

การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์
ของ
พรทิพย์ สุขสวัสดิ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มิถุนายน 2549

การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

บทคัดย่อ
ของ
พรทิพย์ สุขสวัสดิ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มิถุนายน 2549

พรทิพย์ สุขสวัสดิ์. (2549). การศึกษาสมบัติของไวรัสโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย. ปรินญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, รองศาสตราจารย์จรรยา สิ้นเดิมสุข

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียในจลินส์ไวรัสโอและไวรัสโอเฟจ จากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย ทั้งหมด 102 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียดังกล่าว พบว่ามีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง ติดสีแกรมลบ และสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ จึงจัดอยู่ในจลินส์ไวรัสโอ และเมื่อทดสอบสมบัติทางชีวเคมีอื่น พบว่าเป็น *Vibrio parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท จากนั้นนำ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้มาเป็นโฮสต์สำหรับแยกไวรัสโอเฟจ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) และตรวจสอบพลาค (plaque) สามารถแยกไวรัสโอเฟจได้ 9 ตัว ได้แก่ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp9, Vp10, Vp15 และ Vp28 ซึ่งไวรัสโอเฟจแต่ละตัวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของพลาคแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-2 มิลลิเมตร พบทั้งพลาคใสและพลาคขุ่น เมื่อนำไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไวรัสโอเฟจทั้งหมดมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 53.33-93.33 นาโนเมตร มีส่วนหางที่มีความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 66.67-233.33 นาโนเมตร สามารถจัดอยู่ใน Family Myoviridae และ Family Siphoviridae เมื่อนำเฟจทั้ง 9 ตัวไปศึกษาโฮสต์-เรนจ์หรือความสัมพันธ์ในการติดเชื้อมีกับ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 28 ไอโซเลทนอกเหนือจากโฮสต์ที่ใช้แยกเฟจ พบว่าเฟจทั้ง 9 ตัว สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นได้ เมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์ คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท พบว่ามีโฮสต์-เรนจ์ต่างกัน อย่างไรก็ตามไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียจลินส์อื่นที่นำมาทดสอบได้ และเมื่อสกัดดีเอ็นเอของเฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp10, Vp15 และ Vp28 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *NdeI* และ *BglII* พบว่าไวรัสโอเฟจแต่ละตัวมีรูปแบบของดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นไวรัสโอเฟจต่างชนิดกัน

CHARACTERIZATION OF VIBRIOPHAGES ISOLATED FROM SEA WATER AND
RAW SEAFOOD IN THAILAND

AN ABSTRACT
BY
PHORNTHIP SUKSAWAT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education Degree in Biology
At Srinakharinwirot University
June 2006

Phornthip Suksawat. (2006). *Characterization of vibriophages isolated from sea water and raw seafood in Thailand*. Master thesis. M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Onanong Pringsulaka, Assoc. Prof. Jariya Sindermsuk

Vibrio spp. and vibriophages from sea water and raw seafood in Thailand were isolated. From a total of 102 samples, 80 isolates of suspected-bacteria were obtained. All of them were gram-negative, curve-rod shaped and oxidase positive. Thus, they are most likely belonged to the genus *Vibrio*. Twenty-eight isolates were identified as *V. parahaemolyticus*, 48 isolates as *V. vulnificus*, 3 isolates as *V. alginolyticus* and 1 isolate as *V. damsela*. The twenty-eight isolates of *V. parahaemolyticus* were employed as hosts for isolation of phages using double agar layer method. Isolated phages including Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp9, Vp10, Vp15 and Vp28 produced clear and turbid plaques with entire edges varying from 0.5-2 mm in diameter. Electron micrographs indicated that all phage heads were of an icosahedral form, head size and length of tail varying from 53.33-93.33 nm and 66.67-233.33 nm, respectively. On the basis of the morphology, the phages belong to the families Myoviridae and Siphoviridae. Host-range determination revealed that all 9 strains were capable of infecting the 28 isolates of *V. parahaemolyticus*. Further study on host-range among different species, 15 isolates of *V. vulnificus*, 2 isolates of *V. alginolyticus* and 1 isolate of *V. damsela*, showed that all phages had different host-range patterns and unable to infect other genera used. In addition, phage DNAs isolated from 6 strains, namely Vp2, Vp4, Vp6, Vp10, Vp15 and Vp28 were characterized by restriction analyses with the following enzymes, *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *NdeI* and *BglII*. Results showed that the restriction fragment patterns generated were different. Therefore, based on all data obtained from this study it is confirmed that all vibriophages were different.

การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

พรทิพย์ สุขสวัสดิ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มิถุนายน 2549

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การศึกษาสมบัติของไวรัสโอเฟลที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

ของ
พรทิพย์ สุขสวัสดิ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญศิริ จีระเดชากุล)
วันที่ เดือน พ.ศ. 2549

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์จรรยา สิ้นเดิมสุข)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมใจ ศิริโภค)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ขจีนาฏ โพธิเวชกุล)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2548

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์จริยา สิน-เดิมสุข คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งรองศาสตราจารย์ สมใจ ศิริโชค และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัชฌาญ โพธิเวชกุล ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยครั้งนี้ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาประเทศ ตามเจตนารมณ์ของการศึกษาตามหลักสูตรที่วิทยาลัยต่อไป

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ประจำปี 2548 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ทำยที่สุดขอโน้มรำลึกถึงคุณบิดามารดาและขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

พรทิพย์ สุขสวัสดิ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย.....	3
ความสำคัญของการศึกษาวิจัย.....	3
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
อุปกรณ์และสารเคมี.....	25
วิธีดำเนินการทดลอง.....	27
การคัดแยกเชื้อไวรัส.....	27
การจัดจำแนกเชื้อไวรัส.....	27
การแยกไวรัสเฟจโดยใช้ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่แยกได้เป็นโฮสต์.....	28
การตรวจสอบไวรัสเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น.....	29
การหาปริมาณไวรัสเฟจ.....	30
การเพิ่มจำนวนไวรัสเฟจ.....	30
การศึกษารูปร่างของไวรัสเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	
แบบส่องผ่าน.....	30
การศึกษาสมบัติของไวรัสเฟจในการติดเชื้อมี <i>V. parahaemolyticus</i>	
สายพันธุ์อื่นและจีโนสอื่น.....	31
การสกัดดีเอ็นเอของไวรัสเฟจ.....	31
การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัสเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	32
4 ผลการศึกษา.....	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	74
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	89

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ.....	7
2 การทดสอบทางชีวเคมีของจีนัสไวรัส.....	22
3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลืองบนอาหาร TCBS.....	34
4 ลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้.....	38
5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกระดับสปีชีส์.....	43
6 ลักษณะของพลาแคและจำนวนพลาแคที่แยกได้เริ่มต้น.....	48
7 ผลการศึกษารูปร่างของไวรัส.....	51
8 ผลการจัดจำแนกรูปร่างของไวรัส..... อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	54
9 ผลการทดสอบไฮสท์-เรนจ์.....	56
10 รูปแบบดีเอ็นเอของไวรัส.....	64

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การจัดจำแนกเฟจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก.....	6
2 การจัดจำแนก Family ของเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วย การจัดอนุกรมวิธานของไวรัส.....	9
3 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคเฟจ.....	11
4 โครงสร้างของอนุภาคเฟจ.....	12
5 วงชีวิตแบบไลติค.....	14
6 วงชีวิตแบบไลโซเจนิกของแลมดาเฟจ.....	16
7 ลักษณะของพลาซมิดที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย.....	17
8 รูปร่างของ <i>V. cholerae</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	20
9 การทำอาหารวุ้นสองชั้น.....	29
10 รูปร่างของ <i>V. parahaemolyticus</i> มีลักษณะเป็นท่อนโค้ง ติดสีแกรมลบ.....	42
11 ลักษณะโคโลนี <i>V. parahaemolyticus</i> บนอาหาร TCBS จำนวน 9 ไอโซเลท ที่ใช้เป็นโฮสต์ของไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว.....	47
12 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp2 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	58
13 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp4 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	59
14 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp6 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	60
15 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp10 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	61
16 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp15 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	62
17 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp28 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	63
18 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test).....	82
19 ความสามารถในการใช้ซิเตรท (citrate test).....	83
20 ความสามารถในการสร้างสารอินโดล (indole test).....	84
21 ความสามารถในการสร้างสาร acetoin (vp- test).....	85
22 ความสามารถในการใช้กรดอะมิโนไลซีน (lysine decarboxylase test).....	86
23 ความสามารถในการใช้กลูโคส แมนนิทอล อะราบิโนส และ เซลโลไบโอส.....	87

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็น bacterial virus หมายถึง กลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Twort ในปี 1915 และ d' Herelle ในปี 1917 โดย d' Herelle ได้ให้ความหมายของแบคทีริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams. 1958: 2) เฟจโดยทั่วไปมีหลายชนิด แต่ละชนิดอาจมีความจำเพาะกับแบคทีเรียสปีชีส์ (species) เดียวหรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามสปีชีส์เท่านั้น นอกจากนี้เฟจจัดเป็น ออบลิเกตพาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรีย ทำให้การเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฟจ เกิดขึ้นเฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฟจจะเข้าไปเกาะติดกับผนังเซลล์และปล่อย สารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นก็เข้าสู่ชีวิตของเฟจ เพื่อเพิ่มจำนวน อนุภาคเฟจต่อไป (Mckane; & Kandel. 1996: 306)

ปัจจุบันเฟจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ และทางการแพทย์ ทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ได้ใช้เฟจเป็นเวกเตอร์ (vector) เป็นตัวนำ ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทำโคลนนิ่ง (cloning) ให้แทรกเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรียได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536: 102) ส่วนทางด้านการแพทย์สามารถช่วยในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโดยใช้ เทคนิคที่เรียกว่า phage typing มาจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส (genus) หรือสปีชีส์ เดียวกันออกเป็นกลุ่ม ตามความไวต่อการติดเชื้อเฟจ จากสิ่งแวดล้อมหรือจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย นอกจากนี้เฟจยังถูกนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้ออันเนื่องมาจากแบคทีเรีย ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ (Barrow; & Soothill. 1997: 268; Smith; Huggins; & Shaw. 1987: 1111) ตัวอย่างเช่น ในปี 2005 มีการใช้เฟจรักษาการติดเชื้อ *Escherichia coli* ในไก่ โดยเปรียบเทียบกับ การใช้ยาปฏิชีวนะ พบว่าเมื่อใช้เฟจรักษามีประสิทธิภาพดีกว่า (Xie; et al. 2005: 162) นอกจากนี้ยังมีการนำเฟจมาใช้ในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella enteritica* serovar Enteritidis และเชื้อ *Campylobacter jejuni* ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ เพื่อพัฒนาให้เป็นประโยชน์ทางด้าน อุตสาหกรรมอาหารต่อไป (Good; Allen; & Barrow. 2003: 5033)

ไวรัสโอเฟจ (vibriophages) คือ เฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีจีโนมไวรัสโอ (genus *Vibrio*) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Vibrionaceae เป็นจีโนมที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากมักพบ ปนเปื้อนมากับสิ่งแวดล้อมในทะเลรวมทั้งอาหารทะเล และก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดิน

อาหารในคนและสัตว์ จี้นัสวีบริโอที่มีความสำคัญมากทางการแพทย์มี 4 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* (Elliot; et al. 1995: 9.01-9.02) ที่ก่อโรคได้บ่อยในประเทศไทยมี 2 สปีชีส์ คือ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* โดย *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ *V. cholerae* ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ซึ่งในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมาพบการระบาดอันเนื่องมาจาก *V. parahaemolyticus* มากขึ้นโดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือปรุงไม่สุก มีรายงานการระบาดของโรคท้องร่วงในหลายๆ ประเทศ เช่น อินโดนีเซีย (Lesmana; et al. 2001: 71) ได้วันระหว่างปี 1996-1999 (Chiou, Chien-Shun; et al. 2000: 4621) และสหรัฐอเมริการะหว่างปี 1973-1998 โดยพบการระบาดถึง 40 ครั้ง (Daniels; et al. 2000: 1661) ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าวด้วยวิธี conventional microbiological methods ยังคงใช้เวลานานและสิ้นเปลือง (Karunasagar; et al. 2002: 34-36) ดังนั้นการนำสมบัติของเฟจที่มีความจำเพาะและทำให้เกิดการติดเชื้อมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีสปีชีส์เดียว มาใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อมีข้อดี คือ ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เนื่องจากไม่ได้ใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ตัวอย่างของการนำเฟจที่จำเพาะกับจี้นัสวีบริโอมาใช้ ได้แก่ การวินิจฉัยเชื้อ *V. cholerae* 01 biotype El Tor (Basu; & Mukerjee. 1968: 299-300; Chattopadhyay; et al. 1993: 1580) นอกจากนี้ในปี 1992 มีการนำเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. cholerae* 0139 มาใช้ในการวินิจฉัยได้ถูกต้องมากขึ้น ซึ่งเดิมคาดว่าจะมีสาเหตุมาจาก *V. cholerae* 01 (Chakrabarti; et al. 2000: 44)

จากประโยชน์และสมบัติของเฟจดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาไวรัสโอเฟจ โดยเฉพาะเฟจของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย จากนั้นศึกษาสมบัติของไวรัสโอเฟจที่แยกได้เช่น สมบัติทางชีววิทยา ได้แก่ โฮสต์-เรนจ์ (host-range) สมบัติของจีโนม (genome) และความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) รวมทั้งรูปร่างของไวรัสโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งสมบัติดังกล่าวของไวรัสโอเฟจที่แยกได้นี้ นำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และใช้ติดตามเชื้อมีความจำเพาะในแหล่งที่มีการระบาด เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องต่อไป (Faruque; et al. 2003: 7028; Madico; et al. 1996: 2968)

ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย

1. เพื่อแยกไวรัสโอเฟจจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาสมบัติของไวรัสโอเฟจที่แยกได้
3. เพื่อศึกษารูปร่างของไวรัสโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ความสำคัญของการศึกษาวิจัย

ไวรัสโอเฟจที่แยกได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ นอกจากนี้การศึกษสมบัติของไวรัสโอเฟจจะเป็นองค์ความรู้ ในการควบคุม และป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัสได้ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตการศึกษาวิจัย

1. แยกเชื้อไวรัสโอเฟจจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ
2. จัดจำแนกเชื้อไวรัสโอเฟจ
3. แยกไวรัสโอเฟจโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสต์
4. ศึกษาารูปร่างของไวรัสโอเฟจที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
5. ศึกษาสมบัติในการติดเชื้กับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นและจีนส์อื่นๆ
6. สกัดดีเอ็นเอของไวรัสโอเฟจและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ประวัติการค้นพบ

แบคทีเรียโอฟาจ เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรีย ค้นพบครั้งแรกโดย Twort นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ในปี 1915 โดยรายงานสาเหตุการติดเชื้อใน *Staphylococcus* เนื่องจากลักษณะโคโลนีที่ทำการเพาะเลี้ยงเปลี่ยนแปลงไปและแพร่ไปยังโคโลนีอื่น นอกจากนั้นตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อนี้สามารถผ่านเครื่องกรองได้ Twort จึงได้ตั้งสมมุติฐานอย่างหลากหลายและอธิบายลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ว่าสิ่งที่สามารถผ่านเครื่องกรองได้ คล้ายไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ (animal viruses) และพืช (plant viruses) อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวถูกมองข้ามจากนักวิทยาศาสตร์ ไม่มีการศึกษาค้นคว้าต่อ จนกระทั่งในปี 1917 d' Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดา ซึ่งทำงานอยู่ใน Pasteur Institute ได้ทดลองกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เป็นสาเหตุโรคบิด และพบว่าได้เกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Twort โดยเขาได้แยกเชื้อ *S. dysenteriae* จากอุจจาระและนำอุจจาระไปกรอง นำส่วนของเหลวที่ได้ผสมกับอาหารที่มีเชื้อ *S. dysenteriae* ช่วงกำลังเจริญ บ่มไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อ จึงสรุปว่าสิ่งที่ผ่านเครื่องกรองได้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และให้ความหมายของแบคทีเรียโอฟาจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams. 1958: 1-3)

ภายหลังจากการค้นพบของ d' Herelle ทำให้นักวิทยาศาสตร์ในสมัยนั้นพยายามศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโอฟาจ โดยทำการแยกไวรัสโอฟาจที่อยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้เป็นโฮสต์ (Goyal; Gerbra; & Bitton. 1987: 137) แต่ไม่สามารถแยกเฟจจากตัวอย่างได้ เนื่องจากขาดความจำเพาะระหว่างแบคทีเรียที่ใช้เป็นโฮสต์กับเฟจ (Zobell. 1946: 82) ต่อมาในปี 1954 ได้มีการแยกเฟจที่อยู่ในน้ำทะเล โดยใช้อาหารที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวเหมาะสมสำหรับการเจริญของโฮสต์ (Smith; & Krueger. 1954: 161-168) หลังจากนั้นในปี 1955 มีรายงานถึงการแยกเฟจที่จำเพาะกับแบคทีเรียเรืองแสงจากน้ำทะเล พบว่าอาหารที่มีเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เฟจจะไม่สามารถทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลาย แต่ถ้ามีเกลือ 2-3 เปอร์เซ็นต์ เฟจสามารถทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายได้ (Spencer. 1955: 690) ต่อมาการศึกษาเกี่ยวกับเฟจที่อยู่ในน้ำทะเลมีการพัฒนามากขึ้นเป็นลำดับ จนกระทั่งในปี 1993 มีการนำสมบัติของเฟจที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียมาใช้กับ *V. cholerae* 01 biotype El Tor ซึ่งทำให้การวินิจฉัยรวดเร็วแม่นยำยิ่งขึ้น (Chattopadhyay; et al. 1993: 1580) ต่อมาในปี 2000

นักวิทยาศาสตร์จึงได้อาศัยลักษณะที่มีความจำเพาะนี้เป็นวิธีในการแยกและจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *V. cholerae* 0139 (Chakrabarti; et al. 2000: 45)

2. สมบัติทั่วไปของแบคทีเรียโอฟาจ

แบคทีเรียโอฟาจมีสมบัติทั่วไป (Voyles. 2002: 83) ดังนี้คือ

2.1 สามารถดำรงชีวิตแบบอิสระได้ แต่การเพิ่มจำนวนอนุภาคโอฟาจเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่ออยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อโอฟาจหรือภายในโฮสต์เท่านั้น โดยอาศัยเมแทบอลิซึมของโฮสต์ในการผลิตโอฟาจรุ่นใหม่ออกมา

2.2 ไม่จัดเป็นเซลล์เพราะไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) หรือโครงสร้างอื่นๆ ของเซลล์

2.3 องค์ประกอบหลักของโอฟาจมีเพียงกรดนิวคลีอิกซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดใดชนิดหนึ่ง และส่วนของแคปซิด (capsid) ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) เพื่อป้องกันกรดนิวคลีอิกที่อยู่ภายใน

2.4 กรดนิวคลีอิกที่บรรจุอยู่ภายในส่วนใหญ่เป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) อาจพบชนิดอื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) หรือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA)

2.5 ขนาดของกรดนิวคลีอิกแตกต่างกันตามชนิดของโอฟาจ

3. การจัดจำแนกโอฟาจ

การจัดจำแนกอาศัยลักษณะรูปร่างของโอฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และชนิดของกรดนิวคลีอิก โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ตามวิธีของ Bradley ซึ่งเป็นพื้นฐานของการจัดหมวดหมู่ของโอฟาจในปัจจุบัน (Bradley. 1967: 230-234) ดังนี้ คือ

3.1 กลุ่ม A ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีส่วนหาง (tail) ที่มีซีทที่ยึดหดได้ห่อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่พบระยะงาค์ (appendage) เช่น โยหาง (tail fiber) เป็นโครงสร้างส่วนปลายสุด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ อาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยต่อไปอีกตามลักษณะรูปร่าง

3.2 กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีซีทห่อหุ้ม แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีระยะงาค์ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

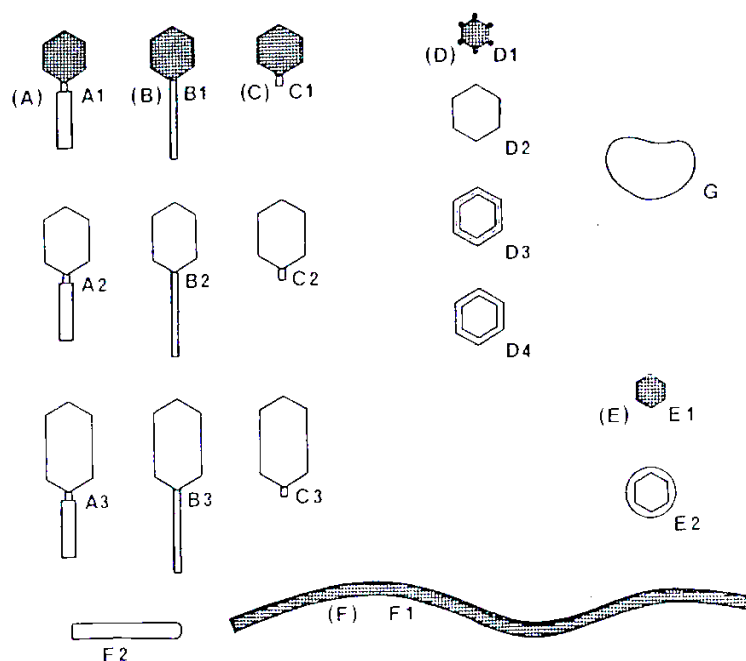
3.3 กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีซีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดรัดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีระยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

3.4 กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคปไซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคปซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

3.5 กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคปไซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

3.6 กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวมีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้พบเฟจกลุ่ม G ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน มี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ (Ackermann; et al. 1984: 61) แต่ไม่พบส่วนของแคปซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เช่น เฟจ MV-L2 โดยทั่วไปเฟจที่พบมีรูปร่างอยู่ในกลุ่ม A, B และ C ดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 การจัดจำแนกเฟจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดกรดนิวคลีอิก

ที่มา: Goyal; et al. (1987). *Phage Ecology*. p. 53.

ในการจัดหมวดหมู่ (classification) ของไวรัสมีการอธิบายน้อยกว่าในแบคทีเรีย เพราะขาดความรู้เบื้องต้น เช่น แหล่งกำเนิด วิวัฒนาการ โดยทั่วไปแบ่งไวรัสแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ไวรัสสัตว์ ไวรัสพืช และไวรัสแบคทีเรีย ซึ่งใช้ความแตกต่างของโฮสต์ในการแบ่งกลุ่ม อย่างไรก็ตามไม่สามารถจัดหมวดหมู่และตั้งชื่อ (nomenclature) ให้เป็นระบบเดียวกันได้ จนกระทั่งคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (international committee for taxonomy of viruses: ICTV) ได้พัฒนารูปแบบการจัดหมวดหมู่และแบ่งไวรัสเป็น 50 Families สำหรับชื่อ Family ให้ลงท้ายด้วยคำว่า -viridae เช่น Family Poxviridae ชื่อ Subfamily ให้ลงท้ายด้วยคำว่า -virinae เช่น Subfamily Chorodopoxvirinae และชื่อ Genus ให้ลงท้ายด้วยคำว่า -virus เช่น Genus *Orthopoxvirus* (Harley; & Klein. 1993: 363) การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ

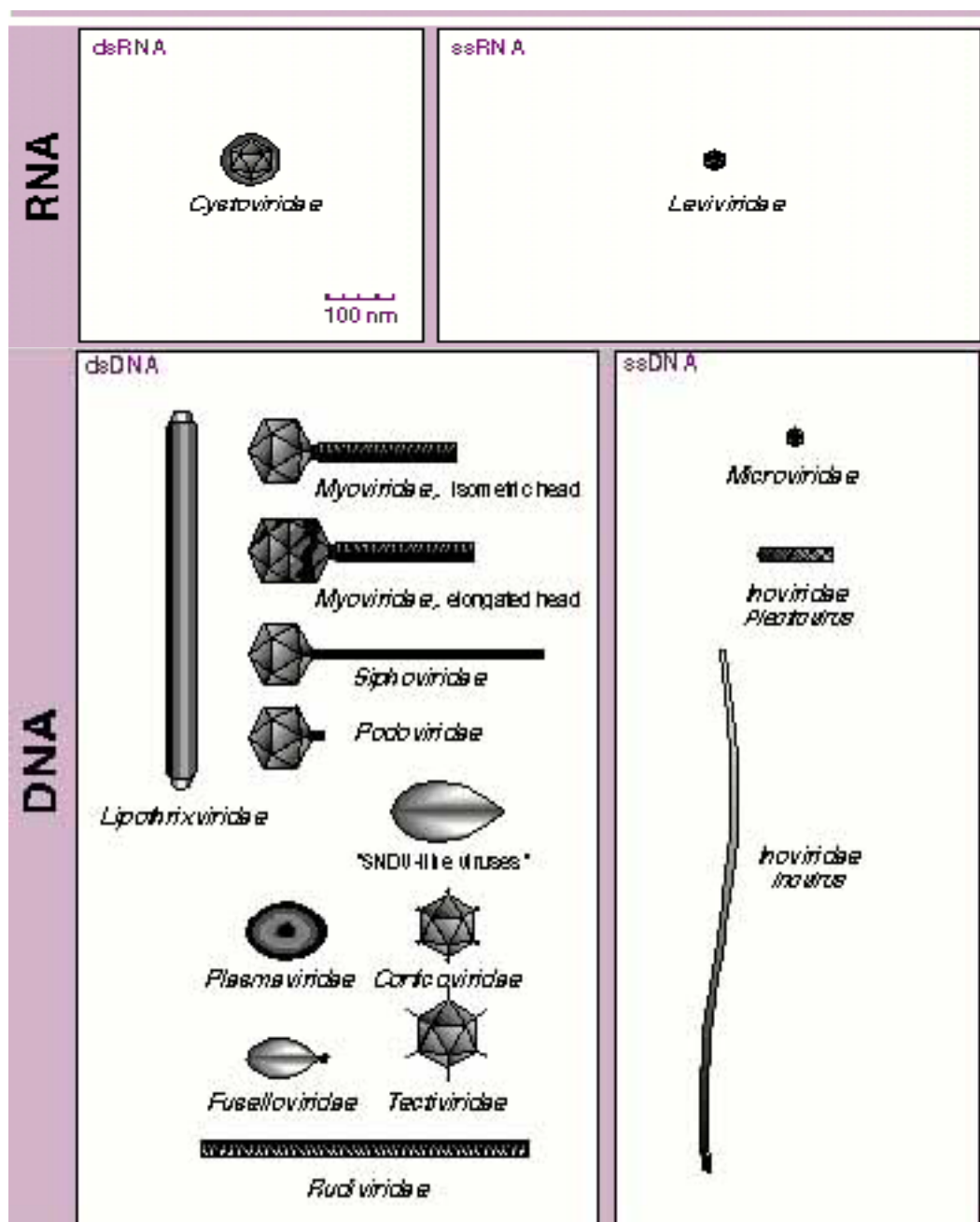
สมบัติต่างๆ ของไวรัสที่นำมาจัดทำอนุกรมวิธาน
1. รูปร่างและขนาด ความสมมาตรของแคปซิด การมี spike การมีหรือไม่มี envelope
2. สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีฟิสิกส์ของไวรัส
2.1 น้ำหนักโมเลกุล buoyant density และ sedimentation coefficient
2.2 ความทนต่อกรด ความร้อน ไอออนที่มีประจุบวก สารละลาย ผงซักฟอก และรังสี
2.3 ลักษณะของจีโนม ได้แก่ มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ
ความยาวของจีโนม เป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่ เป็นเส้นตรงหรือเป็นวงกลม
ถ้าเป็นท่อนมีจำนวนและความยาวเท่าใด
มี polarity เป็นบวกหรือลบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ G-C content การมี repetitive sequence elements การมี isomerization และชนิดของ 5'-terminal cap การมีหรือไม่มี 5'-terminal covalently-linked protein การมีหรือไม่มี 3'- terminal poly (A) tract
2.4 สมบัติของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ เช่น
จำนวน ขนาด และหน้าที่ของโปรตีนโครงสร้าง (structural protein)
จำนวน ขนาด และหน้าที่ของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (non-structural protein)
การมีโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษต่างๆ เช่น transcriptase, reverse transcriptase, hemagglutinin, neuraminidase และ fusion

ตาราง 1 (ต่อ)

สมบัติต่างๆ ของไวรัสที่นำมาจัดทำอนุกรมวิธาน
2.4 สมบัติของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ (ต่อ)
ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน
Epitope mapping
การมี glycosylation, phosphorylation และ myristylation
2.5 สมบัติของไขมัน ได้แก่ ปริมาณ ชนิด และอื่นๆ
2.6 สมบัติของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ปริมาณ ชนิด และอื่นๆ
2.7 การเรียงตัวของยีนในจีโนม (genome organization) และการเพิ่มจำนวน ได้แก่
การจัดลำดับยีน วิธีการเพิ่มจำนวน จำนวนและตำแหน่งของ open reading frame
การถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation)
Post-translational processing
ตำแหน่งภายในเซลล์ที่โปรตีนของไวรัสสะสมอยู่
ตำแหน่งภายในเซลล์ที่ไวรัสประกอบเป็นอนุภาค
ตำแหน่งและวิธีการที่ไวรัสเกิดเป็นอนุภาคสมบูรณ์ และออกจากเซลล์
2.8 สมบัติของแอนติเจน ได้แก่ สมบัติทาง serology
2.9 สมบัติทางชีววิทยา ได้แก่
โฮสต์-เรนจ์ ในธรรมชาติ
วิธีการติดต่อในธรรมชาติ การมีพาหะ การก่อโรค
สภาพภูมิศาสตร์ในแหล่งที่พบไวรัส
ความชอบต่อเนื้อเยื่อ (tissue tropism) และพยาธิวิทยา

ที่มา: พิลิปันท์ พุทธิวัฒน์. (2540). *ไวรัสวิทยา*. หน้า 2.2-2.3.

สำหรับการจัดจำแนก Family ของเฟจ เน้นสมบัติ 3 ประการ คือ ชนิดของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid type) จำนวนสายของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid strandedness) และการมีหรือไม่มี envelope โดยได้จัดจำแนกและตั้งชื่อ Family เฟจที่มีอยู่มากกว่า 2,000 ชนิด ตามที่มีการค้นพบในเวลานั้น (Lim. 1998: 390) ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การจัดจำแนก Family ของเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

ที่มา: Van Regenmortel; Fauquet; & Bishop. (2000). *Virus Taxonomy*. pp. 53-120.

4. โครงสร้างของเฟลจ

โครงสร้างของอนุภาคเฟลจประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ โปรตีนห่อหุ้มหรือแคพซิด เป็นโครงสร้างภายนอก และกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ภายในแคพซิด

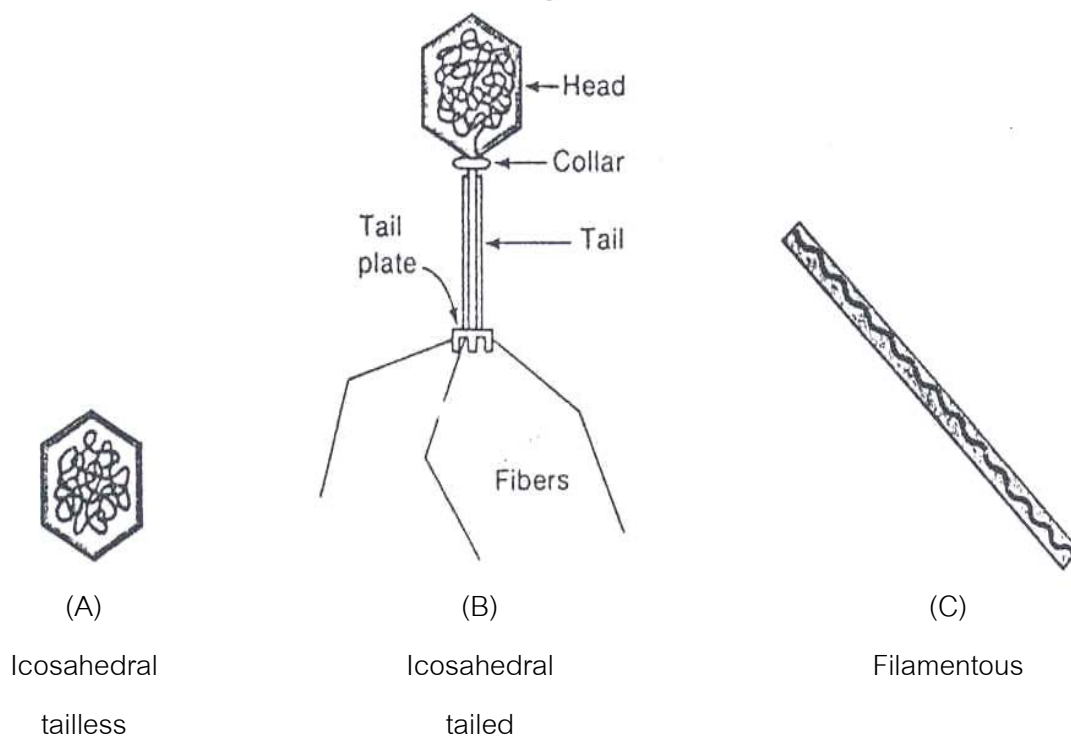
4.1 แคพซิด

แคพซิด เป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคเฟลจ ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกไว้ภายใน ช่วยป้องกันกรดนิวคลีอิกจากการถูกทำลายด้วยรังสี อุณหภูมิ สารเคมี แคพซิดประกอบด้วย โปรตีนหน่วยย่อย เรียกว่า แคปโซเมอร์ (capsomer) เมื่อแคปโซเมอร์มาต่อกันทำให้เกิดรูปร่าง แบบต่างๆ ดังนี้ (Mckane; & Kandel. 1996: 306-309; Maloy; et al. 1994: 82)

4.1.1 รูปทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral structure) เช่น รูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral) โดยโครงสร้างบริเวณส่วนหัว มีมุมยอดทั้งหมด 12 มุม แต่ละมุมประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 5 หน่วย มารวมกันเรียกว่า เพนตอน (penton) นอกจากนี้มีหน้าสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้า เกิดจากแคปโซเมอร์ 6 หน่วย เรียก เฮกซอน (hexon) มาเรียงตัวรอบเพนตอน ดังแสดงในภาพประกอบ 3 (A)

4.1.2 โครงสร้างซับซ้อน (complex structure) จะมีส่วนหางที่เกิดจากการเรียงตัวของแคปโซเมอร์ต่อจากส่วนหัวลงมา ในลักษณะที่เรียงตัวแบบขดเป็นเกลียวและส่วนหางอาจประกอบด้วยซีทห่อหุ้มแกนกลาง (core) แผ่นฐาน (base plate) และใยหาง ดังแสดงในภาพประกอบ 3 (B)

4.1.3 แบบสายยาว (filamentous structure) เกิดจากแคปโซเมอร์มาเรียงต่อกันใน ลักษณะแบบขดเป็นเกลียว มีกรดนิวคลีอิกเป็นแกนกลาง ดังแสดงในภาพประกอบ 3 (C)

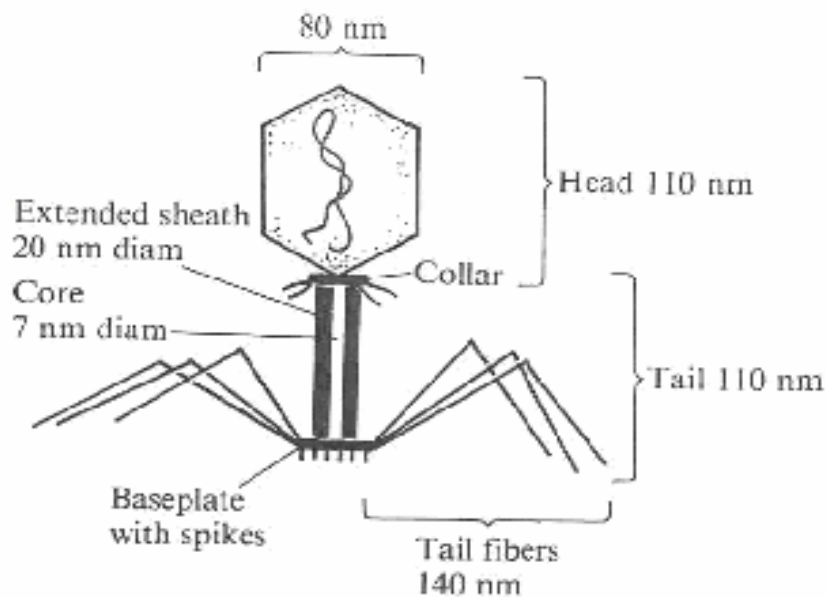


ภาพประกอบ 3 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคเฟจ (A) รูปทรงหลายเหลี่ยม
(B) โครงสร้างซับซ้อน (C) แบบสายยาว

ที่มา: Maloy; Cronan; & Freifelder. (1994). *Microbial Genetics*. p. 82.

4.2 กรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกที่พบเป็นองค์ประกอบของอนุภาคเฟจ อาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอนุภาคของเฟจส่วนมากมีกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายคู่ นอกจากนี้ อาจพบดีเอ็นเอสายเดี่ยว อาร์เอ็นเอสายคู่ และอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว โดยกรดนิวคลีอิกจะอัดตัวแน่นอยู่ภายในแคปซิด (Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 82) ดังแสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของอนุภาคเฟจ

ที่มา: Boyd. (1995). *Basic Medical Microbiology*. p. 403.

5. วงชีวิตของเฟจ

วงชีวิตของเฟจ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

5.1 วงชีวิตแบบไลติก (Lytic cycle)

เฟจที่เพิ่มจำนวนโดยใช้วงชีวิตนี้ เรียกว่า ไวรulent เฟจ โดยเฟจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ติดเชื้อ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตายเพื่อปล่อยเฟจรุ่นใหม่ออกมา (Boyd. 1995: 403; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 84-85)

ตัวอย่าง เช่น วงชีวิตของเฟจ T7 ของ *E. coli* ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

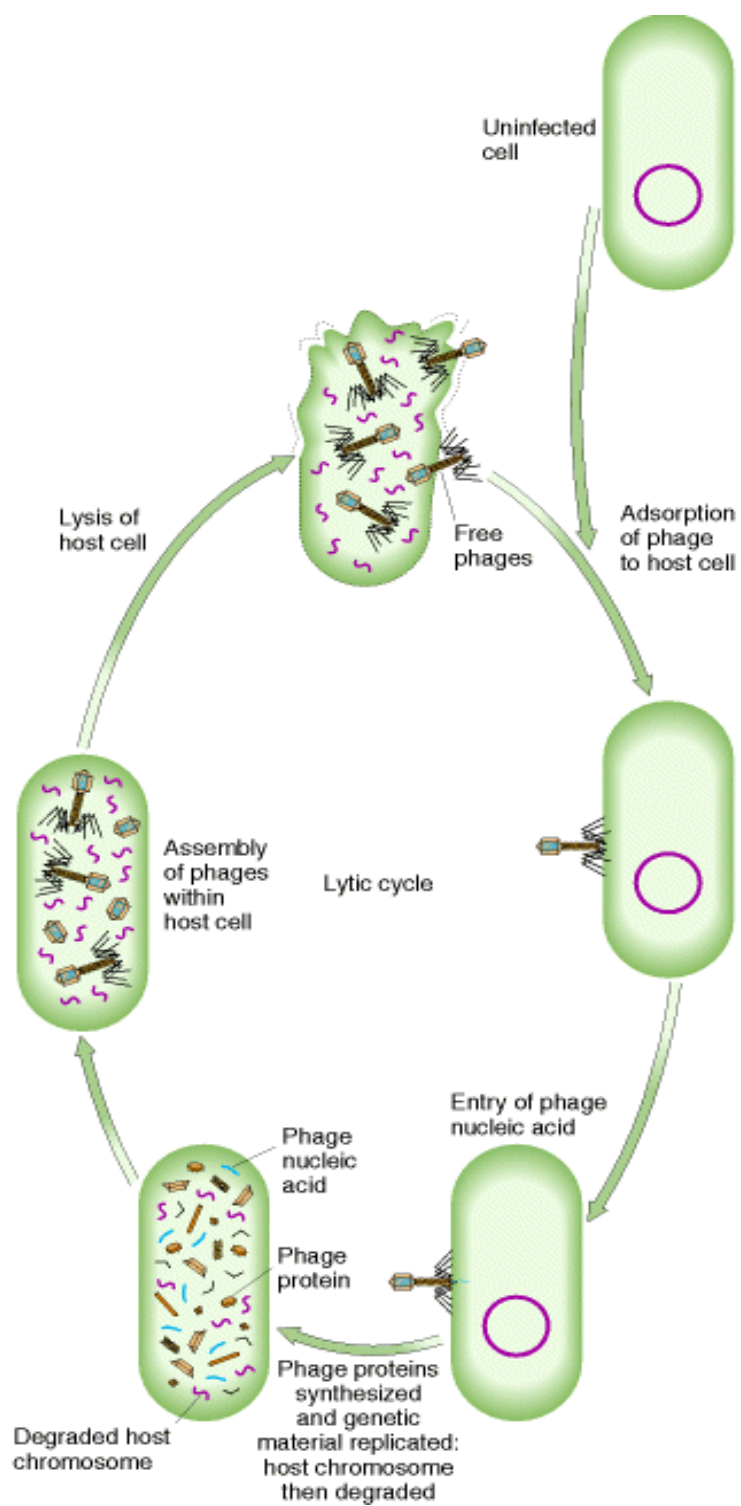
5.1.1 การเกาะติด (adsorption) เฟจจะอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติด (attachment site) ของเฟจ กับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) บนเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ แคปซูล พิไล แฟลกเจลลา โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเปปติโดไกลแคน เป็นต้น ตำแหน่งเกาะติดของเฟจและตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์ของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก ถ้าแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ จะทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเกิดการต้านทานต่อการติดเชื้อเฟจเดิมที่เคยทำให้เกิดการติดเชื้อได้

5.1.2 การส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (penetration) ขั้นตอนนี้เฟจจะปล่อยกรดนิวคลีอิกผ่านผนังเซลล์จนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย ส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่นยังคงอยู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

5.1.3 การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของเฟจ (biosynthesis) เมื่อกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของเฟจ เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ หลังจากนั้นดีเอ็นเอของเฟจจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ของเฟจ และ mRNA ของเฟจจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของเฟจ โดย mRNA ที่สร้างขึ้นในช่วงแรก (early mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์และโปรตีน ที่จำเป็นสำหรับทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ส่วน mRNA ที่สร้างขึ้นช่วงหลัง (late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของเฟจ เช่น แคพซิด หาง เป็นต้น หรือแปลรหัสเป็นโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อปลดปล่อยอนุภาคเฟจรุ่นใหม่ออกมา

5.1.4 การประกอบตัวของเฟจ (assembly) ขั้นตอนนี้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคเฟจ เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคพซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคพซิดจะเชื่อมต่อกับชีทห่อหุ้มและส่วนหาง แล้วประกอบกันเป็นอนุภาคเฟจที่สมบูรณ์

5.1.5 การแตกสลายของแบคทีเรีย (lysis) ขั้นตอนนี้อนุภาคเฟจรุ่นใหม่จะถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตาย เซลล์ของแบคทีเรียที่แตกสลายนี้ เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) และ โฮลิน (holin) ซึ่งหลังโดยเฟจ เพื่อย่อยผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 วงชีวิตแบบไลติก

ที่มา: Griffiths; et al. (1999). *Genetic Analysis*. (Online).

5.2 วงชีวิตแบบไลโซเจนิค (Lysogenic cycle)

เฟจที่มีวงชีวิตทั้งแบบไลโซเจนิคและแบบไลติค เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) (Alcamo. 1996: 338; Mckane; & Kandel. 1996: 317) ตัวอย่าง เช่น แลมดาเฟจ (lambda phage) ที่มีความจำเพาะกับ *E. coli* ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

5.2.1 การเกาะติด

5.2.2 การส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฟจจะส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจ ที่มีลักษณะเป็นสายตรงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย จากนั้นกรดนิวคลีอิกที่เป็นสายตรงจะเปลี่ยนเป็นรูปร่างแบบปิด ซึ่งขั้นตอนที่ 1 และ 2 ของวงชีวิตแบบไลโซเจนิคยังคงเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติค

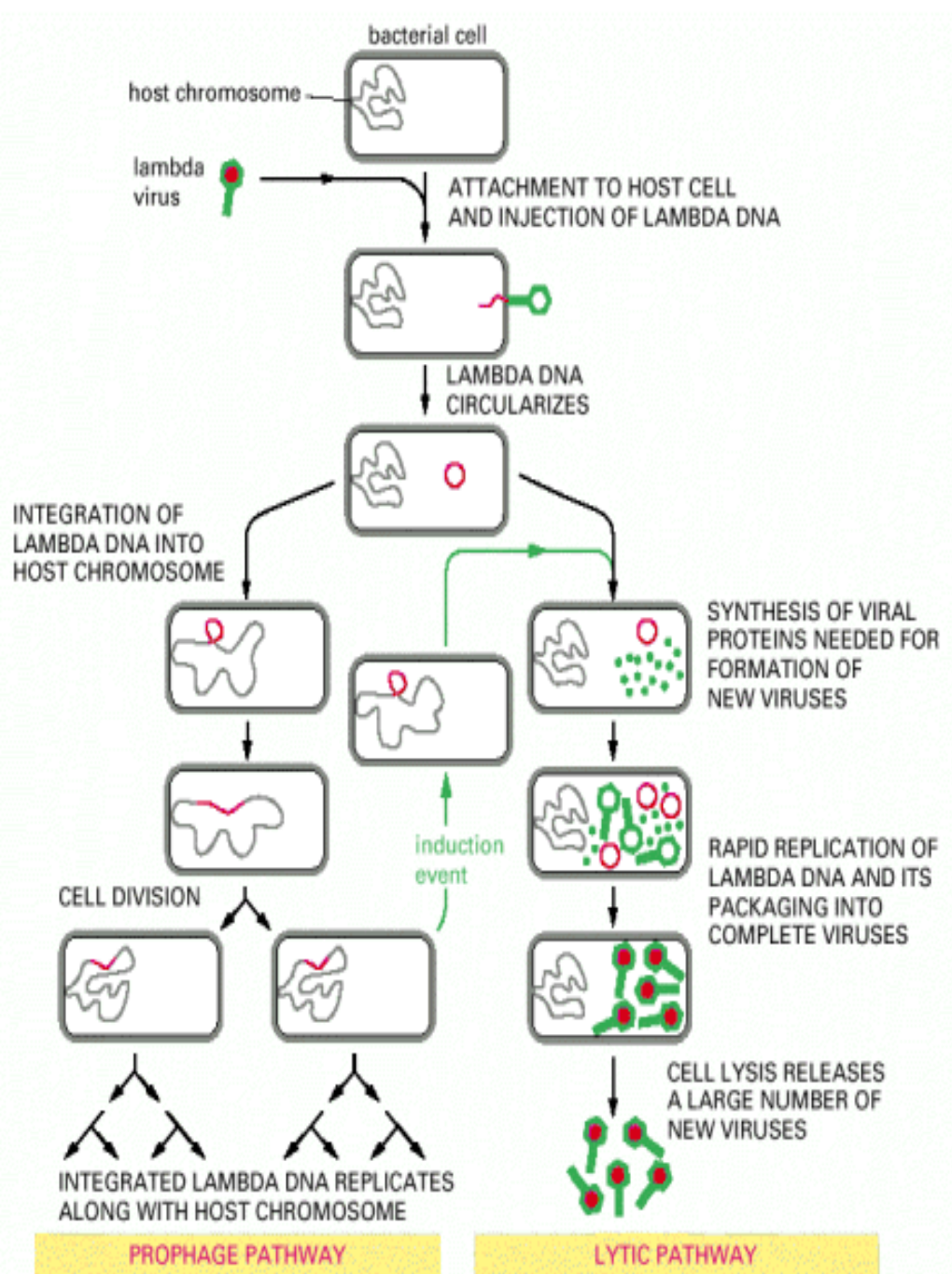
5.2.3 การสอดแทรกดีเอ็นเอของเฟจในโครโมโซมของโฮสต์ (integration) โดยอาศัย เอนไซม์ integrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของกรดนิวคลีอิกของเฟจ เข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกเฟจระยะนี้ว่า โปรเฟจ และเรียกแบคทีเรียที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ว่า ไลโซเจน ขั้นตอนนี้จะเริ่มจากการจำลองดีเอ็นเอ ถอดรหัส และแปลรหัส จนได้โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส (RNA polymerase) จึงไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ของเฟจได้ เมื่อเฟจเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้ว เฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมแบคทีเรีย

5.2.4 การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติค (induction) การชักนำเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ดังนี้

- ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหาย โปรเฟจจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรีย เข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค

- ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอัลตราไวโอเลต (Voyles. 2002: 96) หรือสารเคมี เช่น มิโตมายซิน ซี (mitomycin C) (Lim. 1998: 411)

เมื่อแบคทีเรียตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกเหล่านี้ทำให้ repressor ถูกทำลาย เฟจจะเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 วงชีวิตแบบไลโซเจนิคของแลมดาเฟจ

ที่มา: Alberts; et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (Online).

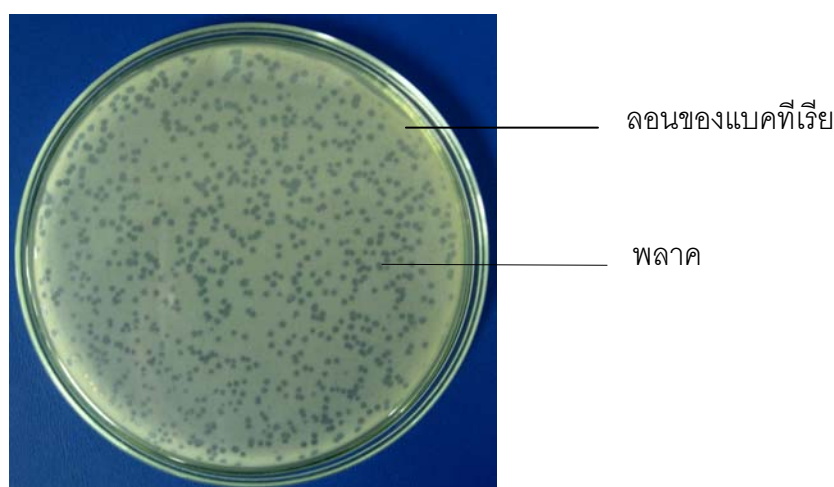
6. การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสต์

การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสต์ที่ใช้เทคนิคที่เรียกว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) โดยนำเฟจและแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ที่มีความจำเพาะกัน มาผสมกันในอาหารวุ้นเหลว แล้วเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–24 ชั่วโมง พบว่าโฮสต์หรือแบคทีเรียที่ไม่ติดเชื้อ สามารถเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารชั้นบนสุด เรียกว่า ลอน (lawn) แต่ถ้าพบว่ามีบริเวณที่มีลักษณะใสขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย เรียกลักษณะนี้ว่า พลาคว (plaque) (Cappuccino; & Sherman. 2001: 231) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อเฟจและแตกสลาย เกิดการปลดปล่อยอนุภาคเฟจรุ่นใหม่ออกมา อนุภาคเฟจที่ปลดปล่อยออกมาสามารถเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณข้างเคียง จนเกิดเป็นวงใสสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในบริเวณนี้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพประกอบ 7

ลักษณะของพลาคว มี 2 แบบ คือ

1. พลาควใส (clear plaque) พลาควที่ปรากฏจะมีลักษณะใส เนื่องจากเฟจเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลติก เฟจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตายจึงเห็นเป็นวงใส เฟจทำให้เกิดพลาควในลักษณะนี้ เรียกว่า ไวรัเรนทเฟจ

2. พลาควขุ่น (turbid plaque) พลาควที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น เฟจที่ทำให้เกิดพลาควมีลักษณะขุ่น เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ โดยเริ่มแรกเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบไลติก จนถึงระยะหนึ่งเฟจบางส่วนจะเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลโซเจนิก ซึ่งแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อโดยเฟจชนิดนี้ จะไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์ จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาคว ทำให้เห็นพลาควมีลักษณะขุ่น



ภาพประกอบ 7 ลักษณะของพลาควที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย

7. การศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของเฟจ

เฟจบางชนิดมีความจำเพาะสูง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสปีชีส์เดียวหรือเพียง 2-3 สปีชีส์ เรียกว่า เฟจมีโฮสต์-เรนจ์แคบ บางชนิดอาจทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียหลายสปีชีส์ เรียกว่า เฟจมีโฮสต์-เรนจ์กว้าง ดังนั้นการศึกษาโฮสต์-เรนจ์ คือ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเฟจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากแบคทีเรียที่ใช้แยกเฟจชนิดนั้น ปัจจุบันนำมาทดสอบความจำเพาะกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์หรือจีโนส (Matsuzaki; et al. 1992: 93-97) ต่อมาได้มีการเรียกเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสปีชีส์เดียวว่า monovalent phage และเรียกเฟจที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียมากกว่า 1 สปีชีส์ว่า polyvalent phage (Kalmanson; & Bronfenbrenner. 1942: 13)

รายงานการศึกษาโฮสต์-เรนจ์ หรือการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเฟจ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียที่ใช้แยกเฟจชนิดนั้น มีรายงานว่า เฟจ 0139 5 ชนิด ที่แยกได้โดยการใช้ *V. cholerae* 0139 เป็นโฮสต์ เมื่อนำเฟจดังกล่าวมาทดสอบกับ *V. cholerae* 01 biotype El Tor strain MAK 757, *V. cholerae* 01 classical biotype strain 569 และ *V. cholerae* 154 พบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมดมีความต้านทานต่อเฟจ 0139 โดยเซลล์ไม่เกิดการแตกสลาย เมื่อนำเฟจ 0139 นี้ไปทดสอบกับแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารอื่น เช่น *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ *E. coli* พบว่าไม่เกิดการติดเชื้อโดยเฟจ 0139 เช่นกัน (Chakrabarti; et al. 2000: 44-49)

8. การศึกษารูปร่างของเฟจ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือสำหรับนำมาศึกษารูปร่างและวัดขนาดเฟจ โดยมักจะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) และย้อมตัวอย่างเฟจด้วยวิธีเนกาทีฟสเตนนิ่ง (negative staining) โดยใช้ uranyl acetate หรือ phosphotungstic acid ทำให้เห็นรูปร่างเฟจมีสีอ่อนบนพื้นผิว (background) ที่ทึบแสง สำหรับการวัดขนาดอนุภาคเฟจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจเกิดความผิดพลาด อันเนื่องมาจากตัวอย่างเฟจแห้งมาก ทำให้ขนาดที่วัดได้เล็กกว่าความเป็นจริง หรืออาจมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเงาของโลหะที่พอกตัวหนาเกินไป (Zachary. 1976: 415-422; Kay; & Bradley. 1960: 553-563)

9. ลักษณะทั่วไปของจิ้นสวิริโอ

เชื้อในจิ้นสวิริโอ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างโค้งงอ ไม่มีเอนโดสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเส้นเดียวหรือบางชนิดมีสองเส้นหรือมากกว่าที่ขั้วเดียวกัน (วิลาวณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539: 85) มักไม่สร้างแคปซูล คุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 18-37 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-9.0 สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสและไม่เกิดแก๊ส ยกเว้น *V. fummisii* ที่สามารถสร้างแก๊ส สร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ บางชนิดเป็น halophile โดยต้องการเกลือสำหรับการเจริญความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-12 เปอร์เซ็นต์ แต่โดยทั่วไปต้องการเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น *V. cholerae* และ *V. mimicus* สามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีเกลือ พบในน้ำจืด น้ำเค็ม ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ การแยกเชื้อจิ้นสวิริโอจะใช้อาหาร selective media ที่ชื่อ TCBS (thiosulfate citrate bile salt sucrose agar) โดยนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TCBS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏจะมีสีเขียวและสีเหลือง โคโลนีสีเขียวเกิดจากเชื้อไม่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครส โคโลนีสีเหลืองเกิดจากเชื้อสามารถย่อยน้ำตาลซูโครส ตัวอย่างเชื้อที่ให้โคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. mimicus* ส่วนเชื้อที่ให้โคโลนีสีเหลือง ได้แก่ *V. cholerae*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. fummisii*, *V. alginolyticus* เป็นต้น ยกเว้น *V. harveyi* อาจให้โคโลนีที่มีลักษณะทั้งสีเขียวและสีเหลือง (Elliot; et al. 1995: 9.10)

9.1 *V. cholerae* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในจิ้นสวิริโอ ก่อให้เกิดโรคอหิวาตกโรค อูจจะระออกมอล้ายน้ำขาวขำว พบระบาดได้ง่ายในประเทศที่ระบบสุขภาพไม่ดี จึงมีการปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำดื่มที่ไม่สะอาด เชลล์มีรูปร่างเป็นท่อนโค้งหรือท่อนตรง ติดสแกรมลบ มีแฟลกเจลลาที่ขั้ว 1 เส้น (ดังแสดงในภาพประกอบ 8) ในการวิเคราะห์เชื้อนั้น เมื่อได้รับสิ่งส่งตรวจมาจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS กรณีที่มีเชื้อจำนวนน้อยอาจเพิ่มจำนวนเชื้อโดยเลี้ยงใน alkaline peptone water หรือ sodium gelatin phosphate broth เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วจึงใช้อาหาร TCBS แยกเชื้อ โดย *V. cholerae* จะให้โคโลนีสีเหลือง ตรงกลางโคโลนีที่บวมและรอบๆ โปร่งแสง เมื่อทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีเกลือ ไม่สามารถย่อยน้ำตาลอะราบินอสและน้ำตาลเซลโลไบโอสได้ (Elliot; et al. 1995: 9.06)

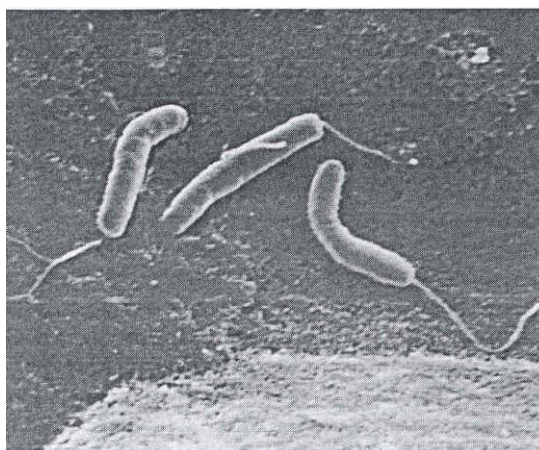
ปัจจุบัน *V. cholerae* แบ่งออกเป็น 3 subgroup ได้แก่ *V. cholerae* 01, *V. cholerae* non-01 และ *V. cholerae* 0139

9.1.1 *V. cholerae* 01 เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรค 7 ครั้ง ตั้งแต่ปี 1816 จนกระทั่งปัจจุบัน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร

ปวดกล้ามเนื้อ ผิวแห้ง สูญเสียน้ำมากถึง 1 ลิตรต่อชั่วโมง อาจเกิดอาการช็อคและตายอย่างเฉียบพลัน

9.1.2 *V. cholerae* non-01 ผลิตสารพิษ (toxin) ทำให้เกิดอาการคล้ายอหิวาตกโรค และทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถแยกได้จากอาหารทะเลหรือจากผู้ป่วย ในบริเวณหมู่ บาดแผล ทางเดินหายใจ และปัสสาวะ (Baron; et al. 2003: 707)

9.1.3 *V. cholerae* 0139 เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรค เริ่มพบในปี 1992 ที่ประเทศอินเดีย มีลักษณะที่แตกต่างจาก *V. cholerae* 01 คือ สามารถสร้างแคปซูลได้



ภาพประกอบ 8 รูปร่างของ *V. cholerae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) กำลังขยาย 12,000 เท่า

ที่มา: Boyd. (1995). *Basic Medical Microbiology*. p. 316

9.2 *V. parahaemolyticus* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร เพราะธรรมชาติทั่วไปของเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ในทะเล มักมีการปนเปื้อนมากับอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยนางรม กุ้ง ปู การเกิดการระบาดมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือมีการปนเปื้อนภายหลัง อาการจะเกิดภายหลังการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปตั้งแต่ 2-48 ชั่วโมง โดยมีอาการปวดท้อง ท้องร่วง ถ่ายเป็นน้ำมีเลือดปน คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ต่ำ บางครั้งก่อให้เกิดโรคโลหิตเป็นพิษพร้อมทั้งเกิดอาการช็อค ปัจจุบันการติดเชื้อชนิดนี้นับวันจะเพิ่มมากขึ้นในหลายประเทศ พบการระบาดมากในช่วงฤดูร้อน (Baross; et al. 1978a: 492) แต่ในช่วงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 13-15 องศาเซลเซียส พบการระบาดน้อยมากหรือไม่พบเลย

V. parahaemolyticus สามารถแยกเชื้อได้ครั้งแรก จากการระบาดในประเทศญี่ปุ่นช่วงต้นทศวรรษ 1950 มีผู้ป่วย 272 คน และเสียชีวิต 20 คน ต่อมาศูนย์ป้องกันและควบคุมโรค (center for disease control and prevention) เริ่มได้รับการรายงานการระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อวันที่ 1 มกราคม 1973 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 1998 (Daniels; et al. 2000: 1662) ปัจจุบันยังพบการระบาดในประเทศแถบทวีปเอเชีย (Wong. 2003: 79) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS มีสีเขียว นอกจากนี้ยังสามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือสูงสุด 10 เปอร์เซ็นต์ และย่อยน้ำตาลอะราบิโนสได้ ทำให้แยกออกจากสปีชีส์อื่นๆ ได้ง่าย (Elliot; et al. 1995: 9.02)

9.3 *V. vulnificus* การเกิดการระบาดมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารทะเลดิบ ทำให้เกิดการติดเชื้อทางกระแสเลือด นอกจากนี้อาจติดเชื้อที่บริเวณบาดแผล และอาจทำให้ถึงตายได้ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS มีสีเขียวคล้ายกับ *V. parahaemolyticus* แต่สามารถแยกออกจากกันได้ เนื่องจาก *V. vulnificus* สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือสูงสุด 6 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถย่อยน้ำตาลอะราบิโนส แต่สามารถย่อยน้ำตาลเซลโลไบโอสได้ (Elliot; et al. 1995: 9.02)

9.4 *V. alginolyticus* พบทั่วไปจากตัวอย่างอาหารทะเลและพบการแพร่กระจายทั่วโลก สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่บาดแผล จึงแยกเชื้อนี้ได้จากบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการติดเชื้อ นอกจากนี้ในบางครั้งสามารถแยกได้จาก หู และตา ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS มีสีเหลือง สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือสูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถย่อยน้ำตาลอะราบิโนส และน้ำตาลเซลโลไบโอส (Baron; et al. 2003: 710; Boyd. 1995: 318) การจำแนกสปีชีส์ในจิ้นัส *Vibrio* สามารถจำแนกได้จากการทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 การทดสอบทางชีวเคมีของจิ้นส์วิบริโอ

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. damsela</i>
TCBS agar	Y	G	Y	G	G	G
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	V
Growth at 42°C	+	+	+	+	+	-
Growth in :						
0% NaCl	+	+	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	-	-	+	+	+	V
8% NaCl	-	-	+	-	+	-
10% NaCl	-	-	+	-	-	-
Acid from :						
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	+	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	+	V	+
Lactose	-	-	-	+	-	-
Arabinose	-	-	-	-	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	V	+	-
Salicin	-	-	-	+	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	-	+	-	-
Voges-Proskauer	V	-	+	-	-	+
Indole	+	+	+	+	+	-
Citrate, Simmons	+	+	-	+	-	-
Motility(36°C)	+	+	+	+	+	V
Gelatinase	+	+	+	+	+	-

Abbreviations: TCBS, thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose; Y= yellow; G = Green; V = variable

ที่มา: Baron; et al. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. p.709.

9. วิบริโอเฟจ

วิบริโอเฟจ หมายถึง เฟจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียในจีนัสวิบริโอ วิบริโอเฟจที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ เฟจที่มีความจำเพาะกับ *V. cholerae* ซึ่งเป็นสาเหตุการระบาดของอหิวาตกโรค เพื่อนำมาใช้พัฒนาการจำแนกและจัดหมวดหมู่ *V. cholerae* สายพันธุ์ต่างๆ ตามความไวต่อการติดเชื้อเฟจ ตัวอย่างเฟจที่แยกได้จากการใช้ *V. cholerae* เป็นโฮสต์ ได้แก่ เฟจ 0139 และ เฟจ K 139 (Nesper; et al. 1999: 2902-2913) เฟจ CTX (Waldor; & Mekalanos. 1996: 1910-1914) เฟจ VPI (Boyd; Davis; & Hochhut. 2001: 137-143) นอกจากนี้มีการศึกษาเฟจที่แยกได้จากการใช้ *V. parahaemolyticus* เป็นโฮสต์ ได้แก่ เฟจ VP เฟจ 16T เฟจ VP16C (Seguritan; et al. 2003: 6434-6477) และ เฟจ VP3 (Koga; & Kawata. 1981: 737-740)

แบคทีเรียจีนัสวิบริโอสามารถแยกได้จากผู้ป่วย ปลา สัตว์ทะเล และสิ่งแวดล้อมในทะเลบริเวณชายฝั่ง ดังนั้นจึงสามารถแยกเฟจได้จากแหล่งเดียวกัน ตัวอย่างเช่น ในปี 1978 Baross และคณะได้แยกวิบริโอเฟจ จากหอยนางรม ปู กุ้ง น้ำทะเล และตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเล รายงานการแยกวิบริโอเฟจจากแหล่งเหล่านี้ พบเฟจสูงมากเมื่อแยกจากสัตว์ทะเลเช่น หอยนางรม พบ 35 เปอร์เซ็นต์ หอยสองฝา 24 เปอร์เซ็นต์ ปู 33 เปอร์เซ็นต์ กุ้ง 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำทะเลและตะกอนพบน้อย โดยพบว่าสามารถแยกได้จากน้ำทะเล 3 เปอร์เซ็นต์ และตะกอน 7 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Baross; Liston; & Morita. 1978a: 492-499)

ปัจจัยที่มีผลต่อวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างที่มาจากทะเล ได้แก่ ปริมาณเกลือในอาหารที่ใช้แยก ในปี 1955 มีการแยกเฟจจากน้ำทะเลบริเวณทะเลเหนือ พบว่าในอาหารที่มีเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เฟจไม่สามารถทำให้เซลล์ของโฮสต์แตกสลาย แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 2-3 เปอร์เซ็นต์ โฮสต์จะเกิดการติดเชื้อและเซลล์แตกสลายได้ (Spencer. 1955: 690) นอกจากนี้ปัจจัยของเกลือแล้ว ในปี 1970 มีการศึกษาปัจจัยของ CaCl_2 , MgSO_4 , tryptone, cysteine และ phosphate ที่มีผลต่อเฟจ V-45 ที่แยกจากโฮสต์ *V. fetus* (Bryner; et al. 1970: 94-99)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเฟจของ *V. parahaemolyticus* พบว่าเฟจกลุ่ม I เมื่อใช้ความร้อนยับยั้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่เฟจในกลุ่ม II, III และ IV ทนได้มากกว่าเฟจกลุ่ม I โดยยับยั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466-470) ส่วนเฟจ V-45 ถูกยับยั้งการทำงานที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Bryner; et al. 1970: 94-99; Faruque; et al. 2005: 1701-1707)

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาไวรัสโอเฟจที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง คือ เทคนิค phage typing ซึ่งเป็นการอาศัยสมบัติความจำเพาะของแบคทีเรียและเฟจ มาจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสหรือสปีชีส์เดียวกันตามความไวต่อการติดเชื้อเฟจ (Basu; & Mukerjee. 1968: 299) ซึ่งได้เริ่มขึ้นในปี 1952 โดยองค์การอนามัยโลก (world health organisation, WHO) ได้แนะนำให้มีการศึกษา *V. cholerae* จากจุดที่เกิดการระบาด โดยอาศัยสมบัติความจำเพาะของแบคทีเรียและเฟจ (Mukerjee; & Phil. 1963: 337) ต่อมาในปี 1955 ที่ประเทศอินเดีย ได้ทำการศึกษาโดยใช้สมบัติดังกล่าวกับ *V. cholerae* เป็นสปีชีส์แรก โดยนำโฮสต์และเฟจที่รวบรวมได้ตั้งแต่ปี 1955-1961 จากอุจจาระผู้ป่วย แห่ล้างน้ำ และมีบางส่วนได้รับจากประเทศไทยที่เกิดการระบาดในระหว่างปี 1959-1960 (Mukerjee; & Phil. 1963: 337) ในปี 1965 มีการแยกเฟจ ของ *V. cholerae* El Tor ได้ 5 ชนิด (Basu; & Mukerjee. 1968: 300) ในปี 1989 มีการแยกเฟจของ *V. cholerae* El Tor อีก 5 ชนิดและนำไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Ghosh; Ansari; & Datta. 1989: 2242) จากรายงานการอาศัยความจำเพาะของแบคทีเรียและเฟจมาจัดหมวดหมู่ *V. cholerae* พบว่ามีสายพันธุ์ของ *V. cholerae* ประมาณ 20 เปอร์เซนต์ ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ตามความไวต่อการติดเชื้อเฟจ อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามพัฒนาเทคนิค phage typing เพื่อให้สามารถจัดหมวดหมู่สายพันธุ์ของ *V. cholerae* El Tor ให้ได้ 100 เปอร์เซนต์ (Chattopadhyay, et al. 1993: 1579) นอกจากนี้ การศึกษาเทคนิค phage typing กับ *V. cholerae* สายพันธุ์อื่นยังคงดำเนินมาอย่างต่อเนื่อง เช่น ในปี 2000 มีรายงานการแยกเฟจของ *V. cholerae* 0139 และใช้เทคนิค phage typing เปรียบเทียบสายพันธุ์ของ *V. cholerae* ที่พบในแต่ละปี (Chakrabarti, et al. 2000: 44) สมบัติด้านความจำเพาะของเฟจนี้เป็นที่ยอมรับในการวิเคราะห์แหล่งกำเนิด เส้นทางการแพร่ระบาด เพื่อควบคุมการระบาดและการจัดหมวดหมู่สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ และวิธีนี้ยังมีข้อดีเหนือกว่าวิธีอื่น คือ ประหยัด รวดเร็ว และแม่นยำ (Basu; & Mukerjee. 1968: 299-300; Wagner; & Waldor. 2002: 3985-3993.)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubators) (บริษัท SHEL-LAB)
เครื่องเขย่า (shaker) (บริษัท IKA Labortechnik)
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (บริษัท Astell)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) (บริษัท Science Tech)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot – air sterilizing oven) (บริษัท Fisher Scientific)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) (บริษัท Du Pont)
กล้องจุลทรรศน์ (microscope) (บริษัท Olympus)
กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) (บริษัท Jeol)
เครื่องซังสาร (บริษัท AND)
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (บริษัท Sanyo)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Brain heart infusion agar (BHA)
Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)
Citrate medium
Lysine decarboxylase medium
Tryptone broth medium
Alpha- naphthol solution
40% KOH solution
Tetramethyl-p- phenylenediamine dihydrochloride
Sodium chloride
Polyethylene glycol 8000
Sodium dodecyl sulfate
Sodium acetate

Chloroform

Absolute ethanol

สารละลาย phenol: chloroform (อัตราส่วน 1:1)

Ethidium bromide

Loading dye

TE buffer (pH 8.0)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BglII*, *PstI*, *HindIII*, *NdeI*

เอนไซม์ RNase I

เอนไซม์ DNase I

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อไวรัส

ตัวอย่างอาหารทะเลดิบ เช่น ปลาหมึก หอยนางรม (ถ้ายังไม่ได้ทำการทดลอง ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ใช้ loop เผลาไฟจนแดง รอจนเย็นแล้วนำ loop แต่ละบริเวณต่างๆ ของอาหารทะเลแล้วนำมา streak ลงบนอาหาร thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) (ภาคผนวก ก) ทำตัวอย่างละ 2 plates บ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างน้ำทะเลใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดน้ำตัวอย่าง 0.1-0.3 มิลลิลิตร ทำการ spread plate ลงบนอาหาร TCBS ทำตัวอย่างละ 2 plates นำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อมีจำนวนมากให้ใช้ loop เผลาไฟจนแดง รอจนเย็นแล้วนำ loop แต่ละน้ำทะเล แล้วนำมา streak ลงบนอาหาร TCBS

2. การจัดจำแนกเชื้อไวรัส

2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

2.1.1 รูปร่าง คัดเลือกโคโลนีสีเขียวและสีเหลืองที่เจริญบนอาหาร TCBS ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ลงบนอาหารวุ้นเอียง brain heart infusion agar (BHA) ที่มีเกล็ด 3 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส โดยเชื้อไวรัสจะให้ผลบวก (ภาคผนวก ค ข้อ 1)

2.1.3 การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสอาหารที่ใช้ คือ phenol red broth base ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อไวรัสจะให้ผลบวก (ภาคผนวก ค ข้อ 6)

ถ้าเชื้อทดสอบให้ผลบวกทั้ง 3 ข้อ คาดว่าเป็นเชื้อโนจีนัสไวรัส นำเชื้อที่ได้ไปทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพื่อจำแนกสปีชีส์ต่อไป

2.2 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.2.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญได้ที่มีเกล็ดความเข้มข้นสูงหรือในสภาพไม่มีเกล็ด โดยเพาะเชื้อในอาหาร nutrient broth ที่มีความเข้มข้นของเกล็ดต่างกัน (ภาคผนวก ค ข้อ 8)

2.2.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) เนื่องจากบางสปีชีส์สามารถเคลื่อนที่และบางสปีชีส์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นจึงทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่เพื่อช่วยในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ (ภาคผนวก ค ข้อ 7)

2.2.3 Lysine decarboxylase test เป็นการทดสอบการใช้กรดอะมิโน lysine โดยใช้ lysine decarboxylase base medium (ภาคผนวก ค ข้อ 5)

2.2.4 Indole test เป็นการทดสอบการสร้างสาร indole จากกรดอะมิโน tryptophan โดยใช้อาหาร tryptone broth (ภาคผนวก ค ข้อ 3)

2.2.5 Citrate test เป็นการทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ citrate medium (ภาคผนวก ค ข้อ 2)

2.2.6 Voges-Proskauer test เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อและให้สาร acetyl methyl carbinol (acetoin) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อใน MR-VP medium (ภาคผนวก ค ข้อ 4)

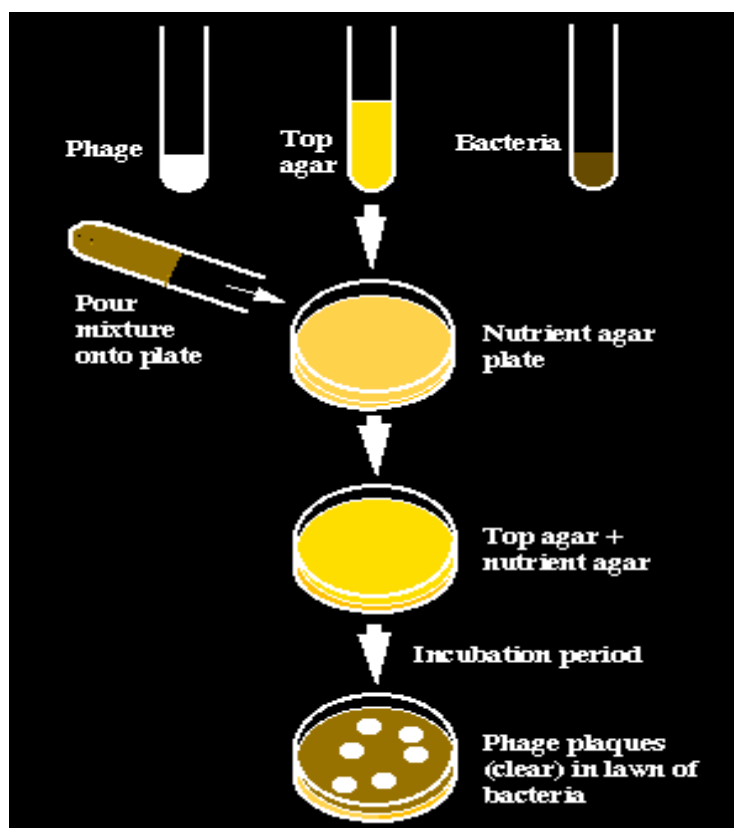
2.2.7 การผลิตกรดจากการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น แมนนิทอล อะราบิโนส และเซลโลไบโอส โดยใช้ phenol red broth base medium แต่เปลี่ยนชนิดของคาร์โบไฮเดรต (ภาคผนวก ค ข้อ 6)

3. การแยกไวรัสโอเฟจโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสต์

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร nutrient agar ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-6 ชั่วโมง จากนั้นใส่อาหารทะเลดิบปริมาณ 25 กรัมลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ถ้าตัวอย่างน้ำทะเลใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร nutrient broth มีความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำตัวอย่างไปตกตะกอน เพื่อแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอน้ำใส่นำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีไวรัสโอเฟจอยู่หรือไม่ (Baross; liston; & Morita. 1978a: 493; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466)

4. การตรวจสอบไวรัสโอเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำน้ำไลที่ได้จากข้อ 3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ *V. parahaemolyticus* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร nutrient agar ที่มีวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมเหลวแล้ว บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร nutrient agar ที่แข็งตัว บ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสหรือพลาไคที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 9 (Baross; Liston; & Morita. 1978b: 501)



ภาพประกอบ 9 การทำอาหารวุ้นสองชั้น

ที่มา: Nester; Robert; & Nester. (1995). *Microbiology*. p. 293

5. การหาปริมาณของไวรัสโอฟ

การหาปริมาณของไวรัสโอฟทำได้โดยเจือจางไวรัสโอฟในตัวอย่างแบบ serial dilution ให้มีค่าลดระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของไวรัสโอฟในแต่ละระดับความเจือจาง และ *V. parahaemolyticus* ที่ใช้เป็นโฮสต์ หาปริมาณไวรัสโอฟโดยนับจำนวนพลาไคที่เกิดขึ้น โดยการ ทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีทดลองในข้อ 4 แล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจาง เพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาไค (PFU; plaque forming unit /ml) คำนวณได้จากสูตร (Depaola; et al. 1998: 347)

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาไค} = \frac{\text{จำนวนพลาไค}}{\text{ปริมาณเฟลที่ใช้} \times \text{ค่าความเจือจาง}}$$

6. การเพิ่มจำนวนของไวรัสโอฟ

เตรียมไวรัสโอฟโดยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 หลังจาก บ่มไว้เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนมีพลาไคเกิดขึ้น ให้เททับหน้าอาหารด้วย nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อชะไวรัสโอฟออกจากผิวหน้าอาหาร โดยตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 2-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่น เหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอาส่วนน้ำใสออกมา กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอนเมตร เก็บตัวอย่างน้ำใสที่กรองได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Adams. 1958: 447)

7. การศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เตรียมไวรัสโอฟในอาหารเหลว โดยนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพาะเลี้ยงในอาหาร วุ้นเอียง BHA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ ลงในอาหาร nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลอง รูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-6 ชั่วโมง ใส่ไวรัสโอฟที่แยกได้ลงไป 100 ไมครอลิตร บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดย ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีไวรัสโอฟ มาเติมเกลือให้ มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีและเติมพอลิเอทิลีนไกลคอล 8000 (polyethylene glycol 8000) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำเซลล์แขวนลอยของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นที่จะทดสอบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร nutrient agar ที่มีวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมเหลวแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร nutrient agar ที่แข็งตัว จากนั้นหยดไวรัสที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของไวรัสในการติดเชื้อกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ จากการเกิดฟลาจบริเวณที่หยดไวรัสลงไป (Baross; liston; & Morita. 1978b: 502; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466–470)

ทำการทดลองดังนี้ คือ

9.1 ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสโอเฟจ โดยเทคนิคการทำอาหารรุ่นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 ประมาณ 100 plates หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จนมีพลาแกเกิดขึ้นแล้ว ให้เททับหน้าอาหารด้วย nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อชะไวรัสโอเฟจออกจากผิวหน้าอาหาร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีไวรัสโอเฟจมาเติม DNase I 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase I 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8000 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.2 ทำการตกตะกอนไวรัสโอฟเจ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนไวรัสโอฟเจที่ได้ มาละลายใน TE buffer (pH 8.0) 500 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 6) เติมคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร เพื่อแยกพอลิเอธิลีนไกลคอล ออก ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำชั้นบนนำมาเติม sodium dodecyl sulfate 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเกลือความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

9.3 ทำการสกัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยเติมฟีนอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสด้านบนมาเติมสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอต่อไป

9.4 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยดูดส่วนใสด้านบนที่ได้จากข้อ 9.3 มาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 (ภาคผนวก ข ข้อ 3) และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (ที่แช่เย็น) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ที่ตู้ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเอทานอลทิ้ง จากนั้นนำไประเหยเอทานอลออกใน vacuum chamber ละลายดีเอ็นเอของไวรัสโอฟเจด้วย TE buffer (pH 8.0) 30-50 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989: 4.22)

10. ตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัสโอฟเจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ทำการทดลองดังนี้ คือ

10.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 9 มาวิเคราะห์ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งเตรียมโดยซิงกะไรส 0.6 กรัม ผสมกับ 1X TAE (ภาคผนวก ข ข้อ 5) 100 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้เจลละลาย แล้วเทเจลลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอของไวรัสโอฟเจที่สกัดได้ มาใส่ลงในช่องภายในเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจล

ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้ม โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ทุกครั้ง

10.2 เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่แยกได้ว่าบริสุทธิ์ ให้นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII* และ *NdeI* โดยเติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เช่นเดียวกับข้อ 10.1

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อไวรัส

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเล และอาหารทะเลดิบ ได้แก่ หอยนางรม ปลาหมึก จำนวนทั้งหมด 102 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียในจิ้นส์ไวรัสโอทีเจริญบนอาหาร TCBS ได้จำนวนทั้งหมด 80 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 3 โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลือง จากนั้นทำการแยกโคโลนีให้บริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อดังกล่าวลงในหลอดอาหารวุ้นเยือก BHA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ตาราง 3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลืองบนอาหาร TCBS

วัน / เดือน / ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้
10 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 1
3 / 1 / 48	ปลาหมึก	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 2
10 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมแท่น จ.ชลบุรี	V 3
17 / 1 / 48	หอยนางรม	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 4
22 / 1 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V5
24 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V6
31 / 1 / 48	ปลาหมึก	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 7
31 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V8
7 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 9
7 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 10
10 / 2 / 48	กุ้ง	ตลาดคลองเตย กรุงเทพมหานคร	V 11
21 / 2 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 12

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน / เดือน / ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 13
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	V 14
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 15
28 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 16
28 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 17
28 / 2 / 48	น้ำทะเล	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	V 18
9 / 3 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 19
9 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 20
16 / 3 / 48	หอยนางรม	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 21
16 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 22
16 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 23
23 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 24
23 / 3 / 48	ปลาหมึก	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 25
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 26
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 27
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 28
9 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 29
23 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 30
10 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 31
17 / 1 / 48	น้ำทะเล	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	V 32
22 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมแท่น จ.ชลบุรี	V 33
31 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 34
7 / 2 / 48	น้ำทะเล	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	V 35

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน / เดือน / ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 36
28 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 37
28 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 38
9 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 39
16 / 3 / 48	น้ำทะเล	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	V 40
23 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 41
23 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 42
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 43
6 / 4 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 44
20 / 4 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 45
17 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 46
17 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 47
24 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 48
24 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 49
24 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 50
24 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 51
24 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 52
31 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 53
31 / 1 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 54
31 / 1 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 55
7 / 2 / 48	น้ำทะเล	แหลมแท่น จ.ชลบุรี	V 56
7 / 2 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 57
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 58
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	แหลมแท่น จ.ชลบุรี	V 59
21 / 2 / 48	น้ำทะเล	แหลมแท่น จ.ชลบุรี	V 60

ตาราง 3 (ต่อ)

วัน / เดือน / ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้
9 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมแท่น จ.ชลบุรี	V 61
9 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 62
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 63
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 64
30 / 3 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 65
6 / 4 / 48	น้ำทะเล	บางแสน จ.ชลบุรี	V 66
6 / 4 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 67
20 / 4 / 48	น้ำทะเล	แหลมฉบัง จ.ชลบุรี	V 68
20 / 4 / 48	หอยนางรม	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 69
20 / 4 / 48	หอยนางรม	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 70
27 / 4 / 48	ปลาหมึก	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 71
27 / 4 / 48	หอยนางรม	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 72
4 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 73
4 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 74
4 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 75
11 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 76
11 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 77
11 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 78
18 / 5 / 48	ปลาหมึก	ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร	V 79
18 / 5 / 48	ปลาหมึก	ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร	V 80

2. การจัดจำแนกเชื้อไวรัส

2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

นำเชื้อที่คัดเลือกและเก็บไว้ในอาหารวุ้นเลี้ยง BHA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ มาย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่าง โดยเลือกเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง ติดสีแกรมลบ (ภาพประกอบ 10) จากนั้นนำมาทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส และความสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส คัดเลือกเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทั้งสองเป็นบวก ซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อในจำแนกไวรัส ดังแสดงในตาราง 4 จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวไปจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ในขั้นต่อไป

ตาราง 4 ลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้

ไอโซเลทที่แยกได้	สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหาร TCBS
V 1	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 2	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 3	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 4	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V5	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V6	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 7	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V8	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 9	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 10	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 11	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 12	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 13	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 14	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 15	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 16	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 17	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร

ตาราง 4 (ต่อ)

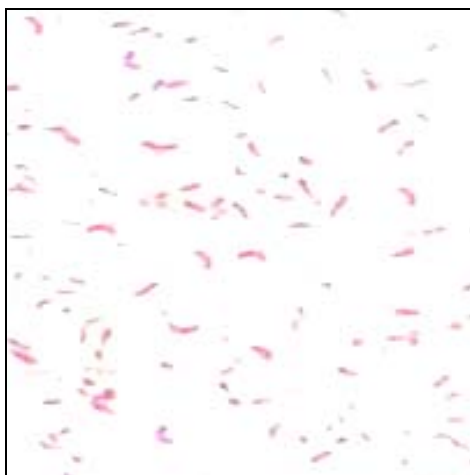
ไอโซเลทที่แยกได้	สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหาร TCBS
V 18	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 19	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 20	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 21	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 22	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 23	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 24	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 25	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 26	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 27	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 28	สีเหลือง ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 29	สีเหลือง ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 30	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 31	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 32	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 33	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 34	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 35	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 36	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 37	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 38	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 39	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 40	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 41	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 42	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร

ตาราง 4 (ต่อ)

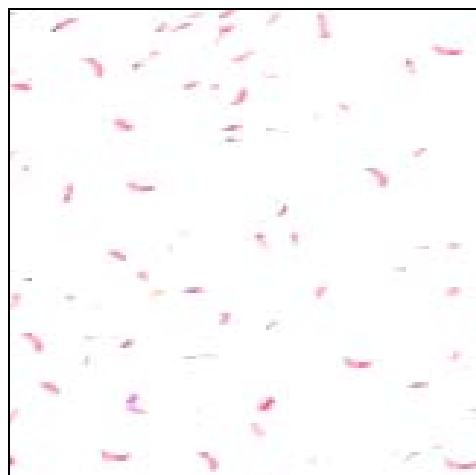
ไอโซเลทที่แยกได้	สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหาร TCBS
V 43	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 44	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 45	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 46	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 47	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 48	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 49	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 50	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 51	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 52	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 53	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 54	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 55	สีเขียว ขนาด 2.5 มิลลิเมตร
V 56	สีเขียว ขนาด 2.5 มิลลิเมตร
V 57	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 58	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 59	สีเขียว ขนาด 2.5 มิลลิเมตร
V 60	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 61	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 62	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 63	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 64	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 65	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 66	สีเขียว ขนาด 3 มิลลิเมตร
V 67	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร

ตาราง 4 (ต่อ)

ไอโซเลทที่แยกได้	สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหาร TCBS
V 68	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 69	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 70	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 71	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 72	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 73	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 74	สีเขียว ขนาด 1.5 มิลลิเมตร
V 75	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 76	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 77	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 78	สีเขียว ขนาด 2 มิลลิเมตร
V 79	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร
V 80	สีเขียว ขนาด 1 มิลลิเมตร



(A)



(B)



(C)

ภาพประกอบ 10 รูปร่างของ *V. parahaemolyticus* มีลักษณะเป็นท่อนโค้ง ติดสีแกรมลบ

(A) *V. parahaemolyticus* V8

(B) *V. parahaemolyticus* V6

(C) *V. parahaemolyticus* V9

2.2 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อที่คาดว่าอยู่ในจิ้นส์วิบริโอมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสปีชีส์ จากการทดลองพบว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. damsela* 1 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 5 จากนั้นนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้มาเป็นโฮสต์สำหรับการแยกวิบริโอเฟจในขั้นต่อไป

ตาราง 5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกระดับสปีชีส์

ไอโซเลท ที่แยกได้	Lysine	VP	Citrate	Indole	Arabi- nose	Cello- biose	Sali- sin	NaCl (%)					ผลการจัดจำแนก
								0	3	6	8	10	
V 1	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 4	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 5	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 6	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 7	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 8	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 9	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 10	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 11	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 12	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 13	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 14	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 15	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 16	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 17	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 18	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 19	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 20	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 21	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 22	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 23	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 24	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 25	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 26	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>

ตาราง 5 (ต่อ)

ไอโซเลท ที่แยกได้	Lysine	VP	Citrate	Indole	Arabi- nose	Cello- biose	Sali- sin	NaCl (%)					ผลการจัดจำแนก
								0	3	6	8	10	
V 27	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 28	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V 29	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
V 30	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
V 31	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 32	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 33	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 34	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 35	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 36	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 37	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 38	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 39	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 40	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 41	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 42	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 43	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 44	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 45	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 46	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 47	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 48	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 49	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 50	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 51	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 52	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 53	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 54	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 55	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 56	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 57	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 58	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 59	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 60	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>

ตาราง 5 (ต่อ)

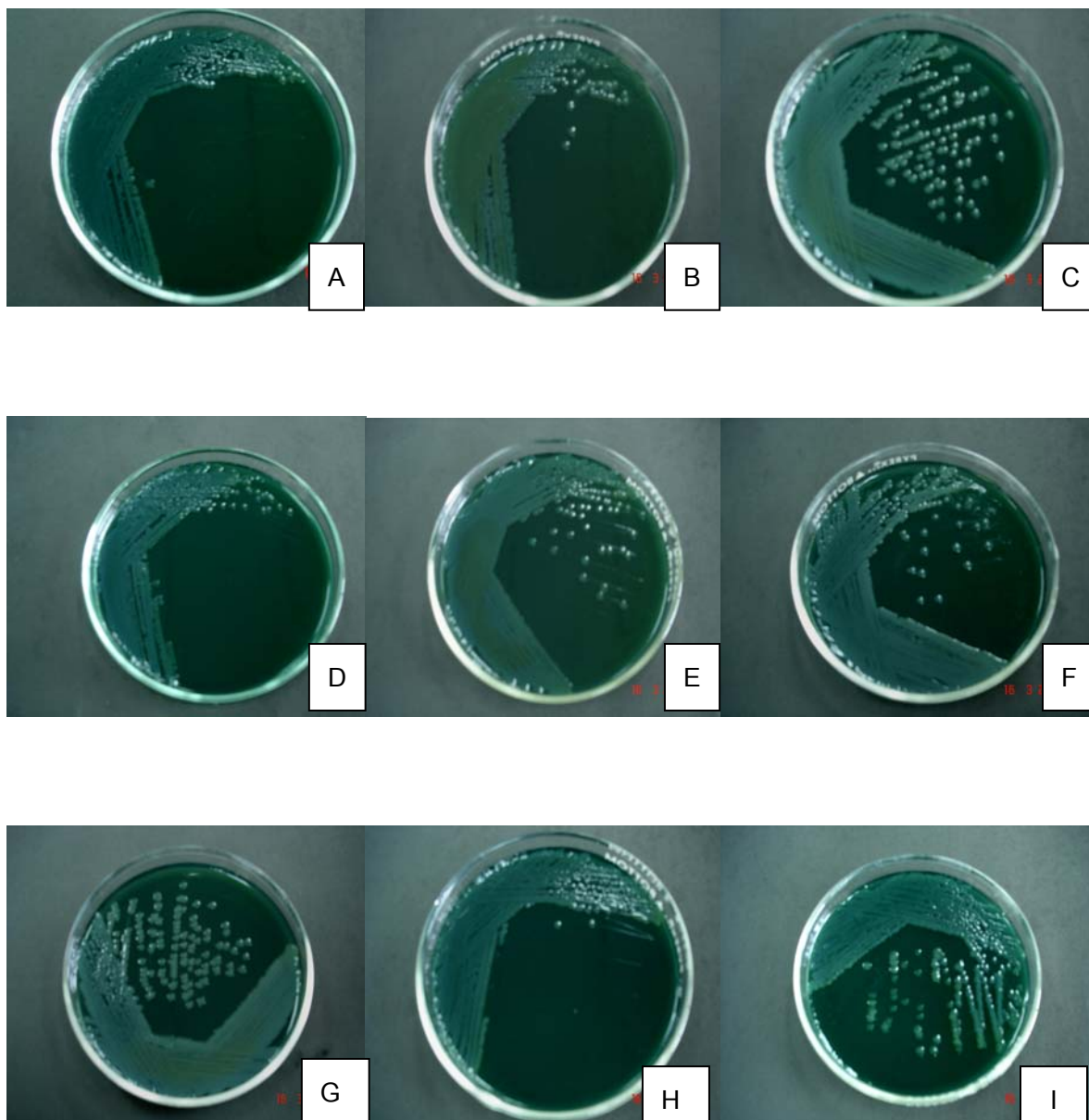
ไอโซเลท ที่แยกได้	Lysine	VP	Citrate	Indole	Arabi- nose	Cello- biose	Sali- sin	NaCl (%)					ผลการจัดจำแนก
								0	3	6	8	10	
V 61	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>V. damsela</i>
V 62	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 63	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 64	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 65	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 66	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 67	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 68	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 69	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
V 70	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 71	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 72	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 73	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 74	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 75	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 76	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 77	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 78	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 79	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>
V 80	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. vulnificus</i>

3. การแยกไวรัสโอฟเควโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสต์

นำ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท ที่แยกได้มาเป็นโฮสต์ สำหรับแยกไวรัสโอฟเควจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ ได้แก่ หอยนางรม ปลาหมึก ตามวิธีการทดลองในข้อ 3 แล้วเก็บตัวอย่างน้ำใสที่คาดว่าจะมีไวรัสโอฟเคว จำนวน 28 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

4. การตรวจสอบไวรัสโอฟเควและหาปริมาณไวรัสโอฟเคว

นำตัวอย่างน้ำใสที่ได้มาตรวจสอบว่ามีไวรัสโอฟเควหรือไม่ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 แล้วตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น พบว่าสามารถแยกไวรัสโอฟเควได้ 9 ตัว โดยการใช้ *V. parahaemolyticus* 9 ไอโซเลทเป็นโฮสต์ (ภาพประกอบ 11) ซึ่งลักษณะผลของไวรัสโอฟเควแต่ละตัวมีขนาด และรูปร่างแตกต่างกัน จากนั้นทำการบันทึกปริมาณของไวรัสโอฟเควที่แยกได้เริ่มต้น ดังแสดงในตาราง 6

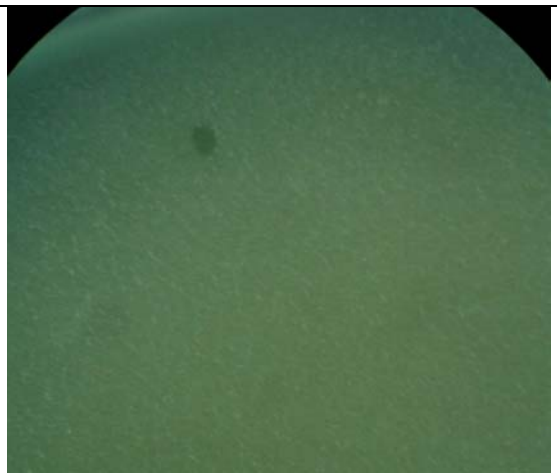
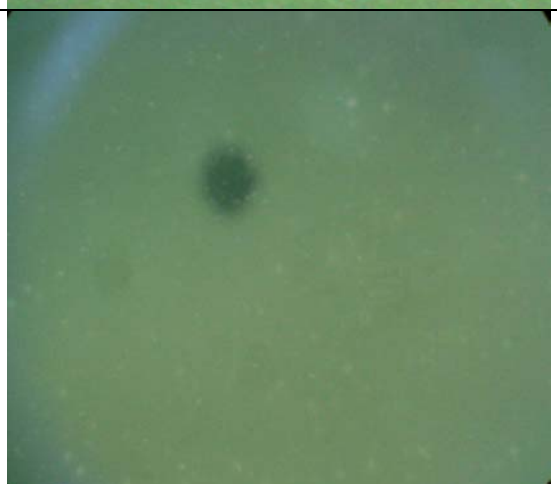


ภาพประกอบ 11 ลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร TCBS

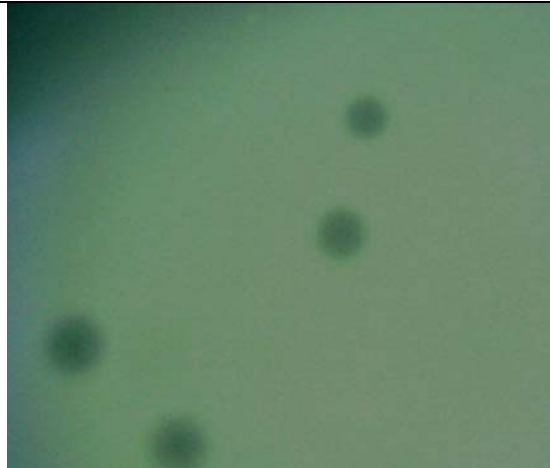
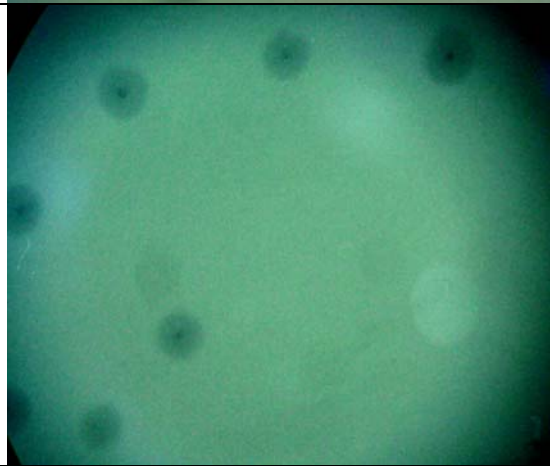
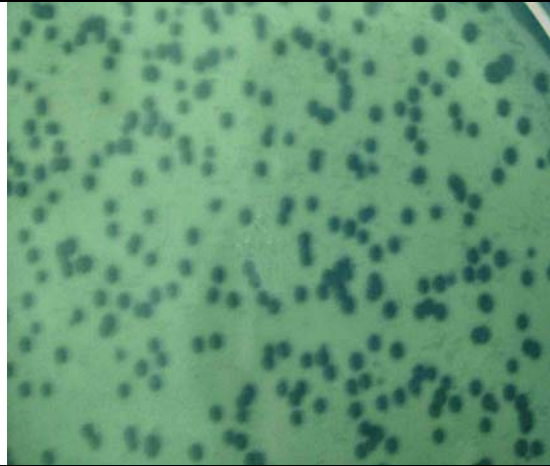
จำนวน 9 ไอโซเลท ที่ใช้เป็นโฮสต์ของไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว

- A) *V. parahaemolyticus* V2, B) *V. parahaemolyticus* V4, C) *V. parahaemolyticus* V6,
 D) *V. parahaemolyticus* V7, E) *V. parahaemolyticus* V8, F) *V. parahaemolyticus* V9,
 G) *V. parahaemolyticus* V10, H) *V. parahaemolyticus* V15, I) *V. parahaemolyticus* V28

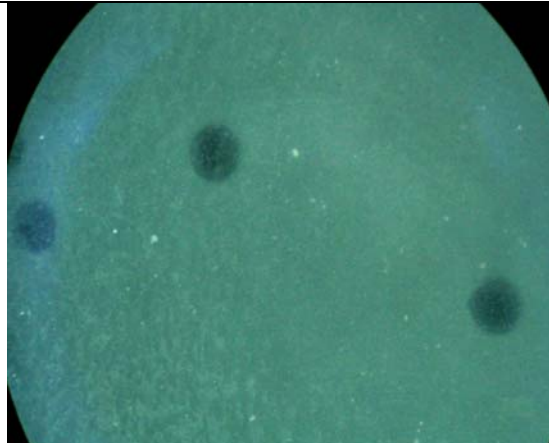
ตาราง 6 ลักษณะของพลาแคและจำนวนพลาแคที่แยกได้เริ่มต้น

เฟจ	จำนวนพลาแค ที่แยกได้เริ่มต้น (pfu/ml)	ขนาดเส้นผ่า ศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ลักษณะ ของพลาแค	รูปร่างของพลาแค
Vp2	5,280	1	ขุ่น	
Vp4	10,900	1.6	ขุ่น	
Vp6	2,000	1.8	ขุ่น	

ตาราง 6 (ต่อ)

เฟจ	จำนวนพลาแค ที่แยกได้เริ่มต้น (pfu/ml)	ขนาดเส้นผ่า ศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ลักษณะ ของพลาแค	รูปร่างของพลาแค
Vp7	3,040	1.8	ขุ่น	
Vp8	3,280	2	ขุ่น มีจุดใส ตรงกลาง	
Vp9	940	0.8	ใส	

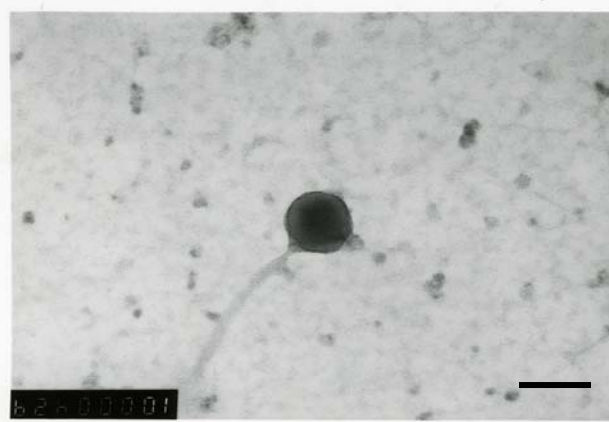
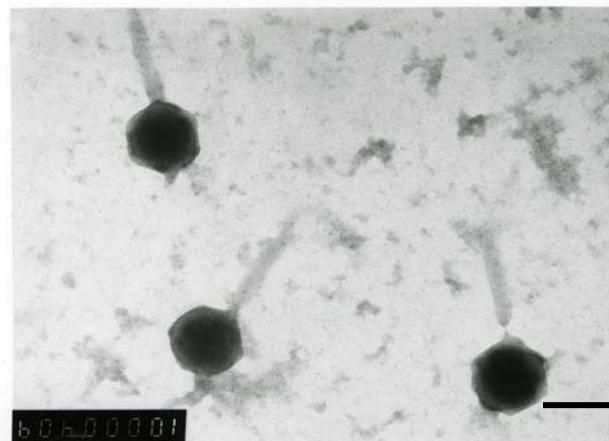
ตาราง 6 (ต่อ)

เฟจ	จำนวนพลาแค ที่แยกได้เริ่มต้น (pfu/ml)	ขนาดเส้นผ่า ศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ลักษณะ ของพลาแค	รูปร่างของพลาแค
Vp10	1,640	2	ขุ่น	
Vp15	12,000	0.5	ขุ่น	
Vp28	1,620	1.6	ขุ่น	

5. การศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟ

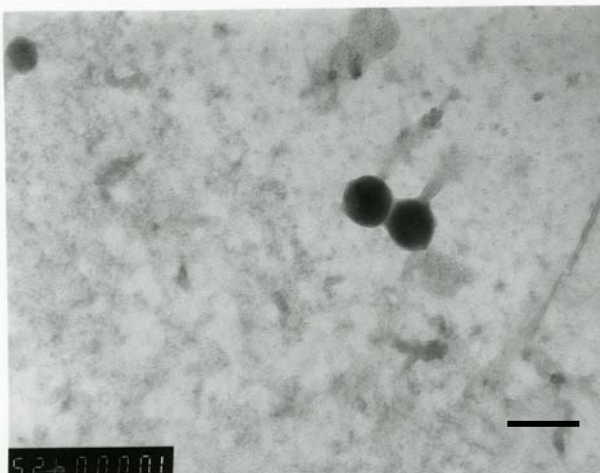
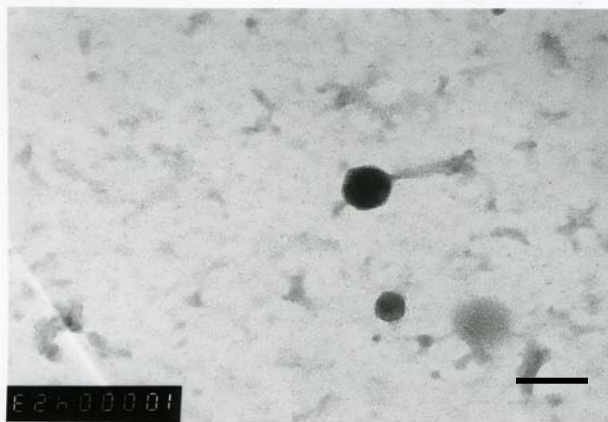
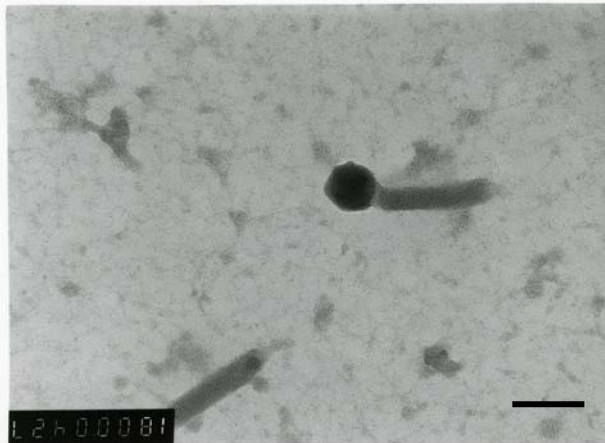
นำไวรัสโอฟทั้ง 9 ตัว ที่ได้ในข้อ 4 ไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ตาราง 7) พบว่าไวรัสโอฟ 8 ตัว มีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ส่วนหางยาวและไม่มีซีทห่อหุ้ม ได้แก่ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp28, Vp9, Vp10 และ Vp15 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส มีไวรัสโอฟเพียง 1 ตัว ที่ส่วนของหางมีซีทห่อหุ้ม ได้แก่ เฟจ Vp8 จึงจัดเฟจนี้อยู่ในกลุ่ม A ตามวิธีของ Bradley และอยู่ใน Family Myoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ตาราง 8)

ตาราง 7 ผลการศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟ

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)		รูปร่างของเฟจ	
	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของส่วนหัว	หาง		
		กว้าง		ยาว
Vp2	80	13.33	233.33	
Vp4	86.67	20	133.33	

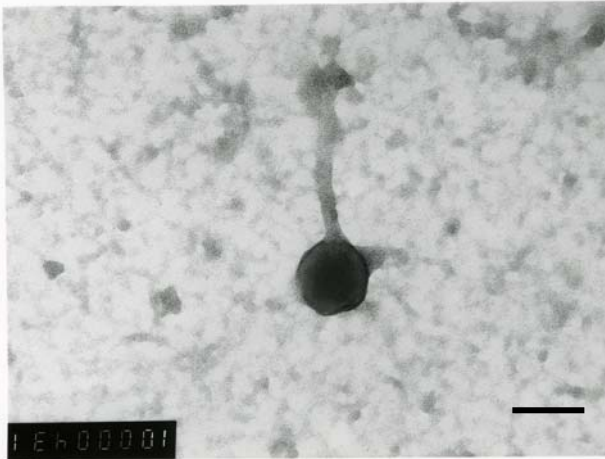
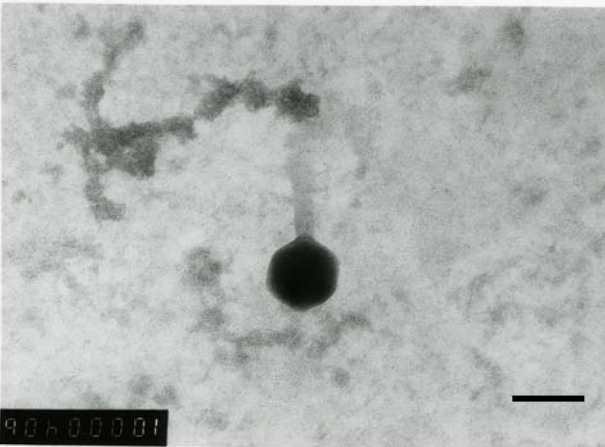
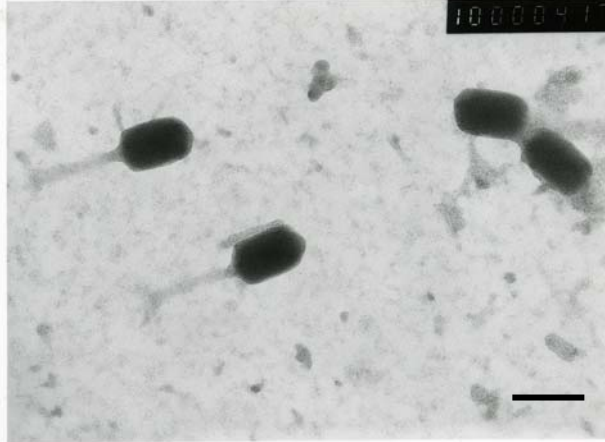
หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 7 (ต่อ)

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)		รูปร่างของเฟจ	
	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของส่วนหัว	หาง		
		กว้าง		ยาว
Vp6	60	13.33	66.67	
Vp7	53.33	13.33	100	
Vp8	60	26.27	146.67	

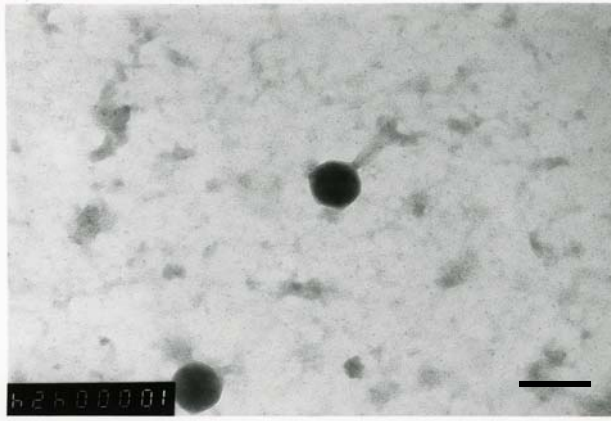
หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 7 (ต่อ)

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)			รูปร่างของเฟจ
	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของส่วนหัว	หาง		
		กว้าง	ยาว	
Vp9	93.33	20	193.33	
Vp10	93.33	26.67	100	
Vp15	กว้าง 93.33 ยาว 53.33	13.33	113.33	

หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 7 (ต่อ)

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

หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 8 ผลการจัดจำแนกรูปร่างของไวรัสโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

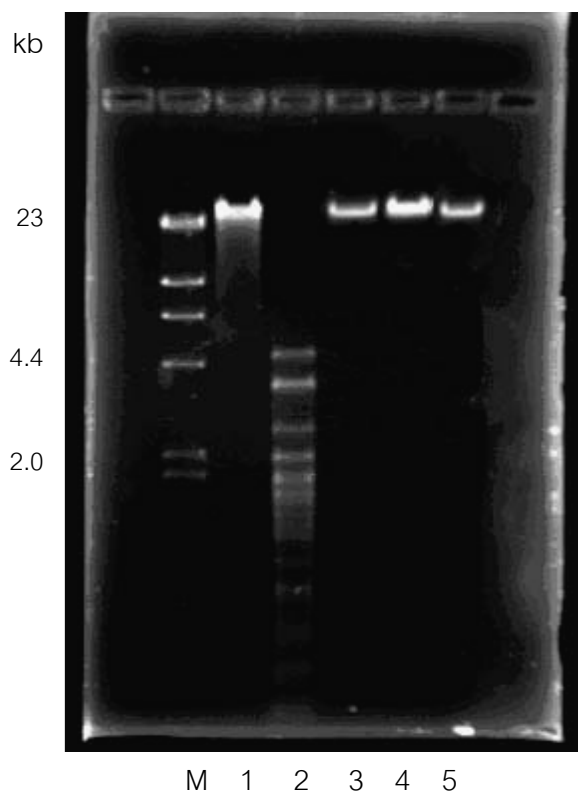
เฟจ	Family / Bradley's classification
Vp2	Family Siphoviridae / B
Vp4	Family Siphoviridae / B
Vp6	Family Siphoviridae / B
Vp7	Family Siphoviridae / B
Vp8	Family Myoviridae / A
Vp9	Family Siphoviridae / B
Vp10	Family Siphoviridae / B
Vp15	Family Siphoviridae / B
Vp28	Family Siphoviridae / B

6. การศึกษาโฮสต์-เรนจ์

การศึกษาความสัมพันธ์ของไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากโฮสต์ที่ใช้แยกไวรัสโอเฟจชนิดนั้น โดยทดสอบกับ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลอง พบว่าไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากสายพันธุ์ที่ใช้แยกไวรัสโอเฟจได้ และเมื่อทดสอบกับสปีชีส์อื่น คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. damsela* 1 ไอโซเลท และ *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท พบว่ามีเพียงเฟจ Vp28 เท่านั้น ที่ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ทดสอบ ส่วนไวรัสโอเฟจอีก 8 ตัว สามารถเกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ทดสอบได้ นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถในการติดเชื้อมีแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ได้แก่ *E. coli* 4 สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. 2 สายพันธุ์ พบว่าไม่เกิดการติดเชื้อโดยไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว ดังแสดงในตาราง 9

7. การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัสโอเฟจโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส

ได้สกัดดีเอ็นเอของไวรัสโอเฟจ 6 ตัว คือ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp10, Vp15 และ Vp28 ตามวิธีการทดลองในข้อ 9 จากนั้นนำดีเอ็นเอของไวรัสโอเฟจมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ เมื่อพบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ จึงนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด พบว่าเฟจ Vp10 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด (ภาพประกอบ 15) เฟจ Vp2, Vp6 และ Vp28 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* (ภาพประกอบ 12,14,17 ตามลำดับ) เฟจ Vp4 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRI* (ภาพประกอบ 13) เฟจ Vp15 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*, *EcoRI* และ *BglII* (ภาพประกอบ 16) รูปแบบดีเอ็นเอของไวรัสโอเฟจ หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด ดังแสดงในตาราง 10



ภาพประกอบ 12 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp2 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ lambda DNA marker/*HindIII*

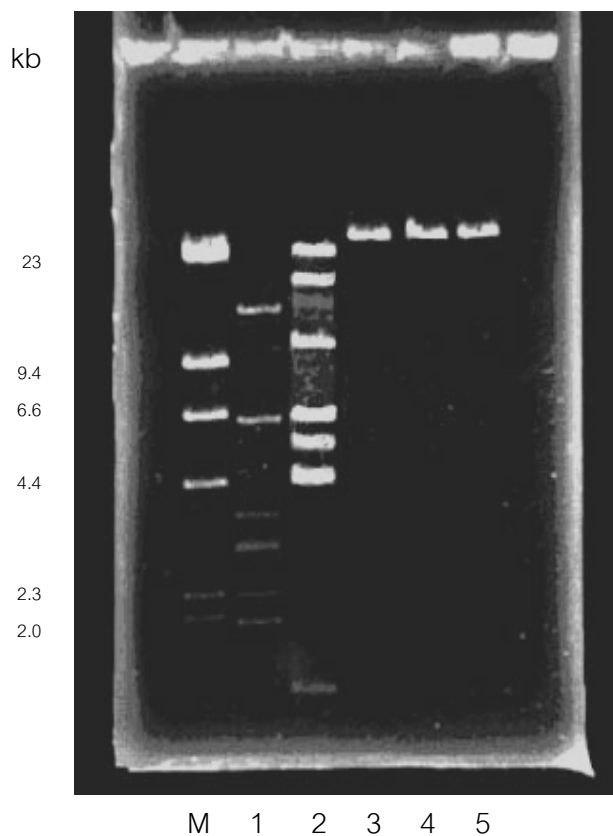
แถวที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

แถวที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

แถวที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

แถวที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

แถวที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*



ภาพประกอบ 13 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp4 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ lambda DNA marker/ *Hind*III

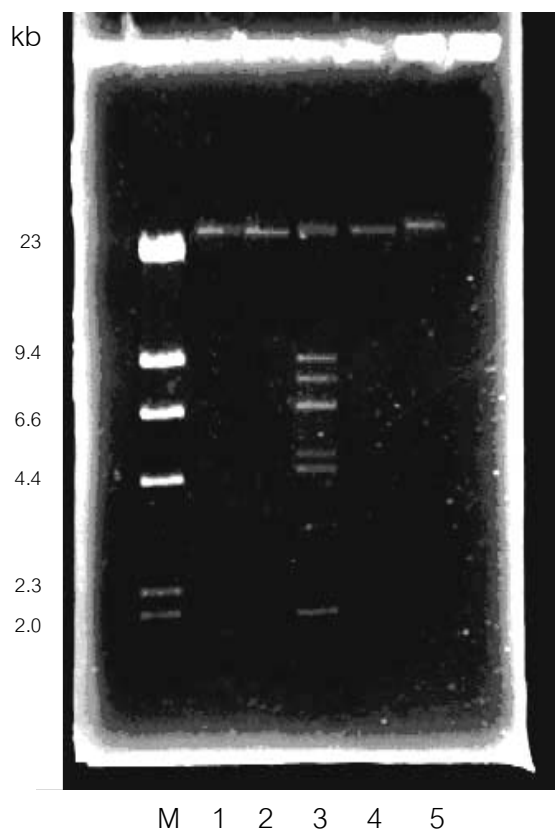
แถวที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

แถวที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถวที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II

แถวที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

แถวที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I



ภาพประกอบ 14 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp6 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ lambda DNA marker / *HindIII*

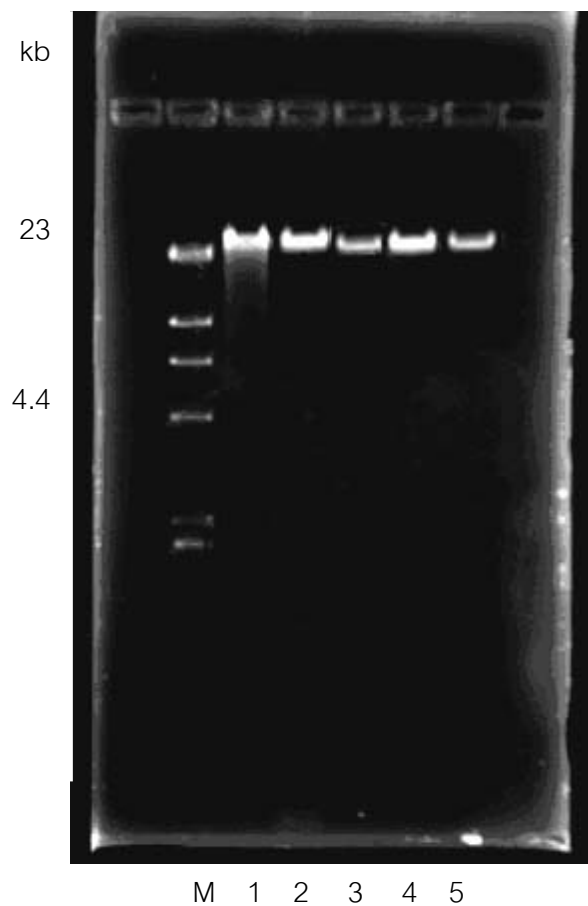
แถวที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

แถวที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

แถวที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

แถวที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

แถวที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*



ภาพประกอบ 15 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp10 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ lambda DNA marker/*Hind*III

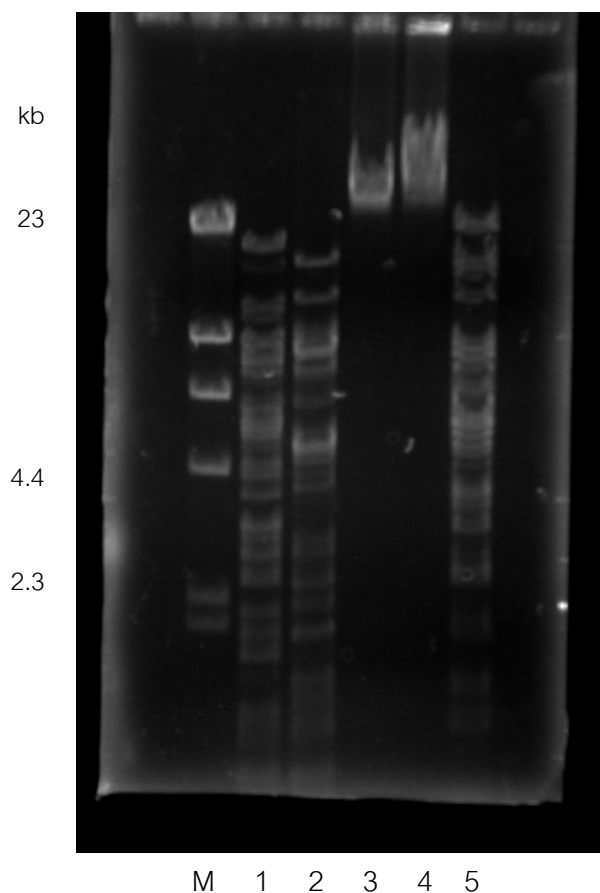
แถวที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถวที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

แถวที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bg*/II

แถวที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

แถวที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I



ภาพประกอบ 16 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp15 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ lambda DNA marker/ *Hind*III

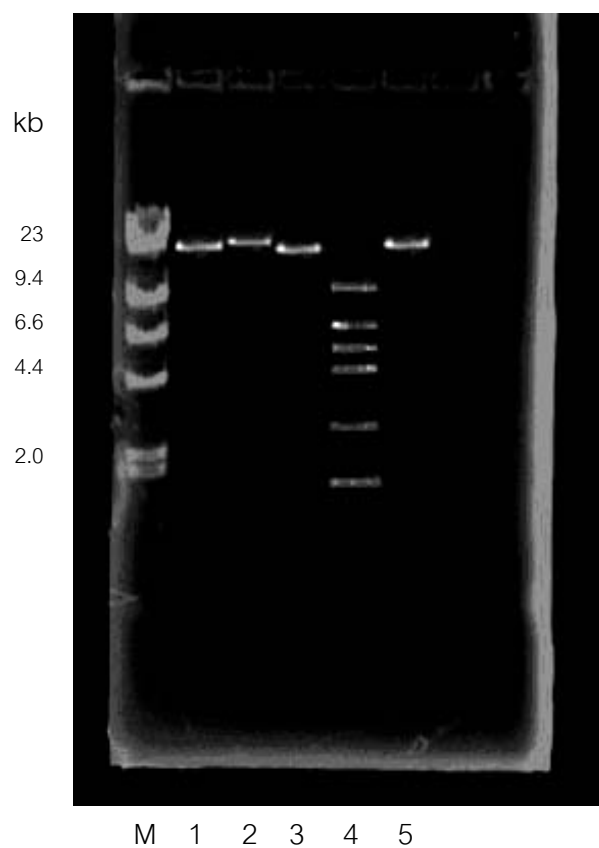
แถวที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถวที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

แถวที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

แถวที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

แถวที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II



ภาพประกอบ 17 ดีเอ็นเอของเฟจ Vp28 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถว M คือ lambda DNA marker/ *HindIII*

แถวที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

แถวที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglIII*

แถวที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

แถวที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

แถวที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

ตาราง 10 รูปแบบดีเอ็นเอของไวรัสโอฟหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด

เฟจ	เอนไซม์ตัดจำเพาะ				
	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>BglII</i>	<i>PstI</i>	<i>NdeI</i>
Vp2	ไม่ตัด	ตัดได้ มากกว่า 5 แถบ	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
Vp4	ตัดได้ 6 แถบ	ตัดได้ มากกว่า 6 แถบ	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
Vp6	ไม่ตัด	ตัดได้ 7 แถบ	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
Vp10	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
Vp15	ตัดได้ มากกว่า 9 แถบ	ตัดได้ มากกว่า 9 แถบ	ตัดได้ มากกว่า 9 แถบ	ไม่ตัด	ไม่ตัด
Vp28	ไม่ตัด	ตัดได้ 6 แถบ	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกแบคทีเรียจิ้งฉวัดวิบริโอ จากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ ได้แก่ ปลาหมึก หอยนางรม จำนวนทั้งหมด 102 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท พบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. damsela* 1 ไอโซเลท และ *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท แบคทีเรียในจิ้งฉวัดวิบริโอบางชนิดต้องการเกลือสำหรับการเจริญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-12 เปอร์เซ็นต์ จึงใช้สมบัติดังกล่าวนี้มาช่วยในการจำแนกสปีชีส์ ทำให้จัดจำแนกได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และช่วงที่คัดแยกแบคทีเรียอยู่ในช่วงฤดูร้อนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงพบเชื้อวิบริโอจำนวนมาก

จากนั้นนำ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้มาเป็นโฮสต์ สำหรับแยกวิบริโอเฟจ สามารถแยกวิบริโอเฟจ ได้ 9 ตัว วิบริโอเฟจแต่ละตัวมีลักษณะของพลาแคแตกต่างกัน คือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.5-2 มิลลิเมตร มีทั้งพลาแคใสและพลาแคขุ่น พลาแคใส ได้แก่ เฟจ Vp9 พลาแคขุ่น ได้แก่ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp10, Vp15 และ Vp28

เมื่อนำวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว ไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าวิบริโอเฟจทั้งหมดมีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 53.33-93.33 นาโนเมตร มีส่วนหางที่มีความยาวแตกต่างกันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 66.67-233.33 นาโนเมตร สามารถแยกวิบริโอเฟจ ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp9, Vp10, Vp15 และ Vp28 มีส่วนหางยาวและไม่มีซีทห่อหุ้ม จัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส กลุ่มที่สอง คือ เฟจ Vp8 ส่วนหางมีซีทห่อหุ้ม จัดเฟจนี้อยู่ในกลุ่ม A ตามวิธีของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Myoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส เช่นเดียวกับการทดลองของ Koga, Toyoshima และ Kawata (Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466) ซึ่งพบว่าวิบริโอเฟจที่พบส่วนใหญ่อยู่ใน Family Myoviridae และ Family Siphoviridae เมื่อศึกษาได้ว่าวิบริโอเฟจมีรูปร่างเป็นแบบใดแล้ว ทำให้ทราบทางอ้อมว่าวิบริโอเฟจมีการดนิวคลิสิกชนิดใด ซึ่งทั้งสองกลุ่มที่แยกได้นี้มีการดนิวคลิสิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

เมื่อนำวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว มาศึกษาความสัมพันธ์ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากโฮสต์ที่ใช้แยกวิบริโอเฟจชนิดนั้น พบว่าวิบริโอเฟจทั้ง 9 ตัว สามารถเกิดการติดเชื้อมี *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากโฮสต์ได้ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มี

ความหลากหลาย ต่อการติดเชื้อไวรัสโอเฟจแต่ละตัวได้แตกต่างกัน มี *V. parahaemolyticus* 2 ไอโซเลท จากทั้งหมดที่แยกได้มีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว เมื่อนำมาทดสอบกับสปีชีส์อื่น คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท มี *V. alginolyticus* 1 ไอโซเลท ที่ไม่สามารถเกิดการติดเชื้อโดยไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว นอกนั้นเกิดการติดเชื้อโดยไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัวได้แตกต่างกัน ไวรัสโอเฟจที่มีโฮสต์-เรนจ์กว้างที่สุด คือ เฟจ Vp4, Vp7, Vp8, Vp10 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อใน *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้ทั้ง 4 สปีชีส์ ไวรัสโอเฟจที่มีโฮสต์-เรนจ์แคบ คือ เฟจ Vp2, Vp6, Vp9, Vp15 และ Vp28 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในจีโนสไวรัสโอเฟจที่ทดสอบเพียงสปีชีส์เดียวหรือ 2-3 สปีชีส์เท่านั้น ส่วนไวรัสโอเฟจตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเฉพาะใน *V. parahaemolyticus* คือ เฟจ Vp28 แต่ไวรัสโอเฟจทั้งหมดไม่สามารถเกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียจีโนสอื่น โดยเมื่อนำมาทดสอบกับ *E. coli* 4 สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. 2 สายพันธุ์ พบว่ามีความต้านทานต่อการติดเชื้อโดยไวรัสโอเฟจทั้ง 9 ตัว จากการทดลองมีเพียงเฟจ Vp28 ที่ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียต่างสปีชีส์และจีโนส ดังนั้นอาจนำสมบัติความจำเพาะของเฟจ Vp28 มาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของ *V. parahaemolyticus* ออกจากสปีชีส์อื่นในจีโนสไวรัสโอเฟจ ส่วนไวรัสโอเฟจอีก 8 ตัว สามารถนำมาจัดจำแนกแบคทีเรียในจีโนสไวรัสโอเฟจ ออกจากแบคทีเรียจีโนสอื่นได้

เมื่อนำไวรัสโอเฟจ 6 ตัว คือ เฟจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp10, Vp15 และ Vp28 มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าเป็นไวรัสโอเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่าเฟจ Vp10 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ Vp10 ไม่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ Vp2, Vp6, และ Vp28 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจทั้ง 3 ตัว มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Hind*III ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ Vp4 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ Vp4 มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI ดีเอ็นเอของเฟจ Vp15 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III, *Eco*RI และ *Bgl*II แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ Vp15 มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Hind*III, *Eco*RI และ *Bgl*II แต่ดีเอ็นเอของเฟจ Vp15 แม้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังแยกได้ไม่ชัดเจน จึงควรเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นที่เหมาะสมต่อไป จากรูปแบบดีเอ็นเอของไวรัสโอเฟจแต่ละตัวหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิดแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นไวรัสโอเฟจต่างชนิดกัน และพบว่าไวรัสโอเฟจส่วนใหญ่มีบริเวณที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hind*III

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ดวงพร คันทโชติ. (2537). *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). *จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ไพโรจน์ พุฒินัน. (2540). *ไวรัสวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรสมัย
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2536). *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน.
- Ackermann, Hans-W.; et al. (1984). Classification of *Vibrio* Bacteriophages. *Inter-virology*. 22: 61-71.
- Adams, M. H. (1958). *Bacteriophages*. New York: Interscience publishers, Inc.
- Alberts, B.; et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Retrieved June 25, 2005, from [http:// www.garlandscience.com](http://www.garlandscience.com)
- Alcamo, E. (1996). *Fundamentals of Microbiology*. 5 th ed. United States of America: Benjamin / Cummings.
- Baron, E. J.; Murvay, P. R.; Jurgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; and Tenover, R. H. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. 8 th ed. Washington, D. C: ASM Press.
- Baross, J. A.; Liston, J.; and Morita, R. Y. (1978a). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages and Other *Vibrio* Bacteriophages in Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 492-499.
- Baross, J. A.; Liston, J.; and Morita, R. Y. (1978b). Ecological Relationship Between *Vibrio parahaemolyticus* and Agar-Digesting Vibrios as Evidenced by Bacteriophage Susceptibility Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 500-505.
- Barrow, P. A.; and Soothill, J. S. (1997). Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: Rediscovery and Renewed Assessment Potential. *Trends in Microbiology*. 5: 268-271.

- Basu, S.; and Mukerjee, S. (1968). Bacteriophage Typing of *Vibrio cholerae* El Tor. *Experientia*. 24: 299-300.
- Boyd, R. F. (1995). *Basic Medical Microbiology*. 5 th ed. United States of America: Little/Brown.
- Boyd, E. F.; Davis, B. M.; and Hochhut, B. (2001). Bacteriophage - Bacteriophage Interactions in the Evolution of Pathogenic Bacteria. *Trends in Microbiology*. 9: 137-143.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriological Reviews*. 31: 230-314.
- Bryner, J. H.; Ritchie, A. E.; Foley, J. W.; and Berman, D. T. (1970). Isolation and Characterization of a Bacteriophage for *Vibrio fetus*. *Journal of Virology*. 66: 94-99.
- Cappuccino, J. G.; and Sherman, N. (2001). *Microbiology: A Laboratory Manual*. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Chakrabarti, A. K.; Ghosh, A. N.; Balakrish, N. G.; Niyogi, S. K.; Bhattacharya, S. K.; and Sarkar, B. L. (2000). Development and Evaluation of a Phage Typing Scheme for *Vibrio cholerae* 0139. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 44-49.
- Chattopadhyay, D. J.; Sarkar, B. L.; Ansari, M. O.; Chakrabarti, B. K.; Roy, M. K.; Ghosh, A. N.; and Pal, S. C. (1993). New Phage Typing Scheme for *Vibrio cholerae* 01 biotype El Tor Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1579-1585.
- Chiou, Chien-shun.; Hsu, Shih-Yuan.; Chiu, Shiou-Ing.; Wang, Tien-Kuei.; and Chao, Cheng-Shun. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* Serovar 03: K6 as Cause of Unusually High Incidence of Food-Borne Disease Outbreaks in Taiwan from 1996-1999. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 4621-4625.
- Daniels, N. A.; Mackinnon, L.; Bishop, R.; Altekuse, S.; Ray, B.; Hammond, R. M. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*. 181: 1661-1666.

- Depaola, A.; Motes, M. L.; Chan, A. M.; and Suttle, C. A. (1998). Phage Infecting *Vibrio vulnificus* are Abundant and Diverse in Oysters Collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 84: 346-351.
- Elliot, E. L.; Kaysner, C. A.; Tamplin, M. L.; and Jackson, L. (1995). *V. cholerae*, *V. vulnificus* and Other *Vibrio* spp. *FDA Bacteriological Analytical Manual*. 8 th ed. United States of America: AOAC International.
- Faruque, S. M.; et al. (2003). *Shigella dysenteriae* Type 1-Specific Bacteriophage from Environmental Waters in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7028-7031.
- Faruque, S. M.; et al. (2005). Seasonal Epidemic of Cholera Inversely Correlate with the Prevalence of Environmental Cholera Phages. *Microbiology*. 102: 1701-1707.
- Ghosh, A. M.; Ansari, M. Q.; and Datta, G. C. (1989). Isolation and Morphological Characterization of El Tor Cholera Phages. *Journal of General Virology*. 70: 2241-2243.
- Good, D.; Allen, V. M.; and Barrow, P. A. (2003). Reduction of Experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5032-5036.
- Goyal, S. M.; Gerbra, C. P.; and Bitton, G. (1987). *Phage Ecology*. United States of America: A Wiley-Interscience.
- Griffiths, A. F.; Miller, J. H.; Suzuki, D. T.; Lewontin, R. C.; and Gelbart, W. M. (1999). *Genetic Analysis*. Retrieved March 9, 2005, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=iga.figgrp.1353>.
- Harley, O. P.; and Klein, D. A. (1993). *Microbiology*. 2 nd ed. Oxford: Wm.C.Brown.
- Kalmanson, G.; and Bronfenbrenner, J. (1942). Evidence of Serological Heterogeneity of Polyvalent " Pure Line " Bacteriophage. *Journal of Immunology*. 45: 13.
- Karunasagar, I.; and Kumar, H. S. (2002). Molecular Methods for Rapid and Specific Detection of Pathogens in Seafood. *Aquaculture Asia*. 7: 34-36.

- Kay, D.; and Bradley, D. E. (1960). The Fine Structure of Bacteriophages. *Journal of General Microbiology*. 23: 553-563.
- Koga, T.; and Kawata, T. (1981). Structure of a Novel Bacteriophages VP3 for *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*. 25: 737-740.
- Koga, T.; Toyoshima, S.; and Kawata, T. (1982). Morphological Varieties and Host - Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 466-470.
- Lesmana, M.; Subekti, D.; Simanjuntak, C. H.; Tjaniadi, P.; Campbell, J. R.; and Oyofo, B. A. (2001). *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Cholera-like Diarrhea among Patients in North Jakarta, Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 39: 71-75.
- Lim, Daniel. (1998). *Microbiology*. 2 nd ed. United States of America: McGraw- Hill.
- Madico, G.; Checkley, W.; Gilman, R. H.; Bravo, N.; Cabrera, L.; Calderon, M.; and Ceball, A. (1996). Active Surveillance for *Vibrio cholerae* 01 and Vibriophages in Sewage Water as a Potential Tool to Predict Cholerae Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2968-2972.
- Maloy, S. R.; Cronan, J. F.; and Freifelder, D. J. (1994). *Microbial Genetics*. 2 nd ed. Boston: Jones and Bartlett.
- Matsuzaki, S.; Tanawa, S.; Koga, T.; and Kawata, T. (1992). A Broad-Host-Range Vibriophage, KVP 40, Isolated from Seawater. *Microbiology and Immunology*. 36: 93-97.
- Mckane, L.; and Kandel, J. (1996). *Microbiology*. United States of America: McGraw-Hill.
- Mukerjee, S.; and Phil, M. B. (1963). Bacteriophage Typing of Cholera. *Bulletin of the World Health Organization*. 28: 337-345.
- Nester, E. W.; Roberts, C. B.; and Nester, M. T. (1995). *Microbiology: A Human Perspective*. United States of America: Wn. C. Brown.

- Nesper, J.; Blab, J.; Fountoulakis, M.; and Reidl, J. (1999). Characterization of the Major Control Region of *Vibrio cholerae* Bacteriophage K139: Immunity, Exclusion and Integration. *Journal of Bacteriology*. 181: 2902-2913.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. 2 nd ed. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seguritan, V.; Feng, I-Wei; Rohwer, F.; Swift, M.; and Segall, A. M. (2003). Genome Sequence of Two Closely Related *Vibrio parahaemolyticus* Phages , VP 16T and VP 16C . *Journal of Bacteriology*. 185: 6434-6477.
- Sklarow, S. S.; Cowell, R. R.; Chapman, G. B.; and Zane, S. F. (1973). Characteristics of a *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Atlantic Coast Sediment. *Canadian Journal of Microbiology*. 19: 1519-1520.
- Smith, H. W.; Huggins, M. B.; and Shaw, K. M. (1987). The Control of Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Claves by Means of Bacteriophages. *Journal of General Microbiology*. 133: 1111-1126.
- Smith, L. S.; and Krueger, A. P. (1954). Characteristic of a New *Vibrio*–Bacteriophage System. *Journal of Genetical Physiology*. 38: 161-168.
- Spencer, R. (1955). A Marine Bacteriophage. *Nature*. 175: 690-692.
- Van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; and Bishop, D. H. (2000). *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Virus. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press.
- Voyles, B. A. (2002). *The Biology of Viruses*. 2 nd ed. New York: McGraw–Hill.
- Wagner, P. I.; and Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. *Infection and Immunity*. 70: 3985-3993.
- Waldor, M. K.; and Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic Conversion by Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*. 272: 1910-1914.
- Wong, Hin-Chung. (2003). Detecting and Molecular Typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11: 79-86.

- Xie, H.; Zhuang, X.; Kong, J.; Ma, G.; and Zhang, H. (2005). Bacteriophage Esc-A is an Efficient Therapy for *Escherichia coli* 3-1 Caused Diarrhea in Chickens. *Journal of General and Applied Microbiology*. 51: 159-163.
- Zachary, A. (1976). Physiology and Ecology of Bacteriophages of the Marine Bacterium *Beneckea natriegens*: Salinity. *Applied and Environmental Microbiology*. 31: 415-422.
- Zobell, C. (1946). *Marine Microbiology*. Massachusetts: Chronica Botanica Waltham.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Brain heart infusion broth

calf brain	200	กรัม
beef heart	250	กรัม
proteose peptone	10	กรัม
dextrose	2	กรัม
sodium chloride	5	กรัม
disodium phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.4		

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Carbohydrate broth (phenol red broth base)

beef extract	1	กรัม
proteose peptone	10	กรัม
sodium chloride	5	กรัม
carbohydrate	10	กรัม
phenol red	0.018	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.4		

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Citrate medium

ammonium dihydrogen phosphate	1	กรัม
dipotassium phosphate	1	กรัม
sodium chloride	5	กรัม
magnesium sulfate	0.2	กรัม

agar	15	กรัม
bromthymol blue	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.9		

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Decarboxylase broth base

peptone	5	กรัม
beef extract	5	กรัม
bromcresol purple	0.01	กรัม
cresol red	0.005	กรัม
dextrose	0.5	กรัม
pyridoxal	0.005	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.0		

เติมกรดอะมิโนที่ต้องการทดสอบลงไป ใน decarboxylase broth base ให้มีความเข้มข้น เป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอย่างเช่น ต้องการตรวจหาเอนไซม์ lysine decarboxylase ก็ให้เติม lysine ลงใน decarboxylase broth base ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Methyl Red/Voges-Poskauer (MR/VP) broth

proteose peptone	7	กรัม
dextrose	5	กรัม
dipotassium hydrogen phosphate	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.2		

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Motility test medium

beef extract	3	กรัม
peptone	10	กรัม
sodium chloride	5	กรัม
agar	4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
2, 3, 5 - triphenyltetrazodiumchloride	0.01	มิลลิกรัม

pH 7.4

ทำการเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การทดสอบ motility ให้ปักเชื้อลงไปให้อาหารแข็ง ตรงกลางอาหารแล้วดูบริเวณตรงกลางที่ปัก ถ้าเชื้อกระจายไปบริเวณอื่นๆ นอกเหนือจากบริเวณที่ปักเชื้อ แสดงว่าเชื้อเคลื่อนที่ได้

7. Nutrient agar

beef extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Nutrient broth

beef extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS agar)

yeast extract	5	กรัม
peptone	10	กรัม
sucrose	20	กรัม
sodium thiosulfate pentahydrate	10	กรัม
oxgall	5	กรัม
sodium chloride	10	กรัม
ferric citrate	1	กรัม
bromthymol blue	0.04	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 8.6		

ละลายสารต่างๆ เข้าด้วยกันตั้งไฟพอเดือด จากนั้นเทใส่จานเพาะเลี้ยง (อาหารไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที) TCBS เป็นอาหาร selective media โดยในอาหารจะเติมสารอาหารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น มีเพียงจีสวีบริโอที่สามารถเจริญได้ คือ มี thiosulfate และ citrate ยับยั้งการเจริญของพวก Enterobacteriaceae Oxbile และ cholate ยับยั้งพวก enterococci ส่วนกลุ่ม coliform เจริญได้แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส มี bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์

10. Tryptone broth

Tryptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0		

อาจใช้ peptone ชนิดอื่น ที่มีปริมาณของกรดอะมิโน tryptophan ค่อนข้างสูง ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การใช้ปริมาณ tryptophan สูงๆ มักใช้ทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ในการเปลี่ยน tryptophan ให้เป็น indole

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. DNase I

ละลาย DNase 2 มิลลิกรัมใน 1 มิลลิลิตร ของ

Tris-Cl (pH 7.5)	10	mM
sodium chloride	150	mM
magnesium chloride	1	mM

2. RNase I

RNase	2	มิลลิกรัม
TE (pH 7.6)	2	มิลลิลิตร

3. 3 M Sodium acetate

sodium acetate	408.3	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้ได้ 5.2 โดย glacial acetic acid เข้มข้นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

sodium dodecyl sulfate	100	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 50X TAE

Tris- base	242	กรัม
glacial acetic acid	57.1	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	1	ลิตร

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะใช้ให้ทำการเจือจางเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น

6. TE- buffer

Tris-HCl	0.1	M
EDTA	1	mM

ปรับค่า pH ให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สภาวะที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

EcoRI (บริษัท Fermentas)

DNA	3	ไมโครลิตร
Enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer H	3.5	ไมโครลิตร
Distilled water	5	ไมโครลิตร
Dye	2	ไมโครลิตร
รวม	15	ไมโครลิตร

NdeI (บริษัท Fermentas)

DNA	3	ไมโครลิตร
Enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer D	3.5	ไมโครลิตร
Distilled water	5	ไมโครลิตร
Dye	2	ไมโครลิตร
รวม	15	ไมโครลิตร

HindIII (บริษัท Fermentas)

DNA	3	ไมโครลิตร
Enzyme	1	ไมโครลิตร
Buffer R	1	ไมโครลิตร
Distilled water	3	ไมโครลิตร
Dye	2	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

BglII (บริษัท Fermentas)

DNA	3	ไมโครลิตร
Enzyme	1	ไมโครลิตร
Buffer O	1	ไมโครลิตร
Distilled water	3	ไมโครลิตร
Dye	2	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

PstI (บริษัท Fermentas)

DNA	3	ไมโครลิตร
Enzyme	1	ไมโครลิตร
Buffer O	1	ไมโครลิตร
Distilled water	3	ไมโครลิตร
Dye	2	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค

การทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส

การทดสอบออกซิเดสใช้ในการจัดจำแนกสกุลต่างๆ ของแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับการวินิจฉัยเชื้อจลิน์สวิตริโอนั้น ควรทดสอบออกซิเดสก่อนเป็นอันดับแรก แล้วนำเชื้อไปทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากจลิน์สวิตริโอและจลิน์สไกล์เคียง เช่น *Aeromonas* หรือ *Plesiomonas* อาจให้ปฏิกิริยาที่คล้ายกับเชื้อใน Family Enterobacteriaceae อาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้

วิธีทดสอบ

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เหมาะสม เช่น blood agar และ nutrient agar จะให้ผลบวกที่ชัดเจนและเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น โดยเลี้ยงเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์
2. หยด 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride บนโคโลนี 2-3 หยด

การตรวจผล สังเกตสีของ oxidase reagent ซึ่งปกติไม่มีสี แต่ถ้าเชื้อมีเอนไซม์ออกซิเดส ทำให้สามารถออกซิไดส์ *p*-phenylenediamine โดยใช้ออกซิเจนในบรรยากาศ ช่วยให้เกิด indophenol blue ขึ้น จะเห็นโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีม่วงทันที (ดวงพร คันทโชติ. 2537: 118) ดังแสดงในภาพประกอบ 18 บางครั้งอาจใช้กระดาษกรองตัดเป็นชิ้นขนาด 1 x 3 เซนติเมตร ชุบน้ำยา oxidase reagent ที่เตรียมใหม่ๆ จากนั้นใช้ loop เขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ โดยจลิน์สวิตริโอให้ผลบวกจะเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที หรืออาจใช้สำลีซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ชุบน้ำยา oxidase reagent แล้วป้ายที่โคโลนี



ภาพประกอบ 18 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

2. การทดสอบการใช้ซิเตรท

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตในอาหาร ที่มีแหล่งคาร์บอนอย่างง่าย คือ ซิเตรท ในอาหารประกอบด้วยซิเตรทและ bromthymol blue อาหารจึงมีสีเขียวมี pH 6.8 และเป็นสีน้ำเงินเมื่อมี pH มากกว่า 7.6 แบคทีเรียที่ใช้ซิเตรทได้ต้องมีเอนไซม์ citrate permease หรือ citrase โดยจะย่อยซิเตรทให้เป็น oxaloacetic acid จากนั้น oxaloacetic acid ถูกย่อยต่อจนได้ pyruvate, CO_2 และโซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์จะรวมตัวเป็น Na_2CO_3 ทำให้อาหารมี pH เป็นด่าง จึงเปลี่ยนสีของ bromthymol blue ได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 19

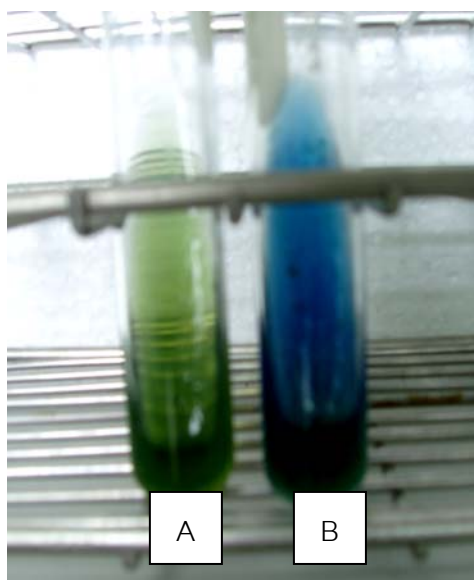
วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อในอาหารซิเตรทที่ทำเป็นวุ้นเอียง
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล

ผลบวก อาหารมีสีน้ำเงิน

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี



ภาพประกอบ 19 ความสามารถในการใช้ซิเตรท

(A) อาหารที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (B) ผลบวก

3. การทดสอบอินโดล

เป็นการทดสอบเพื่อดูความสามารถของเชื้อในการสร้างสารอินโดล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย จากการย่อยกรดอะมิโน tryptophan ซึ่งไม่มีในอาหาร peptone ทั่วไป อาหารที่ใช้จึงควรมีส่วนผสมของ tryptone 1 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเชื้อเจริญได้ไม่จำเป็นต้องใส่อาหารอื่นลงไป การทดสอบหาสารอินโดลใช้ Kovac's reagent ซึ่งมีสาร *p*-dimethyl amino-benzaldehyde โดยหยดลงในอาหาร ถ้าในอาหารมีสารอินโดลอยู่จะเกิดสีชมพู-ม่วงของ quinoidal red violet compound ดังแสดงในภาพประกอบ 20

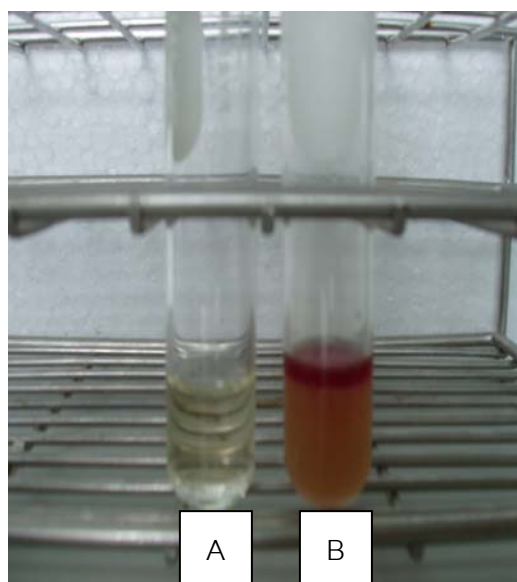
วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อในอาหารเหลว tryptone broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การตรวจผล

ผลบวก เมื่อหยด Kovac's reagent ลงไป จะเกิดสีชมพู-ม่วงขึ้นทันที

ผลลบ เมื่อหยด Kovac's reagent ลงไป อาหารไม่เปลี่ยนสี



ภาพประกอบ 20 ความสามารถในการสร้างสารอินโดล

(A) อาหารที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (B) ผลบวก

4. การทดสอบ Voges-Proskauer

เป็นการทดสอบเพื่อความสามารถของเชื้อในการย่อยกลูโคส แล้วให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น acetoin การหาสาร acetoin ใช้วิธีหยดรีเอเจนท์ KOH และ naphthol ซึ่งผสม creatine solution ลงไป ถ้าเกิดสีแดงเข้มขึ้นในอาหารแสดงว่ามีสาร acetoin ดังแสดงในภาพประกอบ 21

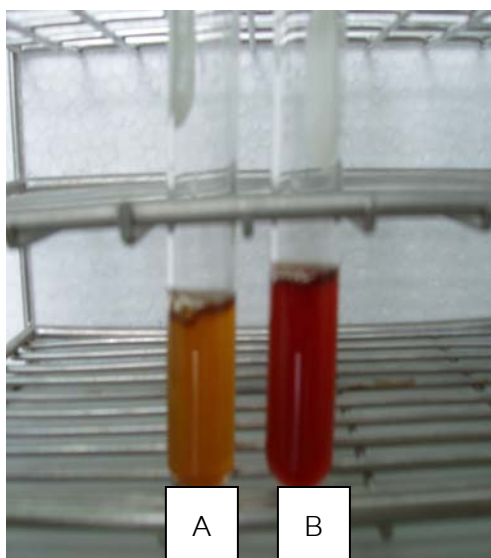
วิธีทดสอบ

1. เลี้ยงเชื้อใน MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
2. เติม alpha-naphthol solution ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ตามด้วย KOH solution ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ เพื่อเพิ่มออกซิเจนในบรรยากาศเข้าไปผสม

การตรวจผล

ผลบวก อาหารมีสีแดง

ผลลบ อาหารมีสีน้ำตาล



ภาพประกอบ 21 ความสามารถในการสร้างสาร acetoin

(A) ผลลบ

(B) ผลบวก

5. การทดสอบการย่อยกรดอะมิโน

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยกรดอะมิโน ผลบวกของปฏิกิริยาเกิดจากการดึงหมู่ carboxyl group ออกจากโมเลกุล (decarboxylation) ถ้าย่อยกรดอะมิโนไลซีน เรียกว่า lysine decarboxylase

lysine decarboxylase test เป็นการทดสอบความสามารถในการย่อยกรดอะมิโนไลซีน แล้วให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารพวก amine ซึ่งมีสมบัติเป็นด่าง ดังนั้นเมื่อเกิดการย่อยกรดอะมิโนไลซีน ทำให้อาหารเป็นด่างมากขึ้น อินดิเคเตอร์ที่อยู่ในอาหารจึงเปลี่ยนสี ดังแสดงในภาพประกอบ 22

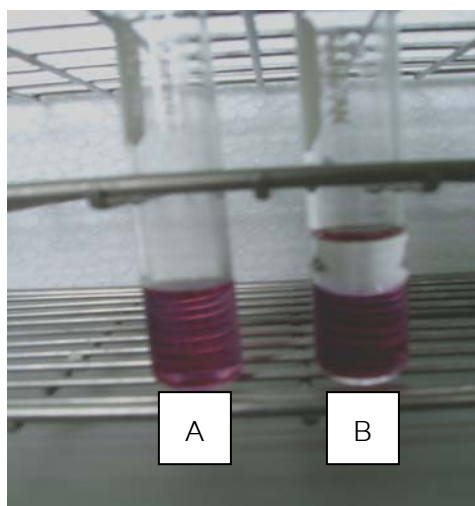
วิธีทดสอบ

1. แผลงเชื้อลงใน lysine decarboxylase base medium
2. ปิดทับด้วย paraffin เหลว ความสูงประมาณ 4-5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล

ผลบวก อาหารมีสีม่วงหรือม่วงแดง

ผลลบ อาหารมีสีเหลือง



ภาพประกอบ 22 ความสามารถในการใช้กรดอะมิโนไลซีน

(A) อาหารที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (B) ผลบวก

6. การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต

การศึกษาศักยภาพของเชื้อในการย่อยคาร์โบไฮเดรต เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน ตรวจสอบโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร phenol red broth base ที่ผสมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบ 1 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเชื้อสามารถย่อยได้จะผลิตกรด ดูได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหาร ดังแสดงในภาพประกอบ 23

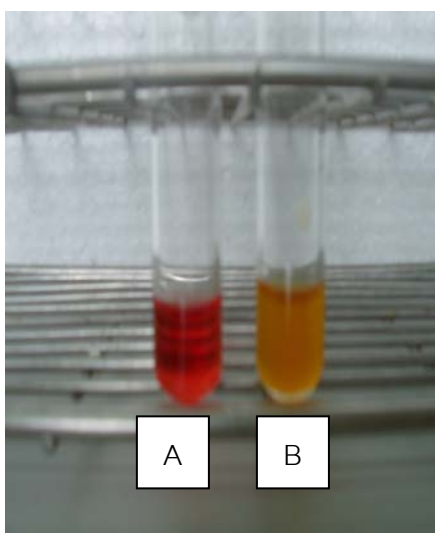
วิธีทดสอบ

1. เตรียม phenol red broth base medium นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. เติมคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส แมนนิทอล อะราบิโนส และเซลโลไบโอส ที่ปลอดเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์
3. ถ้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงหลอดทดลอง ซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล

ผลบวก อาหารมีสีเหลือง

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี



ภาพประกอบ 23 ความสามารถในการใช้กลูโคส แมนนิทอล อะราบิโนส

และเซลโลไบโอส (A) ผลลบ (B) ผลบวก

7. การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่

เชื้อในจั่นสวิบริโอ สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเส้นเดียว บางสปีชีส์มีสองเส้นหรือมากกว่าที่ขั้วเดียวกัน และบางสปีชีส์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นจึงทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ เพื่อช่วยในการจัดจำแนกสปีชีส์ อาหารที่ใช้ทดสอบควรมีวุ้นเป็นส่วนประกอบ 0.3-0.5 เปอร์เซ็นต์ เพราะถ้ามีวุ้นมากถึง 1.5 เปอร์เซ็นต์ อาหารจะแข็งมาก ทำให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

วิธีทดสอบ

1. เตรียม motility medium บรรจุใส่หลอดทดลองตั้งหลอดตรง (ไม่เอียง)
2. ใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) เย็บเชื้อและปักเชื้อลงไปตรงกลางอาหาร
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล

ถ้าเชื้อกระจายไปบริเวณอื่นๆ นอกเหนือจากบริเวณที่ปัก แสดงว่าเชื้อเคลื่อนที่ได้

8. การทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างกัน

เชื้อในจั่นสวิบริโอบางสปีชีส์เป็น halophile ซึ่งต้องการเกลือสำหรับการเจริญ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-12 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น *V. cholerae* และ *V. mimicus* สามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีเกลือ ดังนั้นจึงทดสอบการเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างๆ เพื่อช่วยในการจัดจำแนกสปีชีส์ โดยเตรียมอาหาร nutrient broth และผสมเกลือตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ เช่น 0, 3, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีทดสอบ

1. เตรียมอาหาร nutrient broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างกัน
2. ใช้ loop ถ่ายเชื้อลงหลอดทดลองซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล

ผลบวก อาหารมีลักษณะขุ่น

ผลลบ อาหารมีลักษณะใส

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	นางสาวพรทิพย์ สุขสวัสดิ์
วันเดือนปีเกิด	9 ตุลาคม 2522
สถานที่เกิด	สุพรรณบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 17 หมู่ 7 ตำบลหนองผักนาก อำเภอสามชุก จังหวัดสุพรรณบุรี 72130
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2540	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียน สามชุกรัตนโกศาราม
พ.ศ. 2545	วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) จากมหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา
พ.ศ. 2549	กศ.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทร- วิโรฒ

ผลงานทางวิชาการ

- พรทิพย์ สุขสวัสดิ์; อรอนงค์ พริ้งศุลกะ และ จริยา สนิตเดิมสุข. การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31. 18-20 ตุลาคม 2548, ณ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา. หน้า 296-297.
- พรทิพย์ สุขสวัสดิ์; อรอนงค์ พริ้งศุลกะ; จริยา สนิตเดิมสุข; ณัฐพร ภัทรสินไพบุญย์; ณัฐพงษ์ ใจคง และ ชลธิศ เทพยศ. (2549). การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 22(2): (กำลังตีพิมพ์)