae* เป็น linear dsDNA bacteriophages ใน family นี้มีลักษณะเป็นแท่ง (rod-like shape) และมี lipoprotein envelope ห่อหุ้มอยู่ภายนอก bacteriophages ใน family *Lipothrixviridae* มีเพียง 1 genus โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น TTV 1 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Genome ของ bacteriophages ใน family *Rudiviridae* เป็น linear dsDNA bacteriophages ใน family นี้มีลักษณะเป็นแท่งตรงแข็ง (straight, rigid rod) ไม่มี envelope ห่อหุ้มภายนอก และมีลักษณะคล้าย tobacco mosaic virus bacteriophages ใน family *Rudiviridae* มีเพียง 1 genus โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น SIRV 1 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Pleomorphic phages

Pleomorphic phages เป็น bacteriophages ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน bacteriophages ทุกชนิดในกลุ่มนี้มี genome เป็น circular dsDNA pleomorphic phages ถูกจัดแบ่งเป็น 2 families คือ *Plasmaviridae* และ *Fuselloviridae* (ตารางที่ 1, รูปที่ 2)

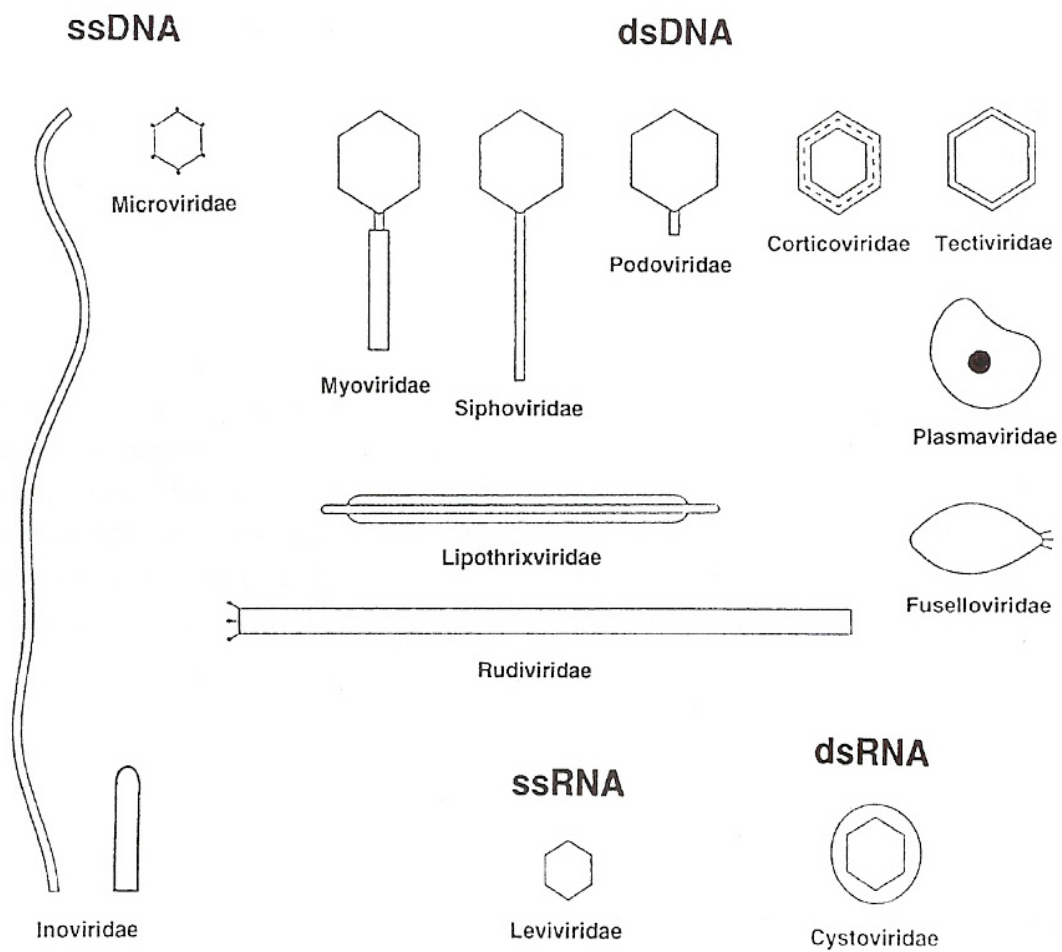
Bacteriophages ใน family *Plasmaviridae* เป็น bacteriophages ที่ไม่มี capsid แต่มี envelope ที่ประกอบด้วยไขมันห่อหุ้มแทน ในการบุกรุกเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่ม mycoplasmas envelope ของ bacteriophage ในกลุ่มนี้จะเชื่อม (fuse) รวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ bacteriophages สามารถปล่อย genome เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ bacteriophages ใน family *Plasmaviridae* มีเพียง 1 genus โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น L2 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Bacteriophages ใน family *Fuselloviridae* มีลักษณะคล้ายผลมะนาว (lemon-shaped) และมีหนามสั้น ๆ (short spikes) ที่ปลายด้านหนึ่ง capsid ของ bacteriophages ใน family นี้ ประกอบด้วย hydrophobic proteins 2 ชนิด และไขมันที่ได้มาจากเซลล์เจ้าบ้าน (host lipids) capsid ดังกล่าวสามารถถูกทำลายได้โดย chloroform bacteriophages ใน family *Fuselloviridae* มีเพียง 1 genus โดยตัวอย่างของ bacteriophages ที่อยู่ใน family นี้ เช่น SSV 1 เป็นต้น (Ackermann 2003)

Shape	Nucleic acid	Families	Genera	Examples	Members	characteristics
Tailed	DNA, ds, L	<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Tail contractile
	DNA, ds, L	<i>Siphoviridae</i>	6	λ	3011	Tail long, noncontractile
	DNA, ds, L	<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Tail short
Polyhedral	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	Φ X174	40	Complex capsid, lipids Internal lipoprotein vesicle
	DNA, ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	3	
	DNA, ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	18	
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	Envelope, lipids
	RNA, ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	Φ_6	1	
Filamentous	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	fd	57	Filaments or rods
	DNA, ds, L	<i>Lipothirixviridae</i>	1	TTV1	6	Envelope, lipids
	DNA, ds, L	<i>Rudoviridae</i>	1	IRV1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Envelope, lipids, no capsid
	DNA, ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	8	Spindle-shape, no capsid

C = circular, L = linear, S = segmented, T = superhelical, ss = single-stranded, ds = double-stranded

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกชนิด และคุณสมบัติโดยทั่วไปของ bacteriophages



รูปที่ 2 ไดอะแกรม (diagram) แสดงลักษณะของ bacteriophages ใน families ต่าง ๆ

Bergey section ^a	Bacterial group	<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	PFP ^b
	Gram-negative bacteria				
1	Spirochetes	10	1	-	-
2	Spirilla and vibrioids	26	14	-	9
4	Rods and cocci, aerobic	303	323	230	22
5	Rods, facultatively anaerobic	440	340	300	93
6	Rods, anaerobic	4	21	5	-
7	Sulfate and sulfur reducers	1	1	-	-
8	Anaerobic cocci	-	2	2	-
9	Rickettsias and chlamydias	-	1	1	2
11	Endosymbionts	-	-	2	-
18	Anoxygenic phototrophs	3	6	3	-
19	Cyanobacteria	22	6	16	-
20	Chemolithotrophs	1	1	-	-
21	Budding and/or appendaged bacteria	8	90	14	8
22	Sheathed bacteria	-	-	1	-
23	Nonfruiting gliding bacteria	30	2	-	2
24	Myxobacteria	11	-	5	-
	Gram-positive eubacteria				
10	Mycoplasmas	1	2	14	21
12	Cocci	44	1144	29	-
13	Endospore producers	257	317	51	10
14	Nonsporing regular rods	71	213	2	-
15	Nonsporing pleomorphic rods	-	183	13	1
16	Mycobacteria	1	77	-	-
17, 26	Nocardioforms	1	95	1	-

^aBergey's Manual of Determinative Bacteriology

^bPolyhedral, filamentous and pleomorphic phages

ตารางที่ 2 จำนวนของ bacteriophages ที่มีรายงานว่าสามารถบุกรุกแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ

Bergey section ^a	Bacterial group	Myoviridae	Siphoviridae	Podoviridae	PFP ^b
	Gram-positive eubacteria (ต่อ)				
28	actinoplanes	1	4	-	-
29	Streptomyces	2	121	8	-
30	Maduromycetes	-	3	-	-
31	Thermomonosporae	-	27	-	-
32	Thermoactinomycetes	-	3	1	-
33	Other actinomycetes	-	6	-	-
25	Archaea	7	7	-	18

^aBergey's Manual of Determinative Bacteriology

^bPolyhedral, filamentous and pleomorphic phages

ตารางที่ 2 จำนวนของ bacteriophages ที่มีรายงานว่าสามารถบุกรุกแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ (ต่อ)

Phage group or family	Bacterial group or genus
Tailed phages (<i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> and <i>Podoviridae</i>)	Eubacteria, Euryarchaeota (extreme halophiles and methanogens)
<i>Microviridae</i>	Enterobacteria, <i>Bdellovibrio</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Spiroplasma</i>
<i>Corticoviridae</i>	<i>Alteromonas</i>
<i>Tectiviridae</i>	(a) Enterics, <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Thermus</i> , <i>Vibrio</i> (b) <i>Bacillus</i> , <i>Alicyclobacillus</i>
<i>Leviviridae</i>	Enterics, <i>Acinetobacter</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
<i>Cystoviridae</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Inoviridae</i> : <i>Inovirus</i> <i>Plectrovirus</i>	Enterics, <i>Pseudomonas</i> , <i>Thermus</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Xanthomonas</i> <i>Acholeplasma</i> , <i>Spiroplasma</i>
<i>Plasmaviridae</i>	<i>Acholeplasma</i>
<i>Lipothrixviridae</i>	Crenarchaeota: <i>Acidianus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermoproteus</i>
<i>Rudiviridae</i>	Crenarchaeota: <i>Sulfolobus</i>
<i>Fuselloviridae</i>	(a) Crenarchaeota: <i>Acidianus</i> , <i>Sulfolobus</i> (b) Euryarchaeota: <i>Methanococcus</i> , <i>Pyrococcus</i>

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถถูกบุกรุกได้โดย bacteriophages กลุ่มต่าง ๆ

พันธุศาสตร์ (Genetics) ของ bacteriophages

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า genome ของ bacteriophages มีทั้งแบบที่เป็น single-stranded DNA double-stranded DNA single-stranded RNA และ double-stranded RNA ซึ่งใน genome แต่ละแบบยังอาจมีได้หลายลักษณะ เช่น ลักษณะที่เป็นเส้นตรง (linear) และ ลักษณะที่เป็นวงกลม (circular) (ตารางที่ 4)

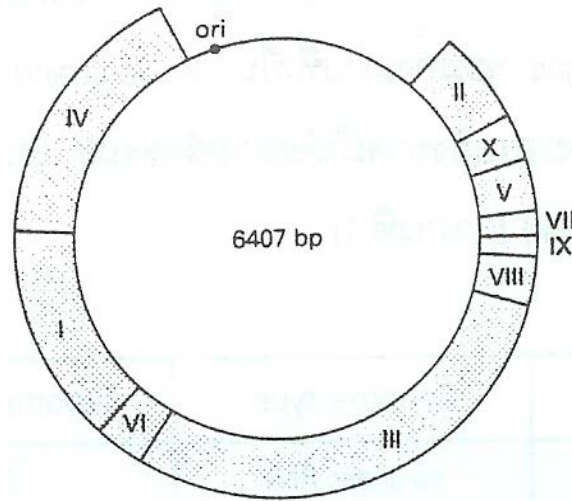
Phage	Host	Genome type	Genome size (kb)	Number of genes [#]
MS2	<i>E. coli</i>	ss linear RNA	3.6	3
φX174	<i>E. coli</i>	ss circular DNA	5.4	11
M13	<i>E. coli</i>	ss circular DNA	6.4	10
T7	<i>E. coli</i>	ds linear DNA	39.9	55
λ	<i>E. coli</i>	ds linear DNA	49.5	48
T4	<i>E. coli</i>	ds linear DNA	166.0	150

ตารางที่ 4 ลักษณะทั่วไปของ genome ของ bacteriophages บางชนิด

(ss = single-stranded, ds= double-stranded,

[#] = the numbers refer to genes with identified functions)

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า bacteriophages บางชนิดมี genome ขนาดเล็ก ซึ่งประกอบด้วย ยีนเพียงไม่กี่ยีน เช่น bacteriophage M13 bacteriophage ชนิดนี้มี genome ขนาดประมาณ 6.4 kb ซึ่งประกอบด้วยยีนเพียง 10 ยีน โดยที่ยีนเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเอง (replication) ของ genome ของ bacteriophage M13 (ยีน II และ ยีน V) และยีนสำหรับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้ม (capsid) ของ bacteriophage M13 (ยีน III ยีน V และ ยีน VIII) (รูปที่ 3) ส่วน bacteriophages บางชนิดมี genome ขนาดใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยยีนจำนวนมาก เช่น bacteriophage lambda (bacteriophage λ) bacteriophage ชนิดนี้มี genome ขนาดประมาณ 49.5 kb ซึ่งประกอบด้วยยีนจำนวนมากนอกเหนือไปจากยีนสำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเองของ genome ของ bacteriophage λ (ยีนในกลุ่ม replication) และยีนสำหรับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้มของ bacteriophage λ (head genes และ tail genes) (รูปที่ 4) ถึงแม้ว่า bacteriophage λ จะมี genome ขนาดใหญ่ และมียีนจำนวนมากเพียงใดก็ตาม bacteriophage λ ก็ยัง จำเป็นต้องอาศัยเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในการดำรงชีพเหมือนกับ bacteriophages ที่มี genome ขนาดเล็กและมียีนเพียงไม่กี่ยีน



รูปที่ 3 genetic map ของ bacteriophage M13

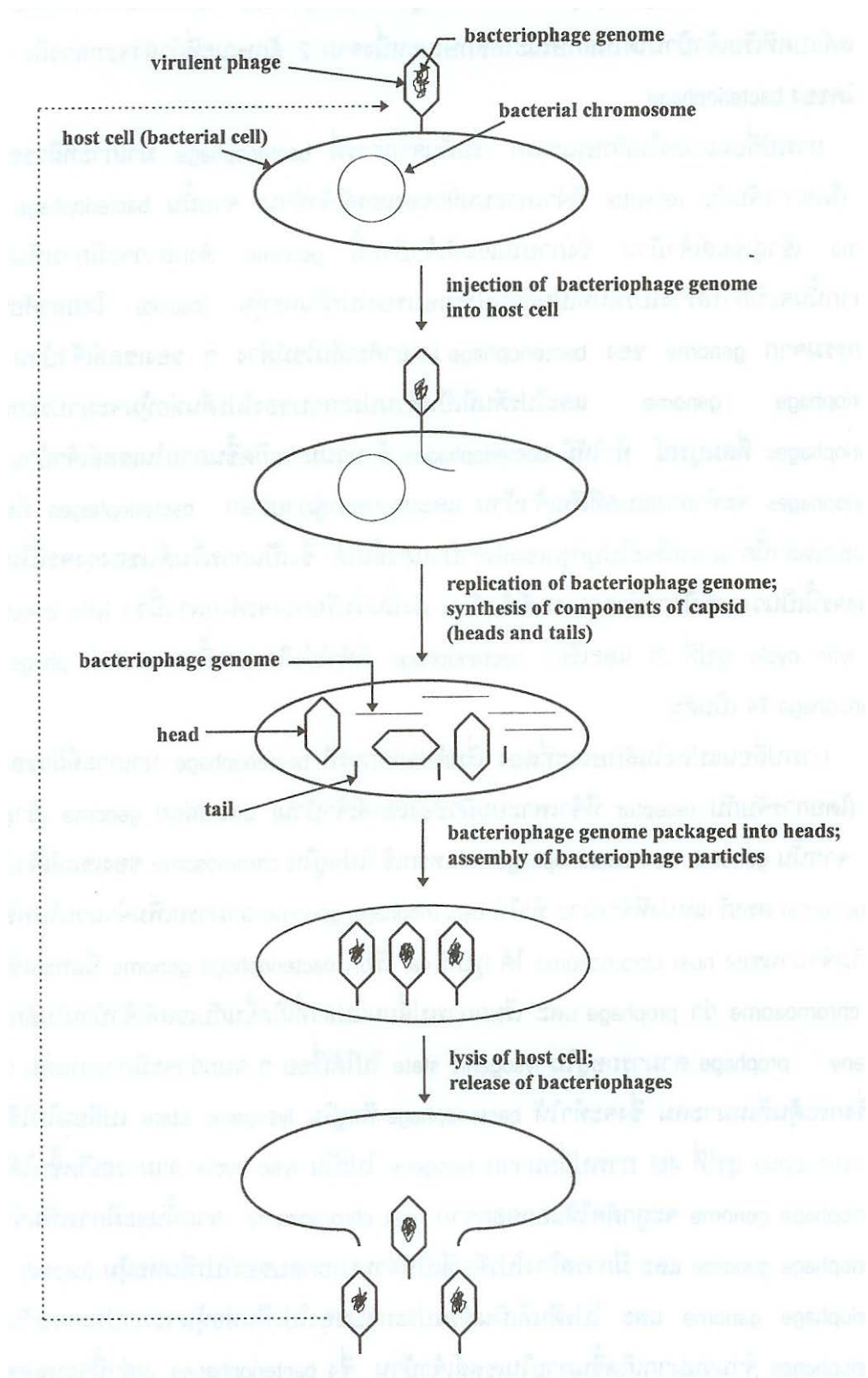
Head genes	Tail genes	Recombination	Regulation	Replication	Lysis
<i>A WBCNu3DE</i>	<i>FZUVGTHMLKIJ</i>	<i>att int xis α β γ</i>	<i>cIII N cI cro cII</i>	<i>O P Q</i>	<i>SR</i>

รูปที่ 4 genetic map ของ bacteriophage λ (แสดงเฉพาะยีนบางยีนเท่านั้น)

Bacteriophages บางชนิดสามารถทำให้เกิดได้เฉพาะ lytic cycle แต่บางชนิดสามารถทำให้เกิดได้ทั้ง lytic cycle และ lysogeny

เมื่อ bacteriophage บุกรุกเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านได้ในลักษณะใดลักษณะหนึ่งจาก 2 ลักษณะที่กำลังจะกล่าวถึง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ bacteriophage

การเปลี่ยนแปลงในลักษณะแรก เริ่มต้นจากการที่ bacteriophage มาเกาะที่ผิวของเซลล์เจ้าบ้าน (โดยการจับกับ receptor ที่จำเพาะบนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน) จากนั้น bacteriophage จะปล่อย genome เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งภายในเซลล์เจ้าบ้านนี้ genome ดังกล่าวจะมีการเพิ่มจำนวนขึ้น หลังจากนั้นจะมีการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้ม (capsid) โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมจาก genome ของ bacteriophage แต่อาศัยเอนไซม์ต่าง ๆ ของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งต่อมา bacteriophage genome และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้มจะมาประกอบกันเป็น bacteriophages ที่สมบูรณ์ ทำให้มี bacteriophages จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้น bacteriophages จะทำลายแบคทีเรียเจ้าบ้าน และหลุดออกสู่ภายนอก bacteriophages ที่หลุดออกสู่ภายนอกเหล่านี้สามารถที่จะไปบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านตัวอื่นได้ ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของวงจรใหม่ เนื่องจากวงจรนี้เป็นวงจรที่มีการทำลายเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงเรียกวงจรดังกล่าวนี้ว่า lytic infection cycle หรือ lytic cycle (รูปที่ 5) และเรียก bacteriophage ที่ทำให้เกิดวงจรนี้ว่า virulent phage ซึ่งได้แก่ bacteriophage T4 เป็นต้น



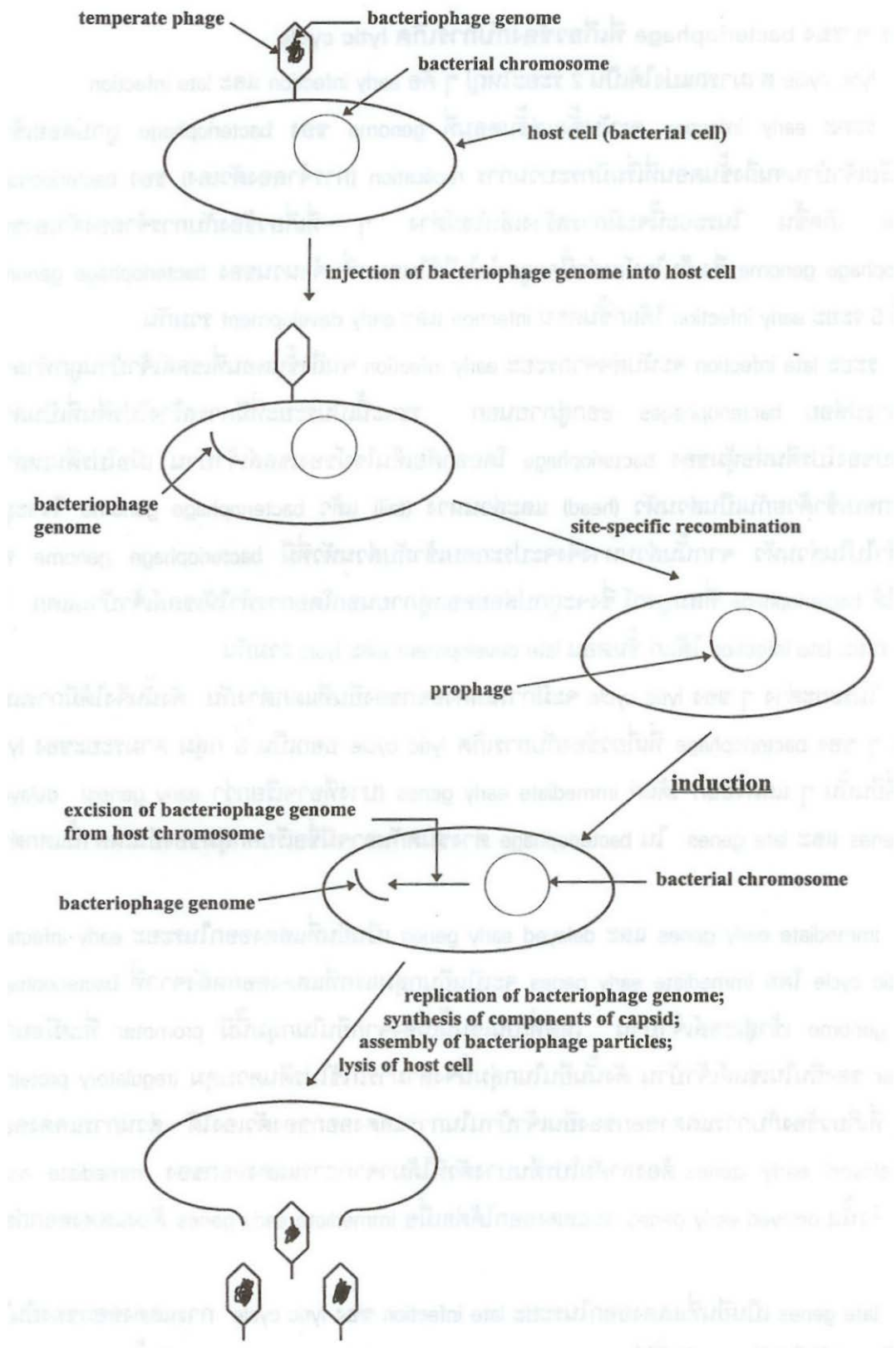
รูปที่ 5 lytic cycle ของ bacteriophage T4

การเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่สอง เริ่มต้นจากการที่ bacteriophage มาเกาะที่ผิวของเซลล์เจ้าบ้าน (โดยการจับกับ receptor ที่จำเพาะบนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน) และปล่อย genome เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน จากนั้น genome ของ bacteriophage จะแทรกเข้าไปอยู่ใน chromosome ของเซลล์เจ้าบ้าน (host chromosome) ตรงตำแหน่งที่จำเพาะ ทำให้ bacteriophage genome สามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อม ๆ กับการเพิ่มจำนวนของ host chromosome ได้ (รูปที่ 6) เรียก bacteriophage genome ที่แทรกเข้าไปอยู่ใน host chromosome ว่า prophage และ เรียกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์เจ้าบ้านในลักษณะนี้ว่า lysogeny prophage สามารถอยู่ใน lysogenic state ไปได้เรื่อย ๆ จนกว่าจะมีการกระตุ้น (induction) ด้วยสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ bacteriophage ที่อยู่ใน lysogenic state เปลี่ยนไปใช้วงจรชีวิตแบบ lytic cycle (รูปที่ 6) การเปลี่ยนจาก lysogeny ไปเป็น lytic cycle สามารถเกิดขึ้นได้โดยการที่ bacteriophage genome จะถูกตัดให้แยกออกจาก host chromosome จากนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage genome และ มีการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้ม (capsid) ซึ่งต่อมา bacteriophage genome และ โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้มจะมาประกอบกัน ทำให้มี bacteriophages จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง bacteriophages เหล่านี้จะหลุดออกสู่ภายนอกได้โดยการทำลายเซลล์เจ้าบ้าน เรียก bacteriophage ที่สามารถทำให้เกิดได้ทั้ง lysogeny และ lytic cycle ว่า temperate phage ซึ่งได้แก่ bacteriophage lambda (bacteriophage λ) เป็นต้น

ยีนต่าง ๆ ของ bacteriophage ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lytic cycle

lytic cycle สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะเวลาใหญ่ ๆ คือ early infection และ late infection

ระยะ early infection จะนับตั้งแต่ขั้นตอนที่ genome ของ bacteriophage ถูกปล่อยเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านจนถึงขั้นตอนที่เริ่มมีกระบวนการ replication (การจำลองตัวเอง) ของ bacteriophage genome เกิดขึ้น ในระยะนี้จะมีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการจำลองตัวเองของ bacteriophage genome ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage genome ในรูปที่ 7 ระยะ early infection ได้แก่ขั้นตอน infection และ early development รวมกัน



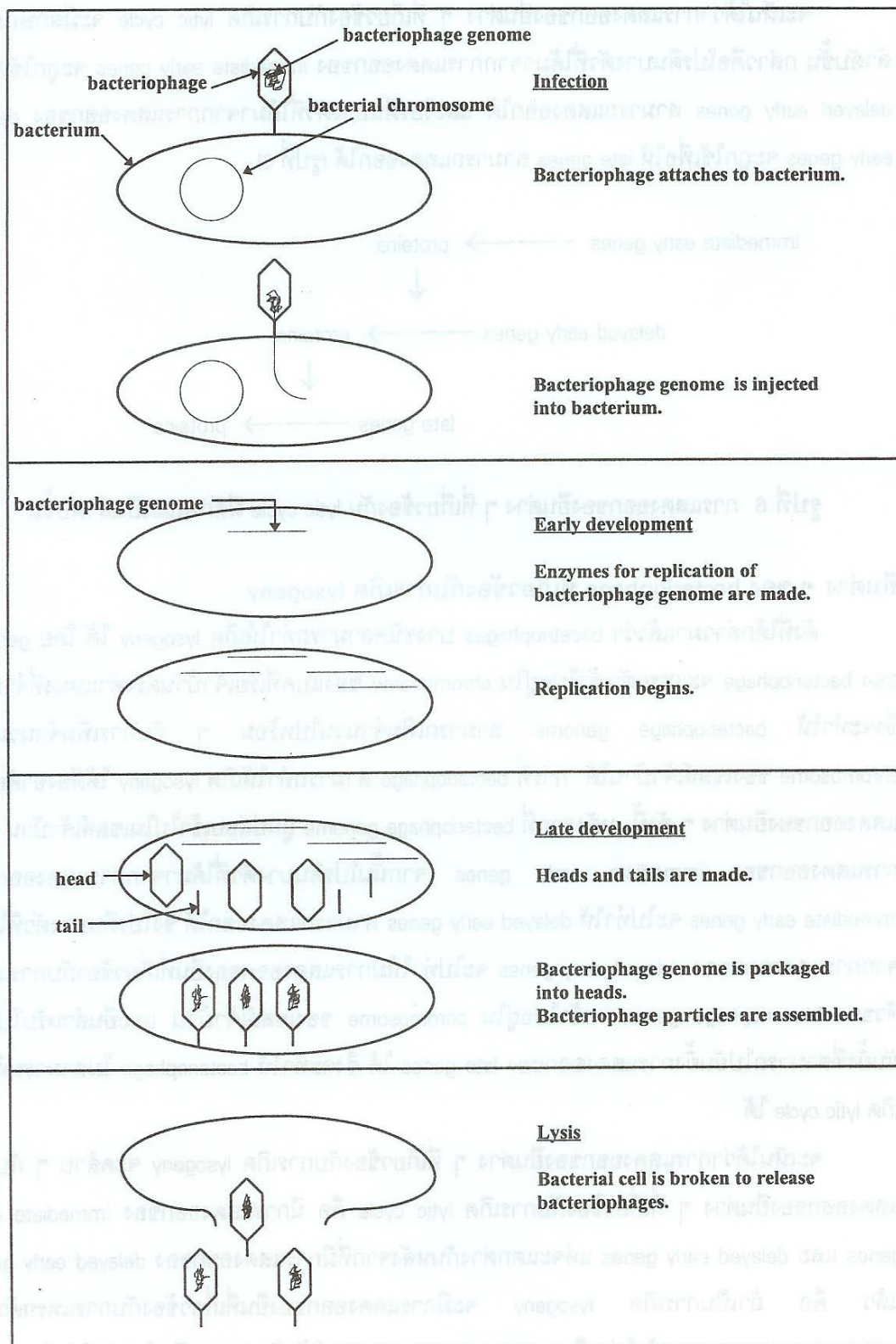
รูปที่ 6 bacteriophage lambda สามารถทำให้เกิดได้ทั้ง lysogeny และ lytic cycle

ระยะ late infection จะนับต่อจากระยะ early infection จนถึงขั้นตอนที่เซลล์เจ้าบ้านถูกทำลายและมีการปล่อย bacteriophages ออกสู่ภายนอก ระยะนี้เป็นระยะที่มีการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนห่อหุ้มของ bacteriophage โดยอาศัยเอนไซม์ของเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อโปรตีนเหล่านี้มาประกอบเข้าด้วยกันเป็นส่วนหัว (head) และส่วนหาง (tail) แล้ว bacteriophage genome ก็จะถูกรวบรวมเข้าไปในส่วนหัว จากนั้นส่วนหางก็จะประกอบเข้ากับส่วนหัวที่มี bacteriophage genome อยู่ เพื่อให้ได้ bacteriophage ที่สมบูรณ์ ซึ่งจะถูกละลายออกสู่ภายนอกโดยการทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก ในรูปที่ 7 ระยะ late infection ได้แก่ ขั้นตอน late development และ lysis รวมกัน

ในระยะต่าง ๆ ของ lytic cycle จะมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้มีการแบ่งยีนต่าง ๆ ของ bacteriophage ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lytic cycle ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระยะของ lytic cycle ที่ยีนนั้น ๆ แสดงออก ได้แก่ immediate early genes (บางที่อาจเรียกว่า early genes) delayed early genes และ late genes ใน bacteriophage ต่างชนิดกันอาจมีชื่อเรียกกลุ่มของยีนเหล่านี้แตกต่างกัน

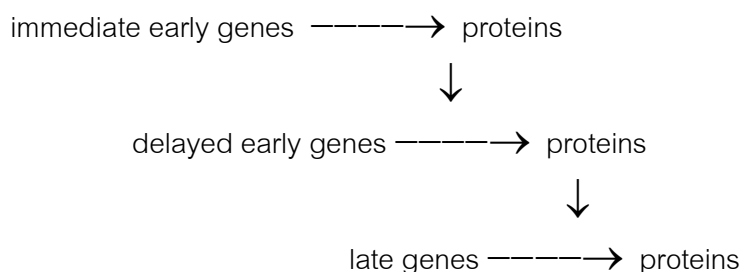
immediate early genes และ delayed early genes เป็นยีนที่แสดงออกในระยะ early infection ของ lytic cycle โดย immediate early genes จะเป็นยีนกลุ่มแรกที่แสดงออกหลังจากที่ bacteriophage ปล่อย genome เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากยีนในกลุ่มนี้มี promoter ที่เหมือนกับ promoter ของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นยีนในกลุ่มนี้จึงสามารถใช้โปรตีนควบคุม (regulatory proteins) ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนเจ้าบ้านในการแสดงออกของตัวเองได้ ส่วนการแสดงออกของ delayed early genes ต้องอาศัยโปรตีนบางตัวที่ได้มาจากการแสดงออกของ immediate early genes ดังนั้น delayed early genes จะแสดงออกได้ต่อเมื่อ immediate early genes ต้องแสดงออกก่อนเสมอ

late genes เป็นยีนที่แสดงออกในระยะ late infection ของ lytic cycle การแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้ต้องอาศัยโปรตีนบางตัวที่ได้มาจากการแสดงออกของ delayed early genes ดังนั้นการแสดงออกของ late genes จะเกิดขึ้นหลังจากที่ delayed early genes แสดงออกแล้วเสมอ



รูปที่ 7 ระยะ early infection และ late infection ของ lytic cycle

จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lytic cycle จะมีลักษณะเป็นลำดับขั้น กล่าวคือโปรตีนบางตัวที่ได้มาจากการแสดงออกของ immediate early genes จะถูกใช้เพื่อให้ delayed early genes สามารถแสดงออกได้ และโปรตีนบางตัวที่ได้มาจากการแสดงออกของ delayed early genes จะถูกใช้เพื่อให้ late genes สามารถแสดงออกได้ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lytic cycle มีลักษณะเป็นลำดับขั้น

ยีนต่าง ๆ ของ bacteriophage ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lysogeny

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า bacteriophages บางชนิดสามารถทำให้เกิด lysogeny ได้ โดย genome ของ bacteriophage จะแทรกตัวเข้าไปอยู่ใน chromosome ของแบคทีเรียเจ้าบ้านตรงตำแหน่งที่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้ bacteriophage genome สามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อม ๆ กับการเพิ่มจำนวนของ chromosome ของเซลล์เจ้าบ้านได้ การที่ bacteriophage สามารถทำให้เกิด lysogeny ได้ต้องอาศัยการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ดังนี้ หลังจาก que bacteriophage genome ถูกปล่อยเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน จะมีการแสดงออกของ immediate early genes จากนั้นโปรตีนบางตัวที่ได้มาจากการแสดงออกของ immediate early genes จะไปทำให้ delayed early genes สามารถแสดงออกได้ ซึ่งโปรตีนบางตัวที่ได้มาจากการแสดงออกของ delayed early genes จะไปทำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของ bacteriophage genome เข้าไปอยู่ใน chromosome ของเซลล์เจ้าบ้าน และยีนสำหรับโปรตีนยับยั้งที่สามารถไปยับยั้งการแสดงออกของ late genes ได้ ซึ่งจะทำให้ bacteriophage ไม่สามารถทำให้เกิด lytic cycle ได้

จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lysogeny จะคล้าย ๆ กับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด lytic cycle คือ มีการแสดงออกของ immediate early genes และ delayed early genes แต่จะแตกต่างกันหลังจากที่มีการแสดงออกของ delayed early genes แล้ว คือ ถ้าเป็นการเกิด lysogeny จะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของ bacteriophage genome เข้าไปอยู่ใน chromosome ของเซลล์เจ้าบ้าน และยีนสำหรับโปรตีนยับยั้งที่สามารถไปยับยั้งการแสดงออกของ late genes ได้ ในขณะที่ถ้าเป็นการเกิด lytic cycle จะมีการแสดงออกของ late genes

ประโยชน์ของ bacteriophages

เมื่อกล่าวถึง bacteriophages ผู้คนส่วนใหญ่มักคิดถึงแต่ข้อเสีย เช่น bacteriophage บางชนิดสามารถทำลายเชื้อตั้งต้นของการหมัก (starter culture) ซึ่งส่งผลทำให้การหมักเกิดความเสียหาย หรือ bacteriophage บางชนิดสามารถทำให้แบคทีเรียหลายชนิด เช่น *V. harveyi* (Austin และคณะ 2003) *V. cholerae* (Waldor และ Mekalanos 2003) และ *Corynebacterium diphtheriae* (Rajadhyaksha และ Roa 2003) มีความสามารถในการก่อโรคได้รุนแรงขึ้น แต่ในความเป็นจริงแล้วมีรายงานจำนวนมากที่กล่าวถึงประโยชน์ของ bacteriophages ซึ่งในที่นี้จะยกมากล่าวเป็นตัวอย่างเท่านั้น

ในกระบวนการสุก (ripening) ของ cheese หาก starter culture ที่ใช้ในการหมัก cheese สามารถแตกสลายเองได้ (autolysis) จะทำให้มีการปลดปล่อยเอนไซม์ peptidases ภายในเซลล์ของ starter culture (intracytoplasmic peptidases) ออกมา ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถช่วยเร่งกระบวนการสุกของ cheese ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานถึงการพบ bacteriophages บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิด autolysis ของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น Husson-Kao และคณะ (2000) ได้รายงานถึงความเกี่ยวข้องกันระหว่าง bacteriophage กับการเกิด autolysis ของ *Streptococcus thermophilus* และ O'Sullivan และคณะ (2000) ได้รายงานถึงความเกี่ยวข้องกันระหว่าง bacteriophage กับการเกิด autolysis ของ *Lactococcus lactis* เป็นต้น จากรายงานดังกล่าวทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำ bacteriophages มาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ของ starter culture โดยทำให้ starter culture สามารถเกิด autolysis ในช่วงเวลาที่ต้องการ

จากการที่ bacteriophages มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรีย จึงได้มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากมีความคิดที่จะนำ bacteriophages มาใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น จุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น ซึ่งจากการที่มีรายงานจำนวนมากสนับสนุนความคิดดังกล่าว ทำให้การนำ bacteriophages มาใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์มีความเป็นไปได้เป็นอย่างมาก จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการทดลองนำ bacteriophages ไปใช้ในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ทดลอง ตัวอย่างเช่น Biswas และคณะ (2002) สามารถใช้ bacteriophage ในการทำลาย *Enterococcus faecium* ที่ดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VRE) ซึ่งถูกนำไปทำให้เกิดโรค VRE-induced bacteremia ในหนูทดลอง และ Cervený และคณะ (2002) สามารถใช้ bacteriophage ในการทำลาย *Vibrio vulnificus* ซึ่งถูกนำไปทำให้เกิดโรค septicemia ในหนูทดลอง นอกจากการนำ bacteriophages ไปทำลายแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ทดลองแล้ว ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถของ

bacteriophages อีกหลายชนิดในการทำลายเชื้อก่อโรคต่าง ๆ เช่น *Bacillus anthracis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค anthrax (Schuch และคณะ 2002) *Streptococcus pyogenes* *Streptococcus pneumonia* และ group A streptococci ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่แยกได้จาก mucous membrane ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Loeffler และคณะ 2001, Fischetti 2003, Nelson และคณะ 2001, Loeffler และ Fischetti 2003) *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ในอาหาร (food-borne pathogen) (Zimmer และคณะ 2002) เป็นต้น นอกจากนี้การนำ bacteriophages ไปใช้ในการทำลายแบคทีเรียแล้ว ยังมีรายงานพบว่า bacteriophage บางชนิดสามารถทำลายไวรัสได้ เช่น bacteriophage phi29 pRNA ซึ่งสามารถทำลาย hepatitis B virus (Hoeprich และคณะ 2003) เป็นต้น

การนำ bacteriophages ไปใช้ประโยชน์เป็น intergration vector ก็เป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก และมีรายงานจำนวนมากที่แสดงถึงความเป็นไปได้ (Coffey และ Ross 2002)

นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้น ยังมีรายงานอีกเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำ bacteriophages ไปใช้ประโยชน์ ซึ่งคาดว่าในอนาคตอันใกล้คงมีการนำ bacteriophages มาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย

Bacteriophage therapy

การนำ bacteriophage มาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรค หรือที่เรียกว่า bacteriophage therapy (Alisky และคณะ 1998, Barrow และคณะ 1998, Barrow และ Soothill 1997) ได้เริ่มต้นขึ้นในช่วงทศวรรษที่ 1980 โดยมีการใช้ bacteriophage ในการรักษาโรคติดเชื้อ *Escherichiae coli* .ในหนูทดลอง และในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด (Smith และ Huggins 1982, Smith และ Huggins 1983, Smith และคณะ 1987a, Smith และคณะ 1987b) รวมทั้งมีการใช้ bacteriophage ในการรักษาโรคในคนที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Alisky และคณะ 1998, Slopek และคณะ 1987) หลังจากนั้นก็มีรายงานอีกเป็นจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการนำ bacteriophage ไปใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ (Barrow และคณะ 1998, Berchieri และคณะ 1991, Merril และคณะ 1996, Ramesh และคณะ 1999, Soothill 1994, Soothill 1992, Soothill 1988)

ปัจจัยที่ทำให้การใช้ bacteriophage ในการรักษาโรคเป็นที่สนใจ คือ ความสามารถของ bacteriophage ในการทำลายเชื้อก่อโรคอย่างจำเพาะ ดังนั้นหากนำ bacteriophage มาใช้ในการรักษาโรค bacteriophage ก็จะไปทำลายเฉพาะเชื้อก่อโรคเท่านั้น โดยที่ไม่ทำอันตรายต่อเชื้อ

แบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในร่างกายของคน และสัตว์ ทั้งยังไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ของคน และสัตว์อีกด้วย นอกจากนี้การดำรงชีพแบบต้องพึ่งพาเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของ bacteriophage ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ การใช้ bacteriophage ในการรักษาโรคเป็นที่สนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อมีการใช้ bacteriophage ในการรักษาโรค หลังจากที่ bacteriophage ทำลายเชื้อก่อโรคแล้ว bacteriophage ก็จะไม่สามารถดำรงชีพต่อไปได้ด้วย ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการมี bacteriophage ตกค้างในร่างกายคน และสัตว์ หลังจากที่ใช้ bacteriophage ในการรักษาโรค

bacteriophage หลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคของสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง และปลา อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น

การใช้ bacteriophage ที่อยู่ใน family Siphoviridae ซึ่งแยกได้จากปลาที่เป็นโรค และนำจากบ่อเลี้ยงปลา มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus garvieae* (หรือชื่อเดิมคือ *Enterococcus seriolicida*) ในปลา yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) (Kusuda และคณะ 1991, Nakai และคณะ 1999)

การใช้ bacteriophage ที่อยู่ใน family Myoviridae และ family Podoviridae ซึ่งแยกได้จากปลาที่เป็นโรค และนำจากบ่อเลี้ยงปลา ร่วมกันในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas plecoglossicida* ในปลา ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Nishimori และคณะ 2000, Park และคณะ 2000)

การใช้ bacteriophage ที่อยู่ใน family Siphoviridae ซึ่งแยกได้จากน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในตัวอ่อน (larvae) ของกุ้ง *Penaeus monodon* (Vinod และคณะ 2006)

การใช้ bacteriophage ที่อยู่ใน family Siphoviridae ซึ่งแยกได้จากหอยนางรม (oyster) และนำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในตัวอ่อน (larvae) ของกุ้ง *Penaeus monodon* (Karunasagar และคณะ 2007)

อุปกรณ์ และวิธีการ

แบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยง

ในการศึกษานี้ใช้ *Vibrio harveyi* CS101 เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจจากแหล่งน้ำธรรมชาติและจากบ่อเลี้ยงกุ้ง และใช้ในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟจ ตลอดจนใช้ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้ แบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งที่เป็นโรคเรืองแสง ในการศึกษานี้ทำการเลี้ยง *V. harveyi* CS101 ในอาหาร BHI broth หรือ BHI agar ที่เติม NaCl ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0% (w/v) (BHI-NaCl) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (bacteriophage host range) มีจำนวนทั้งสิ้น 33 สายพันธุ์ ชนิดของแบคทีเรีย และสถานะในการเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหมดได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

แบคทีเรียทุกชนิดถูกเก็บรักษาไว้ในอาหารเหลวที่เติม 20% glycerol (v/v) เมื่อต้องการนำแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้มากใช้ จึงนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) ก่อน แล้วจึงเลือกเพียงหนึ่งโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว จากนั้นจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมสารละลายแบคทีเรียโอเฟจ (Bacteriophage suspension)

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติหรือจากบ่อเลี้ยงกุ้ง รวม 5 แห่ง แห่งละประมาณ 1 ลิตร นำตัวอย่างดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการแยกแบคทีเรียโอเฟจ (bacteriophage isolation) ที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* CS101 โดยมีวิธีการคือ นำน้ำตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ผ่านการกรองมาผสมกับอาหาร BHI-NaCl broth ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า (double strength) และเติม *V. harveyi* CS101 ที่บ่มข้ามคืน (overnight culture) ลงไปปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า สารละลายแบคทีเรียโอเฟจ (bacteriophage suspension) ซึ่งถูกนำไปทดสอบว่ามีแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 ได้หรือไม่ (bacteriophage detection) โดยวิธี spot test

การตรวจหาแบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage detection)

การตรวจหาแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage detection) โดยวิธี spot test มีรายละเอียดดังนี้ นำเชื้อ *V. harveyi* CS101 ที่เลี้ยงในอาหาร BHI-NaCl broth และบ่มข้ามคืน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร BHI-NaCl soft agar (ความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.7%) ปริมาตร 3 มิลลิตร เททับให้ทั่วผิวน้ำอาหาร BHI-NaCl agar และรอให้อาหาร BHI-NaCl soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว หยด bacteriophage suspension ที่ต้องการตรวจสอบ ว่ามีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 หรือไม่ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน ผิวน้ำอาหาร BHI-NaCl soft agar นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนของกการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด bacteriophage suspension หรือไม่ ถ้ามีส่วนของกการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าวแสดงว่าใน bacteriophage suspension นั้นมีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 อยู่

การแยกแบคทีริโอเฟจ (Isolation of bacteriophage) และการเตรียม bacteriophage lysate

นำ bacteriophage suspension ที่ทดสอบแล้วว่า มีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 มาทำการแยกแบคทีริโอเฟจโดยวิธี plaque assay ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ทำการเจือจาง bacteriophage suspension แบบ ten-fold serial dilution ($1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$...) ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile deionized water) นำ bacteriophage suspension แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ *V. harveyi* CS101 ที่บ่มข้ามคืนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร BHI-NaCl soft agar (0.5% agar) ปริมาตร 4.5 มิลลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวเททับลงบนผิวน้ำอาหาร BHI-NaCl agar และรอให้อาหาร BHI-NaCl soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จะปรากฏ plaque ให้เห็นในจานเพาะเลี้ยง เลือกร plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ (single plaque) มา 1 plaque โดยใช้ปลาย pipette tip เขี่ย plaque ดังกล่าวมาจุ่มลงในอาหาร BHI-NaCl broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำ *V. harveyi* CS101 ที่บ่มข้ามคืนปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำมาผสมกับอาหาร BHI-NaCl soft agar ปริมาตร 4.5 มิลลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวเททับลงบนผิวน้ำอาหาร BHI-NaCl agar และรอให้อาหาร BHI-NaCl soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เลือกร plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ มา 1 plaque จุ่มลงในอาหาร BHI-NaCl broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำ *V. harveyi*

CS101 ที่บ่มข้ามคืนปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำมาผสมกับอาหาร BHI-NaCl soft agar ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวเททับลงบนผิวหน้าอาหาร BHI-NaCl agar และรอให้อาหาร BHI-NaCl soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เลือกรูป plaque เดียว และทำซ้ำเช่นนี้อีก 1 รอบ เพื่อให้แน่ใจว่า plaque เดียวที่เลือกมานั้นเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่บริสุทธิ์ (pure culture) จากนั้นนำ plaque เดียวที่ได้ในครั้งหลังสุด มาใส่ลงในอาหาร BHI-NaCl broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมน้ำ *V. harveyi* CS101 ที่บ่มข้ามคืนปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มาปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 ด้วย 3N NaOH แล้วกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่า bacteriophage lysate การเก็บรักษา bacteriophage lysate ทำได้โดยนำไปเติม chloroform (5% v/v) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเติม glycerol (20% v/v) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ (Bacteriophage titer)

การหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ โดยวิธี double-layer agar method มีวิธีการดังนี้ นำตัวอย่างที่ต้องการหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile deionized water) จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร BHI-NaCl soft agar ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ *V. harveyi* CS101 ที่บ่มข้ามคืนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร BHI-NaCl agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 50-300 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจในหน่วย plaque-forming unit/ml (pfu/ml) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ (pfu/ml)} = \text{จำนวน plaque} \times 10 \times \text{ระดับความเจือจาง}$$

ตัวอย่างการคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจในหน่วย pfu/ml เช่น ถ้าในการทดลองหาค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ นับจำนวน plaque ได้ 150 อัน ที่ระดับความเจือจาง $1:10^4$ แสดงว่าความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจมีค่าเท่ากับ $150 \times 10 \times 10^4 = 1.5 \times 10^7$ pfu/ml

การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (Bacteriophage host range)

การทดสอบความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นโดยวิธี spot test มีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่บ่มข้ามคืน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารกึ่งแข็ง (soft agar) ที่ใช้ในการเจริญของเชื้อชนิดนั้น ๆ ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง (agar) ชนิดเดียวกับ soft agar ที่ใช้ รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว หยด bacteriophage lysate ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 pfu/ml ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร soft agar นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนของสารขุ่น (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด bacteriophage lysate หรือไม่ ถ้ามีส่วนของสารขุ่นเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าแบคทีริโอเฟจที่ใช้ในการทดลองนั้นสามารถทำลายแบคทีเรียทดสอบได้ ในกรณีที่ปรากฏว่ามี clear zone เกิดขึ้น จะทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันอีกครั้งโดยวิธี plaque assay

การศึกษาการยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ (Bacteriophage adsorption assay)

การศึกษาการยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 ทำโดยนำ *V. harveyi* CS101 (10^8 cfu/ml) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติม bacteriophage lysate ให้มีค่า MOI (Multiplicity of infection) เท่ากับ 0.001 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ ซึ่งความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจที่ได้จะเป็นความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจที่ไม่ได้เกาะที่ผิวเซลล์ของ *V. harveyi* ATCC 14126 ซึ่งเรียกว่า residual titer

การทดลองนี้จะต้องทำการทดลองชุดควบคุม (control) ควบคู่ไปด้วย โดยในการทดลองชุดควบคุมจะทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวมา แต่ใช้ BHI-NaCl broth แทน *V. harveyi* ATCC 14126 ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจที่ได้จากการทดลองชุดควบคุมเรียกว่า control titer

การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์
(% adsorption of the bacteriophage) สามารถทำได้โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$[(\text{control titer} - \text{residual titer}) / \text{control titer}] \times 100$$

การศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage

การศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage ทำโดยนำ culture ที่อยู่ในระยะ log phase ของ *V. harveyi* CS101 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด มาเติมสารละลาย CaCl_2 โดยให้สารละลาย CaCl_2 มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 0, 1, 10 และ 20 mM จากนั้นทำการเติม phage lysate ลงไปใน culture ของ *V. harveyi* CS101 ดังกล่าวทั้ง 4 หลอด โดยให้ phage lysate มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^4 pfu/ml หลังจากนั้นนำหลอดทดลองทั้ง 4 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสแล้ว ทำการเก็บตัวอย่าง (ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร) จากหลอดทดลองทุกหลอด ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อนำมา ตรวจวัดความเข้มข้นของ bacteriophage

การศึกษาการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ

การศึกษาการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ สามารถทำได้โดย นำน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile deionized water) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้ จากนั้นเติม bacteriophage lysate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว (ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ หลังจากเติมลงไปในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วมีค่าประมาณ 10^6 pfu/ml) นำหลอด microcentrifuge tube ไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างไปทำให้เย็นลงทันทีโดยจุ่มลงในน้ำแข็ง แล้วนำไปหาค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (pfu/ml)

การศึกษาการทนต่อสารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีริโอเฟจ

สารเคมีหรือสารต้านจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมีดังนี้ Malachite green (0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), Formalin (30 ppm), Sodium hypochlorite (100 ppm), 50% Benzalkonium chloride (1 ppm), 10% Iodine (2 ppm), Ethanol (10%, 50%, 70%, absolute), Isopropanol (10%, 50%, 100%), Acetic acid (0.0001%) และ Hydrogen peroxide (0.0001%)

การศึกษาการทนต่อสารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีริโอเฟจ สามารถทำได้โดย นำ bacteriophage lysate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารเคมีหรือสารต้านจุลินทรีย์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจหลังจากผสมกับสารเคมีหรือสารต้านจุลินทรีย์แล้วมีค่าประมาณ 10^6 pfu/ml) นำส่วนผสมดังกล่าวไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหาค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (pfu/ml)

การทดลองนี้มีการทำการทดลองชุดควบคุม (control) ด้วย โดยในการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile deionized water) แทนการใช้สารเคมีหรือสารต้านจุลินทรีย์

การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีริโอเฟจ (% survival of the bacteriophage) ในสารเคมีหรือสารต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ใช้ สามารถคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$[\text{bacteriophage titer in chemical treatment} / \text{bacteriophage titer in control}] \times 100$$

การทำแบคทีริโอเฟจให้บริสุทธิ์ (Bacteriophage Purification)

การทำแบคทีริโอเฟจให้บริสุทธิ์ มีวิธีการดังนี้ เลี้ยง *V. harveyi* ATCC 14126 ในอาหาร BHI-NaCl ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อเจริญจนมีค่าความขุ่น (OD ที่ 600 นาโนเมตร) เท่ากับ 0.6 เติม bacteriophage lysate ลงไปให้ได้ค่า MOI (Multiplicity of infection) เท่ากับ 0.1 ปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 23,500 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอน (pellet) ใน bacteriophage buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในสารละลาย CsCl ที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน (CsCl gradient ที่มีความหนาแน่น 1.35, 1.53 และ 1.65 กรัม/มิลลิลิตร) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 35,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ใช้ syringe ดูดสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ออกมาจากสารละลาย CsCl แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี dialysis ใน bacteriophage buffer

การศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษารูปร่าง (morphology) ของแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) 1 หยด (ประมาณ 25 ไมโครลิตร) หยดลงบน grid ที่ฉาบด้วยคาร์บอน (carbon-coated grid) ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมแบบ negative ด้วย 0.5% (w/v) uranyl acetate (pH 4.0) ทิ้งไว้ 2 วินาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) การจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจอาศัยเกณฑ์ (criteria) ที่กำหนดโดย International Committee of Taxonomy of Viruses

การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE

การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ปริมาตร 24 ไมโครลิตร ผสมกับ 4X sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 400 mM 1, 4-dithiothreitol, 40% glycerol, 8% SDS, 20% β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปหยอดลงในช่อง (well) บนแผ่น polyacrylamide gel โดยหยอดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (standard protein marker) ลงในช่องข้าง ๆ ด้วย จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าคงที่ (ประมาณ 50mA) ผ่านแผ่น polyacrylamide gel เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมง นำแผ่น polyacrylamide gel ไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วย destaining solution (50% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid) จะเห็นแถบ (band) โปรตีนเป็นสีน้ำเงิน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจ สามารถคาดคะเนได้จากการเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

การศึกษา nucleic acid ของแบคทีริโอเฟจ

การสกัด nucleic acid (หรือ genome) ของแบคทีริโอเฟจ ทำโดยการใช้ชุดสกัด PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit ของ Invitrogen แล้วนำสารละลาย nucleic acid ของแบคทีริโอเฟจที่สกัดได้มาทดลองตัดด้วยเอนไซม์ RNase, S1 nuclease, *Pst*I และ *Bam*HI โดยสถานะที่ใช้ในการตัด nucleic acid ด้วยเอนไซม์เหล่านี้ได้ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำ nucleic acid ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวไปศึกษาด้วยวิธี agarose gel

electrophoresis ซึ่งมีวิธีการคือ นำ nucleic acid ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มาผสมกับ loading sample แล้วหยอดใส่ลงในช่อง (well) บนแผ่น agarose gel (ที่มีความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 0.8 %) บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis คือ Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer และความต่างศักย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 100 V การศึกษา nucleic acid ที่อยู่ในแผ่น agarose gel ทำโดยการนำแผ่น agarose gel ไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาศึกษาด้วยเครื่อง UV transilluminator

ผลการทดลอง

การตรวจหาแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 จากน้ำตัวอย่าง

ในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บน้ำตัวอย่างทั้งสิ้นจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ คลอง และบึงน้ำ เป็นต้น จำนวน 7 ตัวอย่าง และน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 5 ตัวอย่าง จากการนำสารที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างทั้งหมด (bacteriophage suspension) มาทำการตรวจหาแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 ได้ โดยวิธี spot test พบว่า bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง (PW2) ซึ่งเป็นน้ำตัวอย่างที่เก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* CS101 ได้ (ตารางที่ 5) โดยสังเกตจากการได้จากการมีส่วนใสของการยับยั้ง (inhibition zone) เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 เจริญอยู่ (รูปที่ 9) ในขณะที่ bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างที่เหลือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* CS101 ได้

จากการนำ bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2 มาทำ plaque assay โดยใช้ *V. harveyi* CS101 เป็นโฮสต์เซลล์ พบว่ามี plaque เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย plaque ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น plaque ใส มีขอบเขตที่ชัดเจน (รูปที่ 10) ผลการทดลองนี้เป็นที่ยืนยันว่าสิ่งที่อยู่ใน bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2 ที่ทำให้เกิด inhibition zone ในการทำ spot test คือแบคทีริโอเฟจ

เมื่อทราบว่า bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2 มีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 ได้ จึงได้นำ bacteriophage suspension ดังกล่าวมาเตรียมเป็น phage lysate และตั้งชื่อ bacteriophage ที่ตรวจพบว่า bacteriophage PW2

ตัวอย่างน้ำ	การเกิดinhibition zone
ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (NW)	
NW1	-
NW2	-
NW3	-
NW4	-
NW5	-
NW6	-
NW7	-
ตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง (PW)	
PW1	-
PW2	+
PW3	-
PW4	-
PW5	-

- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*

+ = สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*

ตารางที่ 5 ความสามารถของbacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างต่าง ๆ
ในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*



รูปที่ 9 inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* โดย bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2



รูปที่ 10 plaque ที่เกิดจากการนำ bacteriophage suspension ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่าง PW2 มาทำ plaque assay โดยใช้ *V. harveyi* CS101 เป็นโฮสต์เซลล์

การศึกษาความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

เมื่อนำ phage lysate ของ bacteriophage PW2 มาทำการทดสอบความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี spot test พบว่า phage lysate ของ bacteriophage PW2 สามารถทำลาย *Vibrio harveyi* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 6)

แบคทีเรีย	สภาวะของการเลี้ยง	Lysis ^a
<i>Vibrio harveyi</i> CSC101	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 15702	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 25919	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 33842	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 43515	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 700104	BHI-N agar and broth, 25°C	+/C
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 14582	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 14390	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio campbelli</i> ATCC 25920	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11558	BHI-N agar and broth, 37°C	-
<i>Vibrio fischeri</i> ATCC 14546	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio logei</i> ATCC 15382	BHI-N agar and broth, 18°C	-
<i>Vibrio marinovulgaris</i> ATCC 14394	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio natriegens</i> ATCC 14048	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio nereis</i> ATCC 25917	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	BHI-N agar and broth, 37°C	-

^a + = lysis; - = no lysis; C = clear plaque

BHI, brain Heart Infusion; BHI-N, Brain Heart Infusion supplemented with 1% NaCl;

MRS, de Man Rogosa and Sharpe

ตารางที่ 6 ความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

แบคทีเรีย	สภาวะของการเลี้ยง	Lysis ^a
<i>Vibrio salmonicida</i> ATCC 43839	BHI-N agar and broth, 15°C	-
<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 25914	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19105	BHI-N agar and broth, 25°C	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	BHI agar and broth, 25°C	-
<i>Campylobacter fetus</i> ATCC 19438	BHI agar and broth, 37°C	-
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700819	BHI agar and broth, 37°C	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15922	Nutrient agar and broth, 37°C	-
<i>Lactococcus garvieae</i> ATCC 49156	MRS agar and broth, 37°C	-
<i>Listonella anguillarum</i> ATCC 43310	Marine agar and broth, 20°C	-
<i>Moritella marina</i> ATCC 15381	Marine agar and broth, 18°C	-
<i>Photobacterium damsela</i> ATCC 33538	Marine agar and broth, 26°C	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 27968	Nutrient agar and broth, 37°C	-
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> ATCC 33660	BHI agar and broth, 20°C	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 6972	Nutrient agar and broth, 37°C	-
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 33059	Nutrient agar and broth, 37°C	-
<i>Streptococcus iniae</i> ATCC 29177	MRS agar and broth, 37°C	-
<i>Streptococcus phocae</i> ATCC 51973	MRS agar and broth, 37°C	-

^a + = lysis; - = no lysis; C = clear plaque

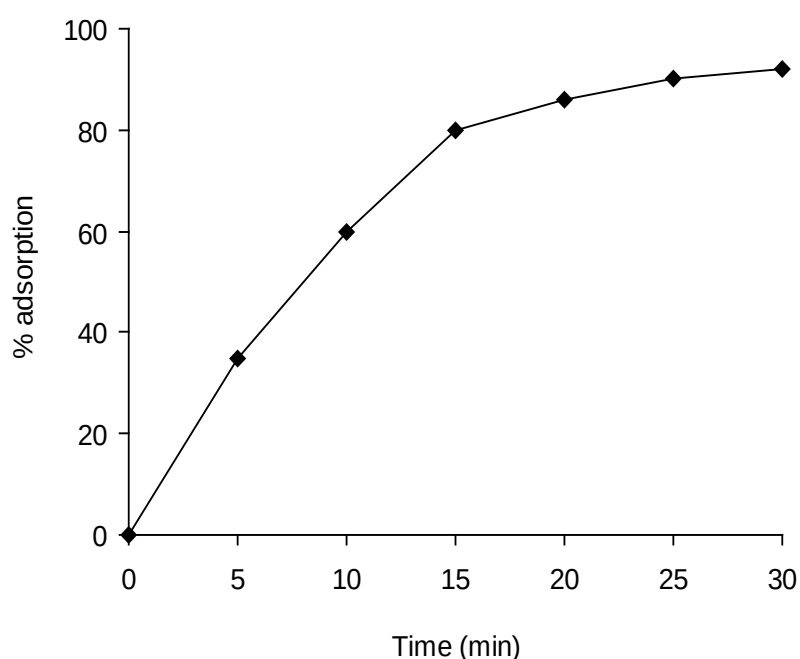
BHI, brain Heart Infusion; BHI-N, Brain Heart Infusion supplemented with 1% NaCl;

MRS, de Man Rogosa and Sharpe

ตารางที่ 6 ความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ (ต่อ)

การศึกษาการยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101

จากการนำ bacteriophage PW2 มาทำการศึกษการยึดเกาะของ bacteriophage ดังกล่าวบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 พบว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ (% adsorption) ของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในช่วง 15 นาทีแรกของการทดลอง ค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเพิ่มขึ้นในอัตราที่เร็วมาก (จาก 0% ในตอนเริ่มต้นการทดลองไปเป็น 80% ในนาทีที่ 15 ของการทดลอง) หลังจากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าลง (จาก 80% ในนาทีที่ 15 ของการทดลองไปเป็นประมาณ 90% ในนาทีที่ 30 ของการทดลอง) (รูปที่ 11, ตารางที่ 7)



รูปที่ 11 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (นาทิตี่)	% Adsorption
0	0
5	35
10	60
15	80
20	86
25	89
30	90

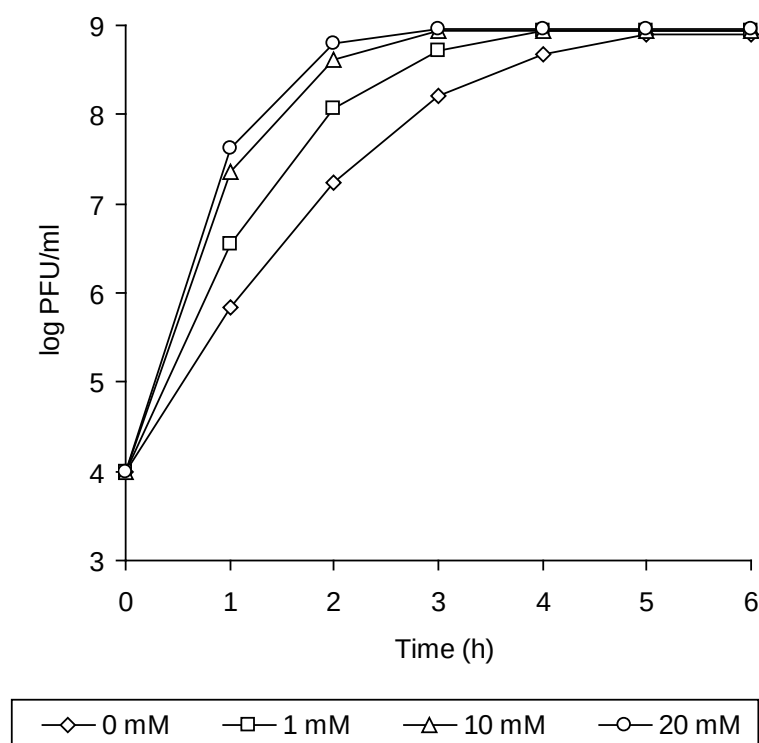
ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101

การศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage PW2

จากการศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage PW2 โดยนำ bacteriophage PW2 (ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 PFU/ml) มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0 mM, 1 mM, 10 mM และ 20 mM พบว่าในสภาวะที่ไม่มีสารละลาย CaCl_2 ใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนสูงสุด ส่วนในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 1 mM bacteriophage PW2 ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนสูงสุด ในขณะที่ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 10 mM และ 20 mM bacteriophage PW2 ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนสูงสุด (รูปที่ 12, ตารางที่ 8) แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองเห็นได้ว่าไม่ว่าในสภาวะที่ไม่มีสารละลาย CaCl_2 หรือในสภาวะที่มีสารละลายดังกล่าวความเข้มข้น 1 mM, 10 mM และ 20 mM จำนวน bacteriophage PW2 สูงสุดที่ตรวจวัดได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก คือมีค่าในช่วงประมาณ 8.12×10^8 pfu/ml ถึง 8.91×10^8 PFU/ml

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวน phage ที่ตรวจวัดได้ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้นต่าง ๆ (PFU/ml)			
	0 mM	1 mM	10 mM	20 mM
0	1.00×10^4	1.00×10^4	1.00×10^4	1.00×10^4
1	6.76×10^5	3.47×10^6	2.24×10^7	4.27×10^7
2	1.74×10^7	1.15×10^8	4.07×10^8	6.35×10^8
3	1.62×10^8	5.25×10^8	8.69×10^8	8.91×10^8
4	4.68×10^8	8.51×10^8	8.69×10^8	8.91×10^8
5	8.12×10^8	8.51×10^8	8.69×10^8	8.91×10^8
6	8.12×10^8	8.51×10^8	8.69×10^8	8.91×10^8

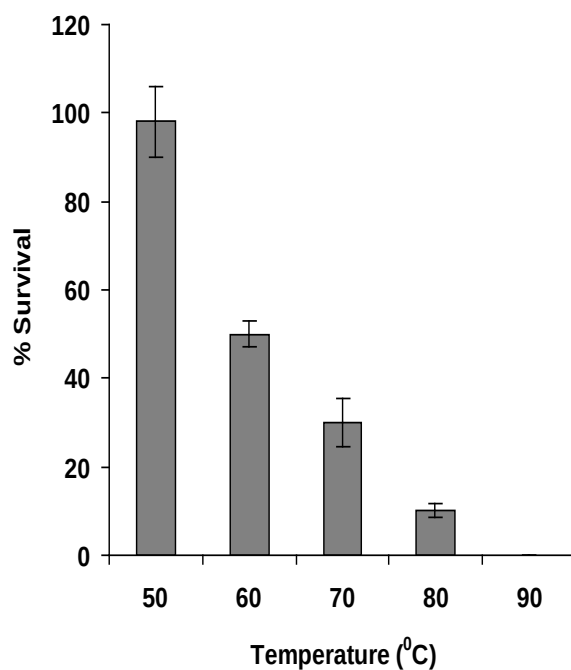
ตารางที่ 8 จำนวน phage ที่ตรวจวัดได้ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 12 จำนวน phage ที่ตรวจวัดได้ในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษาการทนความร้อนของ bacteriophage PW2

จากการศึกษาการทนความร้อนของ bacteriophage PW2 โดยการนำ bacteriophage ดังกล่าว (ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 PFU/ml) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเมื่อนำ bacteriophage PW2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จำนวนของแบคทีริโอเฟจแทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 12, ตารางที่ 9) ในขณะที่เมื่อนำ bacteriophage PW2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 จำนวนของแบคทีริโอเฟจจะลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 13, ตารางที่ 9) และเมื่อนำ bacteriophage PW2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจวัดจำนวนของแบคทีริโอเฟจได้ (รูปที่ 12, ตารางที่ 9)



รูปที่ 13 อัตราการรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 เมื่อบ่ม bacteriophage PW2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิ	การรอดชีวิตของแบคทีริโอเฟจ (%)
50°C	98 ± 7.9
60°C	49 ± 2.8
70°C	32 ± 5.5
80°C	11 ± 1.6
90°C	0

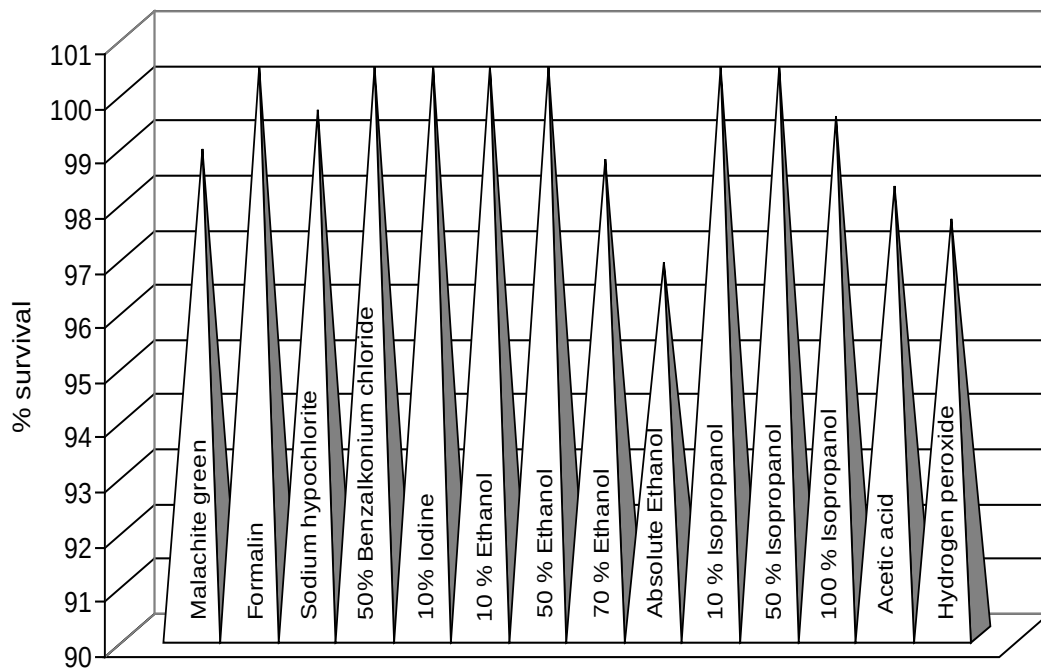
ตารางที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 เมื่อต้ม bacteriophage PW2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที

การศึกษาการทนต่อสารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์ของ bacteriophage PW2

จากการนำ bacteriophage PW2 มาศึกษาการทนต่อสารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ Malachite green, Formalin, Sodium hypochlorite, 50% Benzalkonium chloride, 10% Iodine, Ethanol (10%, 50%, 70%, absolute), Isopropanol (10%, 50%, 100%), Acetic acid และ Hydrogen peroxide พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 ในสารต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นมีค่าค่อนข้างสูง โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 96.4% ถึง 100% (รูปที่ 14, ตารางที่ 10)

สารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์	% survival
Malachite green	98.5
Formalin	100
Sodium hypochlorite	99.2
50% Benzalkonium chloride	100
10% Iodine	100
10 % Ethanol	100
50 % Ethanol	100
70 % Ethanol	98.2
Absolute Ethanol	96.4
10 % Isopropanol	100
50 % Isopropanol	100
100 % Isopropanol	99.1
Acetic acid	97.8
Hydrogen peroxide	97.2

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 ในสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 14 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 ในสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

การศึกษา bacteriophage PW2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

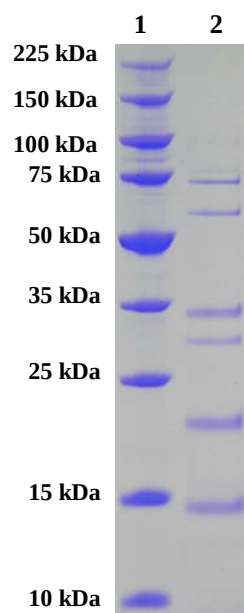
จากการนำ bacteriophage PW2 ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) พบว่า bacteriophage PW2 มีลักษณะดังนี้ ส่วนหัว (head) เป็นรูป icosahedral ในขณะที่ส่วนหาง (tail) มีลักษณะเป็นแบบ noncontractile tail (รูปที่ 15) จากการหาค่าเฉลี่ยของขนาดของส่วนหัว และส่วนหางของ bacteriophage PW2 (จำนวน 5 particles) พบว่าส่วนหัวของ bacteriophage ดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) เฉลี่ยประมาณ 50 ± 3.8 นาโนเมตร ในขณะที่ส่วนหางมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 11 ± 0.5 นาโนเมตร และมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 136 ± 6.2 นาโนเมตร



รูปที่ 15 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ bacteriophage PW2 (Bar = 100 นาโนเมตร)

การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage PW2 โดยวิธี SDS-PAGE

จากการศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage PW2 โดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีน (protein band) บนแผ่น polyacrylamide gel จำนวน 6 แถบ ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75, 60, 35, 30, 20 และ 15 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 16)



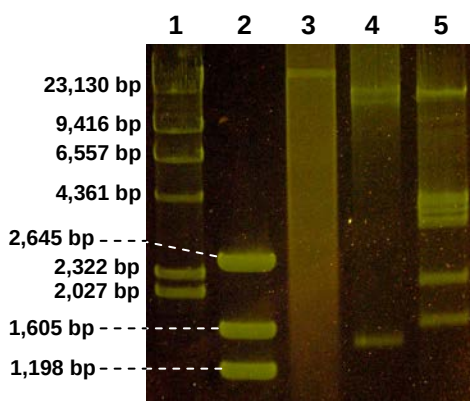
รูปที่ 16 SDS-PAGE ของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage NLP8

Lane 1 = Broad range protein molecular weight markers

Lane 2 = โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage NLP8

การศึกษา nucleic acid ของ bacteriophage PW2

เมื่อทำการสกัดเอา nucleic acid จาก bacteriophage PW2 และนำ nucleic acid ดังกล่าวไปตัดด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด คือ RNase (หรือ ribonuclease), S1 nuclease, *Pst*I และ *Bam*HI ผลปรากฏว่า nucleic acid ของ PW2 สามารถถูกย่อยสลายได้โดย *Pst*I และ *Bam*HI แต่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดย RNase และ S1 nuclease โดยสังเกตได้จากผลของการวิเคราะห์ nucleic acid โดยวิธี agarose gel electrophoresis เมื่อนำเอาขนาดของชิ้นส่วนของ nucleic acid ที่ได้จากการตัดด้วย *Pst*I หรือ *Bam*HI มารวมกัน พบว่า nucleic acid ของ bacteriophage PW2 มีขนาดประมาณ 46 kb (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 แถบ (band) ของ nucleic acid ของ bacteriophage PW2 ที่ปรากฏบนแผ่น agarose gel

Lane 1 = lambda DNA cut with *Hind*III

Lane 2 = pGEM DNA marker

Lane 3 = uncut nucleic acid of bacteriophage PW2

Lane 4 = nucleic acid of bacteriophage PW2 cut with *Pst*I

Lane 5 = nucleic acid of bacteriophage PW2 cut with *Bam*HI

วิจารณ์ผลการทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์ทะเล ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งชุมพรถึงนครศรีธรรมราช ส่วนทางฝั่งทะเลอันดามันจะพบมากที่สุดและระนอง กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำที่สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี อดทนและโตเร็ว ความนิยมในการบริโภคกุ้งกุลาดำของทั้งคนในประเทศไทย และต่างประเทศทำให้อุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างมาก จนประเทศไทยกลายเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำ และผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องไปยังตลาดโลก โดยสามารถสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศได้ปีละกว่า 100,000 ล้านบาท อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำไม่ว่าจะในประเทศไทย หรือในต่างประเทศมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคที่เกิดขึ้นกับกุ้งกุลาดำ การระบาดของโรคกุ้งกุลาดำแต่ละครั้งนอกจากจะก่อให้เกิดความสูญเสียต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งแล้ว ยังก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้ของประเทศอีกด้วย ดังนั้นปัญหาเกี่ยวกับโรคของกุ้งกุลาดำจึงถือว่าเป็นปัญหาระดับชาติที่หลาย ๆ ฝ่ายพยายามช่วยกันป้องกัน และแก้ไข

โรคของกุ้งกุลาดำที่ทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงในเชิงธุรกิจมักเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย ซึ่งโรคหนึ่งในบรรดาโรคดังกล่าวที่มักพบได้ในประเทศไทย และก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมาก คือ โรคเรืองแสง (luminous vibriosis) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้อาการดังนี้ กุ้งลอยอยู่ที่ขอบบ่อ ไม่กินอาหาร ตัวหวม สีลำตัวขุ่น สีเหงือกมีสีดำ ตับอักเสบ ตับอ่อนมีสีซีดลง และจะมีการเรืองแสงเกิดขึ้นในเวลากลางคืน หากกุ้งกุลาดำติดเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงในการก่อโรค (highly virulent strain) สามารถทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 100 % เมื่อในบ่อมีเชื้อเพียง 10^2 cfu/ml (Lavilla-Pitogo และคณะ 1992) วิธีที่นิยมใช้ในการป้องกัน และการรักษาโรคนี้ คือ การใช้ยาปฏิชีวนะ และฆ่าเชื้อในน้ำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือเบนซัลโคนีอุมคลอไรด์ (Benzalkonium chloride)

Vibrio harveyi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคเรืองแสง (luminous vibriosis) ในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง (Karunasagar และคณะ 1994, Pizzuto และ Hirst 1995, Alvarez และคณะ 1998) และปลา (Kraxberger-Beatty และคณะ 1990, Ishimaru และ Muroga 1997) ได้ ความสามารถในการก่อโรคของ *V. harveyi* เกี่ยวข้องกับยีน hemolysin (Zhang และคณะ 2001) โดยปกติแล้ว *Vibrio harveyi* สามารถเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองได้ โดยการเรืองแสงดังกล่าวเกิดจากปฏิกิริยาที่ต้องอาศัยเอนไซม์ luciferase โดยเอนไซม์ luciferase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ของ luciferin การแยกความแตกต่างระหว่าง *V. harveyi* ออกจาก *Vibrio*

species อื่น ๆ สามารถทำได้โดยการเลี้ยงในอาหาร *V. harveyi* agar (VHA) (Harris และคณะ 1996) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของเชื้อ (differential media) ชนิดหนึ่ง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในการเลี้ยง *V. harveyi* จะทำให้ได้โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะแตกต่างไปจากโคโลนีของ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ กล่าวคือ โคโลนีของ *V. harveyi* จะเป็นโคโลนีที่มีสีเขียว กลางโคโลนีมีสีเขียวเข้ม รอบโคโลนีมีสีเหลือง (yellow halo) (Harris และคณะ 1996)

การใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดกับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคทั่วไป เช่น ไก่ เป็ด วัว และปลา รวมทั้งโรคที่เกิดกับกุ้งกุลาดำ มักก่อให้เกิดปัญหาหลายประการ เช่น

การใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในกระบวนการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคอาจก่อให้เกิดการตกค้างของสารต่าง ๆ ดังกล่าวในสัตว์ และส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

การใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในฟาร์ม หรือในบ่อเลี้ยงสัตว์อาจทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารดังกล่าวทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการชะของฝน หรือการปล่อยน้ำจากบ่อเลี้ยงสัตว์ออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ สารเคมี และยาปฏิชีวนะดังกล่าวที่หลุดออกสู่สิ่งแวดล้อมอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในวงกว้างได้

การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคมักก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรค ซึ่งส่งผลให้การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อก่อโรสดังกล่าวเป็นไปได้ยากขึ้น เช่นอาจต้องใช้ยาในปริมาณที่มากขึ้น หรือต้องหายาชนิดใหม่ ๆ มาใช้ในการรักษาโรคตลอดเวลา

จากปัญหาดังกล่าวของการใช้การใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดกับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคจึงทำให้ในบางประเทศมีกฎหมายควบคุม หรือสั่งห้ามการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ชนิด นอกจากนี้ในหลายประเทศยังได้มีการสนับสนุน และกระตุ้นให้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาสารที่ปลอดภัยมาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดกับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคแทนการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะ ซึ่งสารดังกล่าวต้องมีคุณสมบัติหลัก คือ เป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ สามารถทำลายเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และอย่างจำเพาะ และไม่ตกค้างในสัตว์ หรือสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังของนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากทำให้พบว่าแบคทีเรียโอเฟจมีศักยภาพที่จะนำมาใช้แทนสารเคมี และยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียโอเฟจ คือ ไวรัสที่ใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ แบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสที่ต้องเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจโดยทั่วไปประกอบด้วย genome ที่มี capsid หรือ protein coat ห่อหุ้มอยู่ โดยแบคทีเรียโอเฟจบางชนิดอาจมี envelope ซึ่งมีไขมัน (lipid) เป็นส่วนประกอบห่อหุ้ม capsid อีกชั้นหนึ่ง

genome ของแบคทีริโอเฟจอาจเป็น single-stranded DNA (ssDNA) double-stranded DNA (dsDNA) single-stranded RNA (ssRNA) หรือ double-stranded RNA (dsDNA) ก็ได้ นอกจากนี้ genome ของ bacteriophages ยังอาจมีรูปร่างเป็น circular หรือ linear ก็ได้ (Ackermann 2003)

การนำแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรค หรือที่เรียกว่า bacteriophage therapy (Alisky และคณะ 1998, Barrow และคณะ 1998, Barrow และ Soothill 1997) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้แทนการป้องกัน และรักษาโรคในสัตว์เลี้ยง เพื่อการบริโภคโดยการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในอนาคต ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยดังต่อไปนี้ แบคทีริโอเฟจมีความสามารถในการทำลายเชื้อก่อโรคได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นหากนำแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรค แบคทีริโอเฟจก็จะไปทำลายเฉพาะเชื้อก่อโรคเท่านั้น โดยที่ไม่ทำอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในร่างกายของคน และสัตว์ ทั้งยังไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ของคน และสัตว์อีกด้วย นอกจากนี้การดำรงชีพแบบต้องพึ่งพาเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของแบคทีริโอเฟจก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ การใช้แบคทีริโอเฟจในการรักษาโรค เป็นที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อมีการใช้แบคทีริโอเฟจในการรักษาโรค หลังจากที่แบคทีริโอเฟจ ทำลายเชื้อก่อโรคแล้วแบคทีริโอเฟจก็จะไม่สามารถดำรงชีพต่อไปได้ด้วย ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการมี แบคทีริโอเฟจตกค้างในร่างกายคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม หลังจากที่มีการใช้แบคทีริโอเฟจในการรักษาโรค

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาแบคทีริโอเฟจที่มีความสามารถในการทำลาย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ โดยทำการตรวจหาแบคทีริโอเฟจดังกล่าวในน้ำที่ได้มาจากจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ รวมถึงน้ำที่ได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติต่าง ๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคุณสมบัติหลาย ๆ ประการของแบคทีริโอเฟจที่ตรวจหาได้ โดยมีความมุ่งหวังว่าแบคทีริโอเฟจที่ตรวจหาได้จากการศึกษานี้จะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคเรืองแสงที่เกิดขึ้นกับกุ้งกุลาดำต่อไป

จากการนำน้ำตัวอย่างจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยเป็นน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 7 ตัวอย่าง และน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำนวน 5 ตัวอย่างมาทำการตรวจหาแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่าน้ำตัวอย่างที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีรหัสว่า PW2 มีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 ได้ ดังนั้นจึงได้เรียกว่าแบคทีริโอเฟจที่ตรวจหาได้ว่า bacteriophage PW2 และจากการนำ bacteriophage PW2 ไปศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่าแบคทีริโอเฟจดังกล่าวสามารถทำลาย *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่สามารถทำลาย

แบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ การที่ bacteriophage PW2 สามารถทำลายเชื้อ *V. harveyi* ได้หลายสายพันธุ์ ทำให้แบคทีเรียโอเฟดดังกล่าวมีความน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* ทั้งนี้เนื่องจากในสภาพความเป็นจริง *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมีสายพันธุ์ที่หลากหลายมาก ดังนั้นการนำแบคทีเรียโอเฟดที่มีความสามารถในการทำลาย *V. harveyi* ได้หลากหลายสายพันธุ์มาใช้ในการการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* จึงน่าจะดีกว่าการนำแบคทีเรียโอเฟดที่มีความสามารถในการทำลาย *V. harveyi* ได้เพียงสายพันธุ์เดียวมาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* งานวิจัยที่สนับสนุนข้อความดังกล่าวเป็นงานวิจัยของ Vinod และคณะ (2006) ซึ่งได้เลือกนำแบคทีเรียโอเฟดที่มีความสามารถในการทำลาย *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาใช้ทดสอบ (50 สายพันธุ์) มาทดลองใช้ในการรักษาโรคในกุ้งกุลาดำ และพบว่าแบคทีเรียโอเฟดดังกล่าวสามารถรักษาโรคในกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึงแม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบแบคทีเรียโอเฟดที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (Karunasagar I และคณะ 2007, Vinod และคณะ 2006) แต่งานวิจัยในลักษณะดังกล่าวก็ยังเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์จำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟดที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำที่ค้นพบแล้วอาจไม่สามารถนำมาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

การยึดเกาะบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียโอเฟด ถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ขั้นตอนหนึ่งของการบุกรุกเซลล์ของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียโอเฟด แต่งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาแบคทีเรียโอเฟดที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ที่ผ่านมายังไม่เคยมีการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟดในการยึดเกาะบนผิวของเซลล์ *V. harveyi* เลย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษการยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 ซึ่งพบว่าประมาณ 90% ของ bacteriophage PW2 สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 ได้ภายในเวลา 30 นาที ผลที่ได้นี้ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการศึกษการยึดเกาะของ bacteriophage Φ JL-1 บนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* MU45 ซึ่งพบว่า ประมาณ 98% ของ bacteriophage Φ JL-1 สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของ *L. plantarum* MU45 ได้ภายในเวลา 30 นาที (Lu และคณะ 2003)

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า divalent cation เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+} เป็นต้นมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage (Lu และคณะ 2003, Watanabe และคณะ 1970, Seto และคณะ 1964, , Rountree 1955, Luria และ Steiner

1954, Perlman และคณะ 1951, Collins และคณะ 1950) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage PW2 ซึ่งจากการทดลองพบว่าในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 20 mM bacteriophage PW2 สามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าในสภาวะที่ไม่มีสารละลาย CaCl_2 หรือมีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 1 mM และ 10 mM อย่างไรก็ตามเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจประกอบด้วยหลายขั้นตอน เช่น ขั้นตอนที่แบคทีริโอเฟจไปเกาะที่ผิวของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจภายในเซลล์เจ้าบ้าน และขั้นตอนการทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตกสลาย (cell lysis) เป็นต้น และจากการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารละลาย CaCl_2 มีความสำคัญต่อขั้นตอนใดของการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage PW2 ดังนั้นการทดลองเพื่อศึกษาความสำคัญของสารละลาย CaCl_2 ต่อขั้นตอนต่าง ๆ ของการเพิ่มจำนวนของ bacteriophage PW2 จึงเป็นประเด็นที่น่าทำการศึกษาต่อไป

ด้วยเหตุที่แบคทีริโอเฟจแต่ละชนิด มีความสามารถในการทนความร้อนได้แตกต่างกัน เช่น bacteriophage PL-1 สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Watanabe และคณะ 1970) ในขณะที่ bacteriophage Φ JL-1 สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส (Lu และคณะ 2003) ดังนั้นการมีข้อมูลเกี่ยวกับการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจจึงมีความสำคัญต่อการนำแบคทีริโอเฟจไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ เพราะถ้าหากทราบว่าแบคทีริโอเฟจที่จะนำไปใช้ประโยชน์สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิเท่าใด ก็จะได้หลีกเลี่ยงไม่ให้แบคทีริโอเฟจดังกล่าวต้องอยู่ในสภาวะที่อาจถูกทำลายได้ จากการศึกษาการทนความร้อนของ bacteriophage PW2 พบว่าแบคทีริโอเฟจดังกล่าวสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

การนำแบคทีริโอเฟจไปพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคในกุ้งกุลาดำจำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทนต่อสารเคมี และยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคในกุ้งกุลาดำ ทั้งนี้เนื่องจากในบ่อเลี้ยงกุ้งที่จะนำแบคทีริโอเฟจไปใช้อาจมีสารเคมี หรือยาปฏิชีวนะดังกล่าวตกค้างอยู่ นอกจากนี้การมีข้อมูลดังกล่าวอาจช่วยให้สามารถออกแบบการใช้แบคทีริโอเฟจในการป้องกัน และรักษาโรคในกุ้งกุลาดำให้มีประสิทธิภาพขึ้น โดยการนำไปใช้ร่วมกับสารเคมี หรือยาปฏิชีวนะดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทนต่อสารเคมี และยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ชนิดที่นิยมใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคในกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้แก่ Malachite green, Formalin, Sodium hypochlorite, 50% Benzalkonium chloride, 10% Iodine, Ethanol (10%, 50%, 70%, absolute), Isopropanol (10%, 50%, 100%), Acetic acid และ Hydrogen

peroxide และจากการทดลองพบว่าความสามารถในการทนต่อสารเคมี และยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ทดสอบของ bacteriophage PW2 ในเกณฑ์ที่สูง โดย absolute ethanol เป็นสารที่มีความสามารถในการทำลาย bacteriophage PW2 ได้ดีที่สุด แต่ถึงกระนั้นอัตราการรอดชีวิตของ bacteriophage PW2 ในสารละลาย absolute ethanol ก็ยังมีค่าสูงถึง 96.4%

จากการศึกษารูปร่างลักษณะของ bacteriophage PW2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รวมทั้งการศึกษาโปรตีน และ nucleic acid ที่เป็นส่วนประกอบของแคปซิดหรือเฝือกดังกล่าว พบว่า bacteriophage ดังกล่าวน่าจะจัดเป็น tailed phage ใน family Siphoviridae ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลัก (major protein) อย่างน้อย 6 ชนิด และมี genome เป็น DNA สายคู่ (double stranded DNA) ทั้งนี้เนื่องจาก nucleic acid ที่สกัดได้จาก bacteriophage PW2 สามารถถูกทำลายได้โดย *Pst*I และ *Bam*HI ซึ่งเป็น restriction enzymes (เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย double stranded DNA ได้) แต่ไม่สามารถถูกทำลายได้โดย RNase (เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย RNA ได้) และ S1 nuclease (เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายได้เฉพาะ single stranded DNA) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังสามารถคาดคะเนขนาดของ bacteriophage PW2 ได้ว่ามีขนาดประมาณ 46 kb แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า genome ของ bacteriophage PW2 มีรูปร่างเป็นวงกลม (circular) หรือมีรูปร่างเป็นเส้นตรง (linear) จากรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับแคปซิดหรือเฝือกที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ได้พบว่าแคปซิดหรือเฝือกดังกล่าวทุกชนิดเป็นแคปซิดหรือเฝือก ใน family Siphoviridae และมี genome เป็น DNA สายคู่ (double stranded DNA) (Karunasagar I และคณะ 2007, Vinod และคณะ 2006)

สรุปผลการทดลอง

Bacteriophage PW2 เป็น bacteriophage ที่แยกได้จากน้ำต้วอย่างที่เก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และมีความสามารถในการทำลาย *Vibrio harveyi* ได้อย่างจำเพาะ ประมาณ 90% ของ bacteriophage PW2 สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 หลังจากที่มีการเติม bacteriophage ดังกล่าวลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่มี *V. harveyi* CS101 เป็นเวลา 30 นาที bacteriophage PW2 สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสามารถทนต่อสารเคมี และยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่นำมาใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนในสภาวะที่มีสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 20 mM ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีสารละลาย CaCl_2 หรือมีสารละลายดังกล่าวความเข้มข้น 1 mM และ 10 mM จากการศึกษารูปร่าง ชนิดของ nucleic acid และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage PW2 พบว่า bacteriophage PW2 เป็น double stranded DNA virus ใน family *Siphoviridae* และประกอบด้วยโปรตีนหลักอย่างน้อย 6 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. ยาหรือเคมีภัณฑ์ที่ควรใช้ในการเลี้ยงกุ้ง.
- Ackermann HW. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 154: 245-251.
- Ackermann HW. 1999. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv Virus Res* 51: 135-201.
- Ackermann HW. 1996. Frequency of morphological phage descriptions in 1995. *Arch Virol* 141: 209-218.
- Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A and Troitsky N. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect* 36: 5-15.
- Alvarez JD, Austin B, Alvarez AM and Reyes H. 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimp in Venezuela. *J Fish Dis* 21: 313-316.
- Austin B, Pride AC and Rhodie GA. 2003. Association of a bacteriophage with virulence of *Vibrio harveyi*. *J Fish Dis* 26: 55-58.
- Barrow P, Lovell M and Berchieri A Jr. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 294-298.
- Barrow P and Soothill JS. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol* 5: 268-271.
- Berchieri A Jr, Lovell MA and Barrow PA. 1991. The activity in chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol* 142: 541-549.
- Biwas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powel B, Carlton R and Merrill CR. 2002 Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70: 204-210.
- Bradley DE. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *J Bacteriol* 31: 230-314.
- Carveny KE, DePaolo A, Duckworth DH and Gulig PA. 2002. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect Immun* 70: 6251-6262.

- Coffey A and Ross RP. 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 303-321.
- Collins EB, Nelson FE and Parmelee CE. 1950. The relation of calcium and other constituents of a defined medium to proliferation of lactic *Streptococcus* bacteriophage. *J Bacteriol* 60: 533-542.
- d'Herelle F. 1918. Technique de la recherche du microbe filtrant bacteriophage (*Bacteriophagum intestinale*). *C R Soc Biol* 81: 1160-1162.
- Fischetti VA. 2003. Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann NY Acad Sci* 987: 207-214.
- Gautier M, Rouault A, Herve C, Sommer P, Leret V, Jan G, Fraslin JM, Prevot F and Coste A. 1999. Bacteriophages of dairy proionibacteria. *Lait* 79: 93-104.
- Harris L, Owens L and Smith S. 1996. A selective and Differential medium for *Vibrio harveyi*. *Appl Environ Microbiol* 62(9): 3548-3550.
- Hoeprich S, Zhou Q, Guo S, Shu D, Qi G, Wang Y and Guo P. 2003. Bacterial virus *phi*29 pRNA as a hammerhead ribozyme escort to destroy hepatitis B virus. *Gene Ther* 10: 1258-1267.
- Holmes FO. 1948. Order Virales, the filterable viruses, p. 1126-1286. In Breed RS, Murray EGD and Hitchens AP (ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed, Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Husson-Kao C, Mengaud J, Cesselin N, van Sinderen D, Benbadis L and Chapot-Chartier MP. 2000. The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Appl Environ Microbiol* 66: 558-565.
- Ishimaru K and Muroga K. 1997. Taxonomic re-evaluation of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathol* 32: 59-64.
- Karunasagar I, Pia R, Malathi GR and Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.
- Karunasagar I, Shivu MM, Girisha SK, Krohne G and Karunasagar I. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268: 288-292.

- Kim AY and Blaschek HP. 1991. Isolation and characterization of a filamentous viruslike particle from *Clostridium acetobutylicum* NCIB 6444. J Bacteriol 173: 530-535.
- Kraxberger-Beatty T, McGarey DJ, Grier HJ and Lim DV. 1990. *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. J Fish Dis 13: 557-560.
- Kusuda R, Kawai K, Salati F, Banner CR and Fryer JL. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int J Syst Bacteriol 41: 406-409.
- Lavilla-Pitogo CR, Albright LJ, Paner MG and Sunaz NA. 1992. Studies on the sources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries, p. 157-164. In Shariff IM, Subasinghe RP and Arthur JR (ed.), Disease in Asian aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines.
- Lavilla-Pitogo CR, Leano EM and Paner MG. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture 164: 337-349.
- Loeffler JM, Nelson D and Fischetti VA. 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. Science 294: 2170-2172.
- Loeffler JM and Fischetti VA. 2003. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 47: 375-377.
- Lu Z, Breidt F Jr, Fleming HP, Altermann E and Klaenhammer TR. 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Φ JL-1, from a cucumber fermentation. Int J Food Microbiol 84: 225-235.
- Luria SE and Steiner DL. 1954. The role of calcium in the penetration of bacteriophage T5 into its host. J Bacteriol 67: 635-639.
- Lwoff A, Horne RW and Tournier P. 1962. A system of viruses. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 27: 51-62.
- Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S and Adhya S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. Proc Natl Acad Sci USA 93: 3188-3192.

- Nakai T, Sugimoto R, Park K-H, Matsuoka S, Mori K, Nishioka T and Maruyama K. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. Dis Aquat Org 37: 33-41.
- Nelson D, Loomis L and Fischetti VA. 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 98: 4170-4112.
- Nishimori E, Kita-Tsukamoto K and Wakabayashi H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial hemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. Int J Syst Evol Microbiol 50: 83-89.
- O'Sullivan D, Ross RP, Fitzgerald GF and Coffey A. 2000. Investigation of the relationship between lysogeny and lysis of *Lactococcus lactis* in cheese using prophage-targeted PCR. Appl Environ Microbiol 66: 2192-2198.
- Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori K and Nakai T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. Appl Environ Microbiol 66: 1416-1422.
- Perlman D, Langlykke AF and Rothberg HD Jr. 1951. Observations on the chemical inhibition of *Streptomyces griseus* bacteriophage multiplication. J Bacteriol 61,:135-143.
- Pizzuto M and Hirst RG. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M1 DNA fingerprinting. Dis Aquat Org 21: 61-68.
- Rajadhyaksha AB and Rao SS. 1965. The role of phage in the transduction of the toxigenic factor in *Corynebacterium diphtheriae*. J Gen Microbiol 40: 421-429.
- Ramesh V, Fralick JA and Rolfe RD. 1999. Prevention of *Clostridium difficile*-induced ileocectitis with bacteriophage. Anaerobe 5: 69-78.
- Rountree PM. 1955. The role of divalent cations in the multiplication of *Staphylococcal* bacteriophages. J Gen Microbiol 12: 275-287.
- Schuch R, Nelson D and Fischetti VA. 2002. A bacteriolytic agent that detected and kills *Bacillus anthracis*. Nature 418, 884-889.

- Seto S, Osawa T and Yamamoto S. 1964. Studies on bacteriophages for L-glutamic acid producing bacteria, *Microbacterium ammoniaphilum*. Amino Acid Nucl Acid (Tokyo) 10: 27-36.
- Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M and Kucharewicz-Krukowska A. 1987. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infectious in the years 1981-1986. Arch Immunol Ther Exp 35: 569-583.
- Smith HW and Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol 128: 307-318.
- Smith HW and Huggins MB. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets and lambs. J Gen Microbiol 129: 2659-2675.
- Smith HW, Huggins MB and Shaw KM. 1987a. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves by means of bacteriophages. J Gen Microbiol 133: 1111-1126.
- Smith HW, Huggins MB and Shaw KM. 1987b. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. J Gen Microbiol 133: 1127-1135.
- Soothill JS. 1994. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. Burns 20: 209-211.
- Soothill JS. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. J Med Microbiol 37: 258-261.
- Soothill JS, Lawrence JC and Ayliffe GAJ. 1988. The efficacy of phages in the prevention of the destruction of pig skin in vitro by *Pseudomonas aeruginosa*. Med Sci Res 16: 1287-1288.
- Valegard K, Liljas L, Fridborg K and Unge T. 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. Nature 344: 36-41.
- Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, Rajeeva BC, Krohne G, Karunasagar I and Karunasagar I. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for

- biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255: 117-124.
- Waldor MK and Mekalanos JJ. 1996. Lysogenic conversion of a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-1914.
- Watanabe K, Takesue S, Jin-Nai K and Yoshikawa T. 1970. Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol* 20: 409-415.
- Zhang X-H, Meaden PG and Austin B. 2001. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl Environ Microbiol* 67: 3161-3167.
- Zimmer M, Vukov N, Scherer S and Loessner MJ. 2002. The murein hydrolase of the bacteriophage *phi3626* dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol* 68: 5311-5317.
- http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_harveyi
- http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=21
- http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=98
- http://www.thailandshrimp.com/agriculture_tiger8.html

ภาคผนวก

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ยังได้มีการนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในชื่อเรื่อง “Isolation and partial characterization of bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*” ในวารสาร African Journal of Microbiology Research ปี 2010 ฉบับที่ 4(16) หน้า 1794-1800.

Full Length Research Paper

Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*

Parichat Phumkhachorn and Pongsak Rattanachaikunsopon*

Department of Biological Science, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand.

Accepted 29 April, 2010

A bacteriophage infecting *Vibrio harveyi* was isolated from shrimp pond water, it was designated PW2. It infected all strains of *V. harveyi* but not other bacteria used in this study. The phage adsorption rate increased rapidly in the first 15 min of infection to 80% and continued to increase to 90% within 30 min of infection. The stability of phage PW2 was dependent on temperature and pH. It was inactivated by heating at 90°C for 30 min and by treating at pH 2, 3, 11 and 12. From its one step growth curve, latent and burst periods were 30 and 120 min, respectively with a burst size of about 78 plaque-forming unit (pfu) per infected center. As analyzed by transmission electron microscopy, phage PW2 had an icosahedral head (50 ± 3.8 nm in diameter) with a noncontractile tail of 136 ± 6.2 nm long and 11 ± 0.5 nm wide and belongs to the *Siphoviridae* family. Six structural proteins (75, 60, 35, 30, 20 and 15 kDa) were detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, its genome was found to be double stranded DNA with an approximate size of 46 kb.

Key words: Bacteriophage, shrimp, *Vibrio harveyi*.

INTRODUCTION

Vibrio harveyi is a gram-negative bioluminescent bacterium with curved rod shape. It is motile via a single polar flagellum. The bacterium has been recognized as a cause of luminous vibriosis in cultivated black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and has resulted in major losses to shrimp farmers in Thailand and elsewhere (Lavilla-Pitogo et al., 1990; Jiravanichpaisal et al., 1994; Manefield et al., 2000). The symptoms of luminous vibriosis include loss of appetite, slow growth, high mortality and luminescence of the bodies of infected shrimps (Lavilla-Pitogo et al., 1990; Jiravanichpaisal et al., 1994; Karunasagar et al., 1994). Currently, antibiotics have been widely used in shrimp aquaculture to control bacterial infections (Baticados and Paclibare, 1992). However, the use of antibiotics has recently become a major public concern because their use can lead to the development of drug resistant bacteria, thereby reducing drug efficacy. Moreover, the accumulation of antibiotics

both in the environment and in shrimp tissues can be potentially risky to consumers and the environment (Alderman and Hastings 1998). Such adverse effects have prompted scientists to search for alternatives to replace antibiotics in controlling diseases in shrimp farms. One of the potential alternatives is bacteriophage based approach.

Bacteriophages or phages are viruses that specifically infect and lyse bacteria. A method using phages for the treatment of bacterial infectious disease is called bacteriophage therapy or phage therapy. Recently, phage therapy has gained an increasing attention because it has many advantages over chemotherapy. Phages have high specificity for their target bacteria, indicating that they do not harm the normal intestinal microflora. Phages are effective against multidrug resistant pathogenic bacteria because the mechanisms by which they induce bacteriolysis differ completely from those antibiotics. Moreover, phages have self limitation, meaning that the number of phages remain in very low level after killing the target bacteria (Nakai and Park, 2002).

Successful uses of phage therapy to control bacterial infectious diseases have been reported since 1980s. Phages were used for both treatment and prophylaxis of

*Corresponding author. E-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com. Tel: +6645-288380. Fax: +6645-288380.

Escherichia coli infections in mice and farmed animals including calves, piglets and lambs (Smith and Huggins, 1982; Smith and Huggins, 1983; Smith et al., 1987). Polish and Soviet groups reported a series of successful clinical usages of phages for drug resistant bacterial infections in human (Slopek et al., 1987; Alisky et al., 1998). Much of the recent research has focused on using phages to control diseases caused by a variety of human pathogenic bacteria including *Salmonella* (Goode et al., 2003), *Listeria* (Leverentz et al., 2004) and *Campylobacter* (Atterbury et al., 2003) species. However, in addition to the current attempts to apply phages in the control of human pathogens, aquatic animal pathogens have also been investigated as a target for phage therapy. A number of phages have been isolated for potential use in phage therapy against important aquatic animal pathogens such as *Aeromonas salmonicida* in brook trout (*Oncorhynchus fontinalis*) (Imbeault et al., 2006), *Vibrio harveyi* in shrimp (*Penaeus monodon*) (Karunasagar et al., 1994; Vinod et al., 2006; Shivu et al., 2007), *Pseudomonas plecoglossicida* in ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Park et al., 2000; Nakai and Park, 2002) and *Lactococcus garvieae* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) (Nakai et al., 1999).

The application of phage to control a certain bacterial pathogen is complicated by the high degrees of phenotypic and genotypic diversity within populations of both phages and bacteria. Consequently, newly isolated strains of *V. harveyi* may be more or less susceptible or even resistant to previously discovered *V. harveyi* phages. Therefore, there is still a need to find a phage specific for an individual newly emerged *V. harveyi* strain. The purpose of this study was to isolate and characterize a new lytic phage that infect *V. harveyi* and to investigate its lytic property toward its host bacterium under controlled conditions in the laboratory. The study thus provides useful information for further use of the phage in controlling *V. harveyi* infection in shrimp.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strain used for phage isolation was *V. harveyi* CS101. It was isolated from diseased shrimp obtained from a shrimp pond in Songkhla Province, Thailand in May 2007. The bacteria used in phage host range study are present in Table 1. Growth conditions of the bacteria are also included in Table 1. The bacterial stock cultures were stored as frozen cultures at -80°C in appropriate broth containing 20% glycerol (v/v).

Isolation of phage

Phage was isolated from shrimp pond water obtained from five farms in Songkhla Province, Thailand. 50 ml of pond water was filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter (Pall Life Sciences, MI, USA) and mixed with 50 ml of double strength BHI broth supplemented with 1% NaCl (BHI-N broth) containing the log phase cells of *V. harveyi* CS101 (with the cell concentration of

approximately 10^8 cfu/ml). After 48 h of growth at 25°C, the culture was centrifuged and filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter. The presence of lytic phage in the filtrate was examined by using the double layer method with some modifications (Paterson et al., 1969). 100 µl of the filtrate was mixed with 400 µl of log phase culture of *V. harveyi* CS101 and incubated at 25°C for 30 min. The mixture was added into a 4.5 ml of molten BHI-N top agar (0.5% agar) which was already cooled down to 50°C, mixed gently and poured into a BHI-N agar plate. The plate was left to stand at room temperature for 30 min to allow the top agar to solidify. The presence of lytic phage in the form of plaques was detected after incubation of the plate at 25°C for 48 h.

Purification of phage

A single plaque was picked with a sterile glass Pasteur pipette and put into a log phase culture of *V. harveyi*. After incubated at 25°C for 48 h, the phage-host mixture was centrifuged at 12,000 x g for 10 min and filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter. The filtrate was subjected to the double layer method as mentioned above. Three repeated rounds of single plaque isolation and re-inoculation were performed. The phage was eluted from the final resulting plate by adding 5 ml of SM buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 99 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0.01% gelatin) on top of the plate and incubated at room temperature for 4 h with shaking. The phage containing buffer retrieved from the plate was centrifuged at 12,000 x g for 10 min and filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter. The resulting filtrate was called phage suspension.

Concentration of phage suspension

When needed, phage suspension was concentrated using the method described by Su et al. (1998). The double layer method was performed as mentioned earlier to obtain confluent lysis on the plate. The phage was eluted with 5 ml of SM buffer at room temperature for 4 h with shaking. The buffer was transferred to 50 ml tube and the bacterial debris was pelleted by centrifuged at 12,000 x g for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter. The filtrate was added with 2 M ZnCl₂ at a ratio of 1:50 (v/v) and incubated at room temperature for 30 min. The phage was pelleted by centrifugation at 15,000 x g for 20 min. The pelleted was resuspended in approximately 1:25 of the original volume in SM buffer.

Determination of phage titer

The phage containing solution was serially diluted in SM buffer. Each dilution was subjected to plaque assay using the double layer method as mentioned earlier. Plaques were counted in the plate containing 50 - 300 plaques and expressed as plaque forming unit per milliliter (pfu/ml).

Examination of phage host range

Bacteria listed in Table 1 were used as indicators for the examination of phage host range by a modified version of the spot test method (Chopin et al., 1976). 100 µl of a log phase culture of each tested bacteria were added into a 4.9 ml of 50°C molten soft agar (0.5% agar), mixed gently and poured into an agar plate. After solidification, 5 µl of the phage suspension was spotted on the lawn of bacteria. After the plate was left to stand for 30 min at room temperature, it was incubated at an appropriate temperature for 48 h before checking the presence of a clear zone in the plate which indicated the ability of phage in infecting the tested bacteria.

Table 1. Bacteria and growth conditions used in this study.

Bacterial strains	Growth conditions (°C)	Lysis ^a
<i>V. harveyi</i> CSC101	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>V. harveyi</i> ATCC 15702	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>V. harveyi</i> ATCC 25919	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>V. harveyi</i> ATCC 33842	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>V. harveyi</i> ATCC 43515	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>V. harveyi</i> ATCC 700104	BHI-N agar and broth, 25	+/C
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 14582	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 14390	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio campbelli</i> ATCC 25920	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11558	BHI-N agar and broth, 37	-
<i>Vibrio fischeri</i> ATCC 14546	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio logei</i> ATCC 15382	BHI-N agar and broth, 18	-
<i>Vibrio marinovulgaris</i> ATCC 14394	BHI-N agar and broth, 26	-
<i>Vibrio natriegens</i> ATCC 14048	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio nereis</i> ATCC 25917	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	BHI-N agar and broth, 37	-
<i>Vibrio salmonicida</i> ATCC 43839	BHI-N agar and broth, 15	-
<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 25914	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19105	BHI-N agar and broth, 25	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	BHI agar and broth, 2	-
<i>Campylobacter fetus</i> ATCC 19438	BHI agar and broth, 37	-
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700819	BHI agar and broth, 37	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15922	Nutrient agar and broth, 37	-
<i>Lactococcus garvieae</i> ATCC 49156	MRS agar and broth, 37	-
<i>Listonella anguillarum</i> ATCC 43310	Marine agar and broth, 20	-
<i>Moritella marina</i> ATCC 15381	Marine agar and broth, 18	-
<i>Photobacterium damsela</i> ATCC 33538	Marine agar and broth, 25	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 27968	Nutrient agar and broth, 37	-
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> ATCC 33660	BHI agar and broth, 20	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 6972	Nutrient agar and broth, 37	-
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 33059	Nutrient agar and broth, 37	-
<i>Streptococcus iniae</i> ATCC 29177	MRS agar and broth, 37	-
<i>Streptococcus phocae</i> ATCC 51973	MRS agar and broth, 37	-

^a + = lysis; - = no lysis; C = clear plaque, BHI, brain Heart Infusion; BHI-N, Brain Heart Infusion supplemented with 1% NaCl; MRS, de Man Rogosa and Sharpe.

Thermal sensitivity test

900 µl of sterile deionized water was preheated to a desirable temperature, ranging from 50 to 90°C. 100 µl of phage solution (approximately 10⁸ pfu/ml) was added to the preheated water. After heating at the assigned temperatures for 30 min, the solutions were placed in an ice-water bath. Surviving phage titer was assayed by the double layer method.

pH sensitivity test

The phage (at the final concentration of 10⁸ pfu/ml) was incubated overnight at 25°C in phosphate buffered saline (135 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 0.5 mM KH₂PO₄, 3.2 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) adjusted in

steps of 1 pH unit from pH 2 to 12 using HCl or NaCl as required. Upon re-adjustment to pH 7, the double layer method was performed to determine phage titer.

Phage adsorption study

Phage adsorption was studied using method described by Sechaud et al. (1989) modified as follows: log phase growing *V. harveyi* culture in BHI-N broth was centrifuged and the cells were resuspended in BHI-N to a final concentration of 10⁸ cfu/ml. Phage was added at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01, and the mixture was incubated at 25°C. Samples were collected every minute during a total period of 15 min. The samples were centrifuged at 12,000 x g for 10 min to sediment the phage-

adsorbed cells. Then, the titers of unadsorbed free phages in the supernatant were determined as indicated above and the results were expressed as percentages of the initial phage counts.

One step growth curve

One-step growth curve was performed as described by Pajunen et al. (2000) with some modifications. Briefly, 10 ml of log phase culture of *V. harveyi* was harvested by centrifugation at 12,000 x g for 10 min and resuspended in 5 ml of fresh BHI-N broth in order to obtain a final concentration of 10^8 cfu/ml. To this suspension, 5 ml of phage suspension was added in order to have a MOI of 0.01 and the phage was allowed to adsorb for 30 min at 25°C. The mixture was then centrifuged at 12,000 x g for 10 min and the pellet was resuspended in 10 ml of fresh BHI-N broth. Samples were taken every 5 min over a period of 3 h and immediately titrated by the method described earlier. Latent period, burst time and burst size were calculated from the one-step growth curve.

Electron microscopy

Phage suspension with a titer of 10^8 pfu/ml was mixed with one-tenth volume of 2.5% buffered glutaraldehyde (50 mM cacodylate pH 7.2, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$) for 5 min. 25 µl of fixed phage was added to the surface of a polyform coated grid and left for 2 min. The phage was negatively stained with 0.5% uranyl acetate for 2 min and then inspected with a Philips EM 300 electron microscope (Philips, Eindhoven, the Netherlands) operated at 60 kV.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (1970). Briefly 24 µl of phage suspension was mixed with 8 µl of 4 x Laemmli buffer (200 mM Tris pH 6.8, 400 mM 1, 4-dithiothreitol, 20% β-mercaptoethanol, 8% SDS, 40% glycerol, 0.1% bromophenol blue) and boiled for 10 min. The mixture then subjected to electrophoresis on a 4 - 12% Bis-Tris polyacrylamide gel at 200 V with a constant current of 100 mA for 45 min. The protein bands were stained with Coomassie blue G-250 (Sigma-Aldrich, MO, USA), followed by destaining with a destain solution (50% methanol and 10% acetic acid).

Phage genome isolation and digestion analyses

Phage genome was isolated using a PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The genome was digested with the following enzymes: RNase A, S1 nuclease, PstI, and BamHI (all from Promega, WI, USA) according to the instructions provided by the manufacturer. Uncut and digested nucleic acid was analyzed by agarose gel electrophoresis on 0.8% (w/v) agarose gel in Tris-acetate buffer at 100 V and visualized on Hoefer MacroVue UVIS-20 transilluminator (Amersham Bioscience, NJ, USA) after stained with ethidium bromide solution (0.5 µg/ml, Sigma-Aldrich, MO, USA).

RESULTS

Isolation of phage

By the double layer method using *V. harveyi* CS101 as a

host organism, a phage was isolated from a shrimp pond water sample. The phage produced clear plaques on the lawn of the host, indicating that it was a lytic or virulent phage. The plaques were small with an average diameter of 14 mm. The isolated phage was designated PW2.

Host range determination

Of all 34 strains of bacteria used to determine the host range of phage PW2 by using the spot test method, only *V. harveyi* strains were susceptible to the phage as shown in Table 1. The other bacterial strains used in this study were insensitive to the phage. These results suggested that the phage had a broad host range with specificity to *V. harveyi*.

Heat and pH stability

Phage PW2 was stable upon heat treatment at 50°C for 30 min. The temperature dependent decrease of phage titer was observed when temperature used for the heat treatment was 60°C and above. The phage titer was reduced by 50, 70, and 90% at 60, 70 and 80°C respectively. No phage was detected at 90°C (Figure 1).

Phage PW2 maintained its infectivity when incubated overnight at 25°C in a pH range between 4 and 10. However, phage could not be detected at pH 2, 3 and 11 (Figure 2).

Phage adsorption

Phage PW2 had 2 adsorption phases: a very rapid adsorption to its host cells during the first 15 min is followed by a slower rate of adsorption after 15 min. The number of free (unadsorbed) phage particles was approximately 20% and below 10% within 15 and 30 min after infection, respectively (Figure 3).

One-step growth curve

Multiplication parameters of the lytic cycle of phage PW2 were determined from the one-step growth curve (Figure 4). The latent and burst periods were 30 and 120 min, respectively and the burst size was estimated at approximately 78 pfu per infected cell.

Morphology of phage

Morphological characterization of phage PW2 using transmission electron microscope showed that it had an icosahedral head (50 ± 3.8 nm in diameter) with a non contractile tail of 136 ± 6.2 nm long and 11 ± 0.5 nm

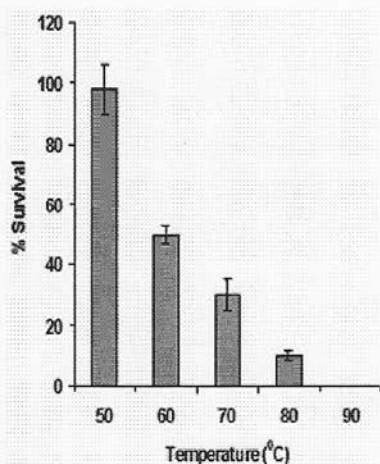


Figure 1. Stability of phage PW2 treated with different temperature for 30 min. Values are the means of 3 determinations.

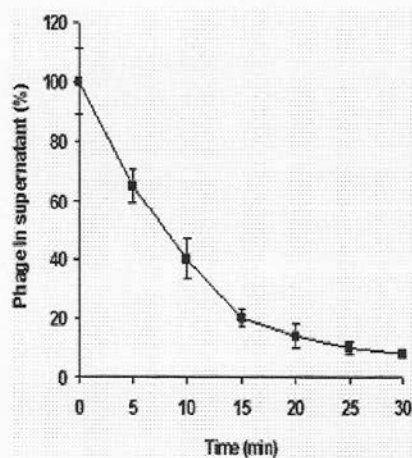


Figure 3. Adsorption of phage PW2 on cells of *V. harveyi* CS101. Values are the means of 3 determinations.

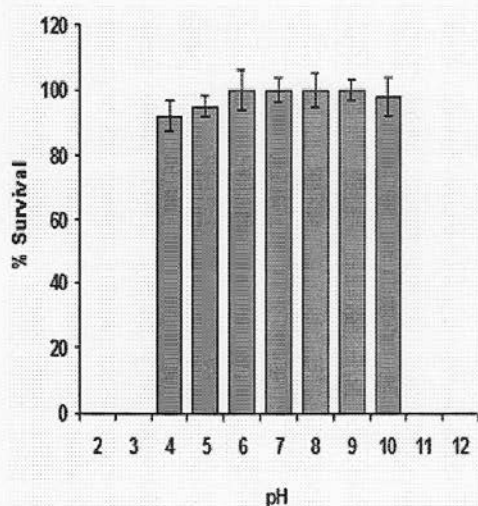


Figure 2. Stability of phage PW2 treated with different pH overnight at 25 °C. Values are the means of 3 determinations.

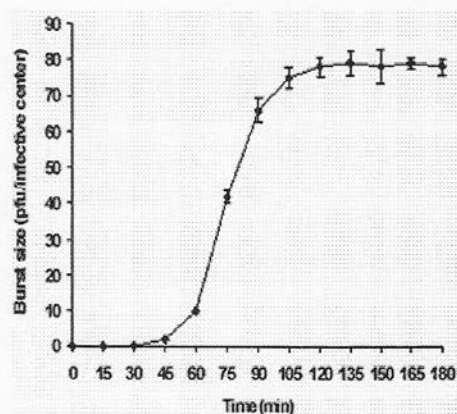


Figure 4. One step growth curve of phage PW2 on *V. harveyi* CS101. Values are the means of 3 determinations.

wide. No collar or tail appendages was observed (Figure 5). All values were determined as means $\pm$ SD from 5 measurements.

Phage structural proteins

Protein composition of phage PW2 was analyzed by

SDS-PAGE. A total of 6 protein bands were clearly seen in the polyacrylamide gel. Their estimated molecular weights were 75, 60, 35, 30, 20 and 15 kDa (Figure 6).

Phage genome

Nucleic acid of phage PW2 was isolated and subjected to enzymatic digestion analysis. It was not digested with RNase A and S1 nuclease (data not shown). However, it was digested with both *Pst*I and *Bam*HI. The genome size estimated from *Pst*I and *Bam*HI digested fragments was approximately 46 kb (Figure 7).



Figure 5. Scanning electron micrograph of phage PW2.

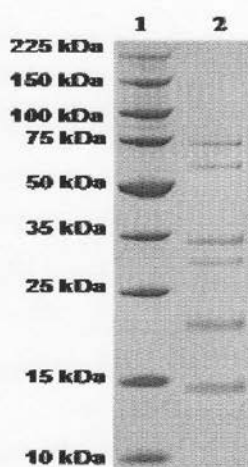


Figure 6. SDS-PAGE analysis of phage PW2 structural proteins. Lane 1, broad range protein molecular weight markers (Promega, WI, USA); Lane 2, phage PW2 proteins.

DISCUSSION

Bacterial diseases are a major problem affecting shrimp farming and most of the mass mortalities reported in shrimp are associated with luminous disease caused by *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo et al., 1990; Jiravanichpaisal et al., 1994; Karunasagar et al., 1994). Till recently, antibiotics were widely used in shrimp aquaculture to control bacterial infections. However, emergence of antibiotic resistant pathogens and awareness of adverse effects of antibiotics has led to a need for alternatives to antibiotics in shrimp aquaculture.

Phage therapy is one of the promising approaches to control bacterial infections. One feature that makes

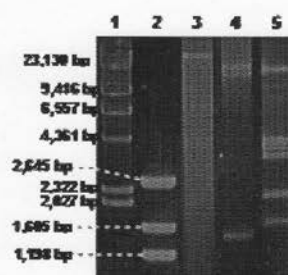


Figure 7. Restriction analysis of phage PW2 DNA. Lane 1, *Hind*III digested lambda DNA (Promega, WI, USA); Lane 2, pGem marker (Promega, WI, USA); Lane 3, uncut PW2 DNA; Lane 4, PW2 DNA cut with *Pst*I; Lane 5, PW2 DNA cut with *Bam*HI.

phage so attractive is their highly discriminatory nature. Most of the known phages interact only with a specific set of bacteria that express specific binding sites. This narrow host range is also a significant challenge for phage therapy. Consequently, there is no known phage that is lytic for all strains of *V. harveyi*. This high specificity of phage-host relationship leads to a need for phages to inhibit newly isolated *V. harveyi*. Phages are generally isolated from environments that are habitats for the respective host bacteria (Nakai and Park, 2002). Since *V. harveyi* used as a main host in phage screening isolated from shrimp farm environment, shrimp pond water would be ideal for isolation of *V. harveyi* phages. For searching phages to use in phage therapy, phages with broad host range are more preferable than those with narrow host range because they can inhibit several strains of bacterial pathogens (Nakai and Park, 2002). In this study, phage PW2 isolated from shrimp pond water had a broad host range infecting all of the tested strains of *V. harveyi*. This characteristic of the phage makes it useful for use individually or in combination with other *V. harveyi* phages as phage cocktails to control *V. harveyi* infection.

As a tailed virus of bacteria, PW2 phage fell into the Order Caudovirales that contains three families of tailed viruses that infect Bacteria and Archaea (van Regenmortel et al., 2000). Possession of an icosahedral head and a long, non contractile tail would tentatively place it in the family Siphoviridae (van Regenmortel et al., 2000). The genome of PW2 phage was found to be double stranded DNA because it was digested with restriction endonucleases but not with RNase A and S1 nuclease. The size of genome estimated by *Pst*I and *Bam*HI digestion analysis was approximately 46 kb. This was close to the genome size of most siphophages ranging from 40 to 50 kb. From previous studies, most of the *V. harveyi* phages were found to be siphophages with double stranded DNA (Pasharawipas et al., 2005; Vinod

et al., 2006; Karunasagar et al., 2007). However, *V. harveyi* phages in other families such as Myoviridae and Podoviridae were also reported (Oakey and Owens, 2000; Oakey et al., 2002; Busico-Salcedo, 2004; Shivu et al., 2007). Several studies documented that thermal and pH stability of phages varied depending on strains of phage. Therefore, it is of interest to investigate the stability of phage PW2 in a wide range of temperatures and pH. This study showed that the phage was tolerant to relatively high temperature ranging from 50 to 80°C and a broad range of pH. These characteristics may be useful for the application of the phage in different environments.

In conclusion, we have isolated and partially characterized phage PW2, a phage infecting *V. harveyi* CS101. The results from this study provide preliminary data useful for designing a rational phage control strategy for *V. harveyi* infection in shrimp aquaculture. However, further characterization of phage PW2 is underway in our laboratory to obtain more information for development of the most effective approach for controlling *V. harveyi* infection.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was financially supported by a grant from Thai Government Budget in Fiscal Years 2009 (project code 15180) and 2010 (project code 15109).

REFERENCES

- Alderman DJ, Hastings TS (1998). Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 33: 139-155.
- Alisky J, Iczkowski K, Rapaport A, Troitsky N (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.*, 36: 5-15.
- Atterbury RJ, Connerton PL, Dodd CER, Rees CED, Connerton IF (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken leads to reduction in the recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6302-6306.
- Baticados MCL, Paclibare JO (1992). The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In: Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR (eds) *Diseases in Asian Aquaculture I*. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 531-546.
- Busico-Salcedo N (2004). The role of Podovirus-like bacteriophage in the virulence of *Vibrio harveyi* strain 47666-1. MThSc Thesis, James Cook University, Brisbane, Australia.
- Chopin MC, Chopin A, Roux C (1976). Definitions of bacteriophage groups according to their lytic action on mesophilic lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 741-746.
- Goode D, Allen VM, Barrow PA (2003). Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5032-5036.
- Imbeault S, Parent S, Lagace M, Uhlund CF, Blais JF (2006). Using bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 18: 203-214.
- Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C (1994). Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquatic Anim. Health*, 6: 27-35.
- Karunasagar I, Shivu MM, Girisha SK, Krohne G, Karunasagar I (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*, 268: 288-292.
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lavilla-Pitogo CR, Baticados MCL, Cruz-Lacierda ER, de la Pena LD (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91: 1-13.
- Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Camp MJ (2004). Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J. Food Prot.*, 67: 1682-1686.
- Manefield M, Rice LA, de Nys R, Kjelleberg S (2000). Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intracellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2079-2084.
- Nakai T, Park SC (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 153: 13-18.
- Nakai T, Sugimoto R, Park KH, Mori K, Nishioka T, Maruyama K (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Organ.*, 37: 33-41.
- Oakey HJ, Cullen WR, Owens L (2002). The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 1089-098.
- Oakey HJ, Owens L (2000). A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 702-709.
- Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M (2000). Bacteriophage phi YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. *J. Bacteriol.*, 182: 5114-5120.
- Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori KI, Nakai T (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for fish disease control. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1416-1422.
- Pasharawipas T, Thaikua S, Sriurairatana S, Ruangpan L, Direkbusarakum S, Manopvisetcharean J, Flegel TW (2005). Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand. *Virus Res.*, 114: 63-69.
- Paterson WD, Douglas RJ, Grinyer I, McDermott LA (1969). Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophages. *J. Fish Res. Can.*, 26: 629-632.
- Sechaud L, Callegari ML, Rousseau M, Muller MC, Accolas JP (1989). Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent phage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus*. *Neth. Dairy J.*, 43: 261-277.
- Shivu MM, Rajeeva BC, Girisha SK, Karunasagar I, Krohne G, Karunasagar I (2007). Molecular characterisation of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ. Microbiol.*, 9: 322-331.
- Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 35: 569-583.
- Smith HW, Huggins MB (1982). Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 307-318.
- Smith HW, Huggins MB (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets, and lambs. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2659-2675.
- Smith HW, Huggins MB, Shaw KM (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1111-21126.
- Su MT, Venkatesh TV, Bodmer R (1998). Large- and small-scale preparation of bacteriophage λ lysate and DNA. *BioTechniques*, 25: 44-46.
- van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsteus EB, EstesMK, Lemon SM, Maniloff JM, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wicher RB (2000). *Virus taxonomy*. Academic Press, San Diego, CA.
- Vinod MG, Shivu MM, Umeshia KR, Rajeeva BC, Krohne G, Karunasagar I, Karunasagar I (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255: 117-124.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลาย *Vibrio harveyi* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ และจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้ ได้แก่ การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลาย *Vibrio* สายพันธุ์อื่นหรือเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ศึกษาการทนความร้อน การทนต่อสารเคมีและสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอเฟจ ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์ ศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียโอเฟจ และศึกษา DNA ของแบคทีเรียโอเฟจ

กิจกรรมที่วางแผนไว้

1. ตรวจสอบแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101
2. ศึกษาความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น
3. ศึกษาการยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101
4. ศึกษาการทนความร้อนของ bacteriophage PW2
5. ศึกษาการทนต่อสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ของ bacteriophage PW2
6. ศึกษารูปร่างของ bacteriophage PW2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
7. ศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage PW2 โดยวิธี SDS-PAGE
8. ศึกษา nucleic acid ของ bacteriophage PW2

กิจกรรมที่ดำเนินการมา

1. ตรวจสอบแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101
2. ศึกษาความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น
3. ศึกษาการยึดเกาะของ bacteriophage PW2 บนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101
4. ศึกษาการทนความร้อนของ bacteriophage PW2
5. ศึกษาการทนต่อสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ของ bacteriophage PW2
6. ศึกษารูปร่างของ bacteriophage PW2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
7. ศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ bacteriophage PW2 โดยวิธี SDS-PAGE
8. ศึกษา nucleic acid ของ bacteriophage PW2

ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

1. สามารถตรวจหาแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *V. harveyi* CS101 ได้ คือ bacteriophage PW2
2. ทราบความสามารถของ bacteriophage PW2 ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยพบว่า bacteriophage PW2 สามารถทำลาย *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลอง แต่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่นำมาใช้ในการทดลองได้
3. พบว่า 90% ของ bacteriophage PW2 สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของ *V. harveyi* CS101 ได้ภายในเวลา 30 นาที
4. พบว่า bacteriophage PW2 สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
5. พบว่า bacteriophage PW2 สามารถทนต่อสารเคมี และสารต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง
6. พบว่า bacteriophage PW2 มีส่วนหัวเป็นรูป icosahedral ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ± 3.8 นาโนเมตร และมีหางเป็นแบบ noncontractile tail ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 ± 0.5 นาโนเมตร และมีความยาว 136 ± 6.2 นาโนเมตร
7. พบว่า bacteriophage PW2 ประกอบด้วยโปรตีนหลักอย่างน้อย 6 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75, 60, 35, 30, 20 และ 15 kDa
8. พบว่า nucleic acid ของ bacteriophage PW2 เป็นแบบ double stranded DNA และมีขนาดประมาณ 46 kb

รายงานการเงิน

งบประมาณที่ได้รับอนุมัติ

จากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552 เป็นจำนวนเงิน 323,300 บาท

จากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2553 เป็นจำนวนเงิน 424,600 บาท

ค่าใช้จ่ายตลอดโครงการ

(หลักฐานต่าง ๆ สามารถตรวจสอบได้ที่ฝ่ายการคลัง คณะวิทยาศาสตร์ ม. อุบลราชธานี)