

89

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเล  
และอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

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

ผู้วิจัย

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

579.26  
อ383ก  
ร.2

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
(เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์) ประจำปี 2548



554.26  
33:37  
3 2

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเล  
และอาหารทะเลดิบในประเทศไทย

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

ผู้วิจัย

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

25 S.A. 2552

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์) ประจำปี 2548



อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. (2549). การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียในจลิน์สบริโอและไวรัสโอฟาจ จากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย ทั้งหมด 102 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียดังกล่าว พบว่ามีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง ติดสีแกรมลบ และสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ จึงจัดอยู่ในจลิน์สบริโอ และเมื่อทดสอบสมบัติทางชีวเคมีอื่น พบว่าเป็น *Vibrio parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท จากนั้นนำ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้มาเป็นโฮสต์สำหรับแยกไวรัสโอฟาจ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) และตรวจสอบพลาค (plaque) สามารถแยกไวรัสโอฟาจได้ 9 ตัว ได้แก่ ฟาจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp9, Vp10, Vp15 และ Vp28 ซึ่งไวรัสโอฟาจ แต่ละตัวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของพลาคแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-2 มิลลิเมตร พบทั้งพลาคใสและ พลาคขุ่น เมื่อนำไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไวรัสโอฟาจทั้งหมดมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 53.33-93.33 นาโนเมตร มีส่วนหางที่มีความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 66.67-233.33 นาโนเมตร สามารถจัดอยู่ใน Family Myoviridae และ Family Siphoviridae เมื่อนำฟาจทั้ง 9 ตัวไปศึกษาโฮสต์-เรนจ์ หรือความสัมพันธ์ในการติดเชื้อมีกับ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 28 ไอโซเลทนอกเหนือจากโฮสต์ที่ใช้แยกฟาจ พบว่าฟาจทั้ง 9 ตัว สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นได้ เมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์ คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท พบว่ามีโฮสต์-เรนจ์ต่างกัน อย่างไรก็ตามไวรัสโอฟาจทั้ง 9 ตัว ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียจลิน์สอื่นที่นำมาทดสอบได้



Onanong Pringsulaka. (2006). *Characterization of vibriophages isolated from sea water and raw seafood in Thailand*. Bangkok: Srinakharinwirot University.

*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.

## ประกาศคุณูปการ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย ได้แก่ คุณพรทิพย์ สุขสวัสดิ์ คุณณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์  
คุณณัฐพงษ์ ใจคง และคุณชลธิศ เทพยศ เป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิ  
โรฒ (เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์) ประจำปี 2548 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

อรอนงค์ พริ้งสุลกะ.



## สารบัญ

| บทที่                                                                                                      | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 บทนำ.....                                                                                                | 1    |
| ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย.....                                                                          | 2    |
| ความสำคัญของการศึกษาวิจัย.....                                                                             | 2    |
| ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....                                                                                | 2    |
| 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....                                                                      | 3    |
| 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....                                                                                  | 9    |
| อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....                                                                            | 9    |
| วิธีดำเนินการทดลอง.....                                                                                    | 9    |
| การคัดแยกเชื้อไวรัส.....                                                                                   | 9    |
| การจัดจำแนกเชื้อไวรัส.....                                                                                 | 9    |
| การแยกไวรัสโอฟาจโดยใช้ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่แยกได้เป็นโฮสต์.....                                  | 10   |
| การตรวจสอบไวรัสโอฟาจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น.....                                                 | 11   |
| การหาปริมาณไวรัสโอฟาจ.....                                                                                 | 11   |
| การเพิ่มจำนวนไวรัสโอฟาจ.....                                                                               | 11   |
| การศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน<br>แบบส่องผ่าน.....                             | 11   |
| การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจในการติดเชื้อมีกับ <i>V. parahaemolyticus</i><br>สายพันธุ์อื่นและจีนส์อื่น..... | 12   |
| 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....                                                                                | 13   |
| 5 สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....                                                                 | 33   |
| บรรณานุกรม.....                                                                                            | 35   |
| ภาคผนวก.....                                                                                               | 39   |

## บัญชีตาราง

| ตาราง                                                               | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| 1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลืองบนอาหาร TCBS..... | 13   |
| 2 ลักษณะของเชื้อไวรัสโอที่แยกได้.....                               | 17   |
| 3 ผลการทดสอบทางซีวเคมีเพื่อจำแนกระดับสปีชีส์.....                   | 21   |
| 4 ลักษณะของพลาคและจำนวนพลาคที่แยกได้เริ่มต้น.....                   | 24   |
| 5 ผลการศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจ.....                               | 27   |
| 6 ผลการทดสอบไฮสท์-เรนจ์.....                                        | 31   |

## บัญชีภาพประกอบ

### ภาพประกอบ

### หน้า

|                                                            |   |
|------------------------------------------------------------|---|
| 1 การจัดจำแนกฟาจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก..... | 4 |
|------------------------------------------------------------|---|



## บทที่ 1

### บทนำ

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ ฟาจ (phage) เป็น bacterial virus หมายถึง กลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Twort ในปี 1915 และ d' Herelle ในปี 1917 โดย d' Herelle ได้ให้ความหมายของแบคทีริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams. 1958: 2) ฟาจโดยทั่วไปมีหลายชนิด แต่ละชนิดอาจมีความจำเพาะกับแบคทีเรียสปีชีส์ (species) เดียวหรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามสปีชีส์เท่านั้น นอกจากนี้ฟาจจัดเป็นออบลิเกต พาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรีย ทำให้การเพิ่มจำนวนของอนุภาคฟาจเกิดขึ้นเฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยฟาจจะเข้าไปเกาะติดกับผนังเซลล์และปล่อยสารพันธุกรรม เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นก็เข้าสู่ชีวิตของฟาจ เพื่อเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจต่อไป (Mckane; & Kandel. 1996: 306)

ปัจจุบันฟาจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ และทางการแพทย์ ทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ได้ใช้ฟาจเป็นเวกเตอร์ (vector) เป็นตัวนำ ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทำโคลนนิ่ง (cloning) ให้แทรกเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรียได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2536: 102) ส่วนทางด้านการแพทย์สามารถช่วยในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโดยใช้ เทคนิคที่เรียกว่า phage typing มาจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส (genus) หรือสปีชีส์ เดียวกันออกเป็นกลุ่ม ตามความไวต่อการติดเชื้อฟาจ

ไวรัสฟาจ (vibriophages) คือ ฟาจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีชีวิตรวบรวม (genus *Vibrio*) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Vibrionaceae เป็นจีนัสที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจาก มักพบปนเปื้อนมากับสิ่งแวดล้อมในทะเลรวมทั้งอาหารทะเล และก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบ ทางเดินอาหารในคนและสัตว์ ที่ก่อโรคได้บ่อยในประเทศไทยมี 2 สปีชีส์ คือ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* โดย *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ *V. cholerae* ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ซึ่งในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมาพบการระบาดอัน เนื่องมาจาก *V. parahaemolyticus* มากขึ้นโดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือปรุงไม่สุก มีรายงานการระบาดของโรคท้องร่วงในหลายๆ ประเทศ เช่น อินโดนีเซีย (Lesmana; et al. 2001: 71) ได้ขึ้นระหว่างปี 1996-1999 (Chiou, Chien-Shun; et al. 2000: 4621) และสหรัฐอเมริกาช่วงปี 1973-1998 โดยพบการระบาดถึง 40 ครั้ง (Daniels; et al. 2000: 1661) ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรสดังกล่าวด้วยวิธี conventional microbiological methods

ยังคงใช้เวลานานและสิ้นเปลือง (Karunasagar; et al. 2002: 34-36) ดังนั้นการนำสมบัติของ ฟาจที่มีความจำเพาะและทำให้เกิดการติดเชื้อมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีที่เรียบง่าย มาใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อมีข้อดี คือ ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เนื่องจากไม่ได้ใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ตัวอย่างของการนำฟาจที่จำเพาะกับจลินทรีย์ไวรัสมาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *V. cholerae* 01 biotype El Tor (Basu; & Mukerjee. 1968: 299-300; Chattopadhyay; et al. 1993: 1580)

จากประโยชน์และสมบัติของฟาจดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาไวรัสโอฟาจ โดยเฉพาะฟาจของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย จากนั้นศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจที่แยกได้ เช่น ได้แก่ โฮสต์-เรนจ์ (host-range) รวมทั้งรูปร่างของไวรัสโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งสมบัติดังกล่าวของไวรัสโอฟาจที่แยกได้นี้ นำมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และใช้ติดตามเชื้อดังกล่าวในแหล่งที่มีการระบาด เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องต่อไป

### ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย

1. เพื่อแยกไวรัสโอฟาจจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจที่แยกได้
3. เพื่อศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

### ความสำคัญของการศึกษาวิจัย

ไวรัสโอฟาจที่แยกได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกเชื้อไวรัสโอ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ นอกจากนี้การศึกษสมบัติของไวรัสโอฟาจจะเป็นองค์ความรู้ ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัสโอได้ต่อไปในอนาคต

### ขอบเขตการศึกษาวิจัย

1. แยกเชื้อไวรัสโอฟาจจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ
2. จัดจำแนกเชื้อไวรัสโอ
3. แยกไวรัสโอฟาจโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสต์
4. ศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
5. ศึกษาสมบัติในการติดเชื้อมีประสิทธิภาพกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นและจลินทรีย์อื่นๆ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. สมบัติทั่วไปของแบคทีเรียโอฟาจ

แบคทีเรียโอฟาจมีสมบัติทั่วไป (Voyles. 2002: 83) ดังนี้คือ

1.1 สามารถดำรงชีวิตแบบอิสระได้ แต่การเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่ออยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อฟาจหรือภายในโฮสต์เท่านั้น โดยอาศัยเมแทบอลิซึมของโฮสต์ในการผลิตฟาจรุ่นใหม่ออกมา

1.2 ไม่จัดเป็นเซลล์เพราะไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโครงสร้างอื่นๆ ของเซลล์

1.3 องค์ประกอบหลักของฟาจมีเพียงกรดนิวคลีอิกซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดใดชนิดหนึ่ง และส่วนของแคพซิด (capsid) ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) เพื่อป้องกันกรดนิวคลีอิกที่อยู่ภายใน

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

1.5 ขนาดของกรดนิวคลีอิกแตกต่างกันตามชนิดของฟาจ

#### 2. การจัดจำแนกฟาจ

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

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

2.2 กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีซีทห่อหุ้ม แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีระยางค์ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

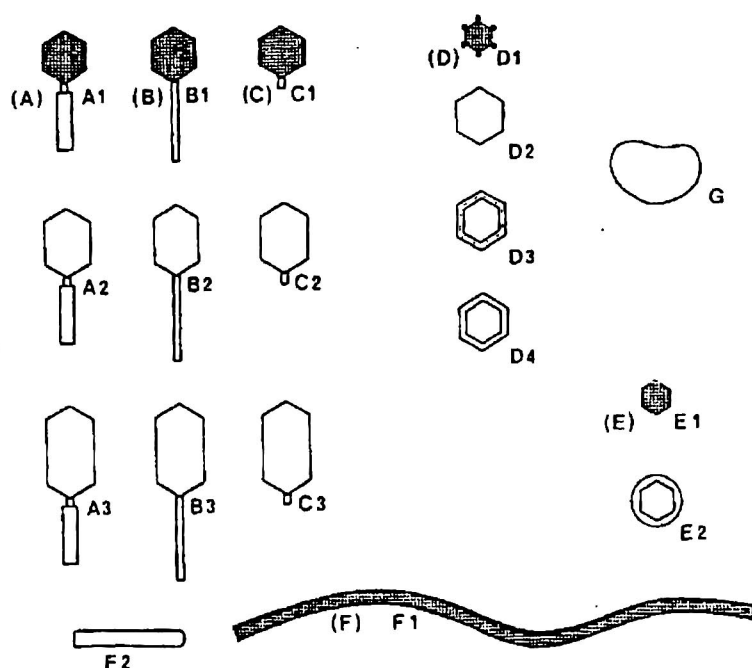
2.3 กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีซีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหอดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีระยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

2.4 กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคปไซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคปซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

2.5 กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคปไซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

2.6 กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวมีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

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



ภาพประกอบ 1 การจัดจำแนกฟาจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดกรดนิวคลีอิก

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)

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

### 3. การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสต์

การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสต์ใช้เทคนิคที่เรียกว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) โดยนำฟาจและแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ที่มีความจำเพาะกัน มาผสมกันในอาหารวุ้นเหลว แล้วเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง พบว่าโฮสต์หรือแบคทีเรียที่ไม่ติดเชื้อสามารถเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารชั้นบนสุด เรียกว่า ลอน (lawn) แต่ถ้าพบว่ามีบริเวณที่มีลักษณะใสขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย เรียกลักษณะนี้ว่า พลาคว (plaque) (Cappuccino; & Sherman. 2001: 231) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อฟาจและแตกสลาย เกิดการปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ออกมา อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกมาสามารถเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณข้างเคียง จนเกิดเป็นวงใสสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในบริเวณนี้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

ลักษณะของพลาคว มี 2 แบบ คือ

1. พลาควใส (clear plaque) พลาควที่ปรากฏจะมีลักษณะใส เนื่องจากฟาจเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลติค ฟาจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตายจึงเห็นเป็นวงใส ฟาจทำให้เกิดพลาควในลักษณะนี้ เรียกว่า ไวรัเรนทฟาจ



2. พลาคว์ (turbid plaque) พลาคว์ที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น ฟาจที่ทำให้เกิดพลาคว์มีลักษณะขุ่น เรียกว่า เทมเพอเรตฟาจ โดยเริ่มแรกฟาจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบโลติค จนถึงระยะหนึ่งฟาจบางส่วนจะเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลโซเจนิค ซึ่งแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อโดยฟาจชนิดนี้ จะไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์ จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาคว์ ทำให้เห็นพลาคว์มีลักษณะขุ่น

#### 4. การศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของฟาจ

ฟาจบางชนิดมีความจำเพาะสูง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสปีชีส์เดียวหรือเพียง 2-3 สปีชีส์ เรียกว่า ฟาจมีโฮสต์-เรนจ์แคบ บางชนิดอาจทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียหลายสปีชีส์ เรียกว่า ฟาจมีโฮสต์-เรนจ์กว้าง ดังนั้นการศึกษาโฮสต์-เรนจ์ คือ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากแบคทีเรียที่ใช้แยกฟาจชนิดนั้น ปัจจุบันนำมาทดสอบความจำเพาะกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์หรือจีโนส ต่อมาได้มีการเรียกฟาจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสปีชีส์เดียวว่า monovalent phage และเรียกฟาจที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียมากกว่า 1 สปีชีส์ว่า polyvalent phage (Kalmanson; & Bronfenbrenner. 1942: 13)

#### 5. การศึกษารูปร่างของฟาจ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือสำหรับนำมาศึกษารูปร่างและวัดขนาดฟาจ โดยมักจะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) และย้อมตัวอย่างฟาจด้วยวิธีเนกาทีฟสเตนนิ่ง (negative staining) โดยใช้ uranyl acetate หรือ phosphotungstic acid ทำให้เห็นรูปร่างฟาจมีสีอ่อนบนพื้นผิว (background) ที่ทึบแสง สำหรับการวัดขนาดอนุภาคฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจเกิดความผิดพลาด อันเนื่องมาจากตัวอย่างฟาจแห้งมาก ทำให้ขนาดที่วัดได้เล็กกว่าความเป็นจริง หรืออาจมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเงาของโลหะที่พอกตัวหนาเกินไป (Zachary. 1976: 415-422; Kay; & Bradley. 1960: 553-563)

## 6. ลักษณะทั่วไปของจิ้นสวิริโอ

เชื้อในจิ้นสวิริโอ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างโค้งงอ ไม่มีเอนโดสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเส้นเดียวหรือบางชนิดมีสองเส้นหรือมากกว่าที่ขั้วเดียวกัน (วิลาวณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539: 85) มักไม่สร้างแคปซูล อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 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 การแยกเชื้อจิ้นสนี้จะใช้อาหาร 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)

6.1 *V. cholerae* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในการก่อให้เกิดโรค อหิวาตกโรค อูจจาระออกมามีลักษณะคล้ายน้ำข้าวขาว พบระบาดได้ง่ายในประเทศที่ระบบสุขาภิบาลไม่ดี จึงมีการปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำดื่มที่ไม่สะอาด เชลล์มีรูปร่างเป็นท่อนโค้งหรือท่อนตรง ติดสีแกรมลบ มีแฟลกเจลลาที่ขั้ว 1 เส้น ในการวิเคราะห์เชื้อนั้น เมื่อได้รับสิ่งส่งตรวจมาจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS กรณีที่มีเชื้อจำนวนน้อยอาจเพิ่มจำนวนเชื้อโดยเลี้ยงใน alkaline peptone water หรือ sodium gelatin phosphate broth เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วจึงใช้อาหาร TCBS แยกเชื้อ โดย *V. cholerae* จะให้โคโลนีสีเหลือง ตรงกลางโคโลนีที่บวมและรอบๆ โปรงแสง เมื่อทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีเกลือ ไม่สามารถย่อยน้ำตาลอะราบิโนสและน้ำตาลเซลโลไบโอสได้ (Elliot; et al. 1995: 9.06)

6.2 *V. parahaemolyticus* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร เพราะธรรมชาติทั่วไปของเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ในทะเล มักมีการปนเปื้อนมากับอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยนางรม กุ้ง ปู การเกิดการระบาดของมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือมีการปนเปื้อนภายหลัง อาการจะเกิดภายหลังการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปตั้งแต่ 2-48 ชั่วโมง โดยมี

อาการปวดท้อง 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 )

6.3 *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)

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

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 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

#### วิธีดำเนินการทดลอง

##### 1. การคัดแยกเชื้อไวรัส

ตัวอย่างอาหารทะเลดิบ เช่น ปลาหมึก หอยนางรม (ถ้ายังไม่ได้ทำการทดลอง ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ) ใช้ loop เมาไฟจนแดง รอจนเย็นแล้วนำ loop แต่ละบริเวณต่างๆ ของอาหารทะเลแล้วนำมา streak ลงบนอาหาร thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) (ภาคผนวก) 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

##### 2. การจัดจำแนกเชื้อไวรัส

###### 2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

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

2.1.2 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส โดยเชื้อ vibrio จะให้ผลบวก

2.1.3 การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยเชื้อ vibrio จะให้ผลบวก

ถ้าเชื้อทดสอบให้ผลบวกทั้ง 3 ข้อ คาดว่าเป็นเชื้อในจำแนก vibrio นำเชื้อที่ได้ไปทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพื่อจำแนกป็นขั้นต่อไป

## 2.2 การจำแนกป็นขั้นโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.2.1 ทดสอบความสามารถในการเจริญที่มีเกลือความเข้มข้นสูงหรือสภาพไม่มีเกลือ

2.2.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test)

2.2.3 Lysine decarboxylase test เป็นการทดสอบการใช้กรดอะมิโน lysine

2.2.4 Indole test เป็นการทดสอบการสร้างสาร indole จากกรดอะมิโน tryptophan

2.2.5 Citrate test เป็นการทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

2.2.6 Voges-Proskauer test เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อและให้สาร acetyl methyl carbinol (acetoin) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2.2.7 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น แมนนิทอล อะราบิโนส และเซลโลไบโอส

## 3. การแยก vibrio ฟ้าจโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสต์

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร nutrient agar ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.6 ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-6 ชั่วโมง จากนั้นใส่อาหารทะเลดิบปริมาณ 25 กรัมลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตัวอย่างน้ำทะเลใช้ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร nutrient broth มีความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำตัวอย่างไปตกตะกอนเพื่อแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอน้ำใส่นำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามี vibrio ฟ้าจอยู่หรือไม่ (Baross; liston; & Morita. 1978a: 493; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466)

#### 4. การตรวจสอบไวรัสโอฟาจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวันสองชั้น

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)

#### 5. การหาปริมาณของไวรัสโอฟาจ

การหาปริมาณของไวรัสโอฟาจ ทำได้โดยเจือจางไวรัสโอฟาจในตัวอย่างแบบ serial dilution ให้มีค่าลดทอนระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของไวรัสโอฟาจในแต่ละระดับความเจือจาง และ *V. parahaemolyticus* ที่ใช้เป็นโฮสต์ หาปริมาณไวรัสโอฟาจโดยนับจำนวนพลาไคที่เกิดขึ้น โดยการทำอาหารวันสองชั้นตามวิธีทดลองในข้อ 4 แล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจางเพื่อหาค่าความ สามารถในการเกิดพลาไค (PFU; plaque forming unit /ml) คำนวณได้จากสูตร (Depaola; et al. 1998: 347)

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

#### 6. การเพิ่มจำนวนของไวรัสโอฟาจ

เตรียมไวรัสโอฟาจโดยเทคนิคการทำอาหารวันสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 หลังจากบ่มไว้เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนมีพลาไคเกิดขึ้น ให้เททับหน้าอาหารด้วย nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อชะไวรัสโอฟาจออกจากผิวหน้าอาหาร โดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอาส่วนน้ำไลออกมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างน้ำไลที่กรองได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Adams. 1958: 447)

#### 7. การศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เตรียมไวรัสโอฟาจในอาหารเหลว โดยนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพราะเลี้ยงในอาหารวุ้นเยือก BHA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร nutrient broth ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพราะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที



ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-6 ชั่วโมง ใส่ไวรัสโอฟาจที่แยกได้ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีไวรัสโอฟาจ มาเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีและเติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8000 (polyethylene glycol 8000) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้งและนำไวรัสโอฟาจที่ตกตะกอนได้มาสองดูรูปร่าง โดยนำกริดวางทับบนตะกอน เป็นเวลา 5 นาที ยกกริดซึ่งจะมีตัวอย่างไวรัสโอฟาจติดมาด้วยขึ้นมา จากนั้นย้อมด้วย uranyl acetate 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Ghosh; Ansari; & Datta. 1989. 2241; Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989: 4.22)

#### 8. การศึกษาสมบัติของไวรัสโอฟาจในการติดเชือกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่น และจีโนสอื่น

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

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. การคัดแยกเชื้อไวรัส

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบ ได้แก่ หอยนางรม ปลาหมึก จำนวนทั้งหมด 102 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียในจีนัสไวรัสโอที่เจริญบนอาหาร TCBS ได้จำนวนทั้งหมด 80 ไอโซเลท (ตาราง 1) โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลือง จากนั้นทำการแยกโคโลนีให้บริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อมาตรวจสอบในหลอดอาหารวุ้นเยิง BHA ที่มีเกลียว 3 เปอร์เซนต์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ตาราง 1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลืองบนอาหาร TCBS

| วัน / เดือน / ปี<br>ที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดของตัวอย่าง | สถานที่เก็บ                                              | ไอโซเลท<br>ที่แยกได้ |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------|----------------------|
| 10 / 1 / 48                         | น้ำทะเล         | บางแสน จ.ชลบุรี                                          | V 1                  |
| 3 / 1 / 48                          | ปลาหมึก         | ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 2                  |
| 10 / 1 / 48                         | น้ำทะเล         | แหลมแท่น จ.ชลบุรี                                        | V 3                  |
| 17 / 1 / 48                         | หอยนางรม        | ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 4                  |
| 22 / 1 / 48                         | ปลาหมึก         | ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร                               | V 5                  |
| 24 / 1 / 48                         | น้ำทะเล         | บางแสน จ.ชลบุรี                                          | V 6                  |
| 31 / 1 / 48                         | ปลาหมึก         | ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 7                  |
| 31 / 1 / 48                         | น้ำทะเล         | บางแสน จ.ชลบุรี                                          | V 8                  |
| 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 1 (ต่อ)

| วัน / เดือน / ปี<br>ที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดของตัวอย่าง | สถานที่เก็บ                                              | ไอโซเลท<br>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<br>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<br>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 1 (ต่อ)

| วัน / เดือน / ปี<br>ที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดของตัวอย่าง | สถานที่เก็บ       | ไอโซเลท<br>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 1 (ต่อ)

| วัน / เดือน / ปี<br>ที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดของตัวอย่าง | สถานที่เก็บ                                              | ไอโซเลท<br>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<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 69                 |
| 20 / 4 / 48                         | หอยนางรม        | ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 70                 |
| 27 / 4 / 48                         | ปลาหมึก         | ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 71                 |
| 27 / 4 / 48                         | หอยนางรม        | ห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส<br>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<br>สาขาฟอร์จูน กรุงเทพมหานคร | V 79                 |
| 18 / 5 / 48                         | ปลาหมึก         | ตลาดห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร                               | V 80                 |

## 2. การจัดจำแนกเชื้อไวรัส

### 2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

นำเชื้อที่คัดเลือกและเก็บไว้ในอาหารวุ้นเยียง BHA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ มาย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่าง โดยเลือกเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง ติดสีแกรมลบ จากนั้นนำมาทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส และความสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส คัดเลือกเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทั้งสองเป็นบวก ซึ่งคาดว่าจะเชื้อในจีนัสไวรัส (ตาราง 2) จากนั้นนำเชืวดังกล่าวไปจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ในขั้นต่อไป

ตาราง 2 ลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้

| ไอโซเลทที่แยกได้ | สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหาร 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 2 (ต่อ)

| ไอโซเลทที่แยกได้ | สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี<br>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 2 (ต่อ)

| ไอโซเลทที่แยกได้ | สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี<br>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 2 (ต่อ)

| ไอโซเลทที่แยกได้ | สีและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี<br>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                           |

## 2.2 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อที่คาดว่าจะอยู่ในจลิน์สบริโอมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสปีชีส์ จากการทดลองพบว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท *V. vulnificus* 48 ไอโซเลท *V. damsela* 1 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 3 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 3 จากนั้นนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้มาเป็นโฮสต์สำหรับการแยกไวรัสโฟฟาในขั้นต่อไป

ตาราง 3 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกระดับสปีชีส์

| ไอโซเลท<br>ที่แยกได้ | Lysine | VP | Citrate | Indole | Arabi-<br>nose | Cello-<br>biose | Sali-<br>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 3 (ต่อ)

| ไอโซเลท<br>ที่แยกได้ | Lysine | VP | Citrate | Indole | Arabi-<br>nose | Cello-<br>biose | Sali-<br>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 3 (ต่อ)

| ไอโซเลท<br>ที่แยกได้ | Lysine | VP | Citrate | Indole | Arabi-<br>nose | Cello-<br>biose | Sali-<br>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>    |

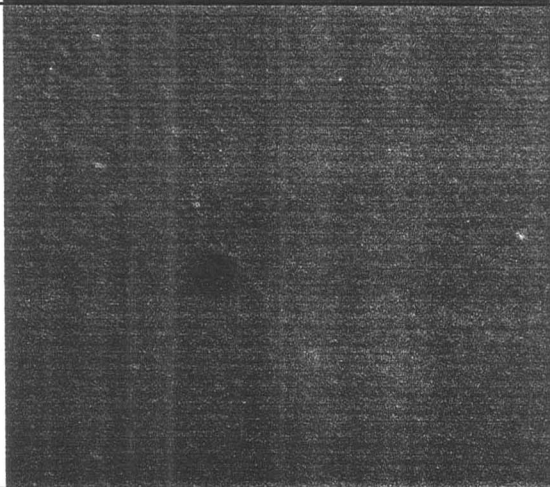
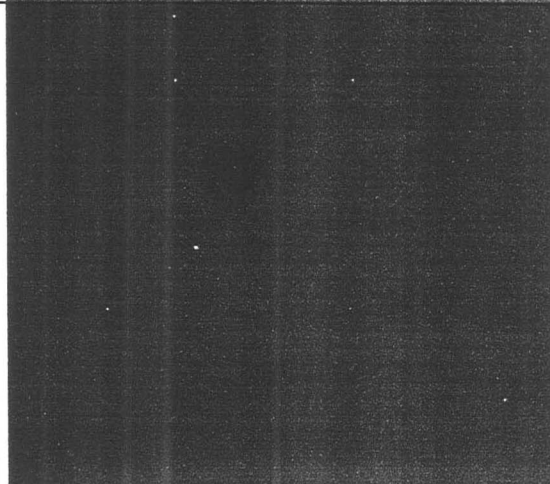
### 3. การแยกไวรัสโอฟาจโดยใช้ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้เป็นโฮสต์

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

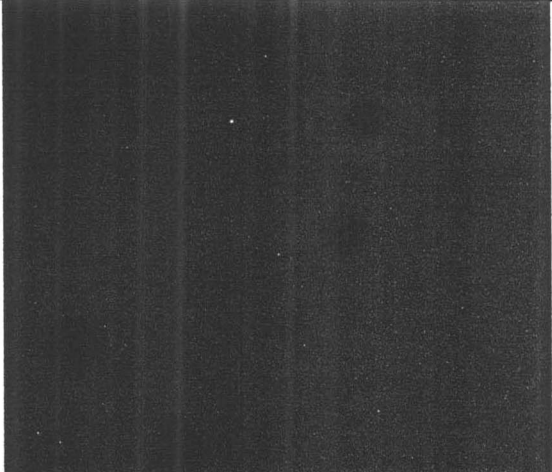
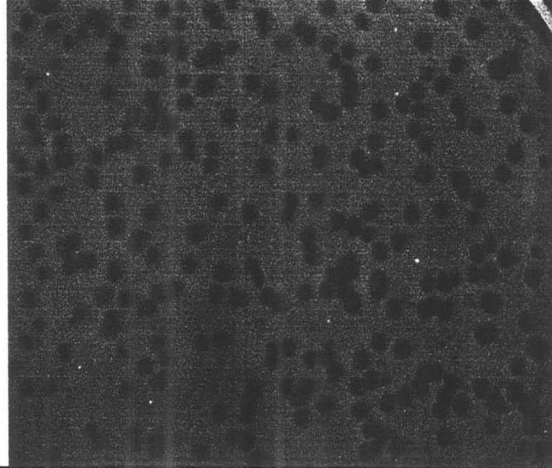
### 4. การตรวจสอบไวรัสโอฟาจและหาปริมาณไวรัสโอฟาจ

นำตัวอย่างน้ำใสที่ได้มาตรวจสอบว่ามีไวรัสโอฟาจหรือไม่ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 แล้วตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น พบว่าสามารถแยกไวรัสโอฟาจได้ 9 ตัว โดยการให้ *V. parahaemolyticus* 9 ไอโซเลทเป็นโฮสต์ ซึ่งลักษณะ ผลของไวรัสโอฟาจแต่ละตัวมีขนาด และรูปร่างแตกต่างกัน จากนั้นทำการบันทึกปริมาณของไวรัสโอฟาจที่แยกได้เริ่มต้น ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ลักษณะของพลาคและจำนวนพลาคที่แยกได้เริ่มต้น

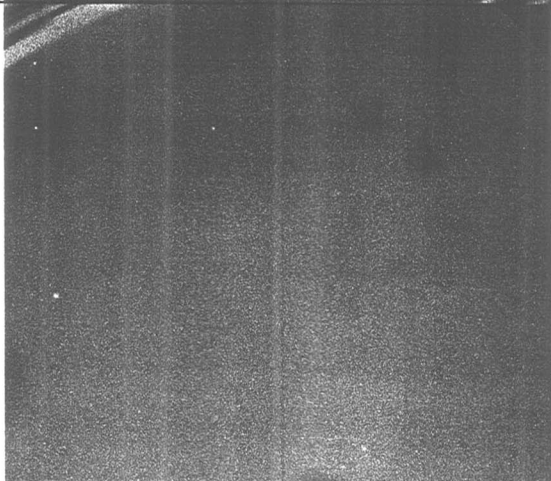
| ฟาจ | จำนวนพลาค<br>ที่แยกได้เริ่มต้น<br>(pfu/ml) | ขนาดเส้นผ่า<br>ศูนย์กลาง<br>(มิลลิเมตร) | ลักษณะ<br>ของพลาค | รูปร่างของพลาค                                                                       |
|-----|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Vp2 | 5,280                                      | 1                                       | ขุ่น              |   |
| Vp4 | 10,900                                     | 1.6                                     | ขุ่น              |  |
| Vp6 | 2,000                                      | 1.8                                     | ขุ่น              |  |

ตาราง 4 (ต่อ)

| ฟาจ | จำนวนพลาแคต์<br>ที่แยกได้เริ่มต้น<br>(pfu/ml) | ขนาดเส้นผ่า<br>ศูนย์กลาง<br>(มิลลิเมตร) | ลักษณะ<br>ของพลาแคต์     | รูปร่างของพลาแคต์                                                                    |
|-----|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Vp7 | 3,040                                         | 1.8                                     | หุ่่น                    |   |
| Vp8 | 3,280                                         | 2                                       | หุ่่น มีจุดใส<br>ตรงกลาง |  |
| Vp9 | 940                                           | 0.8                                     | ใส                       |  |



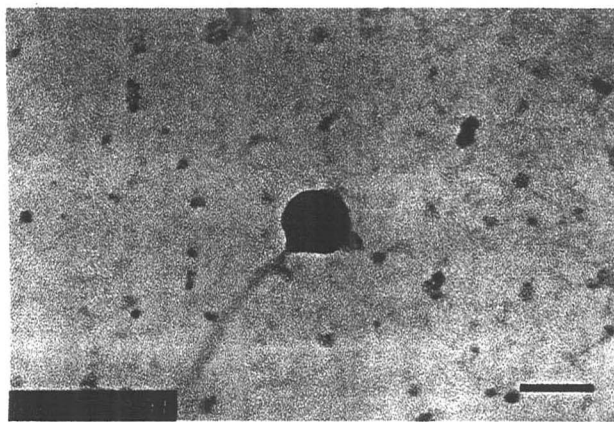
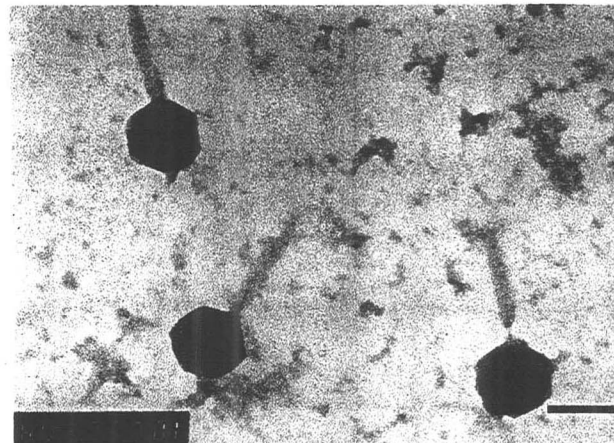
ตาราง 4 (ต่อ)

| ฟาจ  | จำนวนพลาแคต์<br>ที่แยกได้เริ่มต้น<br>(pfu/ml) | ขนาดเส้นผ่า<br>ศูนย์กลาง<br>(มิลลิเมตร) | ลักษณะ<br>ของพลาแคต์ | รูปร่างของพลาแคต์                                                                    |
|------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Vp10 | 1,640                                         | 2                                       | ขุ่น                 |   |
| Vp15 | 12,000                                        | 0.5                                     | ขุ่น                 |  |
| Vp28 | 1,620                                         | 1.6                                     | ขุ่น                 |  |

### 5. การศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจ

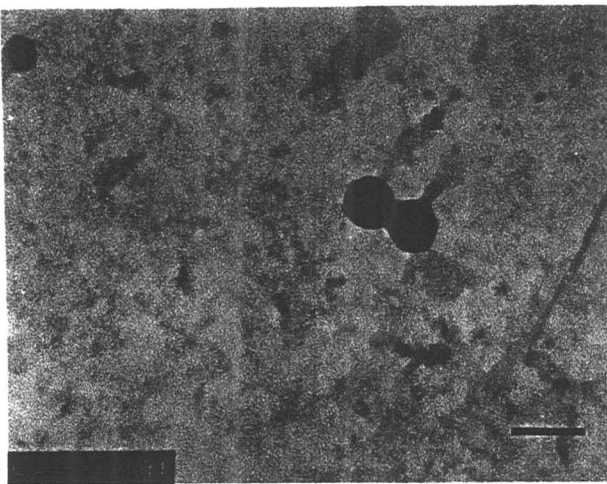
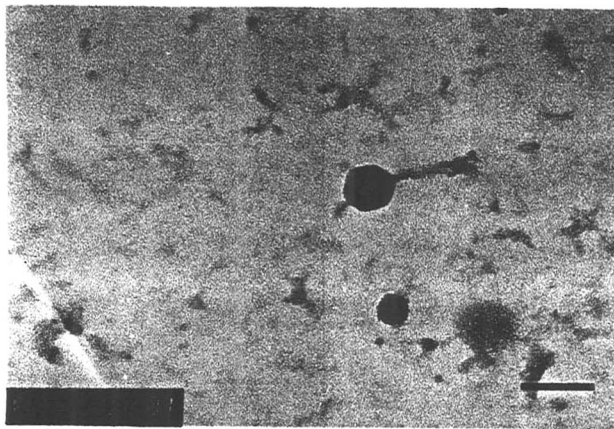
นำไวรัสโอฟาจทั้ง 9 ตัว ที่ได้ในข้อ 4 ไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ตาราง 5) พบว่าไวรัสโอฟาจ 8 ตัว มีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ส่วนหางยาวและไม่มีซีทห่อหุ้ม ได้แก่ ฟาจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp28, Vp9, Vp10 และ Vp15 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส มีไวรัสโอฟาจเพียง 1 ตัว ที่ส่วนของหางมีซีทห่อหุ้ม ได้แก่ ฟาจ Vp8 จึงจัดฟาจนี้อยู่ในกลุ่ม A ตามวิธีของ Bradley และอยู่ใน Family Myoviridae

ตาราง 5 ผลการศึกษารูปร่างของไวรัสโอฟาจ

| ฟาจ | ความยาว (นาโนเมตร)             |       | รูปร่างของฟาจ |                                                                                      |
|-----|--------------------------------|-------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|     | เส้นผ่าศูนย์กลาง<br>ของส่วนหัว | หาง   |               |                                                                                      |
|     |                                | กว้าง |               | ยาว                                                                                  |
| Vp2 | 80                             | 13.33 | 233.33        |  |
| Vp4 | 86.67                          | 20    | 133.33        |  |

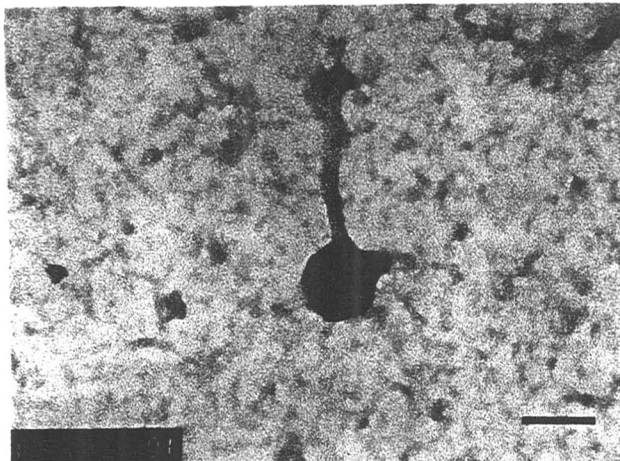
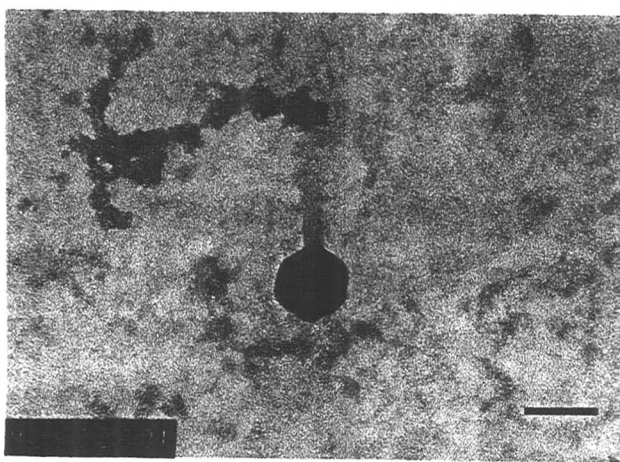
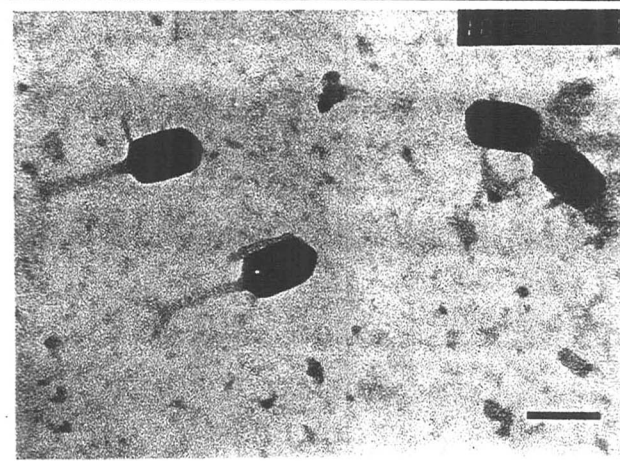
หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 5 (ต่อ)

| ฟาจ | ความยาว (นาโนเมตร)             |       |        | รูปร่างของฟาจ                                                                        |
|-----|--------------------------------|-------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|     | เส้นผ่าศูนย์กลาง<br>ของส่วนหัว | หาง   |        |                                                                                      |
|     |                                | กว้าง | ยาว    |                                                                                      |
| Vp6 | 60                             | 13.33 | 66.67  |   |
| Vp7 | 53.33                          | 13.33 | 100    |  |
| Vp8 | 60                             | 26.27 | 146.67 |  |

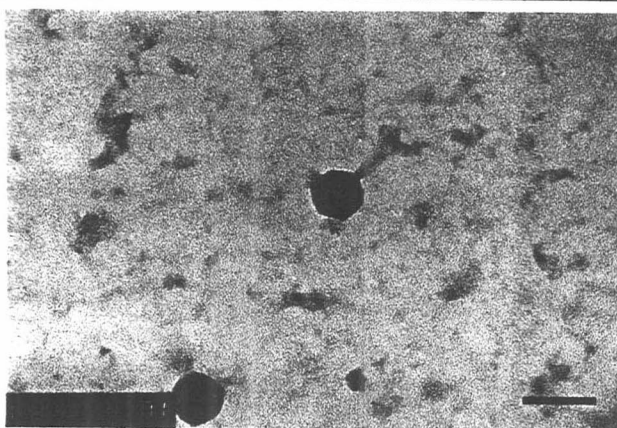
หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 5 (ต่อ)

| ฟาจ  | ความยาว (นาโนเมตร)             |       |        | รูปร่างของฟาจ                                                                        |
|------|--------------------------------|-------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|      | เส้นผ่าศูนย์กลาง<br>ของส่วนหัว | หาง   |        |                                                                                      |
|      |                                | กว้าง | ยาว    |                                                                                      |
| Vp9  | 93.33                          | 20    | 193.33 |   |
| Vp10 | 93.33                          | 26.67 | 100    |  |
| Vp15 | กว้าง 93.33<br>ยาว 53.33       | 13.33 | 113.33 |  |

หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

ตาราง 5 (ต่อ)

| ฟาจ  | ความยาว (นาโนเมตร)             |       | รูปร่างของฟาจ |                                                                                     |
|------|--------------------------------|-------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|      | เส้นผ่าศูนย์กลาง<br>ของส่วนหัว | หาง   |               |                                                                                     |
|      |                                | กว้าง |               | ยาว                                                                                 |
| Vp28 | 60                             | 20    | 73.33         |  |

หมายเหตุ: bar, 66.67 นาโนเมตร

## 6. การศึกษาโฮสต์-เรนจ์

การศึกษาความสัมพันธ์ของไวรัสฟาจทั้ง 9 ตัว ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากโฮสต์ที่ใช้แยกไวรัสฟาจชนิดนั้น โดยทดสอบกับ *V. parahaemolyticus* 28 ไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลอง พบว่าไวรัสฟาจทั้ง 9 ตัว สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมี *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากสายพันธุ์ที่ใช้แยกไวรัสฟาจได้ และเมื่อทดสอบกับสปีชีส์อื่น คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. damsela* 1 ไอโซเลท และ *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท พบว่ามีเพียงฟาจ Vp28 เท่านั้น ที่ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ทดสอบ ส่วนไวรัสฟาจอีก 8 ตัว สามารถเกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ทดสอบได้ นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถในการติดเชื้อมีแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ได้แก่ *E. coli* 4 สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. 2 สายพันธุ์ พบว่าไม่เกิดการติดเชื้อมีไวรัสฟาจทั้ง 9 ตัว ดังแสดงในตาราง 6







## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกแบคทีเรียจิ้งฉวีบริโอ 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 แบคทีเรียในจิ้งฉวีบริโอบางชนิดต้องการเกลือสำหรับการเจริญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-12 เปอร์เซ็นต์ จึงใช้สมบัติดังกล่าวนี้มาช่วยในการจำแนกสปีชีส์ ทำให้จัดจำแนกได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และช่วงที่คัดแยกแบคทีเรียอยู่ในช่วงฤดูร้อนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงพบเชื้อบริโอจำนวนมาก

จากนั้นนำ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้มาเป็นโฮสต์ สำหรับแยกบริโอฟาจ สามารถแยกบริโอฟาจได้ 9 ตัว บริโอฟาจแต่ละตัวมีลักษณะของพลาแคแตกต่างกัน คือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.5-2 มิลลิเมตร มีทั้งพลาแคใสและพลาแคขุ่น พลาแคใส ได้แก่ ฟาจ Vp9 พลาแคขุ่น ได้แก่ ฟาจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp8, Vp10, Vp15 และ Vp28

เมื่อนำบริโอฟาจทั้ง 9 ตัว ไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าบริโอฟาจทั้งหมดมีหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 53.33-93.33 นาโนเมตร มีส่วนหางที่มีความยาวแตกต่างกันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 66.67-233.33 นาโนเมตร สามารถแยกบริโอฟาจได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ ฟาจ Vp2, Vp4, Vp6, Vp7, Vp9, Vp10, Vp15 และ Vp28 มีส่วนหางยาวและไม่มีซีทห่อหุ้ม จัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส กลุ่มที่สอง คือ ฟาจ Vp8 ส่วนหางมีซีทห่อหุ้ม จัดฟาจนี้อยู่ในกลุ่ม A ตามวิธีของ Bradley และจัดอยู่ใน Family Myoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส เช่นเดียวกับการทดลองของ Koga, Toyoshima และ Kawata (Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466) ซึ่งพบว่าบริโอฟาจที่พบส่วนใหญ่อยู่ใน Family Myoviridae และ Family Siphoviridae เมื่อศึกษาได้ว่าบริโอฟาจมีรูปร่างเป็นแบบใดแล้ว ทำให้ทราบทางอ้อมว่าบริโอฟาจ มีกรดนิวคลีอิกชนิดใด ซึ่งทั้งสองกลุ่มที่แยกได้นี้มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

เมื่อนำบริโอฟาจทั้ง 9 ตัว มาศึกษาความสัมพันธ์ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากโฮสต์ที่ใช้แยกบริโอฟาจชนิดนั้น พบว่าบริโอฟาจทั้ง 9 ตัว สามารถเกิดการติดเชื้อมี *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากโฮสต์ได้ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มี



ความหลากหลาย ต่อการติดเชื้อไวรัสโอฟาจแต่ละตัวได้แตกต่างกัน มี *V. parahaemolyticus* 2 ไอโซเลท จากทั้งหมดที่แยกได้มีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสโอฟาจทั้ง 9 ตัว เมื่อนำมาทดสอบ กับสปีชีส์อื่น คือ *V. vulnificus* 15 ไอโซเลท *V. alginolyticus* 2 ไอโซเลท และ *V. damsela* 1 ไอโซเลท มี *V. alginolyticus* 1 ไอโซเลท ที่ไม่สามารถเกิดการติดเชื้อโดยไวรัสโอฟาจทั้ง 9 ตัว นอกนั้นเกิดการติดเชื้อโดยไวรัสโอฟาจทั้ง 9 ตัวได้แตกต่างกัน ไวรัสโอฟาจที่มีโฮสต์-เรนจ์กว้างที่สุด คือ ฟาจ Vp4, Vp7, Vp8 , Vp10 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อใน *V. alginolyticus*, *V. damsela*,

*V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้ทั้ง 4 สปีชีส์ ไวรัสโอฟาจที่มีโฮสต์-เรนจ์แคบ คือ ฟาจ Vp2, Vp6, Vp9, Vp15 และ Vp28 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในจีโนสไวรัสที่ทดสอบเพียงสปีชีส์เดียวหรือ 2-3 สปีชีส์เท่านั้น ส่วนไวรัสโอฟาจตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเฉพาะใน *V. parahaemolyticus* คือ ฟาจ Vp28 แต่ไวรัสโอฟาจทั้งหมดไม่สามารถเกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียอื่น โดยเมื่อนำมาทดสอบกับ *E. coli* 4 สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. 2 สายพันธุ์ พบว่ามีความต้านทานต่อการติดเชื้อโดยไวรัสโอฟาจทั้ง 9 ตัว จากการทดลองมีเพียงฟาจ Vp28 ที่ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียต่างสปีชีส์และจีโนส ดังนั้นอาจนำสมบัติความจำเพาะของฟาจ Vp28 มาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของ *V. parahaemolyticus* ออกจากสปีชีส์อื่นในจีโนสไวรัส ส่วนไวรัสโอฟาจอีก 8 ตัว สามารถนำมาจัดจำแนกแบคทีเรียในจีโนสไวรัส ออกจากแบคทีเรียอื่นได้

**บรรณานุกรม**

## บรรณานุกรม

- วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). *จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- 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.
- Baron, E. J.; Murvay, P. R.; Jurgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; and Tenen, 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.
- Basu, S.; and Mukerjee, S. (1968). Bacteriophage Typing of *Vibrio cholerae* El Tor. *Experientia*. 24: 299-300.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriological Reviews*. 31: 230-314.
- Cappuccino, J. G.; and Sherman, N. (2001). *Microbiology: A Laboratory Manual*. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Chattopadhyay, D. J.; et al. (1993). New Phage Typing Scheme for *V. cholerae* O1 biotype El Tor Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1579-1585.
- Chiou, Chien-shun.; et al. (2000). *V. 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.; et al. (2000). *V. parahaemolyticus* Infections in the United States 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*. 181: 1661-1666.
- Depaola, A.; et al. (1998). Phage Infecting *V. vulnificus* are Abundant and Diverse in Oysters Collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 84: 346-351.
- Elliot, E. L; et al. (1995). *V. cholerae*, *V. vulnificus* and Other *Vibrio* spp. *FDA Bacteriological Analytical Manual*. 8 th ed. United States of America: AOAC International.
- 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.
- Goyal, S. M.; Gerbra, C. P.; and Bitton, G. (1987). *Phage Ecology*. United States of America: A Wiley-Interscience.
- 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.; Toyoshima, S.; and Kawata, T. (1982). Morphological Varieties and Host - Ranges of *V. parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 466-470.
- Lesmana, M.; et al. (2001). *V. 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.
- Mckane, L.; and Kandel, J. (1996). *Microbiology*. United States of America: McGraw- Hill.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. 2<sup>nd</sup> ed.

United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Voyles, B. A. (2002). *The Biology of Viruses*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill.

Wong, Hin-Chung. (2003). Detecting and Molecular Typing of *Vibrio parahaemolyticus*.

*Journal of Food and Drug Analysis*. 11: 79-86.

Zachary, A. (1976). Physiology and Ecology of Bacteriophages of the Marine

Bacterium *Beneckea natriegens*: Salinity. *Applied and Environmental Microbiology*. 31: 415-422.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก

### 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 ตัวอย่างเช่น ต้องการตรวจหาเอนไซม์ lysine decarboxylase ก็ให้เติม lysine ลงใน decarboxylase broth base ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 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                                 |      |           |

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 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 มีเพียงจีสวีริโอที่สามารถเจริญได้ 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

## ประวัติย่อผู้วิจัย

|                              |                                                                              |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ - ชื่อสกุล              | นางสาวอรอนงค์ พริ้งสุลกะ                                                     |
| วันเดือนปีเกิด               | 10 มีนาคม 2517                                                               |
| สถานที่เกิด                  | กรุงเทพ                                                                      |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน          | บ้านเลขที่ 1492 ซอยจรัญสนิทวงศ์ 57<br>แขวงบางบำหรุ เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700 |
| ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน | อาจารย์                                                                      |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน         | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ                 |